

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

TIAGO GOMES RODRIGUES

**USO DE PROGESTERONA DE LONGA AÇÃO E INOVULAÇÃO DE
ÉGUAS NO SEGUNDO DIA APÓS A OVULAÇÃO.**

**Campos dos Goytacazes
2009**

TIAGO GOMES RODRIGUES

Uso de progesterona de longa ação e inovulação de éguas no segundo dia após a ovulação.

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Animais na Área de Concentração em Biotecnologia da Reprodução.

ORIENTADOR: Prof. José Frederico Straggiotti Silva

**Campos dos Goytacazes
2009**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do **CCTA / UENF** 034/2009

Rodrigues, Tiago Gomes

Uso de progesterona de longa ação e inovulação de éguas no segundo dia após a ovulação / Tiago Gomes Rodrigues. – 2009.
55 f. : il.

Orientador: José Frederico Straggiotti Silva

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. Campos dos Goytacazes, RJ, 2009.

Bibliografia: f. 47 – 55.

1. Equino 2. Receptoras 3. Transferência de embrião 4. Progesterona de longa ação I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias. II. Título.

CDD – 636.108245

TIAGO GOMES RODRIGUES

**USO DE PROGESTERONA DE LONGA AÇÃO E INOVULAÇÃO DE
ÉGUAS NO SEGUNDO DIA APÓS A OVULAÇÃO.**

**Dissertação apresentada ao
Centro de Ciências e Tecnologias
Agropecuárias da Universidade
Estadual do Norte Fluminense
Darcy Ribeiro, como requisito
parcial para a obtenção do grau
de Mestre em Ciências Animais
na Área de Concentração em
Biotecnologia da Reprodução.**

Aprovada em 16 de fevereiro de 2009

BANCA EXAMINADORA

Prof. Reginaldo Silva Fontes (Dsc Reprodução Animal) - UENF

Prof. Francisco Carlos Rodrigues de Oliveira (Phd Ciências Veterinária) - UENF

Prof. Bruno Fagundes (Dsc Produção Animal) - UNIG

Prof. José Frederico Straggio tti Silva (Dsc Produção Animal) - UENF
(Orientador)

A Deus, força maior;

A meus pais, Genilson e Clarinda, pela vida e exemplo de trabalho, honestidade,
carinho e amor;

Aos meus irmãos, que sempre estive mos juntos;

Aos que me acompanharam e ajudaram desenvolver este estudo;

*Aos animais, principalmente os eqüinos, que serviram como objeto de estudo;
de estímulo e dedicação.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF e ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias – CCTA, pela oportunidade de realização do curso e pelos ensinamentos que obtive;

Ao professor orientador José Frederico Straggiotti Silva por ser mais que um orientador e profissional, pela sua competência em ajudar, acima de tudo, pela amizade demonstrada durante o curso;

Ao amigo, co-orientador José Renato Costa Caiado, pelos conhecimentos profissionais passados e a confiança em meu trabalho;

Aos amigos, parceiros Guilherme Vallente, Marcus Barreto e Bruno Fagundes, que estiveram ao meu lado e me ajudaram direta e indiretamente nesta caminhada.

Aos demais professores desta instituição que acompanharam meu desenvolvimento e sempre me deram apoio;

Aos proprietários dos haras, em especial Gabriel Peixoto parceiros que confiaram no desempenho dos trabalhos;

Aos funcionários e tratadores de cavalos de Campos dos Goytacazes, em especial Juca, dos quais, me acompanharam e ajudaram na condução deste trabalho;

Aos funcionários da UENF pelo carinho e amizade que conquistei entre eles;

A todos aqueles que, embora não tenham sido citados, participaram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

Muito obrigado.

*A vida é uma grande universidade,
mas pouco ensina a quem
não sabe ser aluno...*

Augusto Cury

BIOGRAFIA

TIAGO GOMES RODRIGUES, filho de Genilson da Silva Rodrigues e Clarinda Gomes Rodrigues, nasceu em 29 de janeiro de 1983, na cidade de Coronel Fabriciano – MG.

Mudou – se para Campos dos Goytacazes em 2000, terminando seu 2º grau no Colégio Anglo Sistema de Ensino.

Foi admitido em Janeiro de 2001, no curso de graduação em Medicina Veterinária, na Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), em Campos dos Goytacazes – RJ,

Em 2003, entrou no programa de Iniciação Científica, fomentado pelo CNPq – UENF, iniciando suas pesquisas no Laboratório de Zootecnia e Nutrição Animal, com término em 2006.

Em 2006, submeteu-se à defesa de monografia e conclusão do curso.

Em Março de 2007, ingressou no curso de Mestrado em Ciências Animais da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), em Campos dos Goytacazes – RJ, submetendo-se aos exames finais de defesa de tese em fevereiro de 2009.

RESUMO

RODRIGUES, TIAGO GOMES, M. SC; UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO; FEVEREIRO DE 2009, **USO DE PROGESTERONA DE LONGA AÇÃO E INOVULAÇÃO DE ÉGUAS NO SEGUNDO DIA APÓS A OVULAÇÃO**. ORIENTADOR: PROF. JOSÉ FREDERICO STRAGGIOTTI SILVA.

Este estudo foi conduzido com a finalidade de avaliar o uso de progesterona de longa ação (P_4^{LA}) no segundo dia (D2) após ovulação de receptoras de embriões, no intuito de otimizar a sua utilização em programas de transferência de embriões eqüinos (TEE). Cento e noventa e dois (192) ciclos estrais de éguas receptoras de embriões foram avaliados por palpação retal e ultra-sonografia, sendo observadas as características dos órgãos genitais durante o estro até o dia da ovulação (D0), e no diestro, no momento da inovulação embrionária. Ao apresentar características reprodutivas incompatíveis com o ciclo estral, 33 receptoras (17%) foram descartadas, enquanto que 159 receptoras (83%) apresentaram boas condições dos órgãos genitais, sendo classificadas como desejáveis para o programa de TEE. Cento e cinquenta e um (151) embriões foram recuperados, equivalendo a uma taxa de recuperação embrionária de 68%, resultando em 108 prenhez (72%). As receptoras foram divididas em três grupos experimentais: grupo 1 - 91 éguas inovuladas do quarto (D4) ao oitavo (D8) dia após ovulação, sem tratamento prévio de progestágeno; grupo 2 - 55 éguas inovuladas no segundo dia após ovulação (D2), com administração de 1500 mg P_4^{LA} no dia da ovulação (D0) e grupo 3 - 05 receptoras inovuladas no segundo dia após ovulação (D2), sem administração de P_4^{LA} , sendo as taxas de prenhez de 75%, 71% e 20% respectivamente. Deste modo observa-se que a taxa de prenhez do grupo de éguas inovuladas no segundo dia após ovulação (D2) com administração de 1500 mg P_4^{LA} no dia da ovulação (D0) e o grupo de receptoras inovuladas do quarto (D4) ao oitavo (D8) dia após ovulação, sem tratamento prévio de progestágeno, não apresentam diferença estatística ($p=0,05$) sendo de grande importância enfatizar que tais procedimentos vêm contribuir na redução de custos da técnica de transferência de embriões em eqüinos, por meio da redução da relação receptora/doadora.

Palavras-chave: eqüinos, receptoras, transferência de embriões, progesterona de longa ação.

ABSTRACT

RODRIGUES, Tiago Gomes, M. SC; UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO; FEBRUARY 2009, **USE OF LONG ACTING PROGESTERONE AND EMBRYO TRANSFER OF SECOND DAY AFTER OVULATION IN MARES.**

Professor Adviser: PROF. JOSE FREDERICO STRAGGIOTTI SILVA.

This study was conducted to evaluate the use of long-acting progesterone (P_4^{LA}) on the second day (D2) after ovulation of recipients of embryos in order to optimize its use in programs of equine embryo transfer (TEE). One hundred and ninety-two (192) estrous cycles of recipients mares were evaluated by transrectal palpation and ultrasonography and it was observed the characteristics of the genitals during estrus until the day of ovulation (D0) and, in diestrus, at the time of embryo transfer. In presenting reproductive traits incompatible with the estrous cycle, 33 recipients (17%) were discarded while 159 recipients (83%) had good conditions of the genital organs which were classified as desirable for the program of TEE. One hundred and fifty-one (151) embryos were recovered, amounting to an embryo recovery rate of 68%, resulting in 108 pregnancies (72%). The recipients were divided into three experimental groups: group 1- 91 mares transferred at the fourth (D4) to eighth (D8) days after ovulation without pretreatment of progesterone; group 2 - 55 mares transferred on D2 with the administration of 1500 mg P_4^{LA} at the day of ovulation (D0) and group 3 - 05 recipients transferred in second day of ovulation (D2) without administration of P_4^{LA} . The pregnancy rates were 75%, 71% and 20% respectively. It was observed that the pregnancy rate of the group of mares transferred in second day of ovulation (D2) with administration of 1500 mg P_4^{LA} on the day of ovulation (D0) and the group of recipients transferred at the fourth (D4) to eighth (D8) days after ovulation without progesterone treatment showed no statistical difference ($p = 0.05$). This procedure contributes in reducing the cost of the technique of embryo transfer in mares, through the reduction of the recipient/donor rate.

Key-words: equine, recipients, embryo transfer, long-acting progesterone.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01. Gráfico em pizza da porcentagem de ocorrência de características indesejáveis no sistema genital de éguas receptoras da raça Mangalarga Machador40

FIGURA 02. Tabela dos resultados em porcentagem do total de lavagens uterinas (LU), recuperação embrionária (RE), taxa de prenhez total (TPT) no período de duas estações de monta em haras de Campos dos Goytacazes41

FIGURA 03. Gráfico em porcentagem de seleção, inovulação e prenhez do total de receptoras, grupo 1 - Receptoras inovuladas do D4 ao D8, grupo 2 - Receptoras inovuladas no D2 + 1500 mg P_4^{LA} e grupo 3 - Receptoras inovuladas no D2 sem administração de P_4^{LA} 43

FIGURA 04. Gráfico da taxa de prenhez dos três grupos experimentais: Grupo 1 - Receptoras inovuladas do D4 ao D8; Grupo 2 - Receptoras inovuladas no D2 + 1500 mg P_4^{LA} ; Grupo 3 - Receptoras inovuladas no D2 sem administração de P_4^{LA} . A linha vertical representa a sobreposição dos intervalos de confiança, representando a similaridades entre os grupos. ($P < 0,05$)44

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1. CICLO ESTRAL.....	14
2.2. FUNCIONALIDADE DO CORPO LÚTEO.....	15
2.3. A PROGESTERONA E SUA FUNCIONALIDADE	18
2.4. USO DA PROGESTERONA EXÓGENA.....	21
2.5. INÍCIO DA GESTAÇÃO.....	22
2.6. TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM EQUINOS.....	24
2.7. MEIO PARA RECUPERAÇÃO EMBRIONÁRIA.....	25
2.8. CLASSIFICAÇÃO EMBRIONÁRIA.....	26
2.9. MEIO PARA LAVAGEM E TRANSFERÊNCIA DO EMBRIÃO.....	27
2.10. SINCRONIZAÇÃO RECEPTORA/DOADORA.....	27
2.11. SELEÇÃO DE RECEPTORAS NO MOMENTO DA INOVULAÇÃO.....	28
2.12. TÔNUS UTERINO.....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1. LOCAL DO EXPERIMENTO E ANIMAIS	32
3.2. METODOLOGIA.....	32
3.3. EXPERIMENTO I - SELEÇÃO E PADRONIZAÇÃO DE CLASSIFICAÇÃO DE RECEPTORAS DE EMBRIÃO EQUINO.....	34
3.4. EXPERIMENTO II – TRATAMENTO DE RECEPTORAS COM PROGESTERONA DE LONGA AÇÃO (P ₄ ^{LA}).....	36
3.5. COLETA, RASTEAMENTO E INOVULAÇÃO DOS EMBRIÕES.....	36
3.6. DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO.....	38
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
4.1 AVALIAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DAS RECEPTORAS.....	39
4.2 LAVAGEM UTERINA, TAXAS DE RECUPERAÇÃO DE EMBRIÕES E PREENHEZ.....	41
4.2.1. AVALIAÇÃO TOTAL.....	41
4.2.2. GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	41
4.3 TAXA DE GESTAÇÃO.....	43
5. CONCLUSÃO	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

1. INTRODUÇÃO

Visando atender às necessidades cada vez maiores do mundo eqüestre no que diz respeito à melhoria genotípica e fenotípica dos animais, aliado ao interesse pelo uso da transferência de embriões, é crescente o estudo na biotecnologia reprodutiva eqüina para maximizar a produção e viabilizar os investimentos.

Pelo fato de a égua ter um período de gestação longo, aproximadamente 330 dias, sua participação genética no plantel fica limitada, comparada a do garanhão que pode fecundar várias fêmeas em uma única estação.

A transferência de embriões eqüinos (TEE) de um animal de alto valor morfozootécnico (doadora) para uma receptora, com o intuito de liberar a primeira da tarefa de gestar o embrião, tem sido muito utilizada e vem justamente para tentar ajudar os criadores a transpor o gargalo na criação de cavalos, sendo uma das ferramentas biotecnológicas que permite à fêmea transmitir suas características para um maior número de descendentes/ano, melhorando o ganho genético do plantel em um menor espaço de tempo.

Hoje, os criadores já reconhecem o benefício desta técnica, sendo permitido o seu uso por quase todas as associações de equídeos, fato este que posiciona o Brasil em destaque no cenário mundial e que em conjunto com a Argentina respondem por mais de 50% da produção de embriões.

Entretanto, existem alguns fatores que interferem na eficiência da implantação de um programa de transferência de embriões, destacando-se a necessidade de manutenção de um grande número de receptoras no haras, valores do material utilizado, bem como custos do profissional especializado para realização dos procedimentos.

A elaboração de protocolos eficazes que determinam a superovulação na espécie equina é de grande importância na evolução desta técnica, uma vez que a

obtenção de vários embriões em uma só coleta diluiria os custos das gestações resultantes. Outra alternativa seria a diminuição do número de receptoras, pois, segundo Lagneaux e Palmer (1993), sua manutenção representa um dos maiores custos da transferência de embriões em eqüinos, devido ao fato da necessidade de sincronização de três receptoras para cada ciclo de uma doadora, ressaltando se esta última não tiver sido superovulada.

Portanto, estudos e comparações experimentais entre os diferentes medicamentos, materiais, meios de manutenção, lavagem do embrião e do útero, protocolos de superovulação e relação número doadoras/receptoras fazem-se necessários para trazer opções mais econômicas e tecnicamente recomendáveis, juntamente com o aumento do número de profissionais habilitados para a execução da técnica, constituindo em pontos importantes na redução destes custos.

Em virtude da crescente busca pela utilização da técnica de transferência de embriões e com o alto custo na manutenção de receptoras, pesquisas vêm sendo desenvolvidas objetivando diminuir tais gastos, aliado a estas pesquisas o presente trabalho através do uso de progesterona exógena de longa ação, busca maximizar o tempo de sincronização entre doadora e receptora, fazendo a inovulação de embriões eqüinos, em receptoras da raça Mangalarga Marchador, já no segundo dia (D2) após a ovulação, reduzindo o número das mesmas em uma estação reprodutiva e otimizando o emprego da biotecnologia de transferência de embriões eqüinos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CICLO ESTRAL

O ciclo estral é denominado como um fenômeno rítmico observado em períodos regulares, que ocorre em intervalos regulares entorno de 21 dias na espécie eqüina. Segundo Mckinnon e Voss (1993), o ciclo estral é a repetição de uma seqüência de eventos em que a égua se prepara para receber o embrião. Os eqüinos são fotoperíodo dependentes, mostrando pouca variação estacional quando próximo da Linha do Equador e sazonalidade bem definida quando em regiões de zona temperada, sendo as éguas classificadas como poliéstricas estacionais. (HAFEZ, 1995)

Após os olhos receberem estimulação luminosa por um longo período de tempo, durante a primavera e verão, há uma sinalização para a glândula pineal e posterior inibição da síntese de melatonina. Por este motivo a síntese de melatonina só se faz presente à noite, explicando o mecanismo de sazonalidade dos eqüídeos, já que no inverno, devido aos longos períodos de escuridão e conseqüentemente à alta produção de melatonina, as éguas entram em anestro. Durante a fase acíclica, a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal está deprimida, sendo as concentrações plasmáticas dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) baixas, refletindo em um padrão infreqüente de liberação pulsátil destes hormônios e inatividade ovariana. (HAFEZ, 1995).

Segundo Fortune (1994), o aumento da concentração plasmática de FSH é a chave para o recrutamento folicular que inicia seu desenvolvimento sincronizado sob forma de uma onda. De acordo com Ginther (2000), a emergência das ondas foliculares em eqüinos e bovinos é estimulada por um pico de FSH que em fêmeas da espécie eqüina ocorre quando o folículo atinge 13 mm, não impedindo o desenvolvimento de mais de um folículo acima de 19 a 22 mm. Quando os folículos alcançam este diâmetro ocorre o desvio, e um folículo se torna dominante com

crescimento contínuo até a ovulação e o outro subordinado, regredirá na maioria das vezes. Gastal e colaboradores (2000) concluíram que o LH não está envolvido no início do desvio, mas é necessário para o crescimento do folículo após o desvio e ovulação do mesmo.

A manifestação dos sinais de cio deve-se a um estrógeno presente no sangue e fluido folicular de éguas não prenhes, o estradiol (SHORT 1961). O edema endometrial que ocorre no estro pode ser percebido pelo ligeiro aumento do tônus e formato quase tubular do útero. (HUGHES et al,1977). O estradiol induz ainda o relaxamento e o aumento do diâmetro do canal cervical, bem como um aumento da secreção uterina, e produção de fluidos com alta capacidade lubrificante pela cérvix e vagina durante o cio (McKINNON e VOSS, 1992). O crescimento do ducto glandular do endométrio uterino, as alterações histológicas do epitélio vaginal durante o ciclo estral, o crescimento do ducto da glândula mamária durante a mamogênese, a liberação de hormônio hipofisário, o auxílio no processo de implantação embrionária, e a potencialização dos efeitos da oxitocina e prostaglandinas sobre as contrações uterinas, são também resultantes da ação dos estrógenos, segundo Hafez (1995).

Trabalhando com éguas ovariectomizadas, Pelehach et al. (2002), reportaram um rápido aumento no edema uterino (6 horas após administração intramuscular de estradiol), elevando significativamente, o número de receptores uterinos para progesterona, embora não tenha alterado os de estrógenos. A associação de 75 mg de progesterona ao tratamento com estradiol, segundo os autores, sugeriu o envolvimento da progesterona na dissipação deste edema.

2.2. Funcionalidade do corpo lúteo

O aumento prolongado nos níveis do hormônio luteinizante (LH) durante o estro e seu pico máximo no momento que antecede a ovulação, fazem com que as células da granulosa sejam estimuladas a se transformar em células luteínicas. (ARRUDA et al., 2001). Estas células invadem o coágulo sanguíneo, originado logo após a ovulação e nele se proliferam para formar o corpo hemorrágico. Entre os dias 1 e 2 após a ovulação, esta estrutura começa a produzir progesterona e, quando a

concentração plasmática supera 1 ng/ml, iniciando a fase de diestro, desaparecendo as características e os comportamentos associados ao estro. (NEELY, et al., 1983). Segundo Hughes, et al., (1980), a concentração de progesterona aumenta rapidamente, atingindo níveis séricos elevados em torno do sexto dia do ciclo, quando mantém um platô.

Com a maturação do corpo lúteo, o sangue coagulado é absorvido e substituído por células luteínicas, causando a diminuição no tamanho do mesmo, por volta do oitavo ao décimo dia após ovulação, o corpo lúteo decresce de tamanho e aparece no ovário como uma área firme e esponjosa dentro do estroma ovariano. Sendo detectado de 8 a 10 ng/ml de progesterona no plasma sanguíneo até aproximadamente 14 e 15 dias após a ovulação, quando sofre luteólise. Após a lise do corpo lúteo, o nível de progesterona diminui rapidamente entre 1 a 2 dias para menos de 1 ng/ml e a égua retorna ao estro. (HUGHES, et al., 1972).

Diferentes níveis plasmáticos de progesterona durante o ciclo estral em éguas têm sido reportados. A produção de progesterona (P_4) durante o estro ocasiona níveis séricos inferiores a 1 ng/ml, sendo demonstrado que os valores alcançam de 0,18 a 1,05 ng/ml. (ARRUDA 2001; FATALLA 1998; OBA 1992).

Pesquisadores revelam que animais em diestro apresentam níveis séricos de progesterona acima de 4 ng/ml 48 horas após o final dos sintomas de estro, 5,49 ng/ml no quinto dia e de 7,0 a 10 ng/ml no sexto dia do ciclo. (VIVO, 1986; PLOKTA, 1971; SMITH, 1970; STABENFELDT, 1971).

Plokta et al. (1971) relatam a existência de um segundo pico de progesterona com séricos de 7,8 ng/ml no décimo dia do ciclo estral e 9,36 ng/ml no oitavo dia. Segundo Fathalla et al.(1988), a concentração plasmática média de progesterona na fase luteínica é de 10,29 ng/ml, com variações nos níveis séricos entre os dias 11 e 14 do ciclo estral de 13,95 ng/ml e 12,09 ng/ml.

Romano. (1993), constatou níveis séricos máximos de P_4 durante o diestro em éguas Puro Sangue Árabe (PSA) de $6,68 \pm 4,56$ ng/ml e em éguas mestiças de $6,56 \pm 1,83$ ng/ml, sendo aceitas concentrações séricas normais de 4,0 a 12,0 ng/ml para animais em diestro e 9,0 a 30,0 ng/ml para animais entre 15 e 30 dias de gestação. (LOPATE, 1991). Apesar da evidente importância da existência e funcionalidade do corpo lúteo durante o ciclo estral e gestação, a presença e o estágio da glândula luteínica não podem ser avaliados com precisão através de palpação retal.

As dosagens de progesterona representam um meio eficiente para indicar a atividade da glândula luteínica, porém, não podem ser utilizadas para uma avaliação rotineira, mas com o advento da ultra-sonografia pode-se fazer imediatamente a detecção e avaliação do desenvolvimento tanto de folículos quanto de corpos lúteos, os quais são reconhecidos via exame ecográfico pelo tamanho, forma e características de ecogenicidade. (KÄHN, 1994). Imediatamente após a ovulação, o tecido luteínico em formação não pode ser bem reconhecido, passando a ser sonograficamente detectável após de 2 a 4 dias. “Cavidades” em corpos lúteos foram diagnosticadas ultra-sonograficamente por Pierson e Ginther (1985); Reeves et al. (1984); Kito et al. (1986) e Kähn, W. (1993). Estas estruturas luteínicas foram chamadas primordialmente de cistos do corpo lúteo, apresentando cavidades de tamanho variado e ecogenicidade semelhante à apresentada por folículos (anecóicas). Kito et al. (1986), não encontraram diferenças nos níveis de progesterona para as fêmeas que apresentavam ou não as cavidades luteínicas, sugerindo que estas cavidades não causam nenhum efeito sobre a fertilidade. As cavidades luteínicas parecem também não desempenhar papel funcional importante sobre o ciclo estral e gestação. (KASTELIC, 1990).

Em bovinos, os corpos lúteos com ou sem cavidade não têm efeito no comprimento do ciclo estral, nos níveis de progesterona e na fertilidade. (KÄHN, 1993). Em éguas, aproximadamente 50% das glândulas desenvolvem coágulo sangüíneo central que se organizam e diminuem de volume no período compreendido entre a ovulação e a regressão luteínica (GINTHER, 1985). Os corpos hemorrágicos centrais, aparentemente, não são funcionalmente importantes, pois são encontrados em 50% de todos os corpos lúteos, tampouco alteram o tempo de visualização ultra-sonográfica ($17 \pm 0,6$ dias) durante o período interovulatório ($21 \pm 0,5$ dias). Nas ovulações subseqüentes de um mesmo animal, o corpo lúteo pode apresentar ou não o centro anecóico, segundo a probabilidade aproximada de 50% de ocorrência.

O corpo hemorrágico central ocorre por acaso e não é peculiaridade de algumas éguas ou de certo período ovulatório. A extensão das rupturas dos componentes vasculares na parede folicular durante a ovulação é que determina, ao acaso, a formação ou não do corpo hemorrágico central. (GINTHER, 1985). Não existem diferenças significativas nos níveis de progesterona produzida por corpos lúteos com centro não-ecogênico ou ecogênico. (TOWNSON, 1989).

Uma forma alternativa de avaliação dos corpos lúteos através da utilização da ecografia é a medida da ecogenicidade da glândula em diferentes fases após a ovulação. (ARRUDA, 2001). Escalas subjetivas de cinza, com notas que variam de 1 a 5, medem a densidade pela quantidade de brilho apresentada na tela do aparelho. A quantidade de tecido luteínico pode afetar a produtividade da glândula. Similarmente, a intensidade da ecogenicidade luteínica pode refletir a qualidade hemodinâmica e a funcionalidade luteínica. O período de baixos níveis de progesterona que ocorre no começo e no final do diestro coincide, temporariamente, com o alto escore na escala de ecogenicidade luteínica. Por outro lado, o período de maior produção de progesterona (meio do diestro) coincide com o baixo escore na escala de ecogenicidade luteínica. (GINTHER, 1986).

Segundo Townson et al. (1989), análise de imagens luteínicas através de sistema computadorizado usando diferentes tonalidades em escala de cinza, também tem se mostrado uma forma segura para mensurar a ecogenicidade e funcionalidade luteínica. Sendo que Arruda et al (2001), ao analisar os resultados do acompanhamento diário de morfoecogenicidade luteínica, definiram que até o segundo dia após a ovulação não se pode caracterizar a imagem do corpo lúteo com a sua funcionalidade. Isto sugere que neste período há organização do corpo hemorrágico e a produção de progesterona não é suficiente para elevar os níveis de progesterona acima de 1 ng/ml.

2.3. A progesterona e a sua funcionalidade

A progesterona é formada em todo o tecido esteroideogênico como: ovário, testículos, glândula adrenal e placenta, tendo participação no anabolismo de todos os outros hormônios esteróides. Embora a progesterona tenha sido isolada do córtex adrenal e da placenta de vários animais, a principal fonte fisiológica continua sendo o corpo lúteo. (JONES et al., 1983)

Irvine e Alexander (1997) afirmaram que o “feedback” negativo da progesterona é muito efetivo no início do diestro e que logo após a aplicação de uma dose de PGF₂α (prostaglandina F2 alfa) em éguas neste período, ocorre um rápido aumento das concentrações circulantes de GnRH, LH e FSH.

A progesterona tem vários efeitos biológicos em tecidos alvos, mas se estes tiverem sido anteriormente submetidos a um período de estimulação pelo estrógeno; sendo uma das mais significantes ações da progesterona o preparo do útero para concepção. (MCDOWELL, 1987).

Juntos, o estradiol e a progesterona regulam as contrações do oviduto, resultando no transporte do óvulo fecundado para o útero. Os efeitos da progesterona no comportamento, características morfológicas da cérvix e útero são eficazes após efeitos estrogênicos. (ALLEN, 2001).

A progesterona atua, entre outros, inibindo o desenvolvimento endometrial, aumentando a espiralização e profundidade das glândulas uterinas, preparando este para implantação e manutenção da prenhez. (HAFEZ, 2004). A espiralização das glândulas aumenta sua capacidade funcional, preparando o endométrio para promover nutrição e suporte ao concepto até a implantação e ocorrência da placenta. (JONES et al.1983)

Sob a influência da progesterona, a consistência do muco cervical muda, tornando-se altamente viscoso, formando assim, uma barreira entre o útero e o ambiente externo. Outro papel importante deste hormônio é o de promover o desenvolvimento do lóbulo alveolar das glândulas mamárias, aumentando a capacidade suporte para eventual secreção de leite. (CNOP FILHO, 2001).

O transporte do estradiol e progesterona no plasma é semelhante. Ambos são fracamente, mas completamente ligados à albumina. O excesso de progesterona é fortemente ligado à transcortina. Quando os esteróides sexuais atingem as células-alvo, são liberados das proteínas transportadoras e penetram no interior destas, onde atuam. (JONES et al., 1983).

Perkins et al. (1993) demonstraram a secreção pulsátil de progesterona, concluindo que ocorre em média 3,33 pulsos diários de liberação deste hormônio em éguas no oitavo dia da ovulação; revelando que a concentração plasmática média de progesterona foi de 7,26 ng/ml. Segundo Sharp (2000), em éguas que permanecem gestantes, a concentração plasmática de progesterona se mantém consistentemente acima de 4,0 ng/ml. Caiado (2000) encontrou níveis séricos médios de progesterona de 7,0 ng/ml em receptoras que foram selecionadas para receberem embriões, dentre os dias quatro e oito após a ovulação. Já Bergfelt e Ginther (1996) trabalhando com éguas e pôneis verificaram que a concentração sérica de progesterona (ng/ml) foi próximo de zero no dia da ovulação, atingindo

aproximadamente 3,0 no segundo dia e 11,0 no sétimo dia pós-ovulação de ambos os tipos de fêmeas. No quarto dia, a concentração de progesterona foi menor nas éguas (em torno de 7,0 ng/ml) que em pôneis (em torno de 9,0 ng/ml). Caldas et al. (1994) não encontraram diferença em relação à concentração de progesterona entre éguas gestantes e não gestantes nos primeiros dez dias após a ovulação.

Souza et al. (1999), trabalhando com potras da raça Brasileiro de Hipismo, encontraram concentrações médias de progesterona plasmática de 5,6 ng/ml no quarto dia após a ovulação, que permaneceram elevadas até o décimo quarto dia, quando retornaram para valores basais. Carvalho (2000) cita que após a ovulação as concentrações de progesterona aumentam progressivamente até o oitavo dia.

A secreção uterina estimulada pela progesterona, produz o leite uterino. (MCKINNON e VOSS, 1992). Sharp (2000) descreve que o meio ambiente uterino é extremamente importante para o desenvolvimento do concepto equino e que a progesterona é essencial para promover este ambiente favorável para uma provável prenhez, sendo que o conteúdo total de proteínas da secreção uterina no ciclo estral das éguas decresce rapidamente com o declínio dos níveis plasmáticos de progesterona.

Watson et al. (1992) estudaram a distribuição dos receptores de progesterona e estrógeno no endométrio equino, relatando que durante o estro as células do estroma apresentam uma maior expressão de ambos receptores do que as células do miométrio, epitélio luminal e epitélio glandular. Durante o diestro a expressão de ambos receptores diminui nas células do estroma e do miométrio. As células do epitélio luminal não alteraram a expressão de receptores nas diferentes fases do ciclo estral. Entre o dia da ovulação e o décimo quarto dia após a ovulação não houve diferença significativa na expressão de ambos receptores entre éguas gestantes e não gestantes.

Segundo Nagy et al. (2004), o aumento da concentração de progesterona ocorre até o quinto dia após ovulação e mantém um platô até a luteólise. Revelam também em seu trabalho que a concentração de progesterona em ciclos com mais de uma ovulação seria maior, afirmando que a capacidade de secreção de dois corpos lúteos é maior do que a de um, porém, características inerentes ao indivíduo, como peso, idade, metabolismo e receptores para o hormônio, podem influenciar nas concentrações plasmáticas de progesterona.

2.4. Uso de progesterona exógena

A terapia com progesterona tem uma enorme aplicabilidade no manejo reprodutivo da égua segundo Mckinnon (1999), atuando na: 1- regulação do estro em éguas no período de transição estacional; 2- sincronização de um lote de éguas; 3- regulação do estro em éguas cíclicas lactentes; 4- suspensão do comportamento do estro; 5- tratamento de patologias reprodutivas; 6- manutenção da prenhez e 7- coadjuvante na inovulação de embriões. (CAIADO, 2007)

Existem várias formas de apresentação da progesterona no mercado, sendo Weibel (1975) o primeiro pesquisador a reportar o uso de um progestágeno sintético via oral, Altrenogest, para o controle do estro e ovulação na égua. Desde então, tem havido numerosas citações do seu uso para este fim e diferentes veículos de administração têm sido desenvolvidos (NEELY, 1988; ALLEN ET AL., 1980 E SQUIRES ET AL., 1983).

Squires et. al., (1983) demonstraram que se as éguas eram tratadas por duas semanas, a partir da metade para o final da fase transicional, um grande número delas exibiam cio e ovulação quando comparadas com as controle não tratadas. Os mesmos autores também avaliaram o Altrenogest na manutenção da gestação em éguas ovariectomizadas, nas doses de 0,022 e 0,044 mg/kg, demonstrando a prevenção de aborto em 87,5% das éguas, em ambas as doses.

O crescimento folicular a partir de um dado momento é inibido durante o tratamento com progestágenos e se pressupõe que o conteúdo de LH na hipófise esteja aumentando, resultando em uma secreção maior de gonadotrofina após a cessação do tratamento.

O acetato de clormadiona (CAP), apesar de ter sido utilizado na alimentação de cavalos na Europa, infelizmente, na dose de 10 mg/dia falhou em inibir o cio e ovulação. (ALLEN, 1980).

Outro progestágeno desenvolvido para administração via oral foi o acetato de melengestrol (MGA), onde Neely (1988), fornecendo duas vezes ao dia pós-ovulação, na dose de 0,4 mg, a éguas com histórico de absorção embrionária, comprovou sua eficiência.

Hughes et. al., (1980) estudaram o efeito da aplicação diária de progesterona oleosa via intramuscular em éguas ovariectomizadas; e demonstraram que, para atingir níveis plasmáticos de 4 ng/ml, as doses de 50 e 100mg/dia não

foram suficientes, sendo estes níveis consistentemente atingidos com doses de 200 mg/dia. Os mesmos autores descreveram que níveis séricos de progesterona abaixo de 1 ng/ml caracterizam o período do estro.

Dinger et al. (1981), foi o primeiro a testar em éguas, dispositivos (esponjas) impregnados com progesterona, inseridos na luz vaginal. Injeções intramusculares de progesterona foram desenvolvidas, mas por serem de aplicações diárias foram caindo em desuso. Burns et al. (1993), relatam a formulação de um progestágeno sintético de longa ação e segundo Rocha Filho (2004) a partir de então diferentes preparações de progesterona estão sendo avaliadas e comercializadas para administração em éguas.

Mckinnon et al. (2000) compararam a habilidade de diferentes progestágenos em manter a gestação de éguas desde pós-indução da luteólise, aos 18 dias de prenhez. Foram usados a medroxiprogesterona, o hexanoato de hidroxiprogesterona, o altrenogest, o norgestomet e o acetato de megestrol, concluindo que somente o altrenogest manteve a gestação enquanto que, com os outros progestágenos ocorre a interrupção da gestação entre 2 e 8 dias após a luteólise.

Recentemente, um preparado de veículo oleoso, progesterona de longa ação (P_4^{LA}) tem sido usada com sucesso em éguas com disfunção luteal, sendo feitas injeções (1500 mg) em intervalos de 7 dias, mantendo as concentrações séricas de progesterona em níveis adequados à manutenção da prenhez, sem que haja necessidade da presença do corpo lúteo. (BRINGEL et al. 2003).

Devido à proibição da comercialização da progesterona de longa ação na União Européia, Handler et. al. 2006, revelam diferentes dispositivos intravaginais que estão sendo comparados e avaliados: PRID™, CIDR-B™, e Cue-Mare™. Ressaltando também as altas taxas de reações adversas, como vaginites, que a espécie equina responde quando exposta a um corpo estranho.

2.5. Início da gestação

Entre os dias 1 e 2 após a ovulação, a estrutura formada chamada de corpo lúteo começa a produzir progesterona (ARRUDA et al. 2001) e, quando a concentração plasmática supera 1 ng/ml, inicia-se o diestro, desaparecendo as

características e o comportamento associados ao estro. (HUGHES et al. 1977). A concentração de progesterona aumenta rapidamente, atingindo o pico aproximadamente no sexto dia do ciclo, quando mantém um platô. (HUGHES et al. 1972).

Com a maturação do corpo lúteo (ARRUDA et al., 2001), o sangue coagulado é absorvido e substituído por células luteínicas. Já por volta de 8 a 10 dias pós-ovulação, o corpo lúteo maduro produz de 8 a 10 ng/ml de progesterona até aproximadamente 14 e 15 dias, quando, se não houver sinalização de prenhez poderá sofrer luteólise.

A prenhez é estabilizada e mantida em resposta a uma série de interações entre o conceito (embrião e membranas associadas) e trato reprodutivo materno. A natureza recíproca do diálogo entre o embrião e o trato reprodutivo da égua tem início já no oviduto e a mais tangível evidência de que o embrião e o oviduto interagem é o transporte diferenciado entre os ovócitos não fecundados e o zigoto, uma vez que os primeiros normalmente são retidos pelo oviduto, Caiado et al. (2005).

Entre sete a vinte um dias, o embrião eqüino é envolto por uma cápsula acelular e glicoprotéica que interage com o ambiente uterino de duas formas diferentes: a primeira com o embrião móvel no útero, até 16-17 dias, e a segunda com o embrião imóvel no ponto de fixação. Esta cápsula é uma estrutura forte que envolve e protege o embrião facilitando sua migração uterina até o dia 16 após a fecundação, fenômeno importante no reconhecimento da prenhez nesta espécie. (BETTERIDGE, 2000).

Arruda et al. (2001), ressaltam a importância de um corpo lúteo funcional, pois a produção de progesterona é crucial neste evento, em proporcionar condições ideais de oportunidade de fertilização. Mckinnon et al. (2000), acrescentam que a secreção contínua de progesterona é essencial para o início e a manutenção da gestação em fêmeas eqüinas até os 120 dias de gestação, já que a partir deste momento a placenta responde pelas concentrações progesterônicas.

A forma pela qual a luteólise é suprimida na égua não é bem conhecida, Betteridge, (2000), citando Stout et al. (1999), relata que uma “down-regulation” nos receptores para oxitocina no endométrio previne liberação de PGF2 alfa endometrial, evitando a lise do corpo lúteo.

Quando a fêmea se encontra gestante, ocorre a manutenção do corpo lúteo mediada pela presença do embrião no lúmen uterino, caso contrário, o corpo lúteo regride sob a ação luteolítica da prostaglandina F_{2a} produzida pelas glândulas endometriais (ARRUDA et al. 2001).

Sharp (2000) concluiu que a diminuição do número e afinidade dos receptores para oxitocina endometriais nas éguas prenhes, reduz a ativação da cascata do ácido araquidônico. Isto somando à presença de um inibidor da síntese endometrial de prostaglandina, produzido pelo embrião, relatado por Watson et al. (1992) e citados por Sharp (2000), seriam os fatores que juntos manteriam a função luteal na égua gestante.

2.6. Transferência de embriões e m eqüinos

A primeira transferência de embriões eqüinos (TEE) que logrou sucesso foi realizada no Japão por Oguri et al. (1972). Nos Estados Unidos da América, as pesquisas nesta área tiveram um grande impulso quando a American Quarter Horse Association, aprovou a técnica (McKINNON, 1999). No Brasil, os trabalhos de transferência de embriões eqüinos (TEE) tiveram início em 1986, no estado de São Paulo, e foram realizados com sucesso na raça Mangalarga. (FLEURY, 1998a). Na raça Mangalarga Marchador a técnica foi reconhecida e aceita pelo seu Conselho Deliberativo Técnico em 1995, sendo a partir daí, muito utilizada (CAIADO, 2005).

É notório o crescimento nos últimos anos pelo interesse pelo uso da transferência de embriões (TE) eqüinos na indústria do cavalo, hoje quase a totalidade das associações de criadores de cavalos reconhece os benefícios da técnica, permitindo o uso da transferência de embriões (TE) eqüinos. (LOSINNO, 2006).

Segundo Caiado (2005), a taxa de gestação na transferência de embriões pode ser afetada: pelo método (cirúrgico e não-cirúrgico), habilidade técnica do operador, pela sincronia de ovulação entre doadora e receptora, pela condição reprodutiva de ambas as fêmeas e pela qualidade e idade do embrião no momento da transferência.

Tem sido utilizada por vários pesquisadores a recuperação não cirúrgica de embriões feita por meio de lavagens uterinas em um sistema fechado, utilizando um

tipo especial de sonda (BIVONA^R Inc. Gary. Indiana. USA), apropriada para utilização em éguas, adaptada a uma extensão de silicone unida a um filtro (75 micras) para coleta de embrião. (ALVARENGA et al., 1993; RIERA e McDONOUGH, 1993; ALLEN, 1994; FLEURY, 1998a; CAIADO et al., 2005). Caiado et al. (2007) citando Squires et al. (2003) afirmaram que esta técnica permanece praticamente inalterada nas duas últimas décadas.

Segundo Betteridge (2000), o tempo de transporte ovidutal na égua é mais demorado que em outros mamíferos, consistindo em cinco ou seis dias, e que, por isto, os embriões entram no útero nos estágios finais de mórula e início de blastocisto. Battut et al. (1997) mostraram que esse tempo é ainda mais longo, demorando de 6,0 a 6,5 dias.

Squires et al. (1998) afirmaram que os melhores índices de recuperação embrionária ocorrem quando as lavagens são feitas no sétimo ou oitavo dia após a ovulação da doadora, mas aconselham a lavagem no sexto dia após a ovulação, quando se pretende o congelamento do embrião.

Wilson et al. (1991) não obtiveram nenhum embrião quando realizaram coletas não-cirúrgicas de potranças de dois anos, no quinto dia após a ovulação, inseminadas com doses apropriadas de espermatozóides viáveis e quando a recuperação embrionária ocorreu no sexto dia após a ovulação, cinquenta e um embriões viáveis e dezenove inviáveis foram obtidos em cento e vinte lavagens em potras da mesma faixa etária. Fleury (1998a) obteve índices de 49,3; 58 e 54,5%, quando realizou a recuperação embrionária respectivamente nos dias sete, oito e nove após a ovulação.

Squires et al. (2003) afirmaram que quase todos os embriões recuperados em programas de transferência em eqüinos, são transferidos por meio de técnica não cirúrgica, utilizando um inovulador apropriado ou pipeta de inseminação eqüina envolvida por proteção plástica. Por esta técnica, o embrião é depositado no corpo ou corno uterino através da cérvix.

2.7. Meio para recuperação embrionária

Procurando um meio de fácil aquisição, dispensando a necessidade de rigorosos acondicionamentos, Alvarenga et al. (1993) afirmaram as vantagens da

utilização da solução “Ringer” com lactato de sódio durante as lavagens uterinas, visando a recuperação de embriões de doadoras eqüinas, enfatizando o custo financeiro e maior facilidade de ser encontrada, uma vez que é um produto rotineiramente usado na clínica hospitalar, apresentando índices similares de recuperação e qualidade de embriões, quando comparado ao PBS (phosphate-buffered saline). Fleury (1998a), Carvalho (2000) e Caiado (2005) também utilizaram a solução Ringer com lactato de sódio, para lavagens uterinas objetivando recuperação embrionária.

2.8. Classificação embrionária

Mckinnon e Squires (1988) classificaram os embriões eqüinos em cinco graus de qualidade, de acordo com a compactação dos blastômeros, número de blastômeros danificados ou extrusados, forma do embrião, integridade da blastocele e da zona pelúcida, estágio de desenvolvimento comparado à idade do embrião, em:

1-Excelente. Embrião ideal, esférico; com células de tamanho, cor e textura uniformes;

2-Bom. Embrião que apresenta pequenas imperfeições, como poucos blastômeros extrusados, formato irregular ou separação trofoblástica;

3-Regular. Embrião definido, sem apresentar lesões severas no que diz respeito ao número de blastômeros extrusados, células degeneradas ou colapso de blastocele;

4-Ruim. Embrião apresentando problemas severos como colapso da blastocele, numerosos blastômeros extrusados e células degeneradas, mas com uma massa embrionária de aparência viável;

5-Mortos ou oócitos não fecundados. Degeneração embrionária total ou oócito não fecundado.

Squires et al. (2003) concluíram que a qualidade dos embriões é o fator que tem o maior efeito sobre a taxa de prenhez por transferência em éguas. Citando trabalhos anteriormente feitos em seus laboratórios, afirmaram que embriões do grau ≥ 3 apresentam baixa taxa de prenhez. Acrescentam que, embriões com tamanho menor que o esperado pela idade e os que apresentam anormalidades morfológicas, também apresentam baixa taxa de prenhez.

2.9. Meio para lavagem e transferência do embrião

Barros, et al. (2000) comparando dois diferentes meios utilizados rotineiramente na transferência de embriões, contendo diferentes tampões: fosfato (DPBS) e zwitteriônico (Embriocare), revelaram que ambos são igualmente eficientes ($p>0,05$), nos processos de rasteamento, lavagem, manutenção à temperatura ambiente, aleatoriamente, por diferentes períodos de tempo (0, 30, 60 e 120 minutos) e inovulação de embriões eqüinos, em ambiente tropical. Porém, a maior taxa de prenhez encontrada com DPBS foi obtida com um tempo de manutenção do embrião por 60 minutos no meio.

Caiado (2005), estudando diferentes meios para transferência de embriões, revela que os meios testados, contendo tampões fosfato ou zwitteriônico, são igualmente eficientes na transferência de embriões, permitindo utilização daquele que estiver com preço mais acessível no momento da compra, reduzindo os custos.

2.10. Sincronização receptora/doadora

Para o sucesso de programa de transferência de embriões eqüinos, o controle e a sincronia do ciclo estral entre doadoras e receptoras é condição relevante. (ARRUDA et al, 2001).

Um dos métodos mais eficientes e baratos para se obter esta sincronia foi descrito por Pashen et al. (1993), que utilizaram aplicação de uma única dose de PGF2 alfa durante o diestro de doadoras e receptoras para obter a sincronização da luteólise; já Alvarenga et al. (1998) obtiveram luteólise por meio da aplicação de uma micro dose de prostaglandina no ponto apropriado de acupuntura, localizado no espaço lombo sacral reduzindo as despesas com a sincronização. Sendo aconselhável o uso de receptoras que estejam entre quatro e oito dias após ovulação. (LOSINNO et al., 2006).

Trabalhos recentes demonstram que receptoras quando tratadas com progesterona exógena podem ser utilizadas em um momento mais precoce do ciclo. Neste trabalho, Caiado et al. (2007) administrando progesterona de ação diária em receptoras a partir do (D0) dia da ovulação, permitiram o uso destas já no segundo

dia do ciclo (D2). Obtendo taxas de prenhez próximas de 70% utilizando tais receptoras no (D2) segundo dia pós-ovulação.

Fleury et al (2001) observaram a possibilidade da utilização de receptoras três dias após ovulação (D3), desde que estas apresentem bom tônus uterino na avaliação ginecológica.

Nos últimos anos, o ingresso no mercado de novos veículos biodegradáveis de liberação lenta controlada, associados à progesterona, que mantém os níveis plasmáticos por 6 a 8 dias, com uma única aplicação injetável semanal, permitindo o uso de receptoras em anestro ou em fase transicional. (LOSINNO et al; 2006).

Rocha Filho et al (2004) e Testa et al (2005), avaliaram os índices de prenhez e perda embrionária precoce em éguas receptoras em anestro ou transicionais tratadas um vez por semana com P_4^{LA} , em programas de transferência de embriões no Brasil, não revelando nenhuma diferença significativa entre o grupo não ciclante e ciclante, demonstrando que este tratamento é seguro desde que o tratamento de progesterona seja continuado semanalmente até os 120 dias de gestação.

2.11. Seleção de receptoras no momento da inovulação.

Losinno et al. (2006) destacam que as receptoras representam o gargalo para o programa de transferência de embrião (TE), tornando-se um dos itens mais caros pelo aumento exponencial da demanda. Destacando alguns pontos importantes no momento da seleção e ou aquisição das mesmas: Tipo e tamanho; Idade; Categoria; Sanidade reprodutiva; Docilidade e Habilidade materna.

Squires et al. (1998); Mckinnon (1999); Carnevale et al. (2000); Squires et al. (2003), destacam que para seleção de receptoras, objetivando transferência de embriões (TE), deve-se levar em conta o estado geral da receptora, histórico reprodutivo, grau de sincronia e exame completo da genitália no momento da seleção, mas nenhum deles fez referência a características encontradas durante o cio e ovulação, como fator importante na possível determinação desta seleção. Já Caiado (2005) em seu trabalho, relata que os veterinários faziam apenas o controle do desenvolvimento folicular, por meio de palpação retal, com anotações minuciosas

do tamanho e consistência dos folículos, ficando este exame restrito aos ovários, na grande maioria das vezes e que o exame completo da genitália, estendendo-se ao útero e cérvix, poderia trazer mais informações ao veterinário no momento da transferência de embriões. Isto ocorre porque no início dos trabalhos de transferência de embriões na espécie eqüina (TEE), a seleção de receptoras levava em conta principalmente o grau de sincronia entre doadoras e receptoras, classificando receptoras também quanto às características de todo trato reprodutivo antes da ovulação e pós-ovulação.

Squires et al. (1998) e Squires et al. (2003) preconizam que receptoras de embriões eqüinos devem ser examinadas no quarto ou quinto dia pós-ovulação (D4 ou D5), por meio de ultra-sonografia, quanto à presença de corpo lúteo e ausência de fluidos ou dobras endometriais e que, além disto, o trato genital deve ser examinado via retal para observação do tônus uterino e cervical. Éguas que apresentam tônus uterino e cervical considerados excelentes, apresentam taxa de prenhez maior que as receptoras com tônus considerado marginalmente aceitável, segundo os mesmos autores.

Carnevale et al. (2000) demonstraram que os fatores mais importantes na seleção de receptoras visando transferência de embriões em eqüinos (TEE) são o tônus do útero e cérvix. Caiado et al. (2007) analisaram a concentração de progesterona de receptoras, no quinto dia pós a ovulação (D5), concluíram que as consideradas aptas para receberem embriões apresentavam uma taxa de progesterona significativamente maior que as rejeitadas. Carnevale et al. (2000), também afirmaram que receptoras eqüinas classificadas com tônus uterino excelente ou bom, no momento da transferência de embriões (TE) no quinto dia pós a ovulação (D5), apresentaram uma taxa de gestação significativamente maior que as que foram classificadas com tônus marginalmente aceitável.

2.12. Tônus uterino

A progesterona é o único fator produzido pelo corpo lúteo necessário para o desenvolvimento da turgidez uterina na égua, segundo Bonafos et al. (1994). Citado por Caiado (2005), estes pesquisadores monitoraram o tônus uterino em éguas prenhes e não prenhes, classificando-o de 1 (flácido) a 6 (túrgido), sendo o trabalho a palpação do útero. Afirmaram que o pico máximo do tônus, encontrado em éguas

não prenhes, ocorreu entre seis a treze dias, e que a partir do décimo terceiro dia pós ovulação (D13), o tônus de éguas gestantes é maior que das não gestantes. A aplicação exógena de progesterona nestas últimas causa turgidez uterina semelhante à de éguas gestantes, com aproximadamente trinta dias.

Mckinnon et al. (1988) trataram éguas ovariectomizadas com estradiol e progesterona, mostrando que o aumento do tônus uterino no início da prenhez e na pseudo prenhez não é somente atribuído à progesterona, uma vez que a adição de pequenas quantidades de estradiol (1 mg) em éguas tratadas com progesterona (100 mg/dia de P4) resultou em um tônus maior que o tratamento somente com progesterona ou com progesterona na mesma dose acrescida de 5mg de estradiol. Atribuindo a classificação do grau de tônus uterino de 1 (mínimo) a 4 (máximo, tônus do início da prenhez).

Gastal et al. (1998) relataram que os métodos utilizados, em diferentes experimentos, visando classificar o grau de contração uterina na égua, tiveram como base o implante de eletrodos e medida extra luminal do grau de estiramento uterino. Variações na pressão têm sido estudadas com aparelhos intra-uterinos e a atividade uterina com uso de ultra-som. Os mesmos autores utilizaram o toque digital do útero, via palpação retal, na classificação do tônus uterino de éguas, em escore de um a quatro, submetidas à aplicação de prostaglandina E2.

Portanto o tônus uterino foi classificado de um a quatro de acordo com Gastal et al. (1998) e Mckinnon et al. (1988), com modificações de Caiado (2005), seguindo os seguintes parâmetros:

- ✓ Tônus 1- Mínimo tônus verificado do anestro até o início da atividade cíclica. O formato e consistência do útero não são bem definidos ao exame de palpação retal (HUGHES et al., 1977);

- ✓ Tônus 2- O tônus proporcionado pela fase estrogênica do ciclo estral (estro), com útero de consistência macia e formato quase tubular (HUGHES et al., 1977). As contrações do útero ainda não são perceptíveis ao toque;

✓ Tônus 3- O tônus da fase progesterônica do ciclo estral (diestro). O útero apresenta formato tubular bem definido, com aumento do tônus e consistência (HUGHES et al., 1977). As contrações uterinas são perceptíveis;

✓ Tônus 4- Máximo tônus do início da prenhez, após o décimo terceiro dia. As contrações uterinas são ainda mais perceptíveis. O útero mantém formato tubular e consistência mais firme.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Local do experimento e animais

O experimento foi realizado em Campos dos Goytacazes em quatro haras criadores da raça Mangalarga Marchador: Haras Gramont, Haras Rancho 13, Haras Terra Molhada, Haras do Leite. Todo o trabalho de amostragem (coletas e transferências) foi realizado durante duas estações de monta entre os meses de setembro a março de 2006 - 2007 e 2007 - 2008. Cento e cinquenta (150) éguas da raça Mangalarga Marchador, sendo quarenta (40) doadoras e cento e dez (110) destas receptoras de embriões, com idade variando de três a quatorze anos e condição corporal compatível com a atividade reprodutiva, foram utilizadas durante o experimento.

Estas éguas foram mantidas em regime de campo, com pastagem de gramínea, água e sal mineral *ad libitum*, sendo suplementadas diariamente com volumoso e concentrado em bretes com cochos individuais. O status de doadora ou receptora foi definido pelo proprietário do haras onde a pesquisa foi realizada, de acordo com o valor genético de cada uma das éguas.

3.2. Metodologia

Uma vez ao dia, no próprio brete de suplementação alimentar, as éguas foram submetidas a exame do trato reprodutivo diário, por meio de palpação retal, auxiliado por um aparelho de ultra-sonografia da marca Aloka SSD-500, acoplado a um transdutor transretal linear de 5,0 MHz, realizando avaliação das características dos órgãos reprodutivos das doadoras e receptoras.

As doadoras, quando submetidas a controle folicular por meio de palpação retal e detectado um ou mais folículo(s) dominante(s) igual ou superior a 35 mm de

diâmetro foram cobertas ou inseminadas a cada 48 horas ou foram induzidas à ovulação por administração de hormônio e inseminadas, no momento hábil a fertilização do oócito, utilizando sêmen de garanhões da mesma raça e de fertilidade comprovada. Detectada a ovulação das doadoras, dava-se o intervalo de oito dias para o momento do lavado uterino, rasteamento e transferência do embrião.

As receptoras foram sincronizadas com as doadoras por meio da aplicação de uma única dose de prostaglandina F2a, durante o diestro, sendo esta realizada dois dias após a aplicação do mesmo hormônio na doadora, objetivando provocar luteólise, cio e a sincronização entre as duas categorias de fêmeas.

Nos exames de palpação retal realizados para o controle reprodutivo dos animais, observou-se a presença ou ausência de corpos lúteos; número, tamanho e consistência dos folículos; tônus uterino e cervical, segundo já citado.

Para a imagem do lúmen uterino, utilizou-se uma classificação de acordo com o grau de dobras e líquido, caracterizando o edema endometrial, portanto pode-se classificar através de imagem ultra-sonográfica o edema uterino em quatro estágios:

- ✓ **Edema 0:** Imagem endometrial compacta, lúmen ecogênico, característica desejável na fase de diestro;
- ✓ **Edema 1:** Imagem endometrial, com ecogenicidade diminuída, característica do proestro;
- ✓ **Edema 2:** Imagem endometrial correspondente ao início da fase do cio, folículos=25mm.
- ✓ **Edema 3:** Imagem endometrial correspondente à fase estral, folículos = 30 mm, fase que começa a ter receptividade ao garanhão.

A cérvix ao mesmo exame foi classificada como aberta ou fechada, de acordo com o toque retal. Verificado pela sua flacidez e mudança de formato ao toque, resultantes de uma baixa tonicidade, ou o fechamento, caracterizado pela alta tonicidade, formato tubular e consistência firme resultante da ação de progesterona no diestro e ou gestação.

A ultra-sonografia complementava os exames, com avaliação morfológica dos corpos lúteos e eventuais folículos, presença de líquidos, tumores, cistos e

edema uterinos, bem como da abertura ou fechamento cervical e diagnóstico de prenhez.

Tanto as doadoras, como as receptoras passaram por esta avaliação do sistema genital, sendo que todos os dados coletados; tamanho e consistência dos folículos; ovulação; edema endometrial; tônus uterino e cervical; foram cuidadosamente registrados.

Foram realizados dois experimentos: o primeiro visou a seleção, padronização e a classificação de receptoras de embriões e o segundo trabalho buscou maximizar o tempo na utilização de receptoras, através do tratamento com progesterona de longa ação (P_4^{LA}).

3.3. Experimento I – Seleção e padronização da classificação de receptoras de embrião eqüino

Através do acompanhamento diário das características do aparelho genital de cada uma das receptoras desde a fase de ciclo estral até o momento oportuno da transferência de embrião (TE), foram observadas nestas éguas características pertinentes a cada fase do ciclo estral, sendo os dados observados e coletados, cuidadosamente registrados.

Após a aplicação de uma única dose de prostaglandina (PGF_{2a}) nas receptoras, estando estas na fase de diestro, iniciava-se o controle do ciclo estral dois dias após a administração deste fármaco.

Logo no início do ciclo estral, ou seja, o proestro, se espera encontrar em éguas um ou mais folículos acima de 20 mm de diâmetro, tônus uterino dois, presença de edema endometrial dois, ligeira flacidez cervical e ausência de cistos endometriais. Já no estro, fase onde o animal apresenta todas as características comportamentais associadas ao cio e receptividade ao garanhão, se espera encontrar em éguas de boa fertilidade um ou dois folículos = a 35 mm de diâmetro, tônus uterino dois, edema endometrial classificado com três e cérvix aberta.

No diestro, ou fase pós-ovulação, se espera encontrar corpo lúteo, firme, consistente e ecogênico, tônus uterino três, ausência de edema endometrial e cérvix fechada.

No momento da detecção da ovulação, somente as receptoras classificadas como possuidoras de condições desejáveis no estro foram utilizadas, obedecendo os seguintes parâmetros: éguas que ovularam um ou dois folículos, não permanecendo outros folículos com diâmetro maior que 20mm no momento da ovulação, com tônus uterino entre dois e três, e que apresentaram durante a fase estral edema uterino grau 3, segundo Squires et al. (2003) e abertura cervical.

De acordo com os parâmetros já observados e nova reavaliação ultrasonográfica no momento da escolha da receptora para a transferência de embriões (TE), tais éguas foram sendo classificadas como: grupo A - excelentes, grupo B - boas, grupo C - marginalmente aceitáveis ou grupo D - rejeitadas, de acordo com as seguintes características:

✓ **Excelentes.(A)** Receptoras que apresentaram tônus uterino de 3 ou 4, cérvix firmemente fechada, pelo menos um corpo lúteo ecogenicamente bem definido, e ausência de cistos, dobras, tumores uterinos e que tivesse apresentado na fase estral condições endometriais morfoecograficamente condizentes à fase;

✓ **Boas.(B)** Receptoras que apresentaram tônus uterino e corpos lúteos nas mesmas condições das anteriores, porém, apresentaram um pouco de dobra endometrial com cérvix menos fechada que nas do grupo anterior;

✓ **Marginalmente aceitáveis.(C)** Receptoras que apresentaram tônus entre 2 e 3, cérvix com um fechamento frágil (inconsistente ou frouxo), corpo lúteo presente, porém pequeno (diâmetro menor que 15 mm) ou imagem de ecogenicidade ruim; presença ou não de pequenos cistos endometriais;

✓ **Rejeitadas.(D)** Receptoras com tônus uterino de 2 para menos, abertura cervical, sem corpo lúteo ecogenicamente definido, edema endometrial pronunciado, bem como presença de patologias uterinas.

A partir deste método de classificação, as receptoras selecionadas como desejáveis, foram as pertencentes aos grupos A e B (excelentes e boas) perfazendo um total de 159 ciclos estrais de éguas aptas a receberem embriões.

Cabe ressaltar que foram avaliados cento e noventa e dois (192) ciclos estrais das receptoras e não 192 animais isoladamente.

3.4. Experimento II – Utilização da progesterona de longa ação (P_4^{LA})

As receptoras possuidoras de condições desejáveis foram divididas aleatoriamente em três grupos experimentais: grupo 1 - convencional, grupo 2 - tratado com progesterona de longa ação (P_4^{LA}) e grupo 3 - controle:

- **GRUPO 1** - Convencional (D4 – D8): (n=91) receptoras ovuladas e classificadas como boas/excelentes para inovulação do quarto dia (D4) ao oitavo dia (D8) pós-ovulação;
- **GRUPO 2** - Tratamento (D2 + P_4^{LA}): (n=55) receptoras ovuladas e classificadas como excelentes/boas no dia da ovulação, sendo administradas a estas por via intramuscular 1500 mg de progesterona de longa ação (P_4^{LA}) e utilizadas com receptoras de embrião no D2, ou seja, no segundo dia após ovulação;
- **GRUPO 3** - Controle (D2): (n=13) receptoras classificadas como excelentes/boas no dia da ovulação, utilizadas para inovulação no segundo dia (D2) pós-ovulação, sem tratamento prévio com progesterona.

3.5. Coleta, rastreamento e inovulação dos embriões

De acordo com os procedimentos citados por Caiado (2005), as doadoras tiveram seus úteros lavados visando à recuperação embrionária entre o sétimo e oitavo dia após a ovulação. Para estes procedimentos a doadora foi contida em um tronco de contenção, para evitar acidentes com a égua e o operador. Logo a seguir, processou-se a lavagem da região perivulvar com água e sabão e secagem com papel toalha, amarração da cauda para o alto e enfaixamento, evitando maiores contaminações na região.

A sonda Bivona[®], já com extensão de silicone e esterilizada foi então conduzida através do canal vaginal até a cérvix, que foi dilatada com o auxílio de um dos dedos do operador, permitindo a entrada do cateter no útero. Logo após estes procedimentos o balão inflável presente na extremidade da sonda foi inflado com

aproximadamente 30 ml de ar, objetivando a fixação do cateter à cervix. De um a dois litros da solução de lavagem (“Ringer” com lactato de sódio) foi então conduzido até o útero, via sonda e por gravidade, para promover a lavagem uterina. Através de massagens uterinas suaves, feitas via retal, este líquido foi uniformemente distribuído pelos dois cornos uterinos. Após aproximadamente três minutos de massagens o líquido foi drenado, também por gravidade, passando através de um filtro apropriado para embrião com poros de 75 micras (Em-Com®. USA). Este procedimento foi repetido três vezes ou mais de acordo com a presença ou ausência do embrião, que pode ser percebido no fundo do filtro quando se faz a lavagem a partir do oitavo dia após a ovulação.

Para embriões com menos de oito dias de desenvolvimento foi necessário promover seu rastreamento por meio de um microscópio estereoscópio com iluminação indireta e aumento de até 35 vezes; para isto, o produto da lavagem contido no copo do filtro foi transferido para uma placa de Petri estéril e levado ao microscópio .

Após a localização do embrião, este foi transferido imediatamente para outra placa de Petri estéril, contendo nove bolhas de meio HAM F-10 modificado com BSA - Nutricel®, para proceder à lavagem do embrião, por meio de passagens sucessivas por pequenos volumes circulares do mesmo meio, objetivando a retirada de debris que aderem no embrião durante o procedimento de coleta do embrião.

Terminada a operação de coleta, rastreamento e manipulação, o embrião foi preparado para ser transferido. Para isto, foi envasado em pipeta, a mesma utilizada para a inseminação artificial, envolto no mesmo meio de manipulação. Após o embrião ter sido envasado na pipeta, este conjunto foi então introduzido em camisa sanitária de plástico facilmente rompível, objetivando sua proteção até a penetração cervical.

Enquanto estes procedimentos estavam sendo realizados, a receptora classificada como desejável (excelente ou boa), estava sendo preparada para receber o embrião, sendo contida em um tronco, higienizada e tendo sua cauda enfaixada conforme a doadora.

Os procedimentos de inovulação foram realizados no mesmo dia da coleta, assim que se concluíu a coleta do embrião. A técnica utilizada foi transcervical e não-cirúrgica (ALVARENGA et al., 1993), com a deposição do embrião no corpo ou corno uterino, de acordo com a facilidade da inovulação. Para isto, o operador

calçou uma luva de cinco dedos descartável, segurou a pipeta, lubrificou a face externa das mãos e introduziu pela vagina até a cérvix o conjunto de inovulação. Na entrada da cérvix a camisa sanitária foi rompida e a pipeta contendo o embrião no seu interior em suspensão no meio Ham F-10 modificado com BSA - Nutricel®, foi introduzido no útero e a inovulação processada nos locais já descritos.

Embriões com mais de oito dias de desenvolvimento foram inovulados com auxílio de um macro-tubo, envoltos no mesmo meio dos embriões inovulados através da pipeta, utilizando-se a mesma camisa sanitária protetora. Os locais de inovulação também foram os mesmos. Apenas embriões considerados excelentes e bons foram utilizados neste experimento.

3.6. Diagnóstico de gestação

Para o diagnóstico de gestação, as receptoras foram examinadas por ultrasonografia transretal aos quinze dias da ovulação da sua respectiva doadora. Se o resultado foi negativo, a receptora retornou ao programa por mais uma vez, se positivo, teve o diagnóstico confirmado aos 28 e 45 dias de gestação.

3.7. Análise estatística

Foi realizada análise descritiva para cada dos três grupos experimentais, avaliando: frequência de animais utilizados, tipos de problemas encontrados, taxas de prenhez.

Para análise entre os grupos experimentais, foi realizado o teste t auxiliado pelo programa estatístico SAEG 9.0, com um intervalo de confiança de 95%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Avaliação e classificação das receptoras

Neste experimento, cento e noventa e dois (192) ciclos estrais foram acompanhados de 110 éguas receptoras da raça Mangalarga Marchador, por meio de palpação retal acompanhada de ultrassonografia, entre os meses de setembro a março de 2006/2007 e 2008/2009, na região de Campos dos Goytacazes.

Por meio da avaliação da dinâmica de 192 ciclos estrais, fora revelado até o momento da ovulação um número de 159 ciclos (82%) apresentando características desejáveis, ou seja, na fase estral apresentaram tônus dois, edema uterino 3 e dinâmica de crescimento folicular, resultando em ovulação e formação de corpo lúteo, enquanto 33 ciclos estrais, apresentaram órgãos genitais com características indesejáveis, observando: a) ausência de edema endometrial de grau 3 no estro, b) tônus uterino 1, 3 ou 4, c) persistência de folículos acima de 20 mm após ovulação e d) cérvix fechada.

Como pode ser visualizado na figura 01, foi encontrada uma maior porcentagem e significativa ($P < 0,05$) de problemas relacionados a edema endometrial e tônus uterino, em comparação aos problemas de fechamento cervical e persistência de folículos.

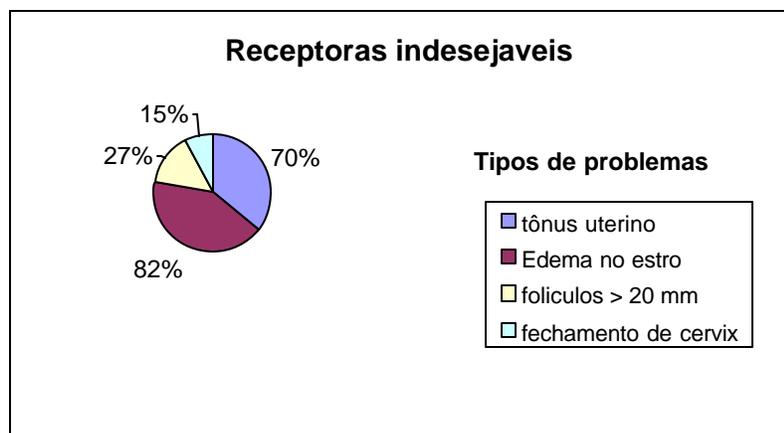


FIGURA 01. Porcentagem de ocorrência de características indesejáveis no sistema genital de éguas receptoras da raça Mangalarga Machador.

Esses resultados concordam com os de Hughes et al., (1977) que relatam ser na fase do estro, a presença do estradiol o principal hormônio ovariano produzido, sendo também responsável pelo aparecimento de edema e tônus uterino característicos, criando receptores para progesterona e preparando o endométrio para uma possível gestação.

Segundo Caiado et al. (2007), as características do sistema genital definem um dos principais fatores decisórios para a classificação de receptoras. Portanto, neste estudo, o fator edema endometrial na fase de estro foi um dos principais, parâmetros na classificação de éguas receptoras.

Dentre os animais que apresentaram tônus uterino classificado, segundo Mckinnon et al. (1998), como 1, característico da fase de anestro, e ou tônus classificado como 3 ou 4, característicos da fase do diestro ou gestação, no dia da ovulação, também demonstram alterações fisiológicas ou patológicas, sendo por isto descartadas. A respeito dos folículos iguais ou maiores do que 20 mm no momento da ovulação, essa é uma condição fisiologicamente de pouca frequência, pois após a dominância folicular, os subordinados tendem a regredir até o momento da ovulação (GASTAL, 2000; GINTHER, 2000), sendo pouco frequente encontrar folículos de diâmetro maior que 10 mm no período de 4 a 9 dias após a ovulação. Quanto ao fechamento cervical no dia da ovulação, trata-se de evento fisiológico pouco comum, pois normalmente a cérvix encontra-se com pouca tonicidade, permitindo sua abertura nessa época, por ação do estradiol (GINTHER, 2000).

Corroborando com a afirmativa de Losinno (2006), de que as receptoras representam um gargalo para o sucesso em um programa de transferência de embriões eqüinos (TEE), este trabalho busca enfatizar a necessidade de uma avaliação criteriosa das receptoras a serem inovuladas, realizando as inovulações somente em receptoras aptas e classificadas com o boas e aceitáveis .

4.2. Lavagem uterina, taxas de recuperação embrionária e prenhez

4.2.1. Avaliação total

Neste experimento foram realizadas no total duzentos e vinte e três (223) lavagens uterinas, objetivando a coleta de embriões eqüinos, das quais foram recuperados cento e cinqüenta e um (151) embriões, equivalendo a uma taxa de recuperação embrionária de sessenta e oito por cento (68%). Dos embriões recuperados, cento e oito (108) resultaram em prenhez (72%), conforme mostra a figura 02.

LU	RE	TPT
223	68%	72%

Figura 02: Resultados do total de lavagens uterinas (LU), recuperação embrionária (RE), taxa de prenhez total (TPT) no período de duas estações de monta em haras de Campos dos Goytacazes.

4.2.2. Grupos experimentais

Como o objetivo principal deste estudo era de avaliar a eficiência da utilização de receptoras no segundo dia após a ovulação, com utilização de progesterona de longa ação, foram analisados os 3 grupos experimentais (Figura 03).

GRUPO 1 - Convencional (D4 – D8): Para esse experimento foram selecionadas cento e quinze éguas (115), sendo noventa e uma (91) éguas inovuladas do quarto ao oitavo dia após ovulação, sem nenhum tratamento prévio de progestágeno, obtendo sessenta e oito gestações (68), uma taxa de setenta e cinco por cento (75%) de aproveitamento.

GRUPO 2 - Tratamento (D2 + P₄^{LA}): Para esse experimento foram selecionadas sessenta e quatro éguas (64), sendo cinquenta e cinco (55) éguas inovuladas no segundo dia pós-ovulação, previamente tratadas com progesterona de longa ação, resultando em trinta e nove (39) prenhez, ou seja, setenta e um (71%) por cento de aproveitamento.

GRUPO 3 – Controle (D2): Para esse experimento foram selecionadas treze éguas (13), sendo cinco (05) éguas inovuladas no segundo dia pós-ovulação, sem tratamento prévio com progesterona longa ação, resultando em uma (01) prenhez, ou seja, vinte por cento (20%) de aproveitamento.

No grupo 1, das 115 receptoras que foram selecionadas em seu ciclo estral para receber embrião entre o D4 - D8, 24 destas éguas (21%) foram rejeitadas no momento da transferência de embriões (TE), sendo realizadas 91 inovulações (79%), com uma taxa de prenhez de 75%.

No grupo 2, o tratamento com administração de progesterona de longa ação (P₄^{LA}) após ovulação, um total de 64 receptoras foram selecionadas, das quais, no dia da inovulação nove (09) foram descartadas, devido à presença de características indesejáveis (14%), sendo realizadas 55 inovulações (86%). Neste grupo obteve-se uma taxa de prenhez de 71%, ou seja, 39 das 55 éguas inovuladas, ficaram prenhes, o que está de acordo com Caiado et al. (2007), que obtiveram 72,7% de prenhez quando utilizaram receptoras no D2 com administração de progesterona de aplicação diária. Sugerindo que a aplicação intramuscular de 1500 mg de progesterona longa ação no dia da ovulação, seja capaz de elevar as taxas do hormônio circulante e preparar o endométrio em condições normais para receber o embrião, já no segundo dia após a ovulação.

No grupo 3, dos treze (13) animais sincronizados, sem aplicação prévia do fármaco em teste, e pertencentes ao grupo 3 (controle), somente cinco (05) receptoras ficaram aptas (38%), apresentando condições uterinas para serem inovuladas no (D2) segundo após ovulação, sendo que, obteve-se apenas um resultado positivo, o que representou a taxa de prenhez de 20%.

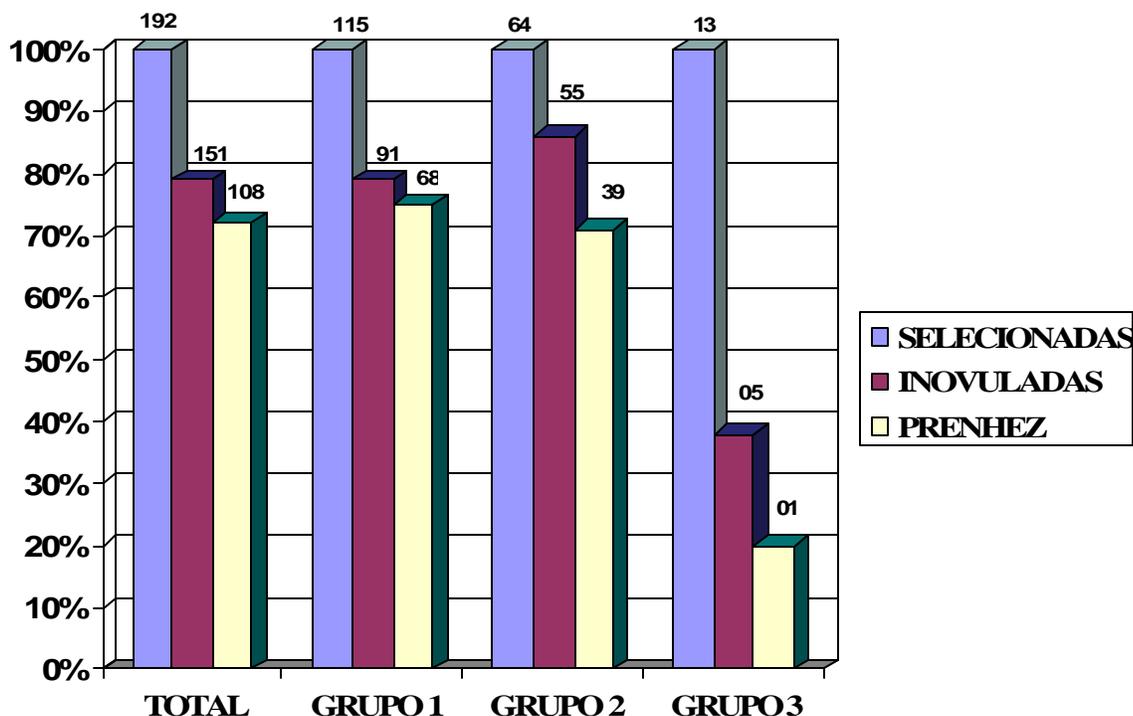


Figura 03: Resultados em porcentagem de seleção, inovulação e prenhez do total de receptoras, grupo 1 - Receptoras inovuladas do D4 ao D8, grupo 2 - Receptoras inovuladas no D2 + 1500 mg P₄^{LA} e grupo 3 - Receptoras inovuladas no D2 sem administração de P₄^{LA}. Os valores demonstrados acima das colunas correspondem ao número real de animais.

4.3. Taxa de gestação

Os resultados obtidos de recuperação embrionária estão de acordo com Squires et al. (2003) e Caiado et al. (2005), que apresentaram índices de recuperação embrionária de 58,9%. As taxas de prenhez pela técnica não cirúrgica de transferência de embriões (TE), também, estão em consonância com Caiado et al. (2005), que obtiveram 75% de prenhez quando utilizaram receptora no quinto dia pós-ovulação (D5), sem uso de progestágeno.

A análise comparativa entre os três grupos experimentais é observada na figura 04, onde as inovulações realizadas entre os dias 4 a 8 após a ovulação (grupo 1) apresentaram 75% de prenhez. Comparando o resultado do grupo 1 com os resultados apresentados pelo grupo 2 (D2 com P₄, 71%), revela não haver diferença estatística entre estes tratamentos ($p < 0,05$).

Os resultados de prenhez alcançados no grupo 1 (convencional), receptoras inovuladas entre os dias 4 a 8 após ovulação, sem o tratamento prévio de

progestágeno, estão de acordo com os melhores resultados citados na literatura. Squires et al. (1999) relatam que os resultados obtidos por veterinários de campo realizando a técnica não cirúrgica variam de 50% a 70%. Caiado et al. (2005) relataram um sucesso de 76% em receptoras no quinto dia pós-ovulação (D5) sem aplicação de progestágeno. Já Carvalho (2000), que trabalhou com receptoras paridas no cio do potro e solteiras obteve 57,9%.

Como observado na Figura 04, o resultado para a taxa de prenhez nas receptoras pertencentes ao grupo 2, inovuladas no segundo dia pós-ovulação (D2), com administração de 1500 mg de P_4^{LA} , a taxa de prenhez foi significativamente maior, 71%, indo ao encontro dos resultados descritos por Caiado et al (2007), onde a suplementação exógena com o progestágeno é capaz de antecipar e melhorar as condições do endométrio para uma possível gestação.

As receptoras pertencentes ao grupo 3, inovuladas no segundo dia pós-ovulação (D2), sem prévio tratamento com progestágeno, obtiveram uma taxa de prenhez de 20%. Este baixo resultado em prenhez, vai de encontro com Arruda et al (2001), que ao analisar os resultados do acompanhamento diário de morfoecogenicidade luteínica, definiram que até o segundo dia após a ovulação, acontece a organização do corpo hemorrágico, resultando na formação do corpo lúteo, portanto, até o segundo dia, a produção de progesterona não é suficiente para elevar os níveis séricos acima de 1 ng/ml. Arruda et al (2001) ressaltam a importância de um corpo lúteo funcional, pois a produção de progesterona é crucial para proporcionar condições ideais de oportunidade de fertilização. Mckinnon et al. (2000), acrescentam que a secreção contínua de progesterona é essencial para o início e a manutenção da gestação em fêmeas eqüinas até os 120 dias de gestação.

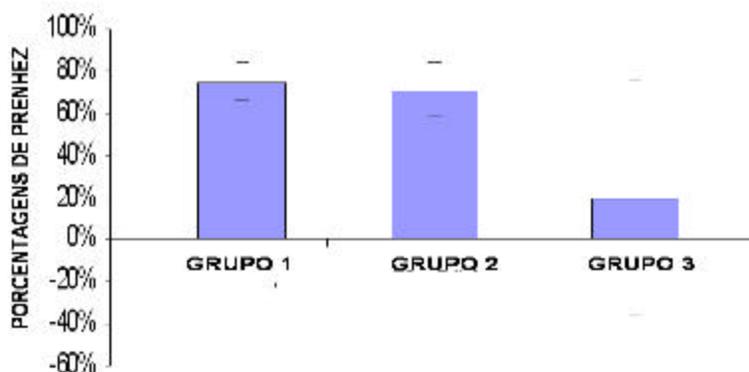


Figura 04. Taxa de prenhez dos três grupos experimentais: Grupo 1 - Receptoras involuadas do D4 ao D8; Grupo 2 - Receptoras involuadas no D2 + 1500 mg P_4^{LA} ; Grupo 3 - Receptoras involuadas no D2 sem administração de P_4^{LA} . A linha vertical representa a sobreposição dos intervalos de confiança, representando a similaridade entre os grupos. ($P=0,05$)

Squires et al. (2003) preconizaram a utilização de receptoras ovuladas um dia antes até três dias após a doadora, quando as coletas forem feitas no sétimo dia de ovulação da doadora, intervalo de quatro a oito dias de ovulação da receptora. Losinno et al., (2006), citam o mesmo intervalo de sincronização entre doadora e receptora, enfatizando que existe uma grande flexibilidade no sincronismo entre doadora e receptora. Riera & McDonough (1993) utilizando receptoras com tempo de ovulação de cinco a oito dias, obtiveram taxa de gestação de 43% para transferência não cirúrgica, a mesma técnica utilizada no presente experimento. Pashen et al. (1993) utilizaram receptoras com um tempo de ovulação entre cinco a oito dias e obtiveram taxa de 61%.

Quando realizadas as involuções em receptoras entre o quatro a oito dias após a ovulação, o índice de prenhez, representado na figura 04, foi de 75%, entrando em consonância aos melhores índices citados na literatura. Pode-se verificar também que por meio da sobreposição dos intervalos de confiança ($P=0,05$) calculado para as taxas de prenhez entre os dois últimos grupos em questão (D4 - D8 e D2 + P_4^{LA}), os índices apresentavam estatisticamente iguais, o que permite concluir que não houve diferença estatística entre as involuções em receptoras no quarto e quinto dias pós-ovulação (D4 ao D8) e as receptoras no segundo dia pós-ovulação (D2) previamente tratadas.

5. CONCLUSÃO

Dentro da hipótese proposta pelo presente trabalho, é confirmada a importância do monitoramento das alterações morfofisiológicas das receptoras, durante o estro, para sua classificação no momento da ovulação.

Fica comprovada a eficiência da utilização de receptoras de embriões já no segundo dia após ovulação, através da administração de uma única dose de 1500 mg de P₄^{LA} no momento da ovulação, sendo mais uma ferramenta a ser empregada na técnica de transferência de embriões eqüinos (TEE).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, W.R. (1994). **Equine embryo transfer: A brief up date on techniques and progress.** *Ars Veterinária*, 10 : 67-74.

ALLEN, W.R. (2001). **Luteal deficiency and mortality in the mare.** *Rep. Dom. Animal*, 36: 121-131.

ALLEN, W.R., URWIN, V., SIMPSON, D.J., GREENWOOD, R.S., CROWHURST, R.C. e ELLIS, D.R. (1980.). **Preliminary studies on the use of an oral progestagen to induce estrous and ovulation in seasonally anoestrous Thoroughbred mares.** *Equine Vet. J.*, 12:141-145.

ALVARENGA, M.A.; LANDIN e ALVARENGA, F.C. and MEIRA, C. (1993) **Modification in the technique used to recovery equine embryos.** *Equine Vet. J. Suppl.*, 15 : 111- 112.

ALVARENGA, M.A.; FERREIRA, J.P.C.; MEIRA, C.; LUNA, S.P.L. e BURNS, P.J. (1998). **Indution of luteolysis in mares utilizing a micro - dose of prostaglandin F2 alfa in sacral lumbar space.** *J. Equine Vet. Sc.*, 18 (3) : 167-169.

ARRUDA, R.P.; VISINTIN, J.A.; FLEURY, J.J.; GARCIA, A.R.; CELEGHINI, E.C.C.; NEVES NETO, J.R. (2001). **Existem relações entre tamanho e morfoecogenicidade do corpo lúteo detectados pelo ultra-som e os teores de progesterona plasmática em receptoras de embriões eqüinos?** *Braz. J. vet. Res. anim. Sci. São Paulo*, v. 38, n. 5, p. 233-239.

BARROS, C.W.C. e BÉNYEI, B. (2000). **Comparison between zwitterion and phosphate buffer-based bovine embryo handing solutions for embryo storage and transfer in a tropical environment.** *Theriogenology* 53: 308.

BATTUT, I.; MILLER, P.G.; TAINURIER, D. e BRUYAS, J.F. (1997) **Succes rates when attempting to nonsurgically collect equine embryos at 144, 156 or 168 hours after ovulation.** *Equine Vet. J.. Suppl.*, 25: 60-62.

BERGFELT, D.R. e GINTER, O.J. (1996). **Ovarian, uterine and embryo dynamics in horses versus ponies.** J. E. Vet. Sci., 16(2): 66-72.

BETTERIDGE, K.J. (2000). **Form and function in equine embryos during the first three weeks of pregnancy.** J. Equine Vet. Science, 17(2):64-66.

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

BURNS P.J.; STEINER J.V.; SERTICH P.L.; POZOR M.A.; TICE T.R.; MASON D.W.; (1993). **Evaluation of biodegradable microspheres for the controlled release of progesterone and estradiol on an ovulation control program for cycling mares.** Equine Vet Sci; 13:521-524.

BRINGEL, B.A.; JACOB, J.C.F.; ZIMMERMAN, M. (2003). **Biorelease progesterone LA 150 and its application to overcome effects of premature luteolysis on progesterone levels in mares.** Rev. Bras. Reprod. Anim., v.27, p.498-500.

CAIADO, J.R.C. (2004). **Otimização de Receptoras e Avaliação de meios na Transferência de Embriões em éguas da raça Mangalarga Marchador. Tese (Doutorado em Produção Animal).** Campos dos Goytacazes-RJ. Universidade Estadual do Norte Fluminense.

CAIADO, J.R.C.; FONSECA, F.A.; SILVA, J.F.S. et al (2005). **Aplicação do flunixin meglumine antes da transferência não-cirúrgica de embriões em éguas da raça Mangalarga Marchador.** Revista Brasileira de Ciências Veterinárias, v.12, n.1-3, p.11-15.

CAIADO J.R.C.; FONSECA F.A.; SILVA J.F.S.; FONTES R.S. (2007). **Tratamento de éguas receptoras de embriões visando sua utilização no segundo dia pós-ovulação.** R. Bras. Zootecnia. 36: 360-368.

CALDAS, M.C.S.; OLIVEIRA, F.R.A.P. e ROSA e SILVA, A.A.M. (1994) **Chronobiological characterization on the first estrous cycle in Brasileiro de Hipismo mares during the postpartum period.** Theriogenology. 42: 803-813.

CARNEVALE, E.M.; RAMIRES, R.J.; SQUIRES, E.L.; ALVARENGA, M. VANDERWAL, L.D.K. & MCCUE, P.M. (2000). **Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer**. Theriogenology 54:965-979.

CARVALHO, G.R. (2000). **Estudo de alguns aspectos da transferência de embriões eqüinos**. Tese (Doutorado em Zootecnia)- Viçosa – MG, Universidade Federal de Viçosa.

CNOP FILHO, F.P.; MATTA, M.F.R.; MATTA, C.G.F.; SÁNCHEZ, R.J.R.; ELIGIO, C.T.; RIEUMONT, J.; CRUZ, G.M.; VIANNA, S.A.B.; SILVA, J.F.S. (2001) **Níveis sangüíneos de progesterona a partir de um implante subcutâneo de um carreador polimérico impregnado de P4**. Revista Brasileira de Reprodução Animal. 25(3): 359-360.

DINGER J.E.; NOILES E.E.; BATES M.J.L.; (1981). **Effect of progesterone impregnated vaginal sponges and PMSG administration on estrous synchronization in mares**. Theriogenology;16: 231–237.

FATHALLA, M.; YOUNIS, L.; JAWAD, N. (1998) **Progesterone concentration and ovascan reading during the estrous cycle in Arabian mares**. Journal of Equine Veterinary Science, 8:326-328.

FLEURY, J.J. (1998a) **O dia da colheita na taxa de recuperação embrionária em eqüinos em uma central de transferência de embriões comercial**. Arq. Fac. Vet. UFRGS Supl.. Porto Alegre, 26 , (1) : 268.

FLEURY,J.J.; PINTA A.J.; MARQUES, A.; LIMA, C.G.; ARRUDA, R.P. (2001). **Fatores que afetam a recuperação embrionária e os índices de prenhez após transferência transcervical em equinos da raça Mangalarga**. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 38:26-38

FORTUNE, J.E. (1994). **Ovarian follicular growth and development in mammals**. Biol. Peprod., 50: 225-232.

GASTAL, M.O.;GASTAL, E.I.; TORRES, C.A.A. e GINTER, O.J. (1998). **Effect of PGE2 on uterine contractility and tone in mares**. Theriogenology 50: 989-999.

GASTAL, E.I.; GASTAL, M.O.; NOGUEIRA, G.P.; BERGFELT, D.R. e GINTER, O.J. (2000). **Temporal interrelationships among luteolysis, FSH and LH concentration and follicle deviation in mares.** Theriogenology 53: 925-930.

GINTHER, O.J. (1985). **Embryonic loss in mares: Incidence, time of occurrence and hormonal involvement.** Theriogenology, 23:77-83.

GINTHER, O.J. (1986). **Ultrasonic imaging and reproductive events in the mares.** 3rd printing. Equiservice.378p.

GINTHER, O.J. (2000). **Selection of the dominant follicle in cattle and horses.** An. Rep. Sci., 60-61: 61-79.

HAFEZ, E.S.E. (1995). **Reprodução animal.** 6^a ed. Ed. Manole. São Paulo. 582p.

HAFEZ, E.S.E. (2004). **Reprodução animal.** 7^a ed. Ed. Manole. São Paulo. 509p.

HANDLER J; SCHOENLIEB S; HOPPEN H; AURICH C; (2006). **Seasonal effects on attempts to synchronize estrus and ovulation by intravaginal application of progesterone-releasing device (PRIDTM) in mares.** Theriogenology 65: 1145-1158.

HUGHES, J.P.; STABENFELDT, D.H.; EVANS, J.W. (1972). **Clinical and endocrine aspects of the estrous cycle of the mare.** Proceedings of the American Association of Equine Practitioners. 119-152.

HUGHES, J.P.; STABENFELDT, G.H. E EVANS, J.W. (1977). **The oestrus cycle in the mare and its uterine control.** Aust. Vet. J., 53:415-419.

HUGHES, J.P.; STABENFELT, G.H. E KENNEDY, P.C. (1980). **The estrous cycle and selected functional and pathologic ovarian abnormalities in the mare.** Vet. Clin. North Am. (Large Anim. Pract.), 2(2): 225-239.

IRVINE, C.H.G. E ALEXANDER, S.L. (1997). **Patterns of secretion of GnRH, LH and FSH during the postovulatory period in mares: mechanisms prolonging the LH surge**. J. Rep. Fert., 109: 263-271.

JONES, L.M.; BOOTT, N.H. & MCDONALD, L.E.(1983). **Farmacologia e Terapêutica em Veterinária**. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro-RJ, 4ªed.

KÄHN, W. **Veterinary reproductive ultrasonography**. 2.ed. London, Mosby-Wolfe. 1994, 256 p.

KASTELIC, J.P.; PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. (1990). **Ultrasonic morphology of corpora lutea and central luteal cavities during the estrous cycle and early pregnancy in heifers**. Theriogenology, v. 34, n. 3, p. 487-498.

KITO, S.; OKUDA, K.; MIYAZAWA, K.; SATO, K. (1986). **Study on the appearance of the cavity in corpus luteum of cows by using ultrasonic scanning**. Theriogenology, v. 25, n. 2, p. 325-333.

LAGNEAUX, D. E PALMER, E.(1993). **Embryo transfer in anoestrous recipient mares: attempts to reduce altrenogest administration period by treatment with pituitary extract** Equine Vet. J. Suppl., 15 : 107- 110.

LOPATE, C.; THERELFALL, W. R. (1991) **Assessment of luteal function with progesterone enzyme immunoassays in the horse mare**. Theriogenology, v. 35, n. 3, p. 583-590.

LOSINNO L. E ALVARENGA, M.A. (2006). **Fatores críticos em programas de transferência de embriões em equinos no Brasil e Argentina**. Acta Scientiae Veterinariae. 34: 39-49.

MCDOWELL, K.J.; SHARP, D.C. e GRUBAUGH, W. (1987). **Comparison of progesterone and progesterone+oestrogen and total and specific uterine proteins in pony mares**. J. Rep. Fert., 35: 335-342.

MCKINNON, A. O. E SQUIRES, E.L. (1988). **Morfologic assesment of the equine embryo**. J. Am. Vet. Med. Ass.,192, (3): 401-406.

MCKINNON, A.O. E VOSS, J.L. (1992). **Equine Reproduction**. Ed. Lea & Febiger, Philadelphia, Vol. 1 (The mare), 639 pg.

MCKINNON, A.O., VOSS, J.L., SQUIRES, E.L., & CARNEVALE, E.M. (1993). **Diagnostic Ultrasonography**. In A.O. McKinnon & J.L. Voss (Eds.), **Equine Reproduction**. (pp. 266-302). Philadelphia, London : Lea & Febiger.

MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; CARNEVALE, E.M. E HERMENET, M.S. (1998). **Ovariectomized steroid-treated mares as embryo transfer recipients and as model to study the role of progestin in pregnancy maintenance**. Theriogenology. 29:1011-1063.

MCKINNON, A.O. (1999). **Breeding and its technology - now and the future**. World Trotting Conf. Papers. <http://www.harness.org.au/99wldcon/PMCKINN5.HTM>. 16/12/2003. 24p.

MCKINNON AO.; LESCUN T.B.; WALKER JH.; VASEY JR.; ALLEN W.R. (2000). **The inability of some synthetic progestagens to maintain pregnancy in the mare**. Equine Vet J, 32:83-85.

NAGY, P.; HUSZENICZA, G.Y.; REICZIGE, J; JUHÁSZ, J; KULCSÁR, M; ABAVARY, K; GUILLAUME D.:(2004). **Factors affecting plasma progesterone concentration and the retrospective determination of time of ovulation in cyclic mares**. Theriogenology, 61. 203–214.

NEELY, D.P.; LIU, I.K. E HILLMAN, R.B. (1983). **Equine reproduction**. Hoffman-La Roche, Nutley. 90 p.

NEELY, D.P. (1988). **Progesterone/progestin therapy in the brood-mare**. Proc. Am. Assoc. Equine Pract., 88: 203-218.

OBA, E.; MOREIRA, A.F.; MAMPRIM, M.J. (1992) **Progesterone and LH serum concentration in adult mares during oestrus**. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 12., , Netherlands. Free communications. Hague, p. 1900-1902.

OGURI, N. E TSUTSUMI, Y. (1972). **Nonsurgical recovery of equine eggs, and an attempt at nonsurgical egg transfer in horses.** J. Rep. Fert., 31:187-195.

PASHEN, R.L.; LACOMBES, F.A. E DARROW, M.D. (1993). **The application of embryo transfer to polo ponies in Argentina.** Equine Vet. Journal. Suppl., 15:119-121.

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

PERKINS, N.R.; THRELFALL, W.R.E OTTOBRE, J.S. (1993). **Pulsatile secretion of luteinizing hormone and progesterone in mares during the estrous cycle and early pregnancy.** Am. J. Vet. Res., 54(11): 1929-1934.

PIERSON, R.A.; GINTHER, O.J. (1985). **Ultrasonography of the bovine ovary.** Theriogenology, v. 21, n. 3, p. 495-504.

PLOKTA, E.D.; WITHERSPOON, D.M.; GOETSCH, D.D. (1971) **Peripheral plasma progesterone levels during the estrus cycle of the mare.** Federation Proceedings. Federation of American Societies for Experimental Biology, v. 30, p. 419,.

REEVES, J.J.; RANTANEN, N.W.; HAUSER, M. (1984) **Transrectal real-time ultrasound scanning of the cow reproductive tract.** Theriogenology, v. 21, n. 3, p. 485-494.

RIERA, F.L.E MCDONOUGH, J. (1993). **Commercial embryo transfer in pólo ponies in Argentina.** Equine Vet. Journal. Suppl., 15:116-118.

ROMANO, M.A. (1993). **Níveis de progesterona no ciclo estral, duração de estro, intervalo entre partos e momento de ovulação em eqüinos árabes.** 93 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

ROCHA FILHO A.N.; PESSÔA M.A.; GIOSO M.M.; ALVARENGA M.A. (2004). **Transfer of equine embryos into anovulatory recipients supplemented with short or long acting progesterone**. Anim. Reprod., 1:91-95.

SHARP, D.C. (2000). **The early fetal life on the equine conceptus**. AN. REP. SCI. 60-61: 679-689.

SHORT, R.V. (1961). **$\Delta^5 3\beta$ -Hydroxi Steroids in the follicular fluid of the mare**. J. endocrinology, 23: 277-283.

SMITH, I.D.; BASSETT, J.M.; WILLIAMS, T. (1970) **Progesterone concentrations in the peripheral plasma of the mare during the oestrus cycle**. Journal of Endocrinology, v. 47, n. 4, p. 523-524.

SOUZA, J.A.T.; GACEK, F. E OLIVEIRA, J.B. (1999). **Características do corpo lúteo e progesterona plasmática no ciclo estral de potras da raça Brasileiro de Hipismo**. Arq. Fac. Vet. UFRGS, sup. 27:298.

SQUIRES, E.L.; SHIDELER, R.K.; VOSS, J.L. E WEBEL, S.K. (1983). **Clinical applications of progestin in mares**. C. C. E. Practing Vet. 5: 516-522.

SQUIRES, E.L.; MCCUE, P.M. E VANDERWALL, D. (1998) **The current of status of equine embryo transfer**. Theriogenology, 51, 91-104.

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

SQUIRES, E. L.;CARNEVALE, E.M.; MCCUE, P.M. E BRUEMMER, J.E. (2003). **Embryo technology in the horse**. Theriogenology, 59:151-170.

STABENFELDT, G.H.; HUGHES, J.P.; EVANS, J.W. (1971) **Studies on the oestrus cycle of the mare**. Federation Proceedings, v. 30, p. 419,.

STOUT, T. A. E. LAMMING G. E. AND ALLEN W. R. (1999). ***Oxytocin administration prolongs luteal function in cyclic mares.*** Journal of Reproduction and Fertility V. 116, p. 315-320. DOI: 10.1530/jrf.0.1160315

TESTA, A.C.; CARMO, M.T.; ALVARENGA, M.A. (2005). **Perda embrionária precoce em éguas receptoras de embrião em anestro tratadas com progesterona de longa ação.** Acta Scientiae Veterinariae, 33:198

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

VIVO, R.; SANTISTEBAN, R.; TOVAR, P.; CASTEJON, M.F. (1986). **Valores de progesterona en plasma de yeguas españolas y árabes durante el ciclo reproductor.** Archivos de Zootecnia, Madrid, v. 35, n. 131, p. 59-67.

WATSON, E.D; SKOLNIK. S.B. e ZANECODKY, H.G. (1992). **Progesterone and estrogen receptor distribution in the endometrium of the mare.** Theriogenology; 38: 575-580.

WEBEL, S.K. (1975). **Estrous control in horses with a progestin.** J. Anim. Sci., 41:385.

WILSON, J.M.; KRAEMER, D.C.; POTTER, G.D. E PIKLIN, J.L. (1991) **Repeated embryo recovery attempts and subsequent fertility of two-year-old fillies.** Theriogenology, 36 (6):1027-1034.