



## Como melhorar os índices reprodutivos em um programa de transferência de embrião equino

*How to improve reproductive indices in an equine embryo transfer program*

Julio Cesar Ferraz Jacob<sup>‡</sup>, Yuri Barbosa Guerson, Paula Junqueira Ferraz

Departamento de Reprodução e avaliação Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brasil.

### Resumo

O Brasil é o país que mais faz uso da biotécnica de transferência de embrião (TE) sendo utilizado por quase todas as raças aqui existentes. A raça Mangalarga Marchador lidera a utilização dessa biotécnica incrementando cada vez mais a indústria do cavalo, havendo atualmente leilões apenas de embrião. A TE possibilitou aumentar o número de descendentes de doadoras zootecnicamente superiores sem ser necessário interromper a carreira esportiva dessas éguas. Apesar dos índices de recuperação embrionária e gestação atualmente serem bastante consistentes, a maior dificuldade em operar um programa TE bem-sucedido é a administração e coordenação das muitas variáveis que pode afetar essas taxas. Essas variáveis incluem a gestão das doadoras e receptoras, a qualidade da receptora, a sincronização da ovulação, a competência técnica do operador e os métodos utilizados para realizar a transferência de embriões. Além, disso, interferem ainda a qualidade do embrião, condições uterinas e nutricionais das doadoras e receptoras. O presente artigo visa demonstrar alguns fatores que podem interferir negativamente na TE, e o que podemos fazer para melhorar os índices reprodutivos nos programas de transferência de embrião.

**Palavras-chave:** éguas, eficiência reprodutiva, embrião.

### Abstract

*Nowadays the Brazil is the country that makes the most use of embryo transfer biotechnology (ET) being used by almost all the breeds. The Mangalarga Marchador breed leads this biotechnology increasing the horse industry more and more, because nowadays, there is only an embryo public sale. ET technology has made it possible to increase the numbers of descendants from genetically superior donors without the need to disrupt the mares' sports careers. Although rates of embryo recovery and gestation are currently quite consistent, the greatest difficulty in operating a successful ET program is the management and coordination of the many variables that may affect these rates. These variables include donor and recipient management, recipient quality, synchronization of ovulation, technical skills of the operator and methods used to perform embryo transfer, embryo quality, uterine and nutritional conditions of donors and recipients. This article aims to demonstrate some factors that may negatively interfere in ET, and what we can do to improve reproductive indices in embryo transfer programs.*

**Keywords:** mare, reproductive efficiency, embryo.

### Introdução

A demanda em aumentar a qualidade dos animais na indústria equina no Brasil tem contribuído significativamente para a aplicação das biotécnicas da reprodução, especialmente a raça Mangalarga Marchador, sendo a transferência de embrião (TE) a biotécnica mais utilizadas para produzir vários potros de uma mesma égua por ano. Além disso, uma das vantagens mais importantes desta biotecnologia é a possibilidade de evitar interromper a carreira esportiva de éguas importantes, transferindo seus embriões enquanto ainda estão competindo (Pinto et al., 2017). O Brasil lidera a produção de embriões equinos respondendo por cerca de 50% dos embriões transferidos no mundo e produzindo anualmente cerca de 25.000 embriões transferidos (Losinno e Urosevic, 2015).

Panzani et al., 2016 relataram também que o sucesso de um programa de TE é afetado significativamente pela idade da doadora, categoria reprodutiva, qualidade do embrião, idade e diâmetro embrionário. Além dos fatores que estão relacionados a taxa de recuperação embrionária, o maior gargalo em um programa de TE equino está relacionado a receptora, portanto na taxa de gestação. Alguns fatores ligados as receptoras são idade, nutrição, saúde uterina e grau de sincronia do ciclo com a doadora, (Squires et al., 1999; Carnevale et al., 2000; Jacob et al., 2002; 2010; Camargo et al., 2013). Estes fatores, associados ou isolados, fazem com que a eficiência de programas de TE nesta espécie sejam baixas, sendo necessários 2 a 3 ciclos para se obter uma gestação (Alvarenga e Tongu, 2017).

As taxas de recuperação embrionária em programas de TE tem uma grande variação dependendo do tipo de doadora utilizada, idade, dia de coleta, atividade física, entre outros fatores. Conforme alguns autores as taxas são: 45% a 51,6% (McCue et al., 2010), 63% (Jacob et al., 2010; 2012), 71% a 76% (Pessoa et al., 2011), 55% (Gomes et al., 2014), 30% a 64% (Marinone et al., 2015), 46,8% a 60,6% (Pinto et al., 2017). Assim como as taxas de gestação também tem grandes variações como: 61% a 77% (Jacob et al., 2010; 2012), 69% a 79% (Pessoa et al.,

<sup>‡</sup>Correspondência: juliorep@ufrj.br

Recebido: 22 de fevereiro de 2019

Aceito: 27 de março de 2019



2011), 68% (Rodrigues et al., 2012), 40,3% a 62,2% (Camargo et al., 2013), 80% a 100% (Gomes et al., 2014), 62,5% a 84,6% (Panzani et al., 2016), 76,3% (Cuervo-Arango et al., 2017).

O presente artigo visa apresentar as taxas médias de recuperação embrionária e taxas de gestação em TE assim como o que pode interferir negativamente nesses índices, e o que podemos fazer para melhorar os índices reprodutivos nos programas de transferência de embrião.

### **Aumentar o número de ovulações**

A indução de múltiplas ovulações tem sido um recurso que aumenta o número de embriões produzidos. Segundo Squires et al. (2003) em éguas que apresentam ovulação natural, a recuperação de embriões é de cerca de 50% para a ovulação. Por outro lado, a recuperação de embriões é maior em éguas apresentando espontaneamente duas ou três ovulações. No entanto, o número de embriões recuperado para cada ovulação em éguas induzidas a múltiplas ovulações ainda é baixa relacionada àquela apresentada por éguas com ovulação natural, em torno de 0,5 embriões. Sendo assim, o ideal é induzir duplas ovulações e não múltiplas ovulações conforme os autores abaixo.

Nagao et al. (2012), demonstraram que o uso de baixas doses de acetato de deslorelina (100µg - IM) próximo ao momento da dominância folicular, induzem com eficiência duplas ovulações (82%) em éguas da raça brasileira de Hipismo e melhoram 112,5% as taxas de recuperação embrionária para o grupo tratado, enquanto o grupo controle apresentou taxa de recuperação de 57%.

Induzindo a duplas ovulações, Segabinazzi et al. (2015) compararam dois protocolos, um sem acompanhamento folicular e o outro com acompanhamento folicular. No primeiro foram utilizadas duas aplicações de PGF2α com intervalo de 14 dias. O tratamento com acetato de deslorelina se iniciava 48 horas após a segunda aplicação de PGF2α, sem qualquer avaliação do status reprodutivo das éguas (sem acompanhamento folicular). Foi então aplicado 125µg por via intramuscular (IM) de acetato de deslorelina (Sincrorrelin® - Ouro Fino, Brasil) a cada 12 horas. No terceiro e quarto dia de tratamento com acetato de deslorelina as éguas foram avaliadas através de palpção retal e ultrassonografia. Utilizando esse protocolo sem controle folicular 44% das éguas apresentaram duplas ovulações. Nos animais que a dinâmica folicular foi acompanhada, a partir da presença de no mínimo um folículo  $\geq 28$  mm durante as avaliações, o tratamento com acetato de deslorelina foi continuado até a detecção de dois ou mais folículos  $\geq 35$  mm ou um  $\geq 38$  mm. Nesse momento a ovulação foi induzida utilizando 750 µg de acetato de deslorelina IM e 1650 UI de Gonadotropina Coriônica Humana (hCG, Vetecort® - Hertape Calier, Brasil) por via intravenosa (IV) obtendo 91% de duplas ovulações (Segabinazzi et al., 2015).

Recentemente, Sá et al. (2017) utilizando 8,0 mg de extrato de pituitária equina (EPE), bid, no D8 após ovulação, até que pelo menos dois folículos atingissem diâmetro  $\geq 35$  mm. Neste momento foi administrado 1000 UI, IV de hCG como indutor de ovulação. A porcentagem de éguas com duas ou mais ovulações foi maior ( $P < 0,01$ ) para o grupo tratado (7/8, 87,5%) do que para o grupo controle (1/6, 12,5%). O número de embriões recuperados por ovulação não apresentou diferença estatística ( $P > 0,05$ ) entre os grupos tratado (11/16, 68,8%) e controle (6/9, 66,6%). Mas número de embrião por ciclo (11/8 e 5/8) foi superior no grupo tratado do que no controle respectivamente. Porém hoje em dia no Brasil tem-se a dificuldade de se conseguir EPE.

### **Éguas idosas**

Em programas comerciais de TE na Argentina, estimava-se que a população de éguas idosas era de 10 – 25% (Baker et al., 1993), isso a mais de 20 anos. No Brasil não se tem precisamente o número de éguas idosas em programa de TE, mas acredita-se que seria mais de 30%. Este percentual relativamente alto de éguas idosas pode ser devido ao fato de que essas éguas geralmente valiosas são mantidas por mais tempo em programas de reprodução para que um número maior de descendentes possa ser obtido. Verificando os efeitos da idade na dinâmica folicular e hormonal durante o ciclo estral, Ginther et al., (2008) verificaram que o IOI (intervalo inter ovulatório) foi 1 dia mais longo no grupo de éguas idosas ( $\geq 18$  anos) do que nos dois grupos mais jovens (5-6 anos e 10-14 anos) isso foi associado com uma taxa de crescimento mais lenta do folículo ovulatório. O grupo de éguas idosas apresentou atividade folicular reduzida, conforme indicado por folículos significativamente menores e menos numerosos. Concentrações de FSH não diferiram entre os grupos etários, exceto a concentração máxima que foi maior no grupo idoso. As concentrações de LH foram maiores no grupo jovem durante o pico de LH ovulatório e podem ter desempenhado papel importante no intervalo mais curto do diâmetro máximo do folículo pré-ovulatório à ovulação.

Durante um programa TE, no entanto, o IOI de doadoras depende também se a égua teve o ciclo encurtado com uma dose de Prostaglandina F2 (PGF2) ou seus análogos (PGF) no dia da coleta do embrião. Na maioria dos programas de TE, a PGF é administrada no mesmo dia da coleta, que varia de 7 a 10 dias após a ovulação. Uma vez que o PGF diminui o IOI (Ginther, 1992), o dia da coleta do embrião provavelmente influenciará o IOI subsequente. Além disso, evidências mostram que o intervalo entre o tratamento da PGF e a ovulação pode influenciar a taxa de prenhez (PR) (Cuervo-Arango e Newcombe, 2010).

No entanto, a relação entre o IOI e a taxa de recuperação embrionária subsequente (TRE) não foi investigada em éguas doadoras durante os programas TE. Éguas mais velhas têm maior taxa de múltiplas ovulações (MO) do que as éguas mais jovens (Losinno et al., 2000; Davies Morel et al., 2005; Hunt et al., 2005a,b). Este efeito



da idade na MO parece ser impulsionado por um aumento gradual na IOI e diferenças nas concentrações de gonadotrofinas à medida que a égua se torna mais velha (Carnevale et al., 1993).

Além disso, o intervalo do tratamento com PGF à ovulação e, por sua vez, o IOI influencia a taxa de MO (Cuervo-Arango e Newcombe, 2010). À medida que o intervalo do tratamento com PGF se torna mais longo, a taxa de MO aumenta. Este efeito parece ser devido a um aumento na concentração de LH após a luteólise induzida pela PGF (Ginther et al., 2008). Também foi observado que as éguas idosas têm menos folículos ovarianos e menores concentrações de LH durante o pico pré-ovulatório (Ginther et al., 2009).

Hanlon et al. (2012) demonstraram que, para cada ano de idade, a taxa de gestação do primeiro ciclo foi reduzida por um fator de 0,94 e no final da temporada foi reduzida por um fator de 0,91. Éguas com mais de 14 anos levaram mais tempo para conceber após o início do acasalamento em comparação com as éguas mais jovens. As chances de concepção para éguas com 14 anos ou mais foram 0,64 vezes menores que as éguas com menos de 9 anos. No entanto, o impacto da idade sobre a qualidade do embrião e a taxa de gestação não foram abordados (Hunt et al., 2005a).

Em um estudo realizado por Marinone et al. (2015), a taxa de recuperação embrionária para éguas Jovens (3-4 anos), Meia idade (5-10 anos) e velhas (13-26 anos) foi significativamente maior nos grupos jovens e meia idade em relação as éguas idosas (171/244) 70.1%, (774/1081) 71.6% e (385/701) 54.9%, respectivamente. Porém, o efeito da faixa etária na taxa de gestação pós-transferência não foi significativo. Quanto a taxa de múltiplas ovulações (MO), no geral foi de 32,6% e foi influenciada pela idade. A taxa de MO aumentou à medida que a égua se tornou mais velha. As éguas da meia-idade eram 2,5 vezes mais prováveis (33,3%) de ter MO do que as potras (16,1%). Éguas idosas tiveram 3,4 vezes mais chances de ter MO (42,8%) do que potras. O IOI variou de 11 a 25 dias. A duração do IOI foi influenciada pela idade da égua doadora; dia do lavado; características individuais e mês. A média geral de IOI das éguas jovens ( $16,4 \pm 0,17$  dias) e éguas de meia idade ( $16,6 \pm 0,12$  dias) não foi diferente, mas foi menor do que nas éguas idosas IOI de éguas idosas ( $17,4 \pm 0,15$  dias). A média de IOI de éguas lavadas nos dias 7, 8 e 9 foi de  $16,1 \pm 0,29$  (variação de 11 a 22 dias, média de 16 dias),  $16,8 \pm 0,09$  (variação de 11 a 25 dias, média de 17 dias) e  $17,5 \pm 0,33$  dias (variação 11 a 25 dias, média de 17 dias), respectivamente.

### Exercício físico

Vários autores relataram que éguas doadoras submetidas a intensa atividade física têm baixa taxa de recuperação embrionária (Sertich PL, 1989; Mortensen et al., 2009), produzem embriões de baixa qualidade (Smith et al., 2012) e mostram baixas taxas de gestação nas receptoras (Allen e Stout, 1999). Além disso, tem sido relatado que os níveis moderados de exercício em éguas cíclicas aumentaram as concentrações de cortisol, diminuí a concentração plasmática de LH e houve alterações na dinâmica folicular, resultando em um aumento no período interovulatório quando comparado a éguas que não estavam em treinamento (24,7 0,8 dias vs. 22,2 0,8 dias, respectivamente) (Kelley et al., 2011).

Vazquez et al., (2010), compararam dois grupos de éguas, um grupo somente na reprodução e outro na reprodução e treinamento. As éguas somente para reprodução tinham uma idade média de 13 anos e éguas no treinamento média de 5 anos ( $13,7 \pm 0,2$  ano vs.  $5,7 \pm 0,3$  ano, respectivamente). O número de embriões recuperados por tentativa foi maior ( $P < 0,001$ , 76% vs. 61%) e o número de embriões Grau 1 tendiam a ser maiores ( $P < 0,06$ , 94% vs. 89%) para as éguas em treinamento do que para as éguas somente na reprodução.

Trabalhando com doadoras em treinamento e doadoras sem treinamento, Pessoa et al., (2011) realizaram um total de 138 e 657 coletas de embrião, respectivamente, obtiveram um total de 105 (76%) e 466 (71%) embriões ( $P > 0,05$ ). Da mesma forma, não foram observadas diferenças ( $P > 0,05$ ) para as taxas de gestação no dia 15 (82/105, 78% vs. 370/466, 79%) e no dia 40 (73/105, 69% vs. 328/466, 70%) entre as doadoras em treinamento e doadoras somente na reprodução. Com base no resultado desse estudo, pode concluir que, em condições normais de treinamento, o exercício não afetou negativamente a eficiência TE em éguas Quarto de Milha em competição.

### Estresse térmico

O estresse térmico também pode influenciar a taxa de recuperação embrionária (TR) assim como a taxa de gestação (TG). Segundo Oliveira et al., (2015) em relação às variáveis climáticas, nota-se que a maior TR (71%) foi obtida a 26°C, e que reduziu significativamente à temperatura de 29°C com 51,4%. Entretanto não houve relação da TR com a umidade relativa do ar e com o Índice de Temperatura e Umidade (ITU), embora menor TR tenha sido obtido quanto maior foi o desconforto térmico expressado pelo ITU. Em relação a Taxa de Gestação a maior TG foi obtida aos 24, 25 e 26°C (81,5%, 63% e 66,7%, respectivamente) próximo a faixa de conforto térmico equino. Quando ocorre um aumento da temperatura para 27°C e 28°C há uma queda significativa na TG 35%, 40%, respectivamente ( $P < 0,05$ ).

### Indução da ovulação

É comum induzir a ovulação em éguas doadoras, sendo o hCG o fármaco mais utilizado para este fim. Atualmente, são utilizados análogos de GnRH (deslorelina, histrelina e assim por diante), pois são mais eficientes para induzir a ovulação. Voge et al. (2012) mostraram que duas doses diferentes de histrelin BioRelease foram



igualmente eficazes como hCG, enquanto em um estudo diferente, Losinno et al. (2008), relataram que a deslorelina BioRelease aumentou as taxas de dupla ovulação e recuperação de embriões em éguas quando comparado ao hCG.

Em um programa comercial de transferência de embrião de doadoras de alta performance, Pinto et al., (2017), trabalharam com dois grupos de doadora; G1 induziram a ovulação com folículo 35 mm com 1 mg de deslorelina BioRelease IM e o grupo 2 (controle) induziram com 2.500 UI de hCG IV. Quando as éguas em treinamento para as competições de salto de nível superior foram induzidas a ovulação com deslorelina a taxa de recuperação embrionária foi de 60,6% (40/66) enquanto que com hCG apenas 46,8% (37/79) de embriões, um aumento de 13%.

No momento da transferência dos embriões os autores administraram antiinflamatórios não-esteróides (AINES) com o intuito de reduzir a resposta inflamatória produzida após a transferência não-cirúrgica de embrião. Além disso, suplementaram progesterona em algumas éguas receptoras para melhorar as condições uterinas antes da transferência. As éguas receptoras foram distribuídas aleatoriamente em três grupos: (1) grupo A recebeu uma dose única de 1,5 g de BioRelease progesterone IM imediatamente após a transferência do embrião e 0,5 g de flunixin meglumine, por três dias consecutivos; (2) grupo B uma dose única de 1,5-g IM e uma dose única de 1,5 mg IM meloxicam no momento da transferência dos embriões; e (3) grupo controle: as éguas não receberam qualquer tratamento quando os embriões foram transferidos. Embora ambos os grupos de receptoras tratado com AINEs em combinação com BioRelease progesterona tenham apresentados numericamente maior taxa de gestação (A, 70,8%; 17/24 e B: 75,0%; 15/20) em comparação com o controle não tratado (47,1%; 33/70), as taxas de gestação foram significativamente maiores apenas em receptoras com Meloxicam no momento da transferência.

Comparando dois indutores da ovulação, Silva et al. (2016) obtiveram o seguinte resultado para os grupos: G1- 1000 UI de hCG (Chorulon), G2 – 0,75 mg de Deslorelina, e G3 controle solução salina; O percentual de ovulação em até 36 horas foi de 34,4%, 13,3% e 8,7%, e em até 42 horas foi de 96,9%, 70% e 17,4%, para o G1, G2 e G3, respectivamente, demonstrando um aumento significativo no G1 em relação aos outros grupos. No G2 houve um aumento significativo das ovulações após 42 horas da indução, e no G3 após 48 horas. Até 48 horas após a indução o percentual de ovulações foi de 96,8% (31/32), 90% (27/30) e 30,4% (7/23), para os respectivos grupos, G1, G2 e G3. Deste modo as doses inferiores dos agentes indutores, foram eficientes em promover a ovulação em até 48 horas, sendo o efeito da hCG mais rápido que a Deslorelina.

### **Idade e tamanho do embrião**

Panzani et al. (2016) relataram que embriões de oito dias a perda embrionária foi significativamente menor em relação a embriões de 9 ou 10 de idade, como ocorreu para embriões entre 400 e 1200µm em comparação com embriões <400 µm. Embriões recuperados de éguas > 20 anos de idade, a taxa de perda de gestação foi significativamente maior do que aqueles recuperados de éguas jovens. Assim como Carmargo et al.2013, também relataram que embriões entre 400 e 1199 µm de tamanho tem maiores taxas de gestação do que os embriões menores, 399 µm, e blastocistos e blastocistos expandidos produzem melhores taxas de gestação que mórulas e blastocistos.

### **O que fazer para melhorar a taxa de recuperação e gestação embrionária**

A implementação de um programa de TE não é caro comparado com outras tecnologias reprodutivas avançadas. A maior dificuldade em operar um programa TE bem-sucedido é a administração e coordenação das muitas variáveis que pode afetar a taxa de gestação bem sucedida. Essas variáveis inclui a gestão das doadoras e receptoras, a qualidade da receptora, sincronização da ovulação, competências técnicas do operador e métodos utilizados para realizar a transferência de embriões, a qualidade do embrião, condições uterinas e nutricionais das doadoras e receptoras e a saúde da receptora após a transferência (Squires et al., 1999). Estudos recentes mostraram que a sincronia da ovulação entre doadora e receptora poderia ser menos rigorosa do que se pensava anteriormente. Éguas receptoras que ovularam um dia antes e até cinco dias após a ovulação da doadora pode ser usado sem qualquer redução na taxa de gestação (Jacob et al., 2010). Jacob et al. (2012) relataram que taxas de gestação aceitáveis podem ser obtidas em receptoras utilizados entre três a oito dias pós-ovulação.

Para aumentar as chances de recuperação embrionária, Hinrichs (1990) sugeriu deixar o útero distendido com solução de lavagem por 3 minutos, antes de recuperá-lo em cada um dos três lavados. Com isso conseguiu ótimas taxas de recuperação embrionária em éguas de ovulação simples (87%), e múltiplas ovulações (160%). Complementando essa técnica Hudson e McCue (2004) descreveram uma quarta lavagem na qual o meio também era deixado no útero por 3 minutos. Após isso era aplicado ocitocina e o útero era vigorosamente manipulado pelo reto antes da recuperação do fluido. Um total de 32 embriões foram recuperados durante esse lavado “extra”, resultando em um incremento na taxa de recuperação embrionária em torno de 10%.

#### *Edema uterino, Corpo lúteo*

A probabilidade de gestação em éguas receptoras com três ou mais dias de edema uterino durante o estro que precede a TE foi significativamente maior (83,1%; 157/189) do que em receptoras com menos de 3 dias de



edema uterino (63,6%; 77/121). A probabilidade de gestação de receptoras sem edema durante a fase folicular foi a menor (50%; 11/22). Assim como a probabilidade de gestação em éguas receptoras com dois ou mais corpos lúteos (CL) no momento da transferência (88,1%; 89/101) foi maior ( $P \leq 0,05$ ) que a das receptoras com 1 CL (71,5%; 178/249). No entanto, o número de CLs não afetou a perda embrionária precoce (PEP), com incidências de 15,7% versus 11,2% para os receptores com 1 e 2 CLs, respectivamente. (Cuervo-Arango et al., 2018).

#### *Tratamento com $E_2$ , $P_4$ e $PGF_2\alpha$*

O tratamento hormonal (prostaglandina, estradiol e progestinas) de éguas em todas as fases do ciclo estral (incluindo recém-ovulada, ou seja, <5 dias) ou acíclica (anestro ou transição de primavera) pode ser útil para sincronizar receptoras de embrião com éguas doadoras. Utilizando de vários protocolos com indução de edema uterino mais prolongado 4 dias de  $E_2$  e Altrenogest, Neto et al. (2018), obtiveram uma taxa de gestação variando de 65% a 90%.

Rodrigues et al. (2012) transferiram embrião para receptoras ovuladas de D4 a D8 e obtiveram 75% (68/91) de gestação, em outro grupo as receptoras estavam no D2 e receberam 1500 mg de  $P_4$  no dia da ovulação e obtiveram 71% (39/55) de gestação e para o controle utilizou receptoras no D2 mas sem tratamento com  $P_4$  e obtiveram 20% (1/5).

A indução precoce da luteólise com  $PGF_2\alpha$ , 4 a 7 dias pós ovulação tem menor taxa de prenhez (46,7%  $P = 0,003$ ) quando comparada com éguas que tiveram a luteólise induzida com 8 a 10 dias e  $\geq 11$  dias (64% e 71,7% respectivamente). Assim como a taxa de múltiplas ovulações que tendeu a ser maior ( $P = 0,08$ ) em éguas tratadas com cloprostenol (36,4%) do que em éguas com retorno espontâneo ao estro (24,6%). As éguas que tiveram indução da luteólise com 8 a 10 dias e  $\geq 11$  dias tiveram maior taxa de MO ( $P = 0,003$ ) (40,4% e 44,3%, respectivamente) do que éguas com cio espontâneo ou induzida com 4 a 7 dias de ovuladas (24,6% e 20,8%, respectivamente). Porém múltiplas ovulações resultaram em mais gestações múltiplas nas éguas de cio espontâneo (71,4%) do que em grupos tratados com cloprostenol (41,4%;  $P = 0,035$ ) Cuervo-Arango e Newcombe, (2010).

#### *Medidas profiláticas*

Em trabalho realizado com *Theileria equi*, por Bezerra, et al. (2015) utilizaram 26 éguas doadoras e 54 éguas receptoras de embrião. Todas assintomáticas para babesiose porém 100% das éguas apresentaram resultado positivo para *Theileria equi* através da técnica de nested-PCR. As doadoras foram divididas em dois grupos de 13 cada e foram utilizados 52 ciclos estrais (dois ciclos cada). O grupo D1 controle (sem aplicação) e para o grupo D2 foi aplicado como dose preventiva, Dipropionato de Imidocarb (1,2 mg/Kg IM) Imizol®. A taxa de TR foi 53,84% (14/26) para o grupo D1 e após o tratamento, a TR aumentou para 65,9% (17/26 embora a diferença não tenha sido significativa ( $p > 0,05$ ). As receptoras foram divididas em: grupo R1 (controle sem aplicação) e grupo R2 (com tratamento). A taxa de gestação aos 15, 30, 45 e 60 dias no grupo R1 foi de 70% (14/20) sem perda embrionária, enquanto no grupo R2 a taxa de gestação aos 15 dias foi de 85% (17/20) e aos 30, 45 e 60 dias foi de 80% (16/20), considerando-se a perda embrionária aos 30 dias de gestação no grupo de éguas tratadas não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) entre as taxas de gestação.

#### *Coleta*

Após realizar uma série de lavados, caso não seja recuperado o embrião e não tenha aplicado  $PGF_2\alpha$ , pode-se repetir os lavados no dia seguinte para doadoras com histórico positivo no controle folicular, edema uterino, com ovulação próxima a inseminação, sêmen de qualidade e histórico de boa taxa de recuperação embrionária, a taxa de recuperação no dia seguinte pode aumentar em pelo menos 10% nos índices. Assim como aplicar  $PGF_2\alpha$  imediatamente após a coleta negativa e uma hora após realiza-se novo lavado uterino, tal prática também possibilita o aumento na taxa de recuperação embrionária. Quando coletamos embrião no D8 com duas coletas negativas, passamos a lavar essa égua no D9, independentemente da idade, assim como em éguas velhas que sempre coletamos embrião no D9 e caso não venha embrião, passamos a lavá-la em D10.

Outro fator importante para melhorarmos a taxa de gestação na TE são os meios de embrião utilizados no Brasil, alguns que já estão no mercado há mais tempo permanecem com a mesma eficiência, porém outros meios mais recentes têm baixas taxas de gestação, chegando a 10%, (dados não publicados pelo autor).

#### **Referências**

- Allen WR, Stout TAE. A failed attempt to collect, transport and transfer embryos from competing mares. In: Havemeyer Foundation Monograph Series, n.1, p.63-5, 1999.
- Alvarenga MA, Tongu EAO. Estratégias para melhorar a eficiência reprodutiva em programas de transferência de embrião de equinos. Rev Bras Reprod Anim, v.41, n.1, p.19-24, 2017.
- Baker, CB, Little, TV, McDowell, K. The live foaling rate per cycle in mares. Equine Vet J Suppl, v.15, p.28-30, 1993.



- Bezerra, LL, Jacob JCF, Santos HA, Massard CL, Silva PCA, Gaudêncio FN, Sá MAF.** Reproductive efficiency of asymptomatic *Theileria equi* carriers mares submitted to an embryo transfer program. *Pesq Vet Bras*, v.35, n.3, p.265-269, 2015.
- Camargo CE, Weiss RR, Kozicki LE, Duarte MP, Garcia Duarte MC, Lunelli D, et al.** Some factors affecting the rate of pregnancy after embryo transfer derived from the Brazilian Jumper horse breed. *J Equine Vet Sci*, v.33, n.11, p.924-929, 2013.
- Carnevale EM, Griffin PG, Ginther OJ.** Age-associated subfertility before entry of embryos into the uterus in mares. *Equine Vet J*, v.25, p.31-5, 1993.
- Carnevale EM, Ramirez RJ, Squires EL, Alvarenga MA, Vanderwall DK, McCue PM.** Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. *Theriogenology*, v.54, n.6, p.965-979, 2000.
- Cuervo-Arango J, Newcombe JR.** Cloprostenol in equine reproductive practice: something more than a luteolytic drug. *Reprod Domest Anim*, v.45, n.5, p.e8-e11, 2010.
- Cuervo-Arango J, Claes AN, Ruijter-Villani M, Stout TA.** Likelihood of pregnancy after embryo transfer is reduced in recipient mares with a short preceding oestrus. *Equine Vet J*, v.50, n.3, p.386-390, 2017.
- Davies Morel MC, Newcombe JR, Swindlehurst JC.** The effect of age on multiple ovulation rates, multiple pregnancy rates and embryonic vesicle diameter in the mare. *Theriogenology*, v.63, n.9, p.2482-2493, 2005.
- Ginther, OJ.** *Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspect*, 2nd ed. Cross Plains, WI: Equiservices Publishing, 1992.
- Ginther OJ, Gastal MO, Gastal EL, Jacob JC, Siddiqui MAR, Beg MA.** Age effects on follicle and hormone dynamics during the oestrous cycle in mares. *Reprod Fertil Dev*, v.20, n.8, p.955-963, 2008
- Ginther OJ, Gastal, MO, Gastal EL, Jacob JC, Beg MA.** Age-related dynamics of follicles and hormones during an induced ovulatory follicular wave in mares. *Theriogenology*, v.71, n.5, p.780-788, 2009.
- Gomes LPM, Gavioli D, Jacob JCF, Crespilho A M, Cardoso CE, Gomes GM.** Taxa de gestação de embriões equinos mantidos em dois meios comerciais diferentes de manutenção pós-transferência de embriões. *Revista Saúde*, v.5, p.23-27, 2014.
- Hanlon DW, Stevenson M, Evans MJ, Firth EC.** Reproductive performance of Thoroughbred mares in the Waikato region of New Zealand: 2. Multivariable analyses and sources of variation at the mare, stallion and stud farm level. *N Z Vet J*, v.60, n.6, p.335-343, 2012.
- Hinrichs KA.** Simple technique that may improve the rate of embryo recovery on uterine flushing in mares. *Theriogenology*, v.33, n.5, p.937-942, 1990.
- Hudson JJ, McCue PM.** How to increase embryo recovery rates and transfer success. In: 50th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners Proceedings... Denver, Colorado, EUA, 4-8 Dezembro, 2004. American Association of Equine Practitioners (AAEP), 2004, p.406-408.
- Hunt C, Aguilar, JJ, Sporleder C, Losinno L.** The effect of donor mare age on efficiency of a large scale embryo transfer programme. In: 21st Annual Meeting AETE, 2005, Keszthely, Hungary. Keszthely: AETE, p.146, 2005a.
- Hunt C, Aguilar JJ, Sporleder C, Losinno L.** Double ovulations: frequency and impact on efficiency in a commercial embryo transfer programme. In: 21st Annual Meeting AETE, 2005, Keszthely, Hungary. Keszthely: AETE, p.148, 2005b.
- Jacob JCF, Santos GO, Oliveira JP, Gastal MO, Gastal EL.** Evaluation of reproductive parameters in a commercial equine embryo transfer program. *Anim Reprod Sci*, v.121, p.305-306, 2010.
- Jacob JCF, Haag KT, Santos GO, Oliveira JP, Gastal, MO, Gastal, EL.** Effect of embryo age and recipient asynchrony on pregnancy rates in commercial equine embryo transfer program. *Theriogenology*, v.77, n.6, p.1159-1166, 2012.
- Kelley DE, Gibbons JR, Smith R, Vernon KL, Pratt-Phillip SE, Mortensen CJ.** Exercise affects both ovarian follicular dynamics and hormone concentrations in mares. *Theriogenology*, v.76, n.4, p.615-622, 2011.
- Losinno, L, Aguilar, JJ, Lisa, H.** Impact of multiple ovulations in a commercial equine embryo transfer program. *Havemeyer Found Monogr Ser*, v.3, 8-83, 2000.
- Losinno L, Alonso C, Rodrigues P, Douglas R.** Ovulation and embryo recovery rates in young and aged mares treated with hCG or Deslorelin. In: 7th International Symposium on equine embryo transfer Proceedings... Cambridge UK, 2008. p.96-97. (Abstract).
- Losinno L, Urosevic IM.** Equine embryo transfer. Technical and practical considerations for application on horse production programs. In: 19th International Congress on Biotechnology in Animal Reproduction (ICBAR). Proceedings... Novi Sad, Serbia, p.23-30, 2015.
- Marinone A.I., Losinno L.b, Fumuso E., Rodríguez E.M., Redolattia, C., Cantatore S., Cuervo-Arango J.** The effect of mare's age on multiple ovulation rate, embryo recovery, post-transfer pregnancy rate, and interovulatory interval in a commercial embryo transfer program in Argentina. *Anim Reprod Sci*, v.158, p.53-59, 2015.
- McCue PM.** Embryo recovery procedures and collection success: results of 492 embryo-flush attempts, In: Annual Convention of the AAEP. Proceedings... 2010, p.318-321.
- Mortensen CJ, Choy YJ, Hinrichs K, Ing NH, Kraemer DC, Vogelsang SG, Vogelsang MM.** Embryo recovery from exercised mares. *Anim Reprod Sci*, v.110, n.3-4, p.237-244, 2009.



- Nagao JF, Neves Neto JR, Papa FO, Alvarenga MA, Freitas-Dell'Aqua CP, Junior JA.** Induction of double ovulation in mares using deslorelin acetate. *Anim Reprod Sci*, v.136, p.69-73, 2012.
- Neto IVO, Canisso IF, Segabinazzi LG, Dell'Aqua CPF, Alvarenga MA, Papa FO, Dell'Aqua JA Jr. JA.** Synchronization of cyclic and acyclic embryo recipient mares with donor mares. *Anim Reprod Sci*, v.190, p.1-9, 2018.
- Oliveira JP, Jacob JCF, Jesus VLT, Silva PCA.** Influência da temperatura e umidade ambiente em um programa de transferência de embriões equinos, na Baixada Fluminense, Rio de Janeiro. *Rev Bras Med Vet*, v.37, n.2, p.158-162, 2015.
- Panzani D, Vannozzi I, Marmorini P, Rota A, Camillo F.** Factors Affecting Recipients' Pregnancy, Pregnancy Loss, and Foaling Rates in a Commercial Equine Embryo Transfer Program. *J Equine Vet Sci*, v.37, p.17-23, 2016.
- Pessoa MA, Cannizza AP, Righini MFS, Alvarenga MA.** Embryo Transfer Efficiency of Quarter Horse Athletic Mares. *J Equine Vet Sci*, 31, 703-705, 2011.
- Pinto MR, Miragaya MH, Burns P, Douglas, R, Neild, DM.** Strategies for Increasing Reproductive Efficiency in a Commercial Embryo Transfer Program With High Performance Donor Mares Under Training. *J Equine Vet Sci*, v.54, p.93-97, 2017.
- Rodrigues TG, Caiado JRC, Fagundes B, Silva JFS.** Uso de progesterona de longa ação e inováção de éguas no segundo dia após a ovulação. *Acta Biomedica Brasiliensia*. v.3, n.1, p.14-26, 2012.
- Sá MAF, Santos GO, Bezerra LL, Moreno1 MP, Barbosa CG, Alvarenga MA, Jacob JCF.** Use of Equine Pituitary Extract (EPE) in low doses to induce double ovulation in mares. *Braz J Vet Med*, v.39, n.2, p.115-119, 2017.
- Segabinazzi LG, Steigleder LF, Kaipper R, Rodrigues TS, Aragão O, Dell'Aqua Jr JA, Alvarenga MA.** Indução de múltiplas ovulações em éguas com baixas doses de acetato de deslorelina sem acompanhamento folicular prévio. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer*, v.11, p.1488-1494, 2015.
- Sertich PL.** Transcervical embryo transfer in performance mares. *J Am Vet Med Assoc*, v.195, n.7, p.940-944, 1989.
- Silva PCA, Oliveira JP, Sá MAF, Paiva SO, Caram DF, Junqueira RGC, Jacob JCF.** Comparação entre dois agentes indutores da ovulação em éguas. *Rev Bras Med Vet*, v.38, p.45-48, 2016.
- Smith RL, Vernon KL, Kelley DE, Gibbons JR, Mortensen CJ.** Impact of moderate exercise on ovarian blood and early embryonic outcomes in mares. *J Anim Sci*, v.90, n.11, p.3770-3777, 2012
- Squires EL, McCue PM, Vanderwall D.** The current status of equine embryo transfer. *Theriogenology*, v.51, n.1, p.91-104, 1999.
- Squires EL, Carnevale EM, McCue PM, Bruemmer JE.** Embryo technologies in the horse. *Theriogenology*, v.59, p.151-70, 2003.
- Vazquez JJ, Garcia A, Kass PH, Liu IKM, Ball BA.** Influence of environmental temperature, exercise, semen type and ovulation characteristics on reproductive performance in a commercial embryo transfer program. *Anim Reprod Sci*, v.121S, p.284-5, 2010.
- Voge JL, Sudderth AK, Brinsko SP, Burns PJ, Blanchard TL.** Comparison of efficacy of two dose rates of histrelin to human chorionic gonadotropin for inducing ovulation in broodmares. *J Equine Vet Sci*, v.32, n.4, p.208-210, 2012.
-