

COMPARAÇÃO ENTRE DOIS MEIOS PARA TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM ÉGUAS DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR

JOSÉ RENATO COSTA CAIADO,¹ MAURICIO FRAGA VAN TILBURG,² FRANCISCO ALOÍSIO FONSECA,³ JOSÉ FREDERICO STRAGGIOTTI SILVA,⁴ BRUNO FAGUNDES⁵ E MARCUS ANTÔNIO PESSANHA BARRETO⁶

1. Doutor em Produção Animal, LSA-CCTA-UENF. E-mail: jrcaiado@hotmail.com

2. Doutor em Produção Animal na área de Biotecnologia da Reprodução, LRMGA, CCTA, UENF. E-mail: mauricio_van_tilburg@yahoo.com.br

3. Professor doutor associado, LZNA, CCTA, UENF. E-mail: ffonseca@uenf.br

4. Professor doutor associado, LRMGA, CCTA, UENF. E-mail: straggio@uenf.br

5. Professor doutor da UNIG. E-mail: b.fagundes@yahoo.com.br

6. Doutor em Produção Animal, LRMGA, CCTA, UENT. E-mail: marcusvet@uenf.br

RESUMO

Diferentes tampões são utilizados nos meios de lavagem e manutenção embrionária durante os procedimentos de transferência de embriões em equinos (TEE). Os mais usados são carbonato, fosfato e zwitteriônico. Durante os procedimentos de transferência é comum que o embrião permaneça por um tempo maior que o previsto em espera no meio de manutenção utilizado. Este experimento foi realizado com o objetivo de comparar o custo-benefício de dois meios contendo tampões diferentes DPBS (fosfato) e Embriocare® (zwitteriônico), na transferência de embriões em éguas da raça Mangalarga Marchador. Dividiram-se os embriões aleatoriamente em dois tratamentos – zwitteriônico e fosfato –, permanecendo em descanso por 0, 30, 60 ou 120

minutos em ambos os meios. Os resultados indicam que esses tampões são igualmente eficientes ($P > 0,05$) nos processos de rastreamento, lavagem, manutenção à temperatura ambiente por diferentes períodos de tempo (0 a 120 minutos), sendo que as taxas de prenhez obtidas em ambiente tropical foram de 65% e de 69,7%, respectivamente. Porém, obteve-se a maior taxa de prenhez encontrada com DPBS com um tempo de manutenção do embrião por sessenta minutos no meio ($P < 0,05$). No tampão zwitteriônico, a maior taxa de prenhez foi alcançada com trinta minutos no meio ($P < 0,05$). Como a aquisição do Embriocare® foi mais onerosa, o DPBS apresentou o melhor custo-benefício.

PALAVRAS-CHAVES: Equino, Mangalarga Marchador, transferência de embriões, tampão fosfato e zwitteriônico.

ABSTRACT

COMPARISON BETWEEN TWO MEDIUM FOR EMBRYO TRANSFER IN MARES FROM MANGALARGA MARCHADOR BREED

Different buffers are used in the solution for washing and embryo maintenance during the procedures of equine embryo transfer (EET). The buffers carbonate, phosphate, and zwitterionic are the most used. During the procedures of transference, it is common to keep the embryos into the maintenance solution during a time longer than previewed. This experiment was realized with the objective of comparing the costs and benefits of using two solutions with different buffers for embryo transfer in mares of the breeding

Mangalarga Marchador. The solutions are DPBS (phosphate) and Embriocare® (zwitterionic). The embryos were divided randomly in two treatment, zwitterionic and phosphate, and kept in the solution for 0, 30, 60, and 120 minutes. The results indicate that both solutions are efficient ($P > 0.05$) in the processes of scanning, washing, maintenance at ambient temperature for different time periods (0 to 120 minutes), and in ovulation of equine embryos under tropical conditions. The pregnancy rates using the solution were 65% and 69.7%.

The greatest pregnancy rate using DPBS was obtained with embryos kept in the solution for 60 minutes ($P < 0.05$). Using zwitterionic buffer, the greatest rate of pregnancy

was obtained with embryos kept during 30 minutes in the solution ($P < 0.05$). Since Embriocare® is more expensive, DPBS presented the best cost-benefit ratio.

KEY WORDS: Embryo transfer, equine, Mangalarga Marchador, phosphate and zwitterionic buffer.

INTRODUÇÃO

É notório o crescimento nos últimos anos pelo interesse no uso da TE (transferência de embriões) na indústria do cavalo. Hoje, a quase totalidade das associações de criadores de cavalos reconhece os benefícios da técnica, permitindo o uso da TE (LOSINNO, 2006).

Durante o processo de transferência de embriões a fresco em equinos, é comum que os embriões permaneçam no meio de manutenção por períodos acima do tempo inicialmente previsto, que é de aproximadamente quinze minutos, antes da inovulação. Esse é o tempo necessário para os processos de rasteamento, lavagem e envasamento do embrião. Contudo, em muitas situações, a receptora escolhida para ser inovulada é rejeitada, por não entrar no tronco de contenção, por apresentar tortuosidades no canal cervical que impedem sua penetração pelo instrumento inovulador, por temperamento agressivo ou outras situações inusitadas, ou por se encontrar em local diferente da doadora, a uma distância que não justifique o resfriamento do embrião, obrigando a permanência deste, no meio de manutenção, por um período de tempo maior que o desejado.

Diferentes meios foram utilizados pelos veterinários que praticam a transferência de embriões em equinos no Brasil, objetivando manutenção, manipulação e inovulação. Dentre esses, destacam-se os que apresentam tampão bicarbonato, fosfato e zwitteriônico. A solução de Ham's F10, a solução fosfato tamponada modificada por Dulbeco (DPBS) e o Embriocare® são constituídos, respectivamente, por esses tampões citados.

Os meios tamponados por bicarbonato requerem atmosfera gasosa (5% CO₂, 5% O₂ e 90% N₂) para manterem estabilidade tamponante (CARNEVALE et al., 2000), dificultando muito seu uso, na rotina de transferência de embriões a campo. Os meios tamponados por fosfato e

tampão zwitteriônico não requerem esse artifício, sendo mais utilizados e, por isso, testados neste experimento.

Por definição, *zwitterion* é um íon que apresenta cargas positiva e negativa no mesmo grupo de átomos, podendo ser formado por compostos que contêm grupos ácidos e básicos. Juntos, são internamente neutralizados e, então, metabolicamente inertes. Um exemplo de tampão do grupo zwitteriônico é o tampão Hepes (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico).

Os primeiros tampões biológicos estudados foram misturas de sais inorgânicos, tamponados com grandes quantidades de fosfato e bicarbonato de sódio (GONÇALVES et al., 2001). GOOD et al. (1966) desenvolveram o Hepes, tampão orgânico para pesquisas biológicas que mantém o pH de maneira mais eficiente e mais constante que a utilização única de bicarbonato. Além disso, apresenta máxima solubilidade em água, dificuldade em atravessar a membrana celular, não forma complexo com substâncias biológicas, tem baixa toxicidade e não age como inibidor em reações bioquímicas. NELSON & NELSON (2001) apontaram o Hepes como um sistema tampão eficiente e estável em atmosfera de oxigênio.

A solução tamponada por fosfato, modificada por Dulbeco (DPBS), foi utilizada por vários pesquisadores na transferência de embriões em equinos, como SQUIRES (1995), EAST et al. (1999) e MCKINNON (1999), acrescentando-se que, se o embrião for inovulado em tempo inferior a uma hora, poderá permanecer à temperatura ambiente em DPBS + 10% SFB. Havendo necessidade de um tempo maior de armazenamento, os autores recomendam a utilização de Ham's F10 em atmosfera de CO₂. CARNEY et al. (1991), ALVARENGA et al. (1993), PASHEN et al. (1993), CARVALHO (2000) e CAIADO (2005) também utilizaram, com sucesso, o DPBS com SFB ou BSA (albumina sérica bovina) em diferentes eta-

pas da TEE. FLEURY (1998b) obteve uma taxa de gestação de 73,3% quando utilizou embriões transportados em temperatura ambiente (23 a 35°C), por um período máximo de sessenta minutos, envoltos em meio DPBS.

CARNEVALE et al. (1987) compararam a taxa de prenhez aos quatorze dias, de éguas inovuladas com embriões resfriados a 5°C, em Ham's F10 com atmosfera CO₂ (5% CO₂, 5% O₂ e 90% N₂) ou tampão Hepes, relatando uma taxa de prenhez maior (70% *versus* 20%) quando o meio utilizado foi o Ham's F10 em atmosfera de CO₂. Entretanto, FLEURY et al. (2002) utilizaram o meio Ham's F-10 modificado com tampão Hepes, na transferência não cirúrgica de embriões equinos, a fresco e resfriados por até dezoito horas, com diferentes diâmetros, obtendo taxa de prenhez em torno de 75%.

Os meios que utilizam tampão Hepes ou zwitteriônico têm sido os mais utilizados em substituição ao DPBS, na indústria de transferência de embriões em bovinos nos Estados Unidos da América (NELSON & NELSON, 2001). O tampão zwitteriônico não atravessa a barreira celular, estabiliza a zona pelúcida e previne uma possível inibição do desenvolvimento que pode ser causada pelo tampão fosfato (SESHAGIRI et al., 1991).

BARROS & BENYEI (2000) compararam os resultados, na transferência e armazenamento de embriões bovinos, de dois meios contendo diferentes tampões: fosfato e zwitteriônico, em ambiente tropical. Concluíram que não existiu diferença significativa na taxa de prenhez em vacas que foram inovuladas com embriões a fresco, mantidos em um ou outro meio. Porém, afirmaram que somente o tampão zwitteriônico pode ser utilizado para embriões destinados ao congelamento, graças ao seu maior poder tamponante.

Diversos trabalhos na área de biotécnicas da reprodução têm usado e comparado o efeito do tampão zwitteriônico com outros comumente utilizados. WALKER et al. (1989) estudaram a substituição de bicarbonato por Hepes, em quantidades crescentes de 0; 6,25; 12,5; 18,75 e 25 mM, no meio de cultivo de embriões ovinos, comprovando um efeito adicional na capacidade tamponante, porém relatando um aumento de danos aos

blastocistos em concentrações superiores a 12,5 mM. MOUSSA et al. (2002), em comparação das taxas de prenhez e o número de células mortas, em embriões equinos resfriados por 24 horas, em meio contendo tampão bicarbonato ou zwitteriônico, concluíram que não houve diferença significativa entre os meios, nem na taxa de prenhez após transferência nem no número de células mortas, após o tempo de cultivo. MOUSSA et al. (2003a), em estudo da viabilidade e do índice de apoptose, em embriões equinos estocados sob meios tamponados com bicarbonato e zwitteriônico, concluíram que não houve diferença significativa no índice de apoptose e células mortas, nos dois diferentes meios.

DONNISON et al. (1996), analisando o desenvolvimento embrionário e o incremento do metabolismo, de blastocistos bovinos cultivados por 24 ou 48 horas, sob temperatura de 25°C, em dois diferentes meios contendo tampões fosfato ou zwitteriônico, apontam uma maior viabilidade embrionária e aumento na taxa metabólica (incremento na produção de CO₂) em embriões mantidos em meio com tampão zwitteriônico. MOUSSA et al. (2003b) também compararam três diferentes meios, objetivando resfriamento de embriões equinos, com dois diferentes tampões: bicarbonato (Ham's F10) e zwitteriônico (Emcare® e ViGro holding plus®), observando que os meios com tampão zwitteriônico não apresentaram diferença estatística quando comparados ao meio com tampão bicarbonato, na taxa de prenhez e na quantidade de células mortas após período de resfriamento. Também demonstraram que embriões maiores que 400 µm podem ter uma maior viabilidade após 24 horas de resfriamento que os menores de 400 µm, por apresentarem, significativamente, um número menor de células mortas.

RUBIO POMAR et al. (2004) relataram que embriões de suínos armazenados por 24 horas em meio com tampão zwitteriônico (Emcare®) apresentaram, significativamente, menores danos que os armazenados em meios com tampão fosfato (DPBS e TCM 199). No mesmo experimento, os embriões maiores (cinco dias *versus* quatro dias) e os que foram incubados a temperaturas mais altas (36°C *versus* 18 e 25°C) também apresenta-

ram, significativamente, maiores danos e maior quantidade de embriões degenerados, em ambos os meios.

COUTINHO da SILVA et al. (2002) utilizaram o Emcare® no *flushing* de folículos de éguas doadoras de ovócitos, nos dez minutos finais de cultivo e como meio de transferência dos ovócitos. Quinze das dezessete receptoras destes ovócitos tornaram-se prenhes.

KEEFER et al. (2002) empregaram com sucesso o Emcare® no momento de desnudar e enuclear ovócitos, destinados à produção de cabras clonadas por transferência nuclear usando células somáticas adultas.

Os objetivos deste trabalho foram verificar a eficiência de dois meios comerciais contendo diferentes tampões – fosfato e zwitteriônico – na manutenção de embriões equinos.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido em um criatório de equinos no município de Guarapari, ES, nas estações de monta dos anos de 2006 e 2007. Utilizaram-se trinta éguas da raça Mangalarga Marchador, com idade média de dez anos e escore corporal 4 como doadoras dos embriões durante o experimento, e cento e vinte seis éguas, da mesma raça, com idade média de seis anos e escore corporal 3, como receptoras desses embriões. Elas 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.

Uma vez ao dia, no próprio brete de suplementação alimentar, as éguas foram rufiadas, examinadas por ultrassonografia do trato reprodutivo. A rufiação foi coletiva e realizada mediante utilização de um rufião equino com a genitália intacta, fértil e com boa libido, que foi conduzido próximo das fêmeas a serem rufiadas, permitindo um contato estreito entre eles, porém separados por uma cerca que impedia coberturas e coices de ambas as partes. No caso de necessidade de uma rufiação individual, o rufião era conduzido por meio de um cabresto à presença da fêmea, amarrada a um mourão, permitindo-se o contato

direto entre ambos, porém impedindo a cópula.

Procedeu-se a exames de palpação retal no próprio brete, realizados por um médico veterinário com comprovada experiência nessa atividade. Os exames de ultrassonografia foram feitos diariamente por meio de um aparelho de ultrassom Scaner-200 Vet (Pie Medical®) acoplado a um transdutor transretal linear de 7,5 MHz, observando-se o desenvolvimento folicular, a detecção da ovulação e características ultrassonográficas do aparelho genital durante o ciclo estral.

As doadoras foram inseminadas a cada 48 horas, utilizando-se sêmen fresco de um garanhão de conhecida fertilidade, a partir do dia em que se detectava a presença de um folículo dominante, com diâmetro igual ou maior que 35 mm, até a ovulação (CAIADO, 2005).

Os embriões foram coletados de forma não cirúrgica, entre os dias 6,5 e 8,5 após a ovulação da doadora (considerando-se D0 como o dia da ovulação), seguindo os procedimentos descritos por SQUIRES et al. (2003). Utilizou-se solução de Ringer com lactato de sódio como meio de coleta (ALVARENGA et al., 1993; FLEURY, 1998a; CARVALHO, 2000; CAIADO, et al., 2007). Após a passagem da sonda Bivona® pela cérvix, o balonete foi inflado com 40 cc ar, e um litro do líquido de coleta introduzido no útero por gravidade, retirado logo após massagem uterina via palpação retal, também por gravidade (Figura 1). Esse procedimento foi repetido três vezes ou até a verificação da presença do embrião no filtro coletor, no caso de embriões D8 ou mais velhos. Quando, após o rasteamento, não se localizava o embrião, repetia-se o procedimento por mais duas ou três vezes (SQUIRES et al., 2003).

Na etapa de rasteamento, realizada em placa de Petri descartável, com auxílio de microscópio estereoscópio com aumento máximo de 35 vezes, dividiram-se, aleatoriamente, os embriões encontrados em dois tratamentos. No Tratamento 1, os embriões foram rasteados, mantidos em repouso de acordo com o tratamento e inovulados em meio comercial Embriocare®, com tampão Zwitteriônico (Laboratório Cutilab, Campinas-SP. Embriocare® solução para lavagem, frasco de 50ml. Embriocare® holding plus 0,4% BSA,

frasco de 15ml). No Tratamento 2, os embriões passaram pelos mesmos procedimentos empregados no Tratamento 1, porém envoltos em meio

comercial DPBS com 0,4% de BSA, tampão fosfato (Laboratório Nutricell®, Campinas-SP, frasco com volume de 30 mL).

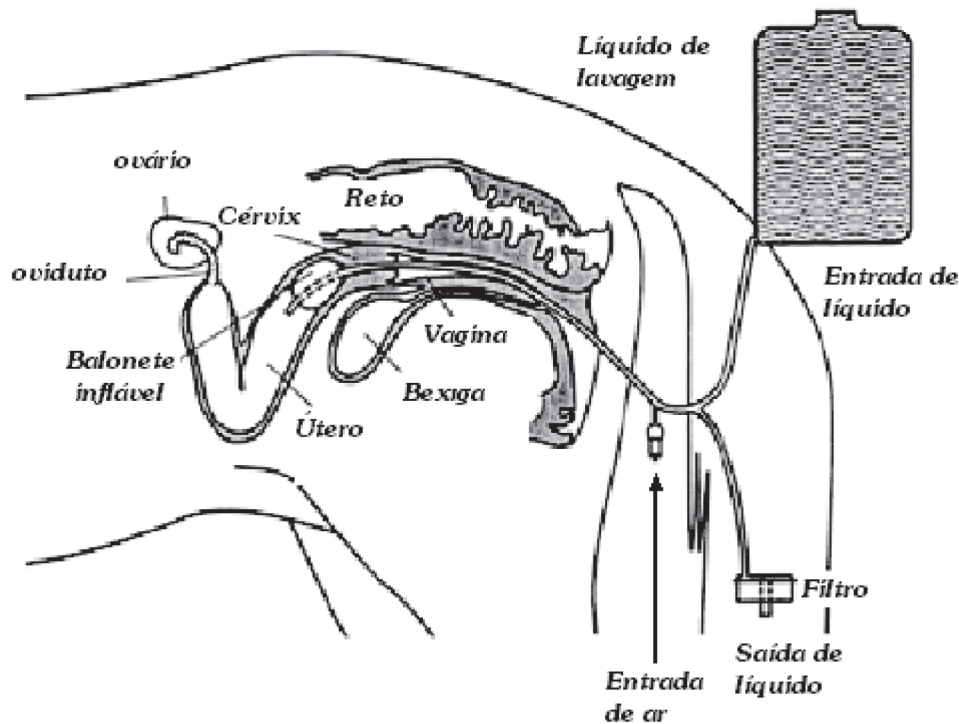


FIGURA 1. Coleta não cirúrgica de embriões em égua, com sonda de coleta já inserida no corpo uterino, após ultrapassagem da cérvix e enchimento do balonete com ar. O sistema genital feminino e a sonda de coleta ligada à solução de lavagem e ao filtro de coletor estão representados (VANDERWAL, 2000).

Em ambos os tratamentos os embriões foram submetidos a diferentes períodos de descanso:

- 0 minuto (P0): n(Tratamento 1 = 15; Tratamento 2 = 13). Os embriões foram imediatamente transferidos, logo após sua observação, classificação, lavagem e envasamento. Procedeu-se à classificação seguindo os critérios estabelecidos por MCKINNON & SQUIRES (1988) e admitindo-se para o experimento somente embriões considerados bons e excelentes.

- 30 minutos (P30): n(Tratamento 1 = 15; Tratamento 2 = 18). Os embriões permaneceram no meio em repouso por trinta minutos, logo após sua observação, classificação e lavagem. As bolhas do meio comercial, destinadas à lavagem do embrião, foram feitas de modo similar na periferia da

placa. A bolha central, com um volume dobrado, era então preparada para o período de repouso e envasamento. Durante esse período, os embriões permaneceram em placa de Petri fechada, em temperatura ambiente, no laboratório de transferência de embriões da própria fazenda, com temperaturas que variaram de 28°C a 35°C. Decorrido esse tempo, os embriões foram reclassificados, envasados e transferidos.

- 60 minutos (P60): n(Tratamento 1 = 16; Tratamento 2 = 16). Igual ao Tratamento B, exceto no tempo em que os embriões permaneceram em descanso, que neste caso foi por sessenta minutos.

- 120 minutos (P120) n(Tratamento 1 = 14; Tratamento 2 = 19). Igual ao Tratamento 2, exceto

no tempo em que os embriões permaneceram em descanso, que neste caso foi por cento e vinte minutos.

A manipulação embrionária nas diferentes etapas foi realizada com auxílio de uma palheta de 0,25 ou 0,50 ml unida a uma seringa de 1 ml, através de um adaptador. Embriões de até oito dias foram envasados em palhetas de 0,25 ml e inseridas num inovulador equino, devidamente preparado, sendo depositadas no corpo ou corno uterino de receptoras sincronizadas com as doadoras, que estivessem com um tempo de ovulação entre quatro a oito dias. Embriões maiores foram manipulados em palhetas de 0,50 ml e inovulados com auxílio de uma pipeta de inseminação (PROVAR[®], SP) da mesma forma descrita anteriormente (CAIADO, 2005).

No décimo quarto dia da ovulação da doadora, as receptoras foram submetidas à palpação retal e exame ultrassonográfico, visando diagnóstico de gestação. Diante de resultado negativo, elas voltavam para o regime de palpação de receptoras vazias, onde tinham mais uma chance de serem inovuladas. Com diagnóstico positivo, elas permaneciam no regime destinado às fêmeas gestantes.

Aplicou-se o teste do qui-quadrado para testar a hipótese de independência das variáveis tipo de meio comercial utilizado (Tratamento 1 e 2) e número de éguas gestantes e não gestantes em cada grupo. O mesmo teste estatístico foi uti-

lizado para verificar a hipótese de homogeneidade entre os períodos (P0, P30, P60 e P120), dentro de cada meio, testando se houve diferença estatística sobre a taxa de gestação após a transferência não cirúrgica dos embriões.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os embriões a serem inovulados podem ser mantidos à temperatura ambiente em meios específicos, por determinado período até o momento da transferência (Tabela 1). Foram inovulados sessenta embriões envoltos no Tratamento 1 (Embriocare[®], com tampão zwitteriônico) em receptoras da raça Mangalarga Marchador. Destes, 39 (45,88%) resultaram em gestação aos quatorze dias. A taxa de prenhez (80%), embora não estatisticamente significativa, foi observada nas éguas inovuladas com embriões tratados com o meio Embriocare[®] com trinta minutos de descanso. Observou-se taxa de 50% de prenhez para receptoras inovuladas com embriões que permaneceram cento e vinte minutos em descanso neste meio, bem aquém das taxas de transferência não cirúrgica em equinos encontrada em literatura mais recente, como relatado por SQUIRES et al. (2003), mencionando índice de prenhez entre 70% e 75%, nos dois últimos anos em seus laboratórios, e FLEURY et al. (2002), que obtiveram 73,5% a 77% de prenhez para embriões resfriados e de 75% encontrado no grupo controle de CAIADO (2005).

TABELA 1. Número de embriões inovulados e taxa de prenhez de éguas receptoras da raça Mangalarga Marchador, submetidos a diferentes períodos de descanso no Tratamento 1 (tampão zwitteriônico) e Tratamento 2 (tampão fosfato)

Número de embriões inovulados e taxa de prenhez (%)	Períodos de descanso (min.)							
	P0		P30		P60		P120	
	Tratamento		Tratamento		Tratamento		Tratamento	
	T1	T2	T1	T2	T1	T2	T1	T2
Número de embriões	15	13	15	18	16	16	14	19
Éguas gestantes (EG)	09	10	12	12	11	12	07	12
Éguas não estantes	06	03	03	06	05	04	07	07
Taxa de prenhez	60	76,90	80	66,67	68,75	75	50	63,16
Valor qui-quadrado (EG):	2,18 ^{ns}		3,36 ^{ns}		3,13 ^{ns}		0,66 ^{ns}	
Taxa de prenhez para meio (M):	1: 39/60 (65,00%)				2: 46/66 (69,70%)			
Valor qui-quadrado (M):	0,58 ^{ns}							

*Teste qui-quadrado entre tipos de problemas, significativo (GL=1, P<0,05); ns= não significativo.

No Tratamento 2 (DPBS com 0,4% de BSA, com tampão fosfato) foram utilizados 66 embriões para inovulação. Destes, 46 (69,70%) resultaram em gestação aos quatorze dias. A taxa de prenhez (75%), embora também não significativa, foi observada em receptoras com embriões que permaneceram em descanso no meio por sessenta minutos. As taxas de prenhez observadas neste grupo corroboram com aquelas encontradas na literatura, como os relatados nos trabalhos de CARNEY et al. (1991), que obtiveram taxas de prenhez de 64% a 71%, para embriões conservados à temperatura ambiente, por períodos de até sessenta minutos, em meio DPBS com 10% de SFB, e de FLEURY (1998b), que obteve uma taxa de gestação de 73,3% quando utilizou embriões transportados em temperatura ambiente (23 a 35°C), por um período máximo de sessenta minutos, envoltos em meio DPBS.

Comparando o desempenho do meio utilizado, verificou-se que o número de éguas gestantes independe do meio utilizado para manutenção dos embriões, durante os diferentes períodos de descanso. Observou-se que os embriões mantidos no Tratamento B apresentaram taxa de prenhez de 69,70%, ao passo que essa taxa foi de 65% para o Tratamento A, sendo estatisticamente iguais entre si ($X^2 = 0,58$; GL = 1; $P > 0,05$). Esses dados demonstram que ambos os tratamentos são eficientes na manutenção de embriões, por período de até vinte e vinte minutos em temperatura ambiente de clima tropical. Da mesma forma, BARROS & BENYEI (2000), trabalhando com bovinos, compararam os resultados, na transferência e armazenamento de embriões, entre dois meios contendo diferentes tampões (fosfato e zwitteriônico), em ambiente tropical, e não observaram diferença significativa na taxa de prenhez entre meios. Além disso, a taxa de gestação encontrada para ambos os meios, nos diferentes períodos de descanso, está em sintonia com aquela encontrada na literatura para transferência não cirúrgica de embriões equinos, de acordo com os trabalhos de SQUIRES et al. (2003), que relataram índice de prenhez entre 70% e 75%, nos dois últimos anos em seus laboratórios, e FLEURY et al. (2002), que obtiveram 73,5% a 77% de prenhez para embriões

resfriados, e de 75% encontrado no grupo controle de CAIADO (2005).

Os embriões utilizados neste experimento foram classificados de acordo com MCKINNON e SQUIRES (1988), antes e após serem colocados em tratamento, a fim de se assegurar a qualidade e a homogeneidade deles. Dentre os embriões utilizados no Tratamento 1, 24 (40%) foram classificados com grau 1 (excelente) e 36 (60%) com grau 2 (bom). No Tratamento 2, 32 (51,52%) embriões foram classificados com grau 1 e 34 (48,48%) com grau 2. Nos trabalhos de CARNEY et al. (1991), embriões do grau 1 e 2 apresentaram taxas de prenhez, após transferência, estatisticamente iguais entre si e significativamente maiores que os do grau três e quatro.

Na reclassificação dos embriões que permaneceram por trinta minutos em ambos os tratamentos, não se observou alteração em microscópio estereoscópico que justificasse uma mudança na classificação inicial. Dos embriões que permaneceram em descanso por sessenta minutos, nenhum no Tratamento 2 sofreu reclassificação. Porém, no Tratamento 1, dois (3,33%) embriões foram reclassificados de grau 2 para grau 3 (regular). Após a inovulação, apenas um deles resultou em prenhez aos quatorze dias. Quanto aos embriões que permaneceram cento e vinte minutos em descanso, em ambos os tratamentos foram observadas reclassificações com queda de grau. Três (5%) embriões do Tratamento 1 foram reclassificados, sendo que dois de grau 1 para grau 2 e um de grau 2 para grau 3. Após quatorze dias da ovulação da doadora, apenas um desses embriões resultou em gestação. No Tratamento 2, quatro (6,06%) embriões sofreram queda de um grau na sua primeira classificação. Dois deles tinham sido classificados como excelentes e dois como bons. Após a inovulação, apenas dois deles resultaram em gestação. MOUSSA et al. (2002), utilizando meios com tampão bicarbonato e zwitteriônico, para conservação de embriões equinos refrigerados, concluíram que o número de células mortas aumenta com acréscimos no tempo de conservação e que a qualidade dos embriões piora.

Quanto ao custo-benefício dos meios Embriocare® e DPBS+BSA, o do segundo foi melhor,

pois o preço equivalente a 20 mL do produto (Laboratório Nutricel[®], Campinas-SP), suficiente para as fases de rasteamento, lavagem, manutenção por diferentes períodos e inovulação do embrião, usado durante o experimento, foi de US\$ 7,63 (dólares americanos), em 11 de julho de 2008 (cotado a R\$ 1,60). Já o preço, na mesma data, de um frasco de 15 ml de Embriocare[®] solução de lavagem, utilizado na fase de rasteamento, foi de US\$ 4,93. O preço de um frasco de 15 ml de Embriocare Holding Plus[®] 0,4% BSA, utilizado nas fases de lavagem, manutenção por diferentes períodos e inovulação foi de R\$ 20,60 ou US\$ 12,87, perfazendo um total de R\$ 28,49 ou US\$ 17,81 por transferência.

Pelos trabalhos consultados na literatura, esperava-se um melhor resultado com o tampão zwitteriônico que com o tampão fosfato. Contudo, neste trabalho, ambos se mostraram com igual eficiência na manutenção por períodos de até duas horas, seguida de transferência de embriões equinos, em ambiente tropical.

CONCLUSÃO

Ambos os meios Embriocare[®] e DPBS com 0,4% BSA são igualmente eficientes na manutenção de embriões equinos, à temperatura ambiente entre 25°C e 35°C, por períodos de até sessenta minutos, podendo chegar a cento e vinte minutos, seguida de transferência não cirúrgica. Contudo, percebeu-se uma queda na qualidade dos embriões quando estes permaneceram em descanso no meio entre sessenta e cento e vinte minutos, embora estatisticamente não significativa. O meio DPBS com 0,4% BSA apresentou o melhor custo-benefício, ou seja, apresentou mesma eficiência do Embriocare[®] por um preço mais baixo.

REFERÊNCIAS

ALVARENGA, M. A.; LANDIN ALVARENGA, F. C.; MEIRA, C. Modification in the technique used to recovered equine embryos. **Equine Veterinary Journal**, Suppl., v. 15, p.111-112, 1993.

BARROS, C.W.C.; BÉNYEI, B. Comparison between zwitterion and phosphate buffer-based bovine embryo

handing solutions for embryo storage and transfer in a tropical environment. **Theriogenology** v. 53, p. 308, 2000.

CAIADO, J. R. C.; FONSECA, F. A.; SILVA, J. F. S.; FONTES, R. S.; CAIADO, J. C. C. 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. 1-2, p. 11-15, 2005.

CAIADO, J. R. C.; FONSECA, F. A.; SILVA, J. F. S.; FONTES, R. S. Tratamento de éguas receptoras de embriões visando sua utilização no segundo dia pós-ovulação **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, p. 360-368, 2007.

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

CARNEVALE, E.M.; SQUIRES, E.L.; MCKINNON, A. O. Comparison of Ham's F10) with CO₂ or Hepes buffer for storage of equine embryos at 5° C for 24h. **Journal Animal Science**, v. 65, p. 1775-1781, 1987.

CARNEY, N. J.; SQUIRES, E. L.; COOK, V. M.; SEIDEL, G. E.; JASKO, D. J. Comparison of pregnancy rates from transfer of fresh *versus* cooled transported equine embryos. **Theriogenology**, v. 36, n. 1, p. 23-31, 1991.

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

COUTINHO da SILVA, M. A.; CARNEVALE, E. M.; MACLELLAN, L.J.; SEIDEL JR., G.E.; SQUIRES, E.L. Effect of time of oocyte collection and site of insemination on oocyte transfer in mares. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 1275-1279, 2002.

DONNISON, M.; SIMMONS, M.; THOMPSON, J. G. Increased embryo development and metabolism following short term storage of bovine IVP blastocysts at 25° C in Emcare compared to ovum culture medium. **Theriogenology**, v. 45, n.1 , p. 214, 1996.

EAST, L. M.; VAN SAUN, R. J.; VANDERWALL, D. K. A review of the technique and 1997 practitioner-based equine embryo transfer. **Equine Practice**, v. 21, n. 1, p. 8-12, 1999.

FLEURY, J. J. O dia da colheita na taxa de recuperação embrionária em uma central de transferência de embriões

particular. **Arquivos da Faculdade de Veterinária**, UFRGS, v. 26, n. 1, p. 268, 1998a.

FLEURY, J. J. Transferência não cirúrgica de embriões eqüinos colhidos no oitavo dia após a ovulação. **Arquivos da Faculdade de Veterinária**, UFRGS, v. 26, n. 1, p. 264, 1998b.

FLEURY, J. J.; FLEURY, P. D. C.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. Effect of embryo diameter and storage period on pregnancy rates obtained with equine embryos stored in Ham's F-10 with Hepes Buffer at a temperature of 15-18°C: preliminary results. **Theriogenology**, v. 58, p. 749-750, 2002.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Livraria Varela, 2001. 340 p.

GOOD, N. E.; WINGET, G. D.; CONOLLY, T. N.; IZAWA, S.; SINGH, R.M.M. Hydrogen ion buffers for biological research. **Biochemistry**, v. 5, p. 467-477, 1966.

KEEFER, C.L.; KEYSTON, R.; LAZARIS, A.; BHATIA, B.; NBEGIN, I.; BILODEAU, A.S.; ZHOU, F. J.; KAFIDI, N. WANG, B.; BALDASSARRE, H.; KARATZAS, C. N. Production of cloned goats after nuclear transfer using adult somatic cells. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 199-203, 2002.

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

MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L. Morphologic assessment of the equine embryo. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 192, n. 3, p. 401-406, 1988.

MCKINNON, A. O. Breeding and its technology: now and the future. In: WORLD TROTting CONFERENCE PAPERS, 1999. Disponível em: <http://www.harness.org.au/99wldcon/PMCKINN5.HTM>. Acesso em: 15 dez. 2004. 24 p.

MOUSSA, M.; DUCHAMP, G.; MAHLA, R.; BRUYAS, J. F.; DAELS, P. F. Comparison of pregnancy rates for equine embryos cooled for 24 h in Ham's F10 and Emcare holding solutions. **Theriogenology**, v. 58, p. 755-757, 2002.

MOUSSA, M.; TREMOLEDA, J. L.; DUCHAMP, G.; BRUYAS, J. F.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M.; DAELS, P. F. Evaluation of viability and apoptosis in

horse embryos stored under different conditions at 5°C. **Theriogenology**, v. 61, n. 5, p. 921-932, 2003a.

MOUSSA, M.; DUCHAMP, G.; MAHLA, R.; BRUYAS, J. F.; DAELS, P. F. *In vitro in vivo* comparison of ham's F10, Emcare holding solution and ViGro holding plus for the cooled storage of equine embryos. **Theriogenology**, v. 59, p. 1615-1625, 2003b.

NELSON, L.D.; NELSON, C.F. Handling and culture of bovine embryos: survey of media used by 26 embryo transfer companies in the USA. **Theriogenology**, v. 56, p. 1377- 1382, 2001.

PASHEN, R. L.; LACOMBES, F. A.; DARROW, M. D. The application of embryo transfer to polo ponies in Argentina. **Equine Veterinary Journal**, v. 15, Suppl., p. 119-121, 1993.

RUBIO POMAR, F. J.; DUCRO-STEVERINK, D. W. B.; HAZALENGER, W.; TEEERDS, K. J.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M. Development, DNA fragmentation and cell death in porcine embryos after 24h storage under different conditions. **Theriogenology**, v. 61, p. 147-158, 2004.

SESHAGIRI, P. B.; BAVISTER, B. D. Glucose and phosphate inhibit respiration and oxidative metabolism in cultured hamster eight-cell embryos: evidence for the "crabtree effect". **Molecular Reproduction and Development**, v. 30, p. 105-111, 1991.

SQUIRES, E. L. Equine embryo transfer and shipping of equine embryos. **Ars Veterinária**, v. 11, n. 2, p. 68-75, 1995.

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.; BRUEMMER, J. E. Embryo technologies in the horse. **Theriogenology**, v. 59, p. 151-170, 2003.

VANDERWALL, D. Current embryo transfer techniques: recent advances in equine reproduction, 2000. Disponível em: <http://www.ivis.org/advances/reproduction-Ball/embryo-transfer-vanderwall/chapter-frm.asp?LA=1>. Acesso em: 14 dez. 2004.

WALKER, S. K.; LAMPE, R. J.; SEAMARK, R. F. Culture of sheep zygotes in synthetic oviduct fluid medium with different concentrations of sodium bicarbonate and Hepes. **Theriogenology**, v. 32, n. 5, p. 797-804, 1989.