

UFRRJ
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

DISSERTAÇÃO

Eficiência Reprodutiva de Éguas Assintomáticas Portadoras de *Theileria equi* Submetidas a um Programa de Transferência de Embrião.

Luciana de Lima Bezerra

2011



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE ZOOTECNIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO ZOOTECNIA

**EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DE ÉGUAS ASSINTOMÁTICAS PORTADORAS DE
THEILERIA EQUI SUBMETIDAS A UM PROGRAMA DE TRANSFERÊNCIA DE
EMBRIÃO**

LUCIANA DE LIMA BEZERRA

Sob a orientação do Professor

Dr. Júlio Cesar Ferraz Jacob

e Co-orientação do Professor

Dr. Carlos Luiz Massard

Dissertação submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Mestre em
Zootecnia**, no Curso de Pós-graduação em
Zootecnia, Área de Concentração em Nutrição
e Produção de Monogástricos

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2011

*“Sofremos muito com o pouco que nos falta e
gozamos pouco o muito que temos”
WILLIAM SHAKESPEARE.*

*“Quando você quer alguma coisa,
todo o universo conspira
para que você realize o seu desejo”.*
PAULO COELHO.

*Aos meus pais
Bezerra e Isaira
À minha irmã Ana e tia Maria
Pelo amor, carinho, incentivo e
compreensão em todos os momentos difíceis
Aos meus amigos
Pelo companheirismo que tiveram comigo e
Aos animais
Inspiração profissional
Dedico*

AGRADECIMENTOS

A DEUS, por me proporcionar força, saúde e equilíbrio nos momentos difíceis.

À UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO, por me proporcionar os melhores anos da minha vida, momentos inesquecíveis, grandes amigos e mega eventos.

Ao Professor Dr. JÚLIO CESAR FERRAZ JACOB, pela oportunidade, ensinamentos e orientação.

Ao Professor Dr. CARLOS LUIZ MASSARD pela co-orientação, apoio durante essa etapa em minha vida.

Aos Professores Dr. FABIO BARBOUR SCOTT e Professora Dr. KATHERINA COUMENDOUROS pela amizade, ensinamentos, confiança, carinho e ajuda em todos os momentos desde a graduação até hoje.

Aos professores Dr. MARCO MELLO BOURG, JOSÉ EUGÊNIO TRÊS e VERA JESUS pelo carinho, atenção, apoio e orientação.

Ao Curso de Pós-graduação em Zootecnia, bem como o corpo docente dos cursos de graduação em Zootecnia e Medicina Veterinária pelo aprendizado e apoio durante a realização deste trabalho.

Aos meus pais JOSÉ FERNANDES BEZERRA e ISAIRA ROSA DE LIMA BEZERRA, a minha irmã ANA LUCIA, TIA MARIA, TIA LEDA e MONICA pelo incentivo, carinho, amor e dedicação incondicional em todos os dias da minha vida.

À amiga THAÍS RIBEIRO CORREIA AZEVEDO, pela amizade, orientação, compreensão, apoio e incentivo.

Aos amigos do Laboratório de Hemoparasitos e Vetores HUARRISSOM, ISABELE, MARCOS e ÉRICA pela ajuda e paciência nos momentos difíceis.

Aos amigos PAULA, VIVIANE, PEDRO IVAN e MARCUS SÁ pelo companheirismo, paciência, amizade, ajuda e compreensão.

Aos amigos (a)s do LQEPV, FRANCISCO, FABRÍCIO, PEDRO, THIAGO, FELIPE, CRISTIANO, CASSIO, JULIO, RAQUEL, VANESSA, YARA, CLARA, MILENA, THAIS, GABRIELA, CAMILA pela compreensão, companheirismo, amizade, carinho e incentivo.

Aos amigos do Departamento de Reprodução, JHONNATHA, GABRIEL, SAVIO, RENATO, DIOGO, MARCELA E RITA por terem tornado o trabalho mais suave e gratificante.

Aos amigos do condomínio JULIANA, ALANA, MIRZA, CARINA, CARLOS e WAGNER por todo companheirismo, incentivo, amizade e apoio técnico.

Aos amigos VANESSA, ALLAN e LEONARDO por fazerem parte da minha vida, sempre companheiros e prestativos durante muitos anos.

Aos animais que participaram da parte experimental, pois sem eles todo o trabalho não teria sido realizado, e, a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

RESUMO

BEZERRA, Luciana de Lima. **Eficiência reprodutiva em éguas assintomáticas portadoras de *Theileria equi* submetidas a um programa de transferência de embrião.** 97p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011. Nutrição e Produção de Monogástricos.

Este estudo teve por objetivo avaliar a influência da babesiose nas taxas de recuperação embrionária, gestação e perda embrionária precoce. O projeto foi realizado em uma Central Comercial de Transferência de Embrião, situado no Município de Itaguaí, e em dois haras no município de Seropédica- RJ. Foram utilizadas 13 doadoras e 40 receptoras de embrião da raça Mangalarga Marchador, positivas para *Theileria equi* através do método de nested-PCR. Nas éguas doadoras foram realizados duas coletas de embriões em dois ciclo estrais consecutivos (GIId), em sequência, esses mesmos animais foram tratados com dipropionato de imidocarb (1,2 mg/kg IM.) para realização de mais duas coletas de embriões em dois ciclos estrais (GIIId). As receptoras de embrião foram divididas em dois grupos de 20 animais cada, onde um grupo foi o controle (GIr) e, o outro grupo, foi tratado (GIIr) com 1,2 mg/ Kg IM de dipropionato de imidocarb, com intuito de avaliar a taxa de gestação aos 15, 30, 45 e 60 dias. As éguas doadoras apresentaram eritrograma normal antes e após o tratamento com dipropionato de imidocarb, e em relação ao leucograma, apresentaram diminuição na contagem de leucócitos e neutrófilos totais e discreto aumento de linfócitos e monócitos somente após o tratamento. As receptoras apresentaram eritrograma e leucograma normal antes e após o tratamento com dipropionato de imidocarb. Após a realização de 52 coletas de embrião, a taxa de recuperação embrionária foi 53,84% (14/26) e 65,38% (17/26) ($p > 0,05$) para GIId e GIIId respectivamente. A taxa de gestação foi de 70% (14/20) ($p > 0,05$) aos 15, 30, 45 e 60 dias no grupo GIr e para o GIIr foi 85% (17/20) ($p > 0,05$) aos 15 dias, 80% (16/20) ($p > 0,05$) aos 30, 45 e 60 dias. O tratamento com dipropionato de imidocarb na forma como foi realizado não promoveu melhora significativa na eficiência reprodutiva em um programa de TE.

Palavras-chave: Biotecnologia, Babesiose, Nested-PCR, éguas.

ABSTRACT

BEZERRA, Luciana de Lima. **Reproductive efficiency in mares with asymptomatic for *Theileria equi* undergo a program for embryo transfer**. P97. (Master Science in Zootecnia,). Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011, Monogastric nutrition and production.

This study aimed to evaluate the influence of babesiosis in embryo recovery rates, early pregnancy and embryonic loss. The project was carried out in a Central Commercial Embryo Transfer, located in the city of Itaguaí, and two farms in the county of Seropédica-RJ, using animals from the same breed (Mangalarga Marchador). The 13 donors and 40 recipients used in this experiment were positive for *Theileria equi* confirmed by nested-PCR method. Two embryo collections were performed in donor mares in two consecutive estrous cycles (GID), in sequence these same animals were treated with imidocarb dipropionate (1.2 mg / kg IM.) in order to conduct two more embryo collections in two estrous cycles (GIId). The embryo recipients were divided into two groups of 20 animals each, where one was the control group (IRG), and the other group was treated (GIIr) with 1.2 mg / kg IM imidocarb dipropionate, with the aim of evaluating pregnancy rate at 15, 30, 45 and 60 days. The embryo donor mares had normal erythrocyte before and after treatment with imidocarb dipropionate. Concerning WBC, the embryo donors showed a decrease in the count of total leukocytes and neutrophils after treatment and a slight increase of lymphocytes and monocytes after treatment. The embryo recipients showed normal erythrocyte and leukocyte counts before and after the treatment with imidocarb dipropionate. After 52 embryo collections performed, embryo recovery rate was 53.84% (14/26) and 65.38% (17/26) ($p > 0,05$) for GID and GIId respectively. The pregnancy rate was 70% (14/20) ($p > 0,05$) at 15, 30, 45 and 60 days in the Gir and the GIId was 85% (17/20) ($p > 0,05$) at 15 days, 80% (16/20) ($p > 0,05$) at 30, 45 and 60 days. Treatment with imidocarb dipropionate did not improve significantly the reproductive efficiency in an ET program.

Keywords: biotechnology, Babesiosis, nested PCR, mares.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Detecção de DNA de <i>Theileria equi</i> pelo nested PCR, em amostras de sangue de éguas doadoras de embrião naturalmente infectadas, antes e após tratamento com dipropionato de imidocarb.....	25
Tabela 2. Detecção de DNA de <i>Theileria equi</i> pelo nested PCR, em amostras de sangue de receptoras de embrião naturalmente infectadas não tratadas e tratadas com dipropionato de imidocarb no início e final do experimento.....	25
Tabela 3. Valores de média e desvio padrão dos parâmetros hematológicos (Hemácias, Hematócrito, Hemoglobina, Volume Globular Médio (VGM), Concentração de Hemoglobina Globular Média (CHGM), Plaquetas e Proteínas) de doadoras de embrião naturalmente infectadas por <i>Theileria equi</i> não tratadas e tratadas com dipropionato de imidocarb.....	27
Tabela 4. Valores observados dos parâmetros leucocitários (Leucócitos, Linfócitos, Monócitos, Neutrófilos, Eosinófilos) de doadoras de embrião naturalmente infectadas por <i>Theileria equi</i> não tratadas e tratadas com dipropionato de imidocarb.....	29
Tabela 5. Valores de média e desvio padrão dos parâmetros hematológicos (Hemácias, Hematócrito, Hemoglobina, Volume Globular Médio, Concentração de Hemoglobina Globular Média, Plaquetas e Proteínas) de receptoras de embrião naturalmente infectadas por <i>Theileria equi</i> não tratadas e tratadas com dipropionato de imidocarb.....	31
Tabela 6. Valores observados dos parâmetros leucocitários (Leucócitos, Linfócitos, monócitos, Neutrófilos, Eosinófilos) de receptoras de embrião naturalmente infectadas por <i>Theileria equi</i> não tratadas e tratadas com dipropionato de imidocarb.....	33

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Critério de classificação do grau de qualidade de embriões equinos.	10
Quadro 2. Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados no nested-PCR.	22

LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofinas
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
LH	Hormônio Luteinizante
hCG	Gonadotrofina Corinica Humana
PGF ₂ α	Prostaglandina da Série F ₂ α
CL	Corpo Lúteo
Mo	Mórula
Bi	Blastocisto Inicial
Bl	Blastocisto
Bx	Blastocisto Expandido
He	Hemácia
Ht	Hematócrito
Hb	Hemoglobina
VGM	Volume Globular Médio
CHGM	Concentrao de Hemoglobina Globular Média
CHGM	Concentrao de Hemoglobina Globular Média
PPT	Proteína Plasmática Total
P ₄	Progesterona

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Ciclo Estral da Égua	3
2.2. Dinâmica Folicular	3
2.3. Manejo Reprodutivo	4
2.4. Transferência de Embrião em Equinos.....	5
2.5. Fatores que Influenciam a Taxa de Recuperação Embrionária	6
2.5.1. Égua Doadora	6
2.5.2. Sincronização do Estro e Indução da Ovulação	7
2.5.3. Qualidade do Sêmen.....	8
2.5.4. Coleta de Embriões.....	8
2.5.5. Manipulação e Avaliação do Embrião	9
2.6. Principais Fatores que Afetam a Taxa de Gestação na Transferência de Embrião em Equinos.	10
2.6.1. Seleção de receptoras	10
2.6.2. Escolha da Receptora no Dia da TE	12
2.6.3. Inovulação	13
2.7. Babesiose.....	14
2.7.1. Histórico	14
2.7.2. Taxonomia.....	15
2.7.3. Distribuição Geográfica.....	16
2.7.4. Transmissão	17
2.7.5. Diagnóstico	17
2.7.6. Tratamento.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1. Local da Coleta dos Dados	19
3.2. Delineamento Experimental	19
3.3. Manejo Reprodutivo das Doadoras e Receptoras de Embrião	20

3.4. Coleta e Transferência dos Embriões	20
3.5. Coleta e Avaliação Hematológica	21
3.6. Detecção Molecular de <i>Theileria equi</i> pelo Nested-PCR (n-PCR)	21
3.6.1. Obtenção de DNA	21
3.6.2. Reação de amplificação	22
3.6.3. Eletroforese de DNA em gel agarose	23
3.7. Análise estatística	23
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1 Detecção de DNA de <i>Theileria equi</i> pelo Nested PCR em Amostras de Sangue de Éguas Doadoras e Receptoras de Embrião	24
4.2 Valores Hematológicas em Equinos Naturalmente Infectados Antes e Após Tratamento com Dipropionato de Imidocarb	27
4.3 Parâmetros Reprodutiva em Éguas Antes e Após Tratamento com Dipropionato de Imidocarb	34
5. CONCLUSÕES	38
6. BIBLIOGRAFIA	39
7. ANEXOS	54
Anexo A. Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de <i>Theileria equi</i> pela técnica de nested PCR em éguas doadoras de embrião antes do tratamento com dipropionato de imidocarb. Linha 1 marcador de peso molecular; Linha 2, controle positivo; Linha 3, controle negativo; Linha 4 a 16 representam amostras de doadoras positivas antes do tratamento com dipropionato de imidocarb	54
Anexo B. Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de <i>Theileria equi</i> pela técnica de nested PCR em éguas doadoras de embrião tratadas com dipropionato de imidocarb. Linha 1 marcador de peso molecular; Linha 2, controle positivo; Linha 3, controle negativo; Linhas 5, 6, 8, 11 representam amostras de doadoras positivas, Linhas 4, 7, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16 representam amostras de doadoras negativas ambas após o tratamento com dipropionato de imidocarb	54
Anexo C. Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de <i>Theileria equi</i> pela técnica de nested PCR em éguas receptoras de embrião do grupo não tratado no início do experimento. Linha 1 e 24 marcador de peso molecular; Linha 2, controle positivo; Linha 3, controle negativo; Linha 4 a 23 representam amostras de receptoras de embrião positivas do grupo não tratado no início do experimento	55
Anexo D. Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de <i>Theileria equi</i> pela técnica de nested PCR em éguas receptoras de embrião do grupo não tratado no final do experimento. Linha 1 e 24 marcador de peso molecular; Linha 2, controle positivo; Linha 3, controle negativo; Linhas 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 representam amostras	

de receptoras positivas, Linhas 6, 7, 13, 14 representam amostras de receptoras negativas do grupo não tratado no final do experimento..... 55

Anexo E. Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *Theileria equi* pela técnica de nested PCR em éguas receptoras de embrião do grupo tratado no início do experimento. Linha 1 e 24 marcador de peso molecular; Linha 2, controle positivo; Linha 3, controle negativo; Linhas 4 a 23 representam amostras de receptoras de embrião positivas do grupo tratado no início do experimento. 56

Anexo F. Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *Theileria equi* pela técnica de nested PCR em éguas receptoras de embrião do grupo tratado no final do experimento. Linha 1 e 24 marcador de peso molecular; Linha 2, controle positivo; Linha 3, controle negativo; Linhas 5, 6, 9, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20 representam a Linhas representam amostras de receptoras positivas, Linhas 4, 7, 8, 10, 11, 14, 15, 21, 22, 23 representam amostras de receptoras negativas ambas após o tratamento com dipropionato de imidocarb..... 56

1. INTRODUÇÃO

A equideocultura no Brasil é de grande relevância para a economia nacional. O Complexo do Agronegócio Cavalo atinge um faturamento anual da ordem de R\$ 7,5 bilhões. São gerados 642,5 mil empregos diretos, aproximadamente seis vezes mais que a indústria automotiva nacional e vinte vezes mais do que a aviação civil brasileira. Somados aos empregos indiretos, o complexo equino brasileiro ocupa 3,2 milhões de pessoas (GUERRA; MEDEIROS, 2007). De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE existem atualmente 5,9 milhões de equinos no País. Segundo o senso de 2004. Deve-se salientar que raças nativas estão em fase de formação e assim, qualquer meio capaz de reduzir o intervalo de gerações e aumentar o número de bons reprodutores e matrizes é de grande valia no aprimoramento de nossos animais.

A demanda pelo desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida de aplicação na equideocultura tem aumentado muito. O Brasil está entre os três países que mais faz transferência de embrião (TE) equino no mundo, junto com EUA e Argentina. Entre as técnicas de reprodução assistida, a TE é a mais utilizada para se obter um rápido aproveitamento genético. Embora o uso da TE tenha aumentado nas últimas décadas, seus números oscilam junto com a situação financeira da indústria equina, devido ao seu alto custo, sendo realizada somente em animais geneticamente superiores usados como doadores.

Vários fatores influenciam na eficiência reprodutiva em um programa comercial de TE equina. Entre eles podemos citar os relacionados às doadoras e receptoras como: fertilidade, idade, dia da coleta do embrião, dia da transferência do embrião, grau de sincronia entre doadora e receptora, status uterino, endometrites, além dos fatores relacionados ao garanhão, como: qualidade do sêmen, fertilidade, tipo de sêmen, se fresco, resfriado ou congelado. O ideal seria trabalhar com animais livres de doenças, ecto e endoparasitas, porém devido ao nosso clima e controle sanitário, fica difícil obter animais isentos de algumas parasitoses, como por exemplo, a theileriose.

A babesiose tem sido descrita como a principal parasitose equina, devido aos danos diretos como as quedas de desempenho e mortalidade, além de danos indiretos como o impedimento para comercialização e principalmente exportação. Essas perdas estão associadas tanto aos fatores clínicos como à restrição ao trânsito internacional de animais soropositivos. Nos Estados Unidos, Canadá, Austrália e Japão, assim como em alguns países da Europa e América Latina, onde o parasito não ocorre de forma endêmica, são impostas rigorosas medidas de controle que impedem a entrada de animais soropositivos em áreas consideradas livres de babesiose. A mortalidade em infecções por *Theileria equi* é baixa, em geral, os animais recuperam-se da fase aguda da doença e permanecem como portadores assintomáticos do parasita provavelmente durante toda a vida do animal. Durante a fase crônica da infecção, sinais clínicos inespecíficos como inapetência, perda de peso e queda no desempenho físico e reprodutivo são comuns. Danos causados por surtos endêmicos causaram prejuízos de aproximadamente \$ 130 milhões na década de 80 nos EUA e \$ 2 bilhões na África do Sul nos anos 90. No Brasil, nas regiões endêmicas as perdas chegam a R\$ 50 milhões/ano e nas áreas não endêmicas as perdas estimadas são de R\$ 20 milhões.

A segunda maior fonte de aborto na África do sul é causada pela babesiose. A ocorrência de fetos abortados com icterícia e estado de anemia, ou potros prematuros e ainda aqueles que nascem doentes, mostrando sintomatologia como icterícia, anemia, prostração e

relutância a amamentação, sugeriram a transmissão congênita de *T. equi* no trimestre inicial da gestação.

Quando se considera o pequeno número de embriões obtidos aos anos por égua, fica explícita a importância de se alcançar a melhor taxa de prenhez e menor perda embrionária. O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência de *T. equi* nas taxas de recuperação embrionária das éguas doadoras de embrião assim como avaliar a taxa de gestação e perda embrionária precoce de éguas receptoras de embrião com 15, 30,45 e 60 dias de gestação antes e após o tratamento com dipropionato de imidocarb, respectivamente.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ciclo Estral da Égua

A égua é um animal poliéstrico sazonal com atividade reprodutiva influenciada por fotoperíodo, mas também pela nutrição e o clima. A maioria das éguas apresenta atividade sexual durante a primavera e o verão (fase denominada de estação de monta), e somente poucas éguas estão cíclicas durante o final do outono e inverno (estação de anestro). O ciclo estral compreende o intervalo que vai de uma ovulação a outra, a média de um ciclo estral equino varia de 19 a 22 dias. O estro, (fase folicular ou estrogênica), varia de cinco a sete dias, e o diestro (fase lútea ou progesterônica) de aproximadamente 14 a 15 dias (DAELS; HUGHES, 1993; GINTHER, 1992).

O estro é caracterizado pela presença de um folículo dominante de 30mm de diâmetro no ovário, onde são produzidos elevados níveis de estrógenos pelas células da granulosa (GINTHER, 1992), tornando a fêmea receptiva ao macho e proporcionando a elevação gradual do hormônio luteinizante (LH), além da formação do edema uterino, que tende a reduzir nos dois dias que antecedem a ovulação (McKINNON; CARNEVALE, 1993). A ovulação, evento no qual ocorre a liberação do ovócito, acontece aproximadamente 24 a 48 horas antes do fim do estro (DAELS; HUGHES, 1993).

O diestro compreende o período no qual a égua não está receptiva ao garanhão, nesta fase o ambiente uterino permite condições adequadas para o desenvolvimento embrionário. Após a ovulação tem-se a total luteinização das células da granulosa e da teca, formando o corpo lúteo, que sintetiza e secreta progesterona. Nos casos em que não ocorre a fecundação, a fase lútea termina 14 a 15 dias após a ovulação, com regressão do Corpo Lúteo (CL) pela ação da prostaglandina ($PGF_2\alpha$) sintetizada pelo endométrio, e tem início um novo estro. No quinto ou sexto dia, após a ovulação, o embrião chega ao útero, onde migrará com intuito de realizar o reconhecimento materno até que ocorra a nidação ao redor do décimo oitavo dia pós-ovulação. A regressão dos CLs só vai ocorrer ao redor dos 120 dias de gestação, quando a placenta torna-se responsável pela produção de progesterona (DAELS; HUGHES, 1993; MALINOWSKY, 2002).

2.2. Dinâmica Folicular

Dinâmica folicular é o processo contínuo de crescimento e regressão folicular que ocorre nos ovários das éguas, o qual é diretamente influenciado por fatores extrínsecos como nutrição, temperatura, estresse e fotoperíodo. O termo “onda folicular” compreende um conjunto de fenômenos foliculares que obedecem à seguinte sequência: recrutamento, seleção, dominância e ovulação ou atresia. Durante o recrutamento, ocorre o crescimento comum de um grupo de folículos antrais sensíveis ao FSH, seguido pela fase de seleção, na qual um ou alguns folículos mantém o padrão de crescimento, em detrimento dos demais que começam um processo de regressão ou atresia. Nas espécies monovulatórias, normalmente, o folículo que continua a crescer é considerado dominante (fase de dominância); este secreta elevada quantidade de estrógeno e é sensível ao estímulo ovulatório desempenhado pela liberação do LH (DRIANCOURT, 2001). A concentração plasmática de estradiol começa a se elevar entre cinco a sete dias antes da ovulação, atingindo pico 24 a 48 horas antes da ovulação (PYCOCK

et al., 1995), quando começa a se reduzir em sincronia com o pico de LH, devido ao impacto negativo do LH ao estradiol (JACOB et al., 2009)

A emergência de uma onda está associada ao surgimento do hormônio FSH (GINTHER et al., 2003), 7-11 folículos (representados por folículos de 6mm de diâmetro) entram em uma fase comum de crescimento (GINTHER et al., 2001). O futuro folículo dominante emerge em média, nas éguas, um dia mais cedo do que o futuro folículo subordinado (GINTHER, 2000; GINTHER et al., 2001), com isso o dominante atinge 6 mm antes do futuro maior folículo subordinado e mantém uma média de 3 mm diâmetro de vantagem até o início do desvio (GINTHER, 2000). O pico da concentração de FSH ocorre quando o maior folículo atinge, aproximadamente, 13 mm de diâmetro e, então essa concentração começa a declinar (GINTHER, 2000; GINTHER et al., 2005). O crescimento paralelo dos folículos finaliza quando o maior folículo alcança um diâmetro de 22 mm (GINTHER, 2000; MACHADO, 2002), e o segundo maior folículo alcança 19 mm com o desvio começando em 6,2 dias depois da emergência dos folículos de 6 mm.

Ao final da fase de crescimento comum, uma mudança na taxa de crescimento tem início. Esse processo é conhecido como divergência e tem início quando o diâmetro dos dois maiores folículos tem em média 22,5mm e 19,0mm (GASTAL et al., 1997, 1999; GINTHER et al.; 2004). O desvio entre as taxas de crescimento entre o futuro folículo dominante e os subordinados é um evento crucial durante a seleção do folículo ovulatório. Após o desvio, o desenvolvimento do folículo dominante mantém uma taxa de crescimento constante até um ou dois dias antes da ovulação. Os folículos remanescentes (folículos subordinados) crescem a uma taxa reduzida e regridem (GASTAL et al., 2006). Em estudo realizado por Jacob et al. (2009) relataram a ocorrência de oito a onze ondas ovulatórias com dois folículos dominantes, uma segunda divergência ocorreu entre o maior e o segundo maior folículo 2,5 dias após a primeira. Ginther et al. (2003) demonstraram que os maiores folículos das ondas menores alcançam diâmetro inerente ao desvio folicular (22,8 mm), mas, depois disso, param de crescer.

As éguas apresentam ondas maiores (caracterizados por folículos dominantes e subordinados) e ondas menores (onde o maior folículo não atinge o diâmetro de um folículo dominante (GINTHER, 2000), posteriormente, as ondas maiores foram subdivididas em ondas primárias, cujo folículo dominante inicia o seu desenvolvimento na metade do diestro e ovula durante o estro e ondas secundárias, que apresentam folículo dominante que inicia seu desenvolvimento no final do estro, momento antes da ovulação, podendo ou não ovular no diestro, sendo denominada ovulação de diestro. (EVANS, 2003).

As concentrações de LH no início do desvio foram maiores no momento correspondente às ondas maiores do que no período das ondas menores, concluindo que o futuro folículo dominante necessita de um estímulo adicional do LH no início do desvio folicular e também indica que o LH fornece o estímulo para conversão de uma onda menor para uma onda folicular maior (GINTHER et al., 2003).

2.3. Manejo Reprodutivo

Para seleção da égua doadora deve ser considerado o seu histórico reprodutivo, a fertilidade, as diretrizes do registro da raça, o valor potencial do potro resultante e o número de gestações desejadas (SQUIRES et al., 1999).

Uma alimentação de qualidade é imprescindível em um programa (TE) tanto para a égua doadora quanto para a receptora. A deficiência alimentar das receptoras é um dos

principais problemas relacionados a TE, já que estas éguas necessitam de alimentação balanceada, assim como, as doadoras (GOMES; GOMES, 2008). As éguas receptoras de embriões devem estar ganhando peso durante a estação de monta, as taxas de prenhez e perda embrionária podem ser drasticamente afetadas em receptoras que estiverem perdendo peso durante a estação reprodutiva, mesmo com boa condição corporal (SAMPER, 2000),

Tanto as doadoras quanto as receptoras necessitam ser vacinadas e vermifugadas regularmente de acordo com protocolo recomendado pelos produtos utilizados (GOMES; GOMES, 2008).

Éguas submetidas a exercício em ambiente quente e úmido apresentam alterações no desenvolvimento folicular, na ovulação e redução na taxa de recuperação embrionária (MORTENSEN et al., 2009). No manejo deve-se sempre evitar o estresse dos animais, as mudanças de grupos de animais não devem ser feitas individualmente, para evitar problemas hierárquicos, em especial aos animais transferidos ou às receptoras que receberam embrião, e que devem estar alojadas em piquetes com baixa lotação, fácil acesso à água e boas pastagens. (SAMPER, 2000; ALONSO, 2008).

O controle folicular eficiente tem papel fundamental em um programa de TE. O exame detalhado através da ultrassonografia é necessário para realizar um melhor controle da ovulação, bem como avaliar se há resquício ou excesso de resposta inflamatória (fluido uterino) após a IA. Este controle deve ser diário em se tratando de éguas doadoras de embrião e em relação às receptoras de embrião, esse controle deve ser realizado pelo menos a cada 48 horas. O ultrassom é indispensável para a avaliação das condições uterinas de receptoras no momento da inovulação, aumentando a chance de êxito da técnica. O uso de gonadotrofina coriônica humana (hCG) ou hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) para induzir a ovulação é muito importante, pois desta forma apenas uma IA é necessária, antes da ovulação ou eventualmente até 6 horas após, especialmente quando se utiliza sêmen congelado (GOMES; GOMES, 2008).

Em recente estudo, 1000UI comparado a 1750UI de hCG IV foram utilizadas para avaliação da resposta ovulatória, à dose de 1000 UI, 89,52 % das éguas ovularam em até 48 horas (111/124); 4,84 % entre 48 e 96 horas (6/124) e 5,65 % não ovularam ou apresentaram folículo hemorrágico (7/124). Para a dose de 1750 UI, 87,21 % das éguas ovularam em até 48 horas (75/86); 4,65 % entre 48 – 96 horas (4/86) e 8,14% não ovularam ou apresentaram folículo hemorrágico (7/86). Mostrando assim que a dose de 1000UI de hCG foi tão efetiva quanto doses maiores (MORENO et al., 2010).

2.4. Transferência de Embrião em Equinos

Na década de 70 no Japão, Oguri e Tsutsumi (1974) reportaram o primeiro resultado positivo de TE em equinos utilizando uma técnica de inovulação a qual evitava a manipulação cervical e que tinha sido descrita anteriormente para bovinos por Sugie (1965). No Brasil, esta técnica em equinos foi primeiramente descrita em 1987 por Fleury et al. adaptando a metodologia relatada por Douglas (1979) às condições brasileiras. Nas últimas décadas, houve um grande avanço desta biotécnica aplicada à referida espécie, melhorando consideravelmente as taxas de gestação de 12,5% a 74,55% (VOGELSANG et al., 1979; OGURI; TSUTSUMI, 1980; FLEURY; ALVARENGA, 1999; PERES et al., 2002; ROCHA FILHO et al., 2004).

A transferência de embriões em equinos tem sido realizada, basicamente, por dois métodos: o cirúrgico e o não cirúrgico. A transferência de embriões pela técnica cirúrgica tem

demonstrado taxas de prenhez mais homogêneas, em torno de 65 a 80% (FLEURY, 1998; SQUIRES et al., 1999). Carnevale et al. (2000) compararam os dois métodos de transferência de embriões (não-cirúrgico e cirúrgico) e obtiveram taxas de gestação aos 12 dias de 47,4% (37/78) e 68,3% (381/558), e aos 50 dias de 39,7% (31/78) e 57,9% (323/558) respectivamente. No entanto, esses autores salientaram que os resultados superiores obtidos pela TE cirúrgica provavelmente tenham sido devido à melhor qualidade dos embriões utilizados.

2.5. Fatores que Influenciam a Taxa de Recuperação Embrionária

O sucesso da implantação de um programa de transferência de embrião está diretamente relacionado à taxa de recuperação dos embriões a partir das éguas doadoras. O dia da coleta do embrião, número de ovulações, características da doadora (condição uterina, idade), manejo reprodutivo (controle de desenvolvimento folicular, ovulação), nutrição, sanidade, qualidade do sêmen, habilidade técnica e fatores como as variações climáticas e adaptação da doadora na central, são citados como fatores que podem exercer influência negativa sobre taxa de recuperação embrionária (GOMES; GOMES, 2008).

2.5.1. Égua doadora

Diferente de outros animais, a égua permanece em atividade reprodutiva por um maior período de sua vida, sendo frequente encontrar uma grande parte do contingente de doadoras de embriões, com mais de 20 anos de idade, quando se tratam de éguas de genética superior (LOSINNO; ALVARENGA, 2006).

Em relação à taxa de recuperação de embriões, observa-se uma diminuição nas taxas de acordo com o aumento da idade na doadora (SQUIRES, 1995). As falhas reprodutivas observadas em éguas velhas estão normalmente associadas a distúrbios da ovulação e maturação oocitária associadas ou não à endometrite crônica, bem como distúrbios hormonais. Uma das possíveis causas de distúrbio hormonal está associada ao mau funcionamento da glândula tireóide, podendo ser diagnosticado através de dosagem hormonal no qual os valores de T4 total estão abaixo do normal que, associada ao quadro clínico poderia caracterizar um animal com hipotireoidismo. Alguns sintomas são: endometrites crônicas, distúrbios de ovulação, obesidade (metabolismo baixo), baixa recuperação embrionária, perdas embrionárias precoce, associadas ou não a idade avançada. Se forem animais em atividade esportiva podem apresentar queda de desempenho, anormalidades sistêmicas, fraquezas e miopatias (GOMES; GOMES, 2008).

Carnevale et al. (2000), indicaram que anomalias morfológicas que não foram observadas no oócito de éguas jovens foram detectadas nos oócitos das éguas idosas. A maior taxa de subfertilidade em éguas velhas pode resultar da fertilização de oócitos que não sofreram maturação meiótica adequada, ou devido ao fato de que os oócitos de éguas idosas possam ter maior prevalência de complementos cromossômicos anormais (BRINSKO et al., 1994).

De acordo com Woods et al. (1986), 53% dos lavados das éguas inférteis continham apenas embriões anormais comparado com apenas 3% de embriões anormais dos lavados de éguas normais. Anormalidades embrionárias consistem em retardo de desenvolvimento, degeneração celular, necrose celular, invasão por fungos, e, podem ter diversas causas como

falha na fertilização, embriões hereditariamente alterados, problemas do oviduto e ambiente uterino inadequado.

A viabilidade reduzida dos embriões de éguas subfêrteis foi demonstrada em estudo de um programa comercial no qual embriões D7 de éguas subfêrteis demonstraram sobreviver em menor taxa do que embriões de éguas normais (IULIANO et al., 1985). Ball et al. (1989) observaram que a qualidade dos embriões era semelhante entre éguas subfêrteis e normais, contudo os embriões de baixa qualidade de éguas subfêrteis resultaram em uma menor taxa de gestação do que os provenientes de éguas normais. O ambiente uterino poder ser considerado como um dos causadores de defeitos embrionários, mas também muitos destes problemas podem ser explicados por defeitos no oócito das éguas velhas e subfêrteis. A taxa de perda embrionária é maior entre os 35 e 50 dias em receptoras que receberam embriões de éguas infêrteis, sugerindo que esses embriões eram anormais antes da TE (SQUIRES, 1993).

2.5.2. Sincronização do estro e indução da ovulação

Várias combinações de hormônios reprodutivos tais como prostaglandina F₂α (PGF₂α e análogos), gonadotrofina coriônica humana (hCG) e hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH e análogos) são utilizados no controle do desenvolvimento folicular, indução do tempo de ovulação, ciclo estral, período pós parto e durante a transição da primavera em éguas (PINTO; MEYERS, 2007).

Atualmente, a sincronização entre doadora e receptora é uma técnica realizada de maneira relativamente simples em éguas cíclicas. Geralmente, administra-se uma única injeção intramuscular de PGF₂α ou análogo na égua doadora um a dois dias antes da aplicação do mesmo protocolo na receptoras. Levando em consideração que ambas estejam entre o 6º e 14º dias do diestro e o exame ultrassonográfico dos ovários revele a ausência de um grande folículo préovulatório que pode ovular rapidamente (ALLEN, 2001). Outra técnica de sincronização praticada consiste na administração de progesterona injetável ou sintéticos orais durante nove ou dez dias, iniciando nas doadoras de embrião um ou dois dias à frente das receptoras (DRIANCOURT; PALMER, 1982). Removendo-se a progesterona e aplicando-se a PGF₂α, as éguas exibirão estros em torno de três dias (BERGFELT, 1999).

Em todos os protocolos de sincronização empregados, monitora-se o crescimento folicular por ultrassonografia e utiliza-se hCG, GnRH ou EPE para induzir ovulação nas éguas receptoras dentro de 48 h depois que a doadora for inseminada (DUCHAMP et al., 1987). Com o objetivo de eliminar a necessidade da sincronização, têm sido utilizadas éguas ovariectomizadas tratadas com progestágenos como receptoras (McKINNON et al., 1988). No entanto, devido à variação do êxito obtido, este método não tem sido amplamente difundido (VANDERWALL, 2000).

O grau de assincronia entre a ovulação da doadora e da receptora é entre -1 (ovulação um dia antes da doadora) a +3 (ovulação três dias após a doadora), não sendo as taxas de gestação entre elas diferentes neste intervalo. Trabalhos mais recentes têm mostrado que a sincronia entre doadora e receptora pode ser mais flexível do que se pensava, visto que a realização da coleta do embrião pode ser realizada em dias diferentes (JACOB et al., 2002; McKINNON; SQUIRES, 2007).

Outros estudos não encontraram diferenças nas taxas de prenhez em éguas receptoras entre o terceiro e oitavo dia do ciclo (-6 a zero de assincronia), mostrando possibilidade de uma maior janela de utilização da receptora, o que facilita a sincronização (FLEURY et al., 2006; JACOB et al., 2010).

2.5.3. Qualidade do sêmen

A qualidade do sêmen a ser utilizado em um programa de TE é de extrema importância, geralmente, se observa uma grande influência do garanhão em relação à recuperação embrionária, visto que alguns garanhões apresentam sêmen de qualidade e fertilidade melhor quando comparados a outros animais. A escolha dos garanhões normalmente está associada a suas características morfológicas e de desempenho físico, raramente leva-se em consideração a questão da fertilidade, o que pode gerar baixas taxas de recuperação embrionária em função da utilização de sêmen de má qualidade (AMANN; PICKETT, 1987).

Os efeitos do garanhão podem ser minimizados com utilização de reprodutores com fertilidade comprovada (GOMES; GOMES, 2008). Outro fator de grande influência na fertilidade está ligado na forma de utilização do sêmen para inseminação nas doadoras, lembrando que os índices de recuperação embrionária decrescem quando se utiliza sêmen congelado ou refrigerado comparado ao sêmen a fresco (SQUIRES et al., 1999).

Fleury et al. (1997) observaram diferença significativa entre cinco garanhões utilizados, em um programa de TE, cujo resultado de recuperação embrionária variou de 28,6% a 84,2%. Em outro momento, Fleury et al., (2001b) em duas estações reprodutivas, obtiveram no primeiro ano diferenças significativas ($p < 0,05$) na recuperação de embriões entre cinco garanhões estudados (28,6; 65,0; 62,9; 66,7 e 84,2%), porém no segundo ano, houve tendência a significância ($p = 0,057$) (44,4% a 73,7%). Douglas (1979) reportou taxa de recuperação embrionária de 36% com a utilização de um garanhão e de 72% com outro. A fertilidade do sêmen é extremamente variável entre garanhões. As taxas de prenhez por ciclo estral em éguas após inseminação artificial com sêmen fresco de onze garanhões variaram de 40 a 79% (AMANN; PICKETT, 1987).

2.5.4. Coleta de embriões

Embriões equinos são seletivamente transportados da tuba uterina para o útero entre o quinto e o sexto dia pós ovulação, os quais estão na fase de mórula compacta. Após entrar no lúmen uterino, o tamanho do embrião aumenta dramaticamente, desenvolvendo-se até blastocisto expandido. Embora embriões possam ser recuperados no sexto ao nono dia, o período ideal para sua coleta é entre o sétimo e oitavo dia após a fertilização. A indicação primária para recuperação embrionária no sexto dia é para congelamento do embrião (SQUIRES; SEIDEL, 1995). Embriões não são rotineiramente colhidos no nono dia após a ovulação, porque o sucesso destes nas taxas de transferência é, geralmente, inferior ao alcançado quando a coleta ocorre entre o sétimo ao oitavo dia (SQUIRES; SEIDEL, 1995). Estudos recentes têm sugerido que quando as éguas são inseminadas pós-ovulação, a entrada do embrião no útero parece ser mais demorada que o esperado (LISA; MEADOWS, 2008). Assim, foi observado um retardo no desenvolvimento embrionário, no qual vesículas embrionárias foram estimadas menores, equivalentes a 1 dia de crescimento, para éguas inseminadas neste período, em relação a éguas inseminadas antes da ovulação (CUERVO-ARANGO et al., 2009).

Os procedimentos para recuperação de embrião permaneceram essencialmente inalterados durante as últimas duas décadas (SQUIRES et al., 2003). A coleta do embrião é realizada pelo procedimento não cirúrgico transvaginal, descrito primeiramente em equinos por Oguri e Tsutsumi (1972), que utilizaram um cateter de três vias. A coleta de embrião era

então realizada no corno ipsilateral à ovulação, inflando o balão do cateter na base desse corno. Atualmente, a coleta de embrião é executada utilizando-se a lavagem uterina transcervical, usa-se um cateter ou sonda de silicone com balão (VEUF-80, Bivona, Inc., Gary, IN 46406) com diâmetro de 8,0 mm; porém, outros estilos de cateter estão disponíveis. Uma vez o cateter inserido no corpo do útero, o balão é inflado, aproximadamente com 60 mL de ar, no corpo do útero, tracionando o cateter caudalmente para se ajustar no óstio cranial da cérvix, lavando-se os dois cornos simultaneamente (FLEURY et al., 2001a; SQUIRES et al., 2003; SILVA, 2003), normalmente o órgão é lavado três ou quatro vezes com um litro de solução salina acrescida com fosfato puro modificado (DPBS), previamente aquecida (30-35°C), contendo 1% (v/v) de soro fetal bovino, penicilina (100 unidades/ml) e estreptomicina (100 µg/ml) (VANDERWALL, 2000). Outra opção para o lavado uterino tem sido o uso de Ringer Lactato, obtendo taxas de prenhez de 64% quando comparadas a 57% obtido pelo DPBS em embriões coletados por estas soluções, conforme Alvarenga et al. (1992).

A sonda ou cateter é acoplada ao circuito e, esse sistema montado, poderá ter o fluxo de recuperação constante, sendo o fluido recuperado em grandes recipientes, ou ter o fluxo de recuperação interrompido com utilização de pinça e filtro milipore (RIERA; MCDONOUGH, 1993; RIERA, 2000). Carvalho et al. (2001) não obtiveram diferenças significativas nas técnicas de coleta de fluxo interrompido ou direto.

O volume recuperado representa normalmente de 95% a 98% do volume infundido (IMEL, 1981; CARVALHO, 2000; SILVA, 2003). Recentemente, foi proposto um quarto lavado adicional, onde logo antes do procedimento é administrada a ocitocina, devendo-se permitir que o meio permaneça no útero da égua por aproximadamente três minutos, seguido de massagem uterina por via transretal. Isto resulta em um incremento da taxa de recuperação embrionária em torno de 10% (HUDSON; McCUE, 2004).

2.5.5. Manipulação e avaliação do embrião

A avaliação do embrião é subjetiva, e relativamente simples, não necessitando de equipamentos sofisticados. O rastreamento dos embriões é realizado com auxílio de um microscópio estereoscópico sob aumento de 10X e a classificação embrionária é realizada utilizando-se aumento de 40X. A placa de Petri deve estar previamente riscada na sua parte inferior para facilitar a localização do embrião. Uma vez localizado, este é removido por aspiração com o auxílio de uma palheta de 0,5 ou 0,25 mL, acoplada a uma seringa de insulina, e transferido para uma placa de Petri menor (35 x 10 mm), contendo o meio de manutenção TQC®, Ham F10, Encare®, dentre outros (LIRA et al., 2009).

A classificação é feita de acordo com os parâmetros de estágio de desenvolvimento e qualidade, conforme recomendações da IETS (International Embryo Transfer Society), descritas por McKinnon e Squires (1988). Em coletas realizadas entre o sexto e o oitavo dia após ovulação, geralmente são encontrados mórula (Mo), blastocisto inicial (Bi), blastocisto (Bl) e/ou blastocisto expandido (Bx). A avaliação da qualidade embrionária leva em consideração a morfologia relacionando-a com sua viabilidade. É atribuído um escore de 1 a 5, avaliando-o quanto ao formato, simetria, coloração, extrusão celular e integridade de zona pelúcida (McKINNON; SQUIRES 1988).

A qualidade do embrião apresenta o principal efeito sobre as taxas de prenhez. Embriões com escores de qualidade pobres (3) resultam em baixa taxa de prenhez (SQUIRES; SEIDEL, 1995). Embriões que são menores que o normal para a idade deles, ou têm anormalidades morfológicas, também resultam em taxas de prenhez reduzidas. Os mesmos

autores reportam taxas de 70–75% de prenhez, com transferência de embriões de Grau 1, diagnosticado ao exame ultrassonográfico aos 12 dias (SQUIRES et al., 2003).

Após avaliação e classificação, o embrião é lavado em 10 passagens consecutivas no meio de manutenção (FLEURY et al., 2001a; CAMILO et al., 2003; DAELS, 2007). O objetivo desse procedimento é eliminar as impurezas presentes na zona pelúcida antes de aspirá-lo na palheta para inovulação, quando então, o embrião estará pronto para ser transferido ou resfriado (DAELS, 2007). Cuidados devem ser tomados quanto ao tempo de armazenamento no meio de manutenção, uma vez que sua viabilidade diminui ao decorrer o tempo (DOUGLAS, 1982). Além disso, toleram temperaturas entre 25 °C a 37 °C, porém deve ser dada importância às mudanças de temperatura extremas (VANDERWALL, 2000).

Quadro 1. Critério de classificação do grau de qualidade de embriões equinos.

Grau	Classificação	Qualidade dos embriões
1	Excelente	Ideais, esféricos, com tamanho, cor e textura uniformes
2	Bom	Pequenas imperfeições com poucos blastômeros extrusos, forma irregular ou separação de trofoblasto
3	Razoável	Problemas não muito severos de blastômeros extrusos, células degeneradas ou blastocele colapsada
4	Pobre	Blastocele colapsada, vários blastômeros extrusos e células degeneradas, mas com aparência viável da massa embrionária
5	Degenerado	Oócito não fertilizado ou embrião totalmente degenerado

Fonte: McKinnon; Squires, 1988

2.6. Principais Fatores que Afetam a Taxa de Gestação na Transferência de Embrião em Equinos.

A taxa de gestação é afetada pela receptora, pelo embrião e pela doadora. A receptora de embrião consiste no ponto crítico do programa de TE; sua seleção e manejo determinarão, em grande parte, o sucesso da técnica (ALONSO, 2008).

2.6.1. Seleção de receptoras

A seleção de uma receptora deve ser criteriosa, responsável e, sobretudo, visando à eficiência do programa de TE com o menor custo. O primeiro critério de seleção está relacionado ao manejo do animal. Um animal com temperamento agitado representa um risco para os profissionais e para a futura gestação, devido ao estresse do animal. Devem ser selecionados animais cabresteados e possíveis de serem manejados (SAMPER et al., 2007; BLANCHARD et al., 2003). Outro fator considerado é a idade do animal. O ideal são éguas

entre três a 10 anos, visto que a idade é um importante fator predisponente para a degeneração endometrial, que pode comprometer a habilidade de manter a gestação (SQUIRES et al., 1999; MORRIS; ALLEN, 2002; STOUT, 2006). De fato, receptoras com mais de 10 anos aparentemente apresentam maior risco de sofrer perda embrionária (CARNEVALE et al., 2000). Ricketts e Alonso (1991) observaram que há um aumento na incidência de alteração endometrial em éguas mais velhas, mesmo aquelas que nunca foram cobertas. A presença de cistos reflete senilidade uterina e normalmente estão presentes acompanhando alterações endometriais. Eles são associados com aumento da idade e um escore de biópsia maior, indicando alterações fibróticas e glandulares. Stanton et al.(2004) relataram que a incidência de cisto endometrial aumenta com a parturidade e com a idade, pois a maioria das éguas afetadas são as que apresentam mais de 10 anos. Em uma população de éguas férteis e subférteis a expectativa para ocorrência de cistos é de 13% a 22%. Em um levantamento os autores avaliaram que 73,1% dos cistos que estavam presentes eram em éguas com mais de 14 anos, e apenas 29,1% dos cistos estavam presentes em éguas que apresentavam de sete a 14 anos.

Um fator na seleção para o qual não se dá muita importância é o tamanho da receptora em relação à doadora e garanhão (STOUT, 2006). Uma série de estudos demonstrou que a discrepância entre o tamanho genético do embrião e a receptora afeta em vários aspectos o desenvolvimento intra-uterino e pós natal. Tamanho materno inadequado pode levar a um maior ou menor crescimento fetal, apesar de um grau de compensação na vida pós natal, este tamanho é mantido na maturidade (ALLEN et al., 2002; 2004). Tanto o crescimento uterino aumentado ou retardado altera a função pós natal cardiovascular, endócrina e metabólica (FORHEAD et al., 2004) e, aparentemente a utilização de receptora que difere marcadamente em tamanho com a doadora vai influenciar o tamanho do potro na maturidade, e em um caso pior, aumentar a morbidade durante a vida intrauterina, imediata pós natal e, possivelmente, na vida adulta (STOUT, 2006).

A sanidade da receptora tem vital importância, sendo que deve estar livre de quaisquer moléstias infectocontagiosas, em especial Anemia Infecciosa Equina, babesiose, leptospirose e adenite equina, que podem comprometer a sanidade de todo o plantel e posteriormente causar declínio nas taxas de prenhez e aumento nas taxas de perda embrionária (LOSINNO; ALVARENGA, 2006). Devem também apresentar boa condição corporal e passar por um exame reprodutivo completo. Este exame de seleção deve incluir palpação, ultra-sonografia, cultura, citologia e biópsia (SQUIRES, 1993; SQUIRES; SEIDEL, 1995; McCUE et al., 1999; STOUT, 2006). Faz-se a observação da genitália externa, sendo necessário ter uma conformação vulvar normal. Qualquer sinal de alteração, como presença de fluido, cistos, ar ou debris no útero, tumores ou outras anormalidades ovarianas, deve determinar o descarte do animal. Aproximadamente 15 a 20% das éguas examinadas são descartadas. Apenas éguas com biópsias de graus IA (endométrio normal ou com inflamação leve) e IB (leve a inflamação moderada) e sem evidência de endometrite crônica ou aguda deveriam ser usadas como receptoras (SQUIRES; SEIDEL, 1995). A égua deve ter uma cérvix íntegra e não muito torta (STOUT, 2006). Como o exame não é feito de uma forma completa, há uma grande quantidade de éguas aceitas e que não estão aptas reprodutivamente (LOSINNO; ALVARENGA, 2006).

Losinno et al. (2005) ao avaliarem o escore na biópsia endometrial de receptoras de embrião, verificaram que o percentual de éguas no grupo “jovem” classificadas nos escores IIb (inflamação moderada e / ou multifocais) e III (inflamação severa e / ou fibrose difusa) foi significativamente menor do que no grupo das éguas idosas (32,2% versus 75 %; $p < 0,05$) e 32% das éguas com menos de 10 anos de idade, as quais foram aprovadas como receptoras

pelas avaliações usuais, tem chances de manter uma gestação á termo bastante comprometida. Baseados nos resultados preliminares deste estudo os autores puderam concluir que éguas com mais de 14 anos de idade não devem ser utilizadas como receptoras de embrião e que éguas com menos de 14 anos devem ser submetidas por um exame ginecológico completo que inclua a biópsia endometrial antes de serem utilizadas como receptoras de embrião.

2.6.2. Escolha da receptora no dia da TE

A escolha da receptora no dia da TE tem influência direta sobre a taxa de gestação. Alguns aspectos devem ser levado em consideração neste momento, sendo os mais importantes o dia pós ovulação e as características uterinas da receptora ao exame de palpação e ultrassonografia. A sincronia entre embrião e ambiente uterino é essencial para o estabelecimento da gestação. O ambiente uterino altera-se marcadamente sob a influência da progesterona, sendo que um embrião em um útero assincronico pode estar sujeito a níveis hormonais e fatores de crescimento não correspondentes a fase na qual ele se encontra, afetando o estabelecimento da gestação, equídeos permitem que uma maior janela de assincronia seja utilizada comparando-se com bovinos (WILSHER et al., 2006). Estudos estabeleceram que receptoras que ovularam um dia antes (-1) até 3 depois (+3) em relação à doadora tem a mesma chance de se tornarem prenhes (McKINNON et al., 1988; SQUIRES; SEIDEL, 1995); fora deste período de sincronia aceitável, as taxas de prenhez caem substancialmente. Kumar et al. (2008) utilizaram receptoras com grau de sincronia um dia antes (-1) até 2 dias depois (+2), obtendo altas taxas de gestação. Santos et al. (2008a) concluíram que receptoras de embrião podem ser utilizadas com um amplo grau de assincronia, um dia antes (-1) até seis dias depois (+6) com as doadoras de embrião.

Outros estudos concluíram que não se deve apenas avaliar o dia da ovulação da receptora, visto que receptoras d3 e d8 (após ovulação) não mostraram diferença significativa nas taxas de gestação, a ecogenicidade e o tônus uterino no momento da TE, também devem se levados em consideração na escolha da melhor receptora para o momento da inovulação (FLEURY et al., 2006; ALONSO, 2007).

Na tentativa de utilizar receptoras que ovularam antes da doadora, Wilsher et al. (2006) trataram com ácido meclofenâmico receptoras que ovularam de 2 a 5 dias antes da doadora, iniciando no dia 9 pós ovulação; taxas de 85% de gestação foram obtidas naquelas que ovularam 2 ou 3 dias antes. Uma alternativa é a utilização de éguas ovariectomizadas ou em anestro estacional tratadas com progestágenos a partir de quando a doadora ovula, particularmente no início da estação de monta, quando poucas éguas ciclando estão disponíveis (HINRICHS et al., 1987).

Carnevale et al.(2000), observaram a taxa de gestação de receptoras entre 2 e 9 anos e esta não diferiu estatisticamente das receptoras entre 10 a 18 anos. Porém, a taxa de perda embrionária foi maior nas receptoras entre 10 e 18 anos (13,3% versus 20,5%). Caiado et al. (2007) verificaram que o tratamento diário com progesterona iniciado no dia da ovulação da receptora permitiu seu uso já no segundo dia pós ovulação, tendo sido obtidas taxas de prenhez próximas a 70% quando utilizada a progesterona e de 30% quando não utilizada à suplementação.

A escolha da égua receptora através da avaliação ginecológica realizada no momento da transferência de embrião é de grande importância, entretanto esta escolha é, muitas vezes, feita de forma subjetiva, sendo que cada veterinário possui um método próprio de avaliação.

Um método mais objetivo de seleção auxiliaria em uma escolha mais adequada com melhores resultados (FLEURY *et al.*, 2006).

É de comum acordo que receptoras com edema endometrial no quinto dia pós-ovulação não devem ser utilizadas neste ciclo (SQUIRES *et al.*, 1999; SQUIRES *et al.*, 2003). O tônus uterino da receptora deve ser avaliado, visto que afeta a taxa de gestação. Éguas com tônus uterino excelente ou bom apresentam melhores taxas de prenhez do que éguas com tônus ruim ou pobre (CARNEVALE *et al.*, 2000; ALONSO, 2007). Carnevale *et al.* (2000) sugeriram que um tônus uterino reduzido pode indicar um ambiente uterino não totalmente compatível com o crescimento e desenvolvimento embrionário.

A morfoecogenicidade uterina é o aspecto de tubularidade e homogeneidade à palpação retal e ultrassonografia. Nos resultados de Alonso (2007), os animais apresentando o útero mais tubular e de ecogenicidade mais homogênea apresentaram maiores taxas de gestação comparando-se com aqueles com útero menos tubular e mais heterogêneo. Com isso, a avaliação da morfoecogenicidade uterina deve ser considerada na seleção da receptora.

Souza (2006) demonstrou que a aplicação de hCG no dia 0 ou 1 pós ovulação aumentou o número de receptoras com útero tubular e ecogenicidade uterina homogênea e tônus uterino bom e excelente. Sendo esta uma interessante ferramenta para melhorar a chance de a receptora apresentar características desejáveis quando o número de receptoras for limitado.

McCue *et al.* (1999) analisou a concentração de progesterona em 242 ciclos de candidatas a receptora de embrião, e 9 animais apresentaram concentração de progesterona <4 ng/ml. Destes 9, 8 foram descartados como receptoras por apresentarem tônus uterino e/ou cervical inadequados.

A avaliação das receptoras, anteriormente ao momento da transferência, é de suma importância. Devendo-se selecionar a égua mais adequada para receber o embrião. Tal seleção fundamenta-se nas concentrações plasmáticas de progesterona, naquele momento, contribuindo assim, para que estas apresentem as melhores condições reprodutivas. Então, por palpação deve-se observar a cérvix firme e fechada, aumento de tônus uterino (cilíndrico e tubular). Além disso, não deve haver nenhuma evidência de dobras endometriais ou secreção uterina no exame ultrassonográfico (CARNEVALE *et al.*, 2000). Os requerimentos sobre o status reprodutivo variam entre os centros de reprodução, podendo variar desde éguas que tenham parido anteriormente (avaliação da habilidade materna), ou éguas virgens, eliminando a possibilidade de laceração cervical ou alterações uterinas prévias (HINRICHS, 1993; SAMPER *et al.*, 2007).

2.6.3. Inovulação

O embrião é envasado em palheta plástica de 0,25 ou 0,5 mL em porções alternadas de solução de manutenção e ar. Este procedimento minimiza os movimentos do embrião dentro da palheta e assegura a perfeita expulsão do embrião para dentro do útero (SILVA, 2003). O equipamento para inovulação mais amplamente utilizado pelos pesquisadores de embriões equinos é a pipeta de inseminação artificial. Contudo, vários outros aplicadores também têm sido descritos, como o modelo Hannover de transferência de embriões bovinos, o aplicador modelo Francês e uma adaptação de tubo de aço e tubo de polietileno.

Considerando o método transcervical, diferentes dispositivos têm sido utilizados na transferência. PERES *et al.* (2002) não observaram diferenças significativas nas taxas de prenhez pós transferência com a utilização do transferidor Francês (59%), da pipeta de

inseminação artificial (54%), do transferidor alemão (44%) ou do aparelho comum constituído por um tubo de aço inox, dentro do qual perpassava-se um tubo de polietileno contendo o embrião (62%). Recentemente foi desenvolvido um método alternativo para se executar a inovulação de embriões equinos, consistindo em depositar o embrião no útero da receptora mediante uma injeção intra-uterina guiada por ultra-sonografia. SILVA (2003) relata que essa nova técnica foi comparada ao método transcervical e não foram encontradas diferenças significativas nas taxas de prenhez, as quais foram de 76,9% e 78,9%, respectivamente. Entretanto, trata-se de uma técnica mais onerosa e complexa cuja aplicação se restringe a situações especiais.

2.7. Babesiose

As babesioses equinas, comumente conhecidas como febre biliar ou piroplasmose equina são parasitoses, causadas por protozoários intra-eritrocíticos, *Babesia caballi* (NUTTALL; STRICKLAND, 1910) e *Theileria equi* (LAVERAN, 1901; MEHLHORN; SCHEIN, 1998), que acometem equinos, asininos, pôneis, muares e zebras (DE WALL, 1992).

Situam-se dentro de dois grandes grupos, as grandes babesias, com comprimento médio superior a 3µm, *B. caballi* e as pequenas babesias, com comprimento médio inferior a 3µm, *T. equi*. No gênero *Babesia* os trofozoítos se multiplicam somente nos eritrócitos por fissão binária, formando pares, ou formando tétrades (HOLBROOK et al., 1968). Descobertas sobre o ciclo de vida de *T. equi*, como multiplicação em linfócito para posterior invasão em eritrócitos e ausência de transmissão transovariana nos carrapatos vetores, a tornam diferente das formas clássicas das babesias, sendo assim este organismo foi reclassificado para família Theileriidae (MEHLHORN; SCHEIN, 1998).

Sabe-se que *T. equi* tem propagação mais rápida que *B. caballi*, (HOLMAN et al., 1993), o que justifica sua elevada prevalência e patogenicidade em áreas endêmicas (ALHASSAN et al., 2005; DE WAAL, 2000; SCHEIN, 1988).

As doenças caracterizam-se por apresentarem uma forma aguda, com o desenvolvimento de anemia hemolítica progressiva, e uma forma crônica na qual os animais tornam-se portadores muitas vezes assintomáticos (KNOWLES et al., 1980). Levando a um quadro de pirexia, anemia hemolítica, icterícia, hepato e esplenomegalia, hemoglobinúria e bilirrubinúria em função da eritrólise que determina em alguns casos, até a morte. No entanto, a grande maioria dos animais afetados tornam-se portadores, permanecendo nesse estado por longos períodos e atuando como fonte de infecção para os carrapatos vetores (DE WALL, 1992). Em situações imunossupressivas como restrição alimentar e uso de corticosteróides, a reagudização da doença é favorecida e os equinos podem apresentar diferentes graus de anemia, com agravamento dos sinais clínicos (NOGUEIRA et al., 2004).

2.7.1. Histórico

A piroplasmose equina foi descrita por Theiler (1901), trabalhando com *T. equi*. De acordo com Schein (1988), Laveran (1901) foi o primeiro pesquisador a descrever a natureza intraeritrocítica do agente causal da babesiose equina ao examinar esfregaços de sangue periférico de equinos da África do Sul, designando-o de *Piroplasma equi*. Posteriormente, Nuttall e Strickland (1910) demonstraram a existência de outra espécie de parasito,

morfologicamente distinto daquele anteriormente descrito e também causador da piroplasmose equina, denominando-o de *Piroplasma caballi*.

Nuttal e Strickland, (1910), propuseram a designação de *Nuttalia equi* para o protozoário descrito como *P. equi* em função das características morfológicas do parasito serem diferentes das demais espécies do gênero *Piroplasma*, até então conhecidas. Entretanto, trabalhos posteriores de nomenclatura e sistemática classificaram as espécies deste parasito dentro do gênero *Babesia*.

Embora com algumas características em comum, *T. equi* e *B. caballi* devem ser consideradas como causadoras de doenças distintas, já que existem diferenças significativas entre as duas espécies, envolvendo o ciclo biológico, a patogenicidade e a quimioterapia (BALDANI, 2004).

2.7.2. Taxonomia

A classificação taxonômica de *Babesia equi* dentro da família *Babesiidae* é uma área de controvérsia há muitos anos, dado a similaridade desse parasito com o gênero *Theileria*; destacando-se a transmissão transtadiária pelo carrapato (FRIEDHOFF, 1988); o desenvolvimento em linfócitos antes do ciclo eritrocítico (MOLTMANN et al., 1983) e o aparecimento de formas intraeritrocíticas em “Cruz de Malta”, como resultado da divisão múltipla do parasito (SCHEIN, 1988). Estudos ultraestruturais evidenciaram a presença de citóstoma, e de uma estrutura alimentar tubular em trofozoítos de *B. equi*, estruturas estas envolvidas no mecanismo de alimentação, muitos similares aquelas observadas em parasitos do gênero *Theileria* (FAWCETT et al., 1987).

Estudos bioquímicos demonstraram que proteínas de superfície de estágios eritrocíticos de *B. equi* e *Theileria* spp apresentam pesos moleculares similares com 33% a 58% de aminoácidos idênticos (KAPPMAYER et al., 1993). Além destes dados morfológicos e biológicos suplementados pela bioquímica, estudos de sensibilidade à drogas têm demonstrado que esquizontes exoeritrocíticos de *T. equi* são altamente susceptíveis à drogas esquizontocidas usadas no tratamento de theileriose bovina, tais como buparvacina que em associação ao imidocarb podem eliminar o parasito (KUMAR et al., 2003).

Entretanto, análises comparativas realizadas por meio de técnicas de biologia molecular, indicam que *T. equi* deve ser caracterizada como um grupo distinto (ALLSOPP et al., 1994), principalmente porque estudos filogenéticos, realizados a partir da avaliação da sequência de RNA ribossomal, demonstraram que este parasito encontra-se num grupo filogenético distante de qualquer espécie do gênero *Theileria* (KATZER et al., 1998). Criado-Fornelio et al. (2003) sugerem com base na análise de diversos modelos de árvores filogenéticas, que *B. equi* e *Cytauxozoon felis* seriam ancestrais de *Theileria* spp. e que esses parasitos estariam situados relativamente distantes de *Babesia rodhaini*. Assim a criação de uma nova família, como proposto por Allsopp et al. (1994) só faria sentido se essa compreendesse apenas esses dois parasitos.

Estes estudos apontam fortes evidências de que ainda existe certa discussão com relação à taxonomia de *T. equi*. Alguns autores propõem a transferência desse parasito para o gênero *Theileria* (SCHEIN, 1988), enquanto outros propõem a criação de uma nova família (ALLSOPP et al., 1994).

2.7.3. Distribuição geográfica

A babesiose equina é uma doença cosmopolita, considerada emergente nos países subtropicais, e presente em áreas que abrigam 90% da população equina mundial (FRIEDHOFF et al., 1990). A ampla distribuição geográfica e diversidade das espécies de carrapatos, potencialmente transmissoras, pertencentes aos gêneros *Dermacentor*, *Hyalomma* e *Rhipicephalus*, justificam a ocorrência mundial desta enfermidade (THOMPSON, 1969).

Infecções mistas por *T. equi* e *B. caballi* podem ocorrer quando o vetor comum para as duas espécies está presente. Porém, as infecções devidas à *T. equi* são mais prevalentes, enquanto que as de *B. caballi* são mais difundidas (FRIEDHOFF et al., 1990). Na Europa a presença do parasita foi descrita na França, Portugal, Bélgica, Espanha e Itália (CORDEIRO del CAMPILLO et al., 1974), no entanto, Alemanha, Áustria, Suíça e Grã-Bretanha, são consideradas regiões livres. Holanda, Inglaterra, Irlanda, Alemanha e Países escandinavos não apresentam comportamento endêmico da doença (FRIEDHOFF et al., 1990).

Nos países asiáticos, *T. equi* foi registrada de forma enzoótica, principalmente, na China e Coreia. Na África, estudos soropidemiológicos têm evidenciado alta prevalência de babesiose em equinos e zebras (FRIEDHOFF et al., 1990). Os Estados Unidos e Canadá são considerados livres de *T. equi* e *B. caballi*, porém, focos epidêmicos de *B. caballi* em 1961 e de *T. equi* em 1965, ocorreram no Estado da Flórida, através de equinos importados de Cuba, mas permaneceram localizados devido às rígidas medidas de controle adotadas (HOLBROOK, 1969). Nas Américas, a babesiose se manifesta de forma enzoótica nos países da América Latina, exceto as regiões do Sul do Chile e Argentina.

A presença destes parasitas foi detectada no Japão, e Mongólia, e de acordo com a OIE (2009), 27 países reportaram casos de piroplasmose equina em 2008, dentre estes estavam Israel, Jordânia e Qatar (JAFFER et al., 2009).

No Brasil, a babesiose equina por *T. equi* foi relatada pela primeira vez por CARINI, (1910) através do diagnóstico clínico e laboratorial de animais originados do Estado de São Paulo. Esta mesma espécie de protozoário foi diagnosticada em animais de corrida com quadro agudo de babesiose (GUIMARÃES et al., 1950).

Ribeiro e Lima (1989) observaram uma prevalência de 80,1% para *T. equi* em equinos no estado de Minas Gerais. Pfeifer Barbosa et al. (1992) relataram também a ocorrência de 75% de equinos reagentes à reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para *B. caballi* no estado do Rio de Janeiro. Posteriormente, Pfeiffer Barbosa (1993; 1995) detectou prevalência de 100% para *T. equi* pela RIFI e 61,7% para *B. caballi* pelo teste de fixação de complemento (TFC) e 70% pela RIFI em 60 equinos com até 8 meses de idade, procedentes da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Seropédica, RJ.

Souza et al. (2000) observaram uma prevalência de 50,38% para *T. equi* em equinos de diferentes idades, sexo e raças, nascidos e criados no Planalto Catarinense, Santa Catarina. Botteon et al. (2002) observaram a soroprevalência de 89,58%, 87,89% e 45,24%, nos sistemas de produção de equinos extensivo, semi-extensivo e confinado. Pereira et al. (2004) determinaram a prevalência de *T. equi* e *B. caballi* através do TFC em equinos da raça Puro Sangue Inglês de pequenas propriedades equestres localizados na região e Sul e Sudeste, encontrando 18,1% para *T. equi*, 1,5% para *B. caballi* e de 6,0% para infecção mista. Jacob et al. (2010), em inquérito epidemiológico em uma central de reprodução equina no município de Itaguaí-RJ, e em dois haras no município de Seropédica-RJ, obtiveram a partir do nested-PCR 100% de positividade para *T. equi* em 28 doadoras e 54 receptoras de embriões da raça Mangalarga Marchador assintomáticas para babesiose.

2.7.4. Transmissão

Para transmissão de *T. equi* já foram descritas oito espécies de carrapatos dos gêneros *Dermacentor*, *Hyalomma* e *Rhipicephalus*, como vetores naturais no Velho Mundo. (STILLER et al., 2002). No Brasil, as espécies de carrapatos envolvidos na transmissão de *T. equi* e *B. caballi* são *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (GUIMARÃES et al., 1998) e *Dermacentor (Anocentor) nitens* (MUJICA LINARES, 2002), respectivamente.

Diferindo da maioria das espécies de *Babesia*, *T. equi* é transmitida transtadialmente, um processo similar ao que ocorre em *Theileria*. Geralmente a infecção é adquirida por ninfas e transmitida por fêmeas e machos adultos; sendo que esses estágios perdem a sua infecção após a transmissão ter ocorrido (YOUNG; MORZARIA, 1986).

2.7.5. Diagnóstico

Para o diagnóstico, devem-se considerar o exame clínico, evidências de infestação do carrapato vetor, considerações de viagem recente para regiões endêmicas da doença, avaliação de parâmetros laboratoriais e pesquisa parasitológica direta. A forma indireta é também muito utilizada, baseada na detecção de anticorpos específicos da doença. Acima de tudo, um teste de diagnóstico deve ser avaliado quanto a sua sensibilidade, especificidade, reprodução, simplicidade, custo e rapidez (BRUNING, 1996).

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica de rápido diagnóstico para a detecção de *Babesia* spp. O seu procedimento é suficientemente sensível, específico e reproduzível para uso na confirmação do diagnóstico laboratorial da babesiose aguda e da erlichiose granulocítica em animais (KRAUSE et al., 1996). O teste da PCR tem demonstrado uma sensibilidade superior a 100 vezes que a técnica de microscopia direta, detectando níveis de parasitemia na ordem de 10^{-8} a 10^{-9} , com alta especificidade, menor custo e maior rapidez de diagnóstico em relação à sonda de DNA (FIGUEROA et al., 1993). A alta especificidade e custos menos elevados, quando comparados com as sondas de DNA, fizeram com que a PCR se tornasse o método mais adequado para estudos epidemiológicos em áreas geográficas específicas (OHTA et al., 1995).

Bashiruddin et al. (1999) demonstraram ser possível, por meio da amplificação da região 18s do gene rRNA, detectar DNA de *T. equi* em sangue de equinos com parasitemias equivalentes a 0,000083%. Essa sensibilidade é muito superior ao relatado para esfregaços sanguíneos e sondas de DNA, que apresentam limites de detecção de 0,001% e 0,00025% respectivamente (POSNETT et al., 1991).

Variações da técnica de PCR têm sido desenvolvidas para os diagnósticos das babesioses, dentre as quais cita-se o nested PCR (nPCR), que apresenta maior sensibilidade que a PCR tradicional, sendo uma excelente alternativa para o diagnóstico de portadores assintomáticos de babesiose equina, bem como para estudos epidemiológicos. Nicolaiewsky et al. (2001) demonstraram que o nPCR, baseado na sequência do EMA-1 de *T. equi*, é capaz de detectar parasitemias de até 0,000006%, equivalente a 6 células infectadas de um total de 10^8 eritrócitos. A avaliação da técnica de PCR para a detecção rotineira de *T. equi* foi realizada por Rampersad et al. (2003) por meio da análise do sangue de equinos sadios e clinicamente doentes. Os resultados mostram que o nPCR foi capaz de detectar o parasito 3,6 vezes mais que esfregaços sanguíneos e 2,2 vezes mais do que o detectado na primeira amplificação do PCR.

2.7.6. Tratamento

Equinos que apresentam diagnóstico de babesiose crônica com repetidas reagudizações ou reinfecções são tratados com doses de dipropionato de imidocarb. O imidocarb pertence ao grupo das carbanilidas, com nome químico 3,3'-bis-(2-imidazolina-2yl) dipropionato de carbanilida (HARTWIG, 2008). Os derivados do imidocarb são recomendados para a quimioprofilaxia da tristeza parasitária bovina (FARIAS, 1998). Em equinos, o tratamento baseia-se no uso de drogas que combatem a fase aguda da doença, mas sabe-se que as drogas utilizadas causam graus variados de toxicidade ao hospedeiro, dependendo principalmente da dosagem em que são administradas (ADAMS, 1981)

Segundo Frerichs et al. (1973), a única dose capaz de eliminar a parasitemia pela *T. equi* é a de 4mg/kg de imidocarb a cada 72 horas em quatro aplicações, este protocolo terapêutico realizado pelos autores, resultou em resolução da infecção e não induziu efeito colaterais anticolinesterásicos. De acordo com fabricantes do produto, a dose de 2,4mg/kg, é recomendada como babesicida na fase aguda da doença. Ribas et al. (2004) demonstraram que as doses de 1,2 mg/kg e 2,4 mg/Kg, foram eficazes na quimioprofilaxia da babesiose equina, frente às situações estressantes impostas pelos autores, onde os equinos portadores estiveram predisposto a apresentarem quadros de reagudização da doença. Para os autores a dose de 1,2 mg/kg também já demonstrou ser eficaz no combate dos sinais clínicos da doença. Tendo essa dose como vantagem, a redução de custos e os riscos de intoxicação aos animais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local da Coleta dos Dados

A pesquisa foi desenvolvida em um Centro Comercial de Transferência de Embrião, situado no Município de Itaguaí – RJ, latitude 22°51'08"S, e em dois haras no município de Seropédica- RJ, latitude 22°44'38"S, durante o período correspondente a uma estação reprodutiva no Hemisfério Sul no ano de 2009-2010. A realização do hemograma completo dos animais foi feita no Laboratório de Quimioterapia Experimental em Parasitologia Veterinária (LQEPV) e a detecção do parasita através do nested-PCR foi realizada no Laboratório de Hemoparasitos e Vetores, ambos do Departamento de Parasitologia Veterinária Animal do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, localizada no município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro.

3.2. Delineamento Experimental

Foram utilizadas 13 doadoras e 40 receptoras de embrião da raça Mangalarga Marchador entre três e 12 anos de idade, escore cinco (classificação de um a nove) e previamente diagnosticadas para *T. equi*, pelo método de nested-PCR. Durante toda a pesquisa realizou-se controle de endoparasitas com produto proveniente da associação de ivermectina e o praziquantel¹ e para o controle de ectoparasitas, as éguas foram pulverizadas semanalmente com solução carrapaticida a base de cipermetrina 15%. As éguas doadoras de embrião foram mantidas em baias individuais, alimentadas com quatro quilos por dia de ração comercial, feno de alfafa, sal mineral e água *ad libitum*, as receptoras foram mantidas a pasto, sendo alimentadas em comedouros com dois quilos por dia de ração comercial, feno de alfafa, sal mineral e água *ad libitum*.

As éguas doadoras foram submetidas a duas coletas de embriões em dois ciclos estrais consecutivos (GI_d), em sequência esses mesmos animais foram tratados com dipropionato de imidocarb² na dose de 1,2 mg/kg IM em intervalos de 30 dias, com intuito de se reduzir a parasitemia, para realização de mais duas coletas de embriões em dois ciclos estrais subsequentes (GII_d), ao término foram comparadas as taxa de recuperação embrionária antes e após o tratamento contra *T. equi*.

As receptoras de embrião foram divididas aleatoriamente em dois grupos de 20 animais cada, onde um grupo foi o controle (GI_r), e o outro grupo, foi tratado (GII_r) com 1,2 mg/ Kg IM de dipropionato de imidocarb mensal, com intuito de avaliar a taxa de gestação aos 15, 30, 45 e 60 dias.

¹ Equimax® - Virbac

² Imizol - Intervet Shering-Plough Animal Health

3.3. Manejo Reprodutivo das Doadoras e Receptoras de Embrião

As éguas foram examinadas em intervalos de dois dias até apresentarem folículo com aproximadamente 30 mm de diâmetro, quando passaram a ser examinadas diariamente. Com o uso de exames ultrassonográficos foram registradas estruturas ovarianas presentes (folículos ou corpos lúteos), e ecogenicidade uterina. Esses exames também foram realizados sempre que considerados necessários para a pesquisa de fluido uterino durante o estro nas doadoras (LOPES, 2004).

As éguas ao apresentarem folículos ≥ 35 mm de diâmetros foram induzidas à ovulação com 1000 UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG)³ intravenoso. Foram realizadas monta natural ou IA com sêmen fresco 24 horas após a administração de hCG endovenosa. Caso não tivesse ocorrido a ovulação 48 horas após a IA ou a monta natural, a égua era então submetida ao mesmo procedimento. As IA foram realizadas utilizando sêmen fresco de qualidade comprovada com dose inseminante de 500×10^6 espermatozóides com movimento progressivo

3.4. Coleta e Transferência dos Embriões

A coleta de embrião foi realizada sete a nove dias após a ovulação. Após a devida higienização da vulva e região perineal da doadora, com a mão enluvada, uma sonda do tipo “Bivona”⁴ foi guiada através da cérvix até o corpo uterino, local onde foi inflado o “cuff” com 40 a 60 ml de ar. Em seguida a sonda foi tracionada em sentido caudal para que o “cuff” se ajustasse no óstio cranial da cérvix, obstruindo assim sua abertura. Uma vez a sonda inserida no corpo do útero, foi feita infusão de um litro de solução Ringer com Lactato pré-aquecida a cerca de 37°C. Todo líquido drenado passou através de um copo coletor com filtro milipore⁵. Sempre que o embrião era observado macroscopicamente no copo coletor o restante da solução contida no útero era drenada e a coleta encerrada. Caso o embrião não tivesse sido encontrado no primeiro lavado uterino, prosseguia-se com a coleta até terem sido realizados pelo menos três lavados com um litro de solução de Ringer com Lactato cada. Após a coleta do embrião, a égua doadora recebeu uma injeção intramuscular de PGF₂ α (6,71 mg de Lutalyse® ou 5 mg de Dinoprost⁶) para indução de um novo estro.

Encerrados os lavados, o fluido contido no filtro de coleta (aproximadamente 50 ml) foi rotacionado e vertido em uma placa de petri riscada e descartável de 100 x 20 mm. A placa foi levada ao microscópio estereoscópio com aumento de 10x, para o rastreamento do embrião que, quando localizado, era avaliado em aumento de 40x e classificado segundo McKinnon e Squires (1988). Os embriões foram imediatamente transferidos para uma placa de petri onde o mesmo foi “lavado” dez vezes em pequenas gotas de Holding Plus®⁷ antes de ser envasado para transferência.

³ Chorulon® 5000UI- Intervet Shering-Plough Animal Health

⁴ Bioniche®

⁵ Vitrocell/ Embriolife

⁶ Pfizer Saúde Animal

⁷ Embriolife Base- 4 mg BSA Fração V, Gentamicina 0,02mg, anfotericina B 0,25 μ g.

Os embriões foram depositados aleatoriamente no corpo do útero das receptoras entre as que apresentavam grau de sincronia de -1 a +5, cérvix firme e fechada, aumento de tônus uterino (cilíndrico e tubular) e ausência de evidência de dobras endometriais ou secreção uterina no exame ultrassonográfico.

O diagnóstico de gestação foi realizado por técnica de ultra-sonografia com o aparelho Sonovet 600^{®8} aos 15 dias da data de ovulação da doadora e repetido aos 30, 45 e 60 dias para as gestantes a fim de verificar a taxa de perda embrionária precoce.

3.5. Coleta e Avaliação Hematológica

As amostras de sangue foram coletadas através de punção da veia jugular, com agulhas 25x8, acondicionadas em frascos com anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético 11% (EDTA) e encaminhadas em caixas isotérmicas com gelo ao LQEPV da UFRRJ- RJ. A partir desse sangue colhido foi determinada a contagem de eritrócitos (He), hemoglobina (Hb), hematócrito (Ht), volume globular médio (VGM), concentração de hemoglobina globular média (CHGM), plaquetas, proteína plasmática total (PPT), leucócitos, contagem absoluta de linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos, segundo The Merck Veterinary manual (2010). Logo após a coleta, as amostras foram submetidas à realização dos hemogramas no setor de análises clínicas do LQEPV. Para o processo de hematimetria e leucometria foi utilizado o aparelho eletrônico Poch 100 IV Roche. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada através de esfregaços sanguíneos corados com conjunto corante panótico Instant-Prov e a determinação de proteínas por refratômetro manual.

3.6. Detecção Molecular de *Theileria equi* pelo Nested-PCR (n-PCR)

Para realização do nested-PCR, foram coletadas 2 amostras de sangue de 4ml de cada animal envolvido no experimento, por venopunção jugular em tubo do tipo *vacutanier* com anticoagulante etilenodiaminotetracético 11% (EDTA). Posteriormente, parte de cada amostra de sangue foi acondicionada em eppendorf de 1,5 mL e mantidas em freezer à -80°C até a extração de DNA.

O nested PCR foi realizado no Laboratório de Hemoparasitos e Vetores do Departamento de Parasitologia Veterinária Animal do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, localizada no município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro segundo técnica descrita por Nicolaiewsky et al.(2001).

3.6.1. Obtenção de DNA

Segundo Nicolaiewsky et al. (2001), alíquotas de 300 µL de cada amostra de sangue equino foram acondicionadas em um tubo de polipropileno de 2 ml e em seguida foram acrescentados 2 µL de proteinase K (20 mg/ml) e 500 µL de SDS a 20%, os quais foram

⁸ Medison[®]

homogeneizados em *vortex* e incubados a 65°C por 1 hora. Em sequência, foi removido o tubo da incubação e então adicionados 800 µL (ou 400 µL) de clorofórmio. A amostra obtida foi agitada vigorosamente em *vortex* e, após a completa homogeneização, acrescentou-se 350 µL de solução de precipitação protéica e uma nova homogeneização em *vortex* foi realizada. O material foi então centrifugado a 18.000 x G por 10 minutos e posteriormente a fase aquosa foi pipetada e transferida para outro tubo onde se adicionou 1 mL (ou 500 µL) de etanol 100% gelado. Ao homogeneizar por inversão o material obtido, ocorreu a formação de um precipitado, o qual foi visualizado entre 30 e 60 segundos. Caso não ocorresse a visualização do precipitado, aguardava-se por mais 10 minutos. Após a visualização do precipitado, este foi centrifugado a 13.000 rpm por cinco minutos e, após o desprezo do sobrenadante, acrescentou-se 1 mL (ou 500 µL) de etanol 70%. Centrifugou-se novamente por dois minutos, desprezando o sobrenadante; inverteu-se o tubo para secagem do sedimento (10 a 15 minutos) e adicionou-se 50 ou 100 µL de TE (tampão de extração) pH 8,7 com RNase e homogeneizou-se lentamente a amostra (10 µL de RNase por mililitro de amostra -1 µL de RNase para cada 1000 µL de TE) ou 50 ou 100 µL de água ultra pura e incubou-se a 37°C por 1 hora.

3.6.2. Reação de amplificação

Os *primers*⁹ utilizados foram baseados na sequência do gene EMA-1 de *T. equi* (KAPPEYER et al., 1993; número de acesso no Genebank L13784), sendo:

Quadro 2. Sequência de oligonucleotídeos iniciadores utilizados no nested-PCR.

Iniciadores	Sequência de Nucleotídeos	Fragmento Esperado
EMAE-F	(5'CCGCCCTTCACCTCGTTCTCAA-3')	396pb
EMAE-R	(5'TCTCGGCGGCATCCTTGACCTC-3')	
EMAI-F	(5'CCGTCTCCGTTGACTTGGCCG-3')	102pb
EMAI-R	(5'GGACGCGCTTGCTGGAGCCT-3')	

As reações de amplificação foram conduzidas em um volume total de 50 µL, utilizando 3 µL de cada amostra de DNA (160 ng), juntamente com 5 µL do tampão da enzima (200 mM TRIS-HCL, pH 8,4 e 500 mM KCL), 1,5mM de MgCl₂, 250 µM de cada dNTP¹⁰, 0,5 µM de cada *primer* EMAE-R/EMAE-F e 1,5 unidades de Platinum® Taq DNA polimerase (Invitrogen, nº10966-018)¹¹, completando o volume com água destilada ultrapura. As amplificações foram processadas em um termociclador (Techne Genius) com um ciclo inicial de 94°C, por 4 minutos, e 40 ciclos de 94°C por 40 segundos, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, finalizando com um ciclo de 72°C durante 4 minutos.

⁹ Invitrogen

¹⁰ Ludwigbiotec

¹¹ Invitrogen /Ludwigbiotec

As reações da segunda amplificação foram semelhantes, utilizou-se volume total de 50 μL , contendo 5 μL do tampão enzima (200 mM TRis-HCL, pH 8,4 e 500 mM KCL), 1,5mM de MgCl_2 , 250 μM de cada dNTP, 0,5 μM de cada *primer* EMAI-R/EMAI-F e 1,5 unidades de Platinum® Taq DNA polimerase, 32,2 μL de água destilada ultrapura e 1 μL do produto já amplificado. As amostras foram submetidas a um pré-aquecimento a 94°C por 4 minutos, e 35 ciclos de 94°C, por 1 minuto, 60°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, com extensão final a 72°C por 5 minutos.

3.6.3. Eletroforese de DNA em gel agarose

As preparações de DNA amplificadas forma submetidas à eletroforese horizontal, em gel agarose 1,5%, contendo 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de brometo de etídio, em tampão de corrida TAE (40 mM Tris-acetato, 2mM EDTA pH 8,0). Um volume de cinco microlitros de cada amostra acrescido de três microlitros de tampão de amostra (glicerol 40%, azul de bromofenol 0,02%) foi aplicado no gel. A corrida eletroforética foi realizada a 80V durante 70 minutos e, para determinação do tamanho dos produtos amplificados, foi utilizado um marcador de peso molecular de 100 pares de base (100pb ladder, Invitrogen)¹². Os produtos da PCR foram visualizados e fotografados em transiluminador de luz ultravioleta (BIO RAD).

3.7. Análise estatística

Os parâmetros hematológicos analisados foram transformados (log natural) e submetidos ao teste t ($p>0,05$) e as taxas de recuperação embrionária e de gestação dos animais foram avaliadas através do teste de qui-quadrado com nível de significância de 95% segundo Sampaio (2002).

¹² Ludwigbiotec/ Invitrogen

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Detecção de DNA de *Theileria equi* pelo Nested PCR em Amostras de Sangue de Éguas Doadoras e Receptoras de Embrião

Os resultados observados sob a detecção do parasita nas amostras de sangue coletadas são visualizados nas tabelas 3 e 4. As 13 doadoras e as 40 receptoras de embrião envolvidas no experimento, antes do tratamento, apresentaram resultado positivo para *T. equi* após a realização do nested PCR, o que demonstra a alta prevalência e disseminação deste protozoário nos municípios de Itaguaí e Seropédica- RJ. No Brasil diversas pesquisas são realizadas com intuito de caracterizar a ocorrência deste parasita, testes sorológicos são utilizados em estudos epidemiológicos, revelando a presença de anticorpos e indicando, portanto, que em algum momento da vida do animal, este esteve em contato com o parasita. O grande entrave destas técnicas sorológicas reside no fato de que os anticorpos podem permanecer circulantes por meses ou até mesmo por toda a vida do animal, caracterizando positividade em provas sorológicas. Em animais portadores crônicos devido a um baixo desafio, o animal pode não albergar o parasita na circulação sanguínea, nesta situação as provas moleculares são indicadas, pois são capazes de detectar a presença do protozoário circulante em baixas parasitemias. Segundo Rampersad (2003), com a introdução de técnicas moleculares de diagnóstico, vários ensaios, baseados na detecção de DNA pela reação em cadeia polimerase (PCR) e suas variantes, têm sido desenvolvidas com sensibilidade e especificidade superiores aos métodos parasitológicos convencionais, visando o melhor método de detecção em animais portadores assintomáticos. Posnett et al. (1991) demonstraram que a sensibilidade da PCR é superior à relatada para esfregaços sanguíneos e sondas de DNA, cujos limites são 0,001% e 0,00025% respectivamente.

O uso de *primers* da sequência do gene Ema-1 utilizado no nested PCR, obtiveram resultados positivos em amostras de sangue com parasitemia equivalente a 0,000008%, ou seja, $8 \times 10^{-6}\%$, essa sensibilidade é 1000 vezes maior que a observada em esfregaços sanguíneos corados com Giemsa (BOSE et al., 1995) e aproximadamente 100-1000 vezes superior às técnicas moleculares que fazem uso de sondas específicas de DNA (POSNETT et al., 1991).

Tabela 1. Detecção de DNA de *Theileria equi* pelo nested PCR, em amostras de sangue de éguas doadoras de embrião naturalmente infectadas, antes e após tratamento com dipropionato de imidocarb.

Detecção de DNA de <i>Theileria equi</i> Pelo Nested-PCR em doadoras		
Doadoras	Positivos	Negativos
Antes do Tratamento	13 (100%)	0
Pós Tratamento	4 (31%)	9 (69%)

Tabela 2. Detecção de DNA de *Theileria equi* pelo nested PCR, em amostras de sangue de receptoras de embrião naturalmente infectadas não tratadas e tratadas com dipropionato de imidocarb no início e final do experimento.

Detecção de DNA de <i>Theileria equi</i> pelo Nested PCR em receptoras				
Receptoras	Não Tratadas		Tratadas	
	Positivas	Negativas	Positivas	Negativas
Início do experimento	20 (100%)	0	20 (100%)	0
Final do experimento	16 (80%)	4 (20%)	10 (50%)	10 (50%)

Bashiruddin et al. (1999) através da amplificação da região 18s do gene rRNA, detectaram parasitemia equivalente a 0,000083%, ou seja, $8,3 \times 10^{-5}\%$, em equinos naturalmente infectados e Nicolaiewsky et al. (2001), avaliaram que o nested PCR é capaz de detectar parasitemias de até 0,00000006%, o equivalente a 6 células infectadas em um total de 10^8 eritrócitos. O nested PCR é capaz de detectar *T. equi* 2,2 vezes mais do que a primeira amplificação da PCR (RAMPERSAD et al. 2003).

Ao Avaliar equinos que apresentaram resultado negativo em métodos de detecção direta, tal como esfregaço sanguíneo e cultivo *in vitro*, o autor demonstrou que a sensibilidade do nested PCR é alta o suficiente para detectar equinos portadores e ainda apresenta-se superior ao da PCR. Este resultado foi atribuído a dois fatores: a capacidade do nested em realizar duas reações de amplificação, o que promoveu um aumento do número das cópias de DNA e a capacidade de codificar uma proteína de superfície altamente conservada na espécie de *T. equi*, o EMA-1, devido ao conjunto de *primers* utilizados na técnica. Nesse mesmo estudo, o pesquisador foi capaz de produzir amplificação detectáveis até a diluição $8 \times 10^{-5}\%$, o que representa a 8 células infectadas de um total de 10^7 eritrócitos (BALDANI, 2004).

Battsetseg et al. (2002) relataram ocorrência de *T. equi* no Brasil com taxas de 96% de infecção em equinos utilizando o nested PCR como método de detecção. Estudos anteriores também demonstraram que a infecção por *T. equi* foi generalizada em cavalos que vivem no Brasil e em Gana (ALHASSAN et al., 2007), corroborando com os resultados obtidos no presente estudo, onde todos os animais apresentaram-se positivos pelo nested PCR, mostrando a eficácia acurada deste método de detecção. Santos et al. (2008b) em estudo avaliando a ocorrência de transmissão transplacentária de *T. equi* obtiveram positividade em dois potros através desta técnica, os autores afirmaram que resultados falso-positivos na nested PCR são improváveis. Recentemente, em inquérito epidemiológico em um centro de reprodução equina no município de Itaguaí-RJ, e em dois haras no município de Seropédica-RJ, obtiveram a partir do nested-PCR 100% de positividade para *T. equi* em 28 doadoras e 54

receptoras de embriões da raça Mangalarga Marchador assintomáticas para babesiose (JACOB et al., 2010).

Segundo Alhassan et al. (2007) as técnicas de PCR devido a sua alta especificidade e sensibilidade, são capazes de detectar parasitemia de 0,000001% em aproximadamente 2,5µL de amostra de sangue.

A reação em cadeia polimerase (PCR) vem sendo investigada como alternativa de alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico rápido de doenças infecciosas. A nested-PCR, constituída por duas ampliações sucessivas do marcador molecular, é defendida por conciliar ainda maior sensibilidade e especificidade (LIMA et al., 2007). No entanto, seu uso em países com poucos recursos é limitada pelos custos elevados (NICOLAIEWSKY et al., 2001).

No início do presente estudo todas as doadoras e receptoras de embrião de ambos os grupos apresentaram resultado positivo para *T. equi* pelo método de nested-PCR. Após o tratamento das doadoras avaliadas 69% (9/13) apresentaram resultado negativo pela nested-PCR. Em relação às receptoras de embrião, o grupo não tratado apresentou 20% (4/20) de animais negativos ao final do experimento e 50% (10/20) de animais negativos no grupo tratado ao final do experimento pelo nested-PCR. Os resultados negativos obtidos nas receptoras sem tratamento ao final do experimento podem estar associados a uma redução nos níveis de parasitemia devido ao melhor manejo destes animais durante a estação de monta, mas possivelmente pode estar associado à ausência de DNA dos protozoários disponíveis na amostra sanguínea coletada, o que não indica que os animais estejam livres da babesiose. Apesar da altíssima sensibilidade demonstrada pelo teste, os portadores crônicos têm apresentado resultados falso negativos, sendo a provável explicação, que nesta fase talvez deva haver poucos parasitas circulantes, de tal forma que não haja DNA dos protozoários disponível na alíquota coletada (KERBER, 2004). Segundo Roncati (2006) quando se tratam de resultados negativos não se pode afirmar com total segurança a ausência do protozoário no organismo. Segundo Cunha et al. (1998), quando os animais estão na fase crônica da doença em geral apresentam sintomas inespecíficos e parasitemias inferiores a 0,01%, podendo levar a resultado falso negativo.

A maior porcentagem de animais negativos dos grupos tratados das doadoras e das receptoras se deve possivelmente pelo tratamento profilático com dipropionato de imidocarb. Acredita-se que, pelo fato dos animais não apresentarem nenhuma sintomatologia, a parasitemia já era baixa, porém ainda sim detectável e após o tratamento, o nível de parasitemia tornou-se inferior e provavelmente indetectável pela técnica. Segundo Simpson e Neal (1980) animais clinicamente infectados que receberam tratamento com dipropionato de imidocarb (5 mg/kg) apresentaram diminuição da parasitemia após dois dias, de 20% para 10% em eritrócitos infectados e em pôneis não tratados observou-se aumento de 20% para 60% em três dias. Para Henry (1993), mesmo em altas doses o imidocarb é apenas 50% efetivo na eliminação de *T. equi*. O tratamento com dipropionato de imidocarb em equinos infectados tem demonstrado que o medicamento promove uma remoção dos parasitas da circulação, entretanto os cavalos permanecem sempre infectados (BRUNING, 1996).

4.2 Valores Hematológicas em Equinos Naturalmente Infectados Antes e Após Tratamento com Dipropionato de Imidocarb

Todos os parâmetros do eritrograma das éguas doadoras de embrião encontram-se na tabela 3. As médias das hemácias foram de 7,62 e 8,16 para antes e após tratamento respectivamente. Verificou-se que o valor máximo e mínimo antes do tratamento foi de 8,53 e 6,99 e após o tratamento o valor máximo e mínimo foi de 9,87 e 6,88 respectivamente.

Estes resultados obtidos encontram-se dentro da normalidade dos parâmetros hematológicos para espécie equina segundo The Merck Veterinary Manual e não apresentam diferenças significativas ($p \geq 0,05$). Entretanto, é importante ressaltar que os valores de hemácias após o tratamento com o dipropionato de imidocarb, sofreram discreta elevação. Esses resultados corroboram com Hartwig et al. (2008) ao avaliarem os efeitos de diferentes doses de dipropionato de imidocarb, 2 mg/Kg e 4 mg/Kg a cada 72 horas, observaram logo após a administração do fármaco, elevação nos índices de hemácias, mas após a última aplicação, ocorreu diminuição de hemácias nos dois grupos. A justificativa para essa elevação segundo os autores é devido a uma ausência de resposta esplênica.

Tabela 3. Valores de média e desvio padrão dos parâmetros hematológicos (Hemácias, Hematócrito, Hemoglobina, Volume Globular Médio (VGM), Concentração de Hemoglobina Globular Média (CHGM), Plaquetas e Proteínas) de doadoras de embrião naturalmente infectadas por *Theileria equi* não tratadas e tratadas com dipropionato de imidocarb.

Parâmetros		Doadoras não tratadas	Doadoras tratadas	Valores de referência
Hemácias (10^6 céls/μL)	Média	7,62 ^a	8,16 ^a	6 - 12 ($\times 10^6$ céls/ μL)
	DP ¹	0,59	0,83	
Hematócrito (%)	Média	34,91 ^a	35,04 ^a	32 - 48%
	DP ¹	1,90	2,10	
Hemoglobina (g/DL)	Média	11,70 ^a	12,02 ^a	10- 18 (g/dL)
	DP ¹	0,71	0,83	
Volume Globular Médio (fL)	Média	45,92 ^a	45,57 ^a	34 - 58fL
	DP ¹	2,17	1,92	
Concentração de Hemoglobina Globular Média (g/dL)	Média	33,50 ^a	33,73 ^a	31-37 (g/dL)
	DP ¹	0,97	0,54	
Plaquetas (céls/μL)	Média	151.230,77 ^a	154.230,77 ^a	100.000- 600.000 (céls/μL)
	DP ¹	39.581,46	39.230,42	
Proteína (g/dL)	Média	6,75 ^a	6,89 ^a	6-8,5 (g/dL)
	DP ¹	0,54	0,68	

¹Desvio padrão; ^a^bLinhas com letras iguais não diferem significativamente ($p > 0,05$).

Os parâmetros de hematócrito se encontram dentro da normalidade, não houve diferença significativa entre as médias antes e após tratamento 34,91 e 35,04, respectivamente. Foram observados valores máximos antes e após o tratamento de 38,4 e 38,5 e valores mínimos de 33 e 31,5 respectivamente. Nizoli (2005) em estudo das alterações hematológicas demonstrou que não houve variações significativas de hematócrito entre equinos infectados e

sadios, acompanhados durante o período de doze meses, concordando com os achados apresentados acima. Hailat et al. (1997) observaram que durante a fase crônica não há alteração significativa entre o hematócrito de equinos não infectados e de portadores de *T. equi*. Segundo este autor os equinos infectados e previamente tratados com imidocarb não apresentaram nenhum sinal clínico da doença. Os mesmos autores ainda citam que os equinos altamente infectados experimentalmente tiveram queda no hematócrito em torno de 20 a 30%. Em um estudo semelhante, Nogueira et al. (2005) observaram que apenas os equinos infectados e não tratados com imidocarb tiveram queda de hematócrito relevante, mas que não ultrapassaram 15%. Cunha et al. (1998) obtiveram queda relevante de hematócrito em animais inoculados experimentalmente com *T. equi* comparado com o controle negativo. Os dados referentes aos valores de hemoglobina encontram-se dentro da normalidade, com médias de 11,70 e 12,02 antes e após o tratamento respectivamente, não diferindo significativamente. Verificou-se que os valores máximos antes e após o tratamento foram de 13,1 e 13,3 e os valores mínimos antes e após o tratamento foram de 10,2 e 10,8 respectivamente. Hailat et al. (1997) após serem submetidos a exercício extenuante, equinos que apresentavam sinais clínicos e positividade ao esfregaço sanguíneo apresentaram diminuição nos valores de hemoglobina comparados aos animais portadores crônicos e animais livres de babesiose.

O trabalho de De Waal et al. (1987) com animais infectados experimentalmente também mostrou uma queda nos parâmetros de hematimetria (Hm), hemoglobinometria (Hg) e hematócrito (Ht) tanto em animais infectados com *T. equi* como em animais infectados com *B. caballi*. Em concordância, Camacho et al. (2005) encontraram uma significativa diminuição da hematimetria (Hm), hemoglobinometria (Hg) e hematócrito (Ht) de animais com sintomatologia clínica e com presença do parasita no esfregaço sanguíneo, comparados com o controle negativo sem sinais clínicos.

As médias sobre o volume globular médio das doadoras antes e após o tratamento com dipropionato de imidocarb foram de 45,92 e 45,7. Estes resultados estão dentro dos padrões esperados para espécie equina, não apresentando diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as médias. Valores máximos antes e após tratamento de 48,5 e 48,5 e valores mínimos antes e após tratamento de 42,1 e 42,7. Em relação à Concentração de hemoglobina globular média antes e após tratamento com dipropionato de imidocarb foram de 33,50 e 33,73. Esses valores se encontram dentro da normalidade hematológica para equinos, e não diferem significativamente entre si, identificaram-se valores máximos antes e após tratamento de 36,3 e 34,5, valores mínimos de 32,4 e 33 antes e após o tratamento respectivamente. Os resultados também apresentados por Hailat et al. (1997) não demonstraram diferenças significativas no volume globular médio (VGM) e na Concentração de hemoglobina globular média (CHGM), em todos os animais envolvidos no experimento antes e após o tratamento com dipropionato de imidocarb.

Os dados relativos sobre as médias de plaquetas e proteínas plasmáticas totais das doadoras foram de 151.230,77 e 154.230,77 e 6,75, 6,89, não havendo diferença significativa antes e após o tratamento, os valores máximos antes e após o tratamento foram de 211.000, 214.000 e 7,4, 7,8, os valores mínimos antes e após tratamento foram de 72.000, 85.000 e 5,8, 5,8. Os valores estão dentro dos parâmetros normais para equinos e não diferem significativamente. Nizoli (2005) em estudo avaliando equinos infectados e sadios concluiu que não houve diferenças significativas entre as contagens diferenciais de leucócitos, hematócritos e proteínas plasmáticas totais entre animais cronicamente infectados e sadios.

As médias obtidas sobre o leucograma encontram-se na tabela 4. A contagem de leucócitos das doadoras, antes do tratamento foi de 12.900,00 e após o tratamento de 11.646,15 esses valores demonstram que houve uma redução dos leucócitos com o uso do

dipropionato de imidocarb em éguas portadoras crônicas, visto que a média antes do tratamento excediam os limites considerados normais e após o tratamento os animais voltaram à normalidade dos padrões hematológicos, os valores máximos antes e após o tratamento foram de 16700 e 14600 e os valores mínimos foram de 10200 e 8900 respectivamente.

Knowles (1996) observou que os resultados dos exames diferenciais de leucócitos das doadoras demonstraram padrões normais na comparação entre animais positivos e negativos. Este achado tem sido citado quando se trata de animais cronicamente infectados, enquanto que animais com sintomatologia clínica da infecção demonstram alterações, principalmente em leucócitos conforme descrito por Rudolph et al. (1975).

Segundo Knowles (1996) ainda não está bem definida como é a resposta imune mediada por células para o controle da parasitemia de *T. equi*, mas existe uma correlação estabelecida entre a inibição da migração de leucócitos e o grau de parasitemia. Adicionalmente, durante o início da infecção, *T. equi* concentra sua ação sobre o sistema mononuclear fagocítico (fase linfoproliferativa), para posteriormente provocar uma severa anemia, já que podem alcançar elevados níveis de parasitemia, próximos a 80% de eritrócitos parasitados. Em ambos os casos estão presentes os processos auto-ímmunes manifestados com fenômenos de eritrofagocitose, descritos por Levine (1985) e Schein (1988). Em concordância, Hailat et al. (1997) encontraram um aumento de leucócitos nos animais com sinais clínicos e positivos no exame de esfregaço sanguíneo, segundo os autores este resultado pode ser explicado, pois os animais foram submetidos a exercícios intensos o que pode ter causado lesões musculares elevando assim os leucócitos. Foi observado um aumento significativo em monócitos nas amostras positivas quando comparadas com as negativas.

Tabela 4. Valores observados dos parâmetros leucocitários (Leucócitos, Linfócitos, Monócitos, Neutrófilos, Eosinófilos) de doadoras de embrião naturalmente infectadas por *Theileria equi* não tratadas e tratadas com dipropionato de imidocarb.

		Doadoras não tratadas	Doadoras tratadas	Valores de referência
Leucócitos (célus/μL)	Média	12900,00^a	11646,15^b	6.000- 12.000 (células/μL)
	DP ¹	1733,97	1740,51	
Linfócitos (célus/μL)	Média	5379,08^a	5421,54^a	1.500-5.000 (células/μL)
	DP ¹	1357,71	1717,33	
Monócitos (célus/μL)	Média	270,62^a	714,77^a	0-600 (células/μL)
	DP ¹	171,00	1394,02	
Neutrófilos (célus/μL)	Média	6742,85^a	5524,54^b	3.000-6.000(células/μL/
	DP ¹	770,69	1008,35	
Eosinófilos (célus/μL)	Média	518,92^a	432,23^a	0-800(células/μL)
	DP ¹	283,62	318,27	

¹Desvio padrão; ^{a,b}Linhas com letras iguais não diferem significativamente (p>0,05).

Em relação aos linfócitos foi verificada média antes do tratamento de 5379,08 e após o tratamento de 5421,54, valores máximos e mínimos antes do tratamento de 8684 e 3604 e, após, o tratamento de 8468 e 3100 respectivamente, estas médias não diferiram significativamente.

Os dados referentes à contagem de monócitos das doadoras antes do tratamento foram de 270,62 e após o tratamento de 714,77, os resultados não diferem significativamente segundo teste t ($p > 0,05$), porém no grupo tratado, estão acima dos parâmetros normais para equinos, com valores máximos antes e após tratamento de 501 e 5320 e valores mínimos antes e após tratamento de 0 e 0. Esses valores corroboram com Rudolph et al. (1975) e Portz et al. (2007) que observaram monocitose em resposta a infecção por *T. equi* em equinos adultos da raça PSI. A fagocitose dos parasitos por monócitos e neutrófilos é um fenômeno comum, portanto, ocorre um aumento esperado de células fagocitárias em doenças causadas por protozoários.

Segundo Coles (1984) a monocitose ocorre em diversas condições, como algumas doenças infecciosas (Ex. brucelose) e doenças crônicas acompanhadas por reações granulomatosas, porém nenhum animal apresentou sintomatologia característica de doença.

A principal função dos monócitos e dos macrófagos é a fagocitose, especialmente de partículas grandes tais como debris celulares, sendo os únicos capazes de fagocitar grandes microorganismos como protozoários (KERR, 2003).

Quanto às médias de neutrófilos das doadoras antes do tratamento de 6742,85 e após o tratamento de 5524,54, houve diferenças significativas nas médias ($p < 0,05$), valores máximos e mínimos antes do tratamento de 8195 e 5508 e após o tratamento de 6600 e 3600 respectivamente.

Rudolph et al. (1975) e Portz et al. (2007) afirmaram que a fagocitose dos parasitos por neutrófilos é um fenômeno comum, portanto ocorre um aumento esperado de células fagocitárias em doenças causadas por protozoários.

As médias obtidas na contagem de eosinófilos foram de 518,92 e 432,23, não havendo diferença significativa antes e após o tratamento, os valores máximos antes e após o tratamento foram de 1002 e 1080 e os valores mínimos antes e após tratamento foram iguais a zero.

Não foram observados neutrófilos bastões na contagem diferencial de leucócitos em éguas doadoras de embrião antes e após tratamento com dipropionato de imidocarb.

Segundo Failace (2006) o hemograma é um exame muito utilizado na clínica médica equina, sendo um indicador de alterações que podem não ser percebidas ao exame clínico, além de servir como procedimento para avaliar a saúde animal e auxiliar na obtenção de um diagnóstico. A avaliação dos elementos celulares do sangue, quantitativamente e qualitativamente, fornece informações indispensáveis ao controle evolutivo das doenças.

Todos os parâmetros sobre o eritrograma das receptoras de embrião encontram-se na tabela 5. Os valores observados encontram-se dentro da normalidade esperada para a espécie equina. Os resultados avaliados sobre as variações das médias das hemácias nas receptoras de embrião foram de 7,59 e 7,56 para o grupo de receptoras não tratadas e tratadas respectivamente. Verificou-se que o valor máximo e mínimo do grupo não tratado foi de 9,22 e 6,46 e o valor máximo e mínimo do grupo tratado foi de 9,56 e 6,27 respectivamente. Estes resultados não apresentam diferenças significativas entre si.

Tabela 5. Valores de média e desvio padrão dos parâmetros hematológicos (Hemácias, Hematócrito, Hemoglobina, Volume Globular Médio, Concentração de Hemoglobina Globular Média, Plaquetas e Proteínas) de receptoras de embrião naturalmente infectadas por *Theileria equi* não tratadas e tratadas com dipropionato de imidocarb.

Parâmetros		Receptoras não tratadas	Receptoras tratadas	Valores de referência
Hemácias (10⁶ céls/μL)	Média	7,59 ^a	7,56 ^a	6 - 12 (x10⁶ céls/ μL)
	DP ¹	0,76	1,01	
Hematócrito (%)	Média	34,79 ^a	34,32 ^a	32 - 48%
	DP ¹	3,46	4,68	
Hemoglobina (g/DL)	Média	11,68 ^a	11,6 ^a	10- 18 (g/dL)
	DP ¹	1,29	1,67	
Volume Globular Médio (□I)	Média	45,89 ^a	45,43 ^a	34 - 58fL
	DP ¹	2,17	2,75	
Concentração de Hemoglobina Globular Média (g/dL)	Média	33,52 ^a	32,79 ^a	31-37 (g/dL)
	DP ¹	0,78	4,48	
Plaquetas (céls/μL)	Média	189700 ^a	181900 ^a	100.000- 600.000
	DP ¹	44064,67	37719,04	
Proteína (g/dL)	Média	7,54 ^a	7,63 ^a	6-8,5 (g/dL)
	DP ¹	0,65	0,56	

¹Desvio padrão; ^a Linhas com letras iguais não diferem significativamente (p>0,05).

No parâmetro hematócrito nas receptoras de embrião, não houve diferença significativa entre as médias dos grupos de receptoras não tratadas 34,79 e tratadas 34,32 respectivamente. Foram observados valores máximos nas receptoras não tratadas de 41,6 e tratadas de 41,7 e valores mínimos de 29,9 para as não tratadas e 27,7 para receptoras tratadas.

Os padrões de hemoglobina apresentam-se com médias de 11,68 no grupo de receptoras não tratadas e 11,6 em receptoras de embriões tratadas, estes valores não diferiram significativamente (p>0,05). Verificou-se que os valores máximos para o grupo não tratado e para o grupo tratado foram de 14,5 e 13,6 e os valores mínimos foram de 10 e 9,1 para os grupos de receptoras não tratadas e tratadas respectivamente.

Os dados analisados sobre as médias do volume globular médio das receptoras de embrião não tratadas e tratadas foram de 45,89 e 45,43, respectivamente, não apresentando diferenças significativas entre as médias. Valores máximos sem tratamento e após tratamento de 49,4 e 49,7 e valores mínimos sem tratamento e após tratamento de 41,6 e 40,3 respectivamente. As médias obtidas sobre a CHGM das receptoras não tratadas e tratadas com dipropionato de imidocarb foram de 33,52 e 32,79, esses valores se encontram dentro da normalidade hematológica para equinos, e não diferem significativamente entre si, identificaram-se valores máximos nos grupos não tratados e tratados de 34,9 e 36,4 e valores mínimos de 32,1 e 14,6 para os grupos não tratados e tratados.

A contagem de plaquetas obteve média de 189.700 para o grupo de receptoras não tratadas e 181.900 para o grupo de receptoras tratadas, valores máximos do grupo sem

tratamento de 274.000 e 253.000 para o grupo com tratamento e valores mínimos de 113.000 e 119.000 para o grupo de receptoras não tratadas e tratadas respectivamente. Em relação às proteínas plasmáticas totais, as médias foram de 7,54 e 7,63 para o grupo não tratado e tratado, o valor máximo para o grupo sem tratamento foi de 8,9 e 8,8 para o grupo tratado e os valores mínimos de 6,5 e 6,4 para os grupos não tratados e tratados.

Takeet et al. (2009) em uma descrição de caso clínico, avaliou dois garanhões com *T. equi* e observou que os animais apresentavam histórico de cólica, anorexia e polidipsia poucos dias após torneio de pólo, o exame físico dos animais apresentou membrana ocular pálida, linfadenite submandibular, desidratação leve, descarga ocular e presença de carrapatos, os animais apresentavam anemia macrocítica normocrômica. Os garanhões foram tratados com 3 aplicações de 4 mg/kg de dipropionato de imidocarb em intervalos de 72 horas e com repetição de uma dose um mês após o tratamento inicial. Foram realizados exames de sangue nos quais após o tratamento observou-se melhora na contagem de hemácias, hemoglobina e hematócrito, antes do tratamento estes valores estavam abaixo da normalidade e após o tratamento atingiram valores padrões, observou-se também decréscimo dos valores de VGM e CHGM, que atingiram a normalidade em ambos os equinos após o tratamento. No presente estudo as receptoras de embrião são portadoras crônicas e não apresentam sintomatologia de babesiose, o que pode ser visualizado através do hemograma completo, no qual não se observou diferenças significativas na série vermelha, e todas as fêmeas apresentaram padrões normais de hematologia. Verificou-se discreta queda em todos os parâmetros após o tratamento com dipropionato de imidocarb, com excessão da concentração de proteína plasmática total.

Todos os parâmetros da série branca das receptoras de embrião encontram-se na tabela 6 e estão dentro da normalidade esperada para a espécie equina. As médias obtidas sobre a contagem de leucócitos das receptoras de embrião não tratadas foi de 11.100 e do grupo receptoras tratadas 11.395, não havendo diferença significativa entre as médias, observou-se valores máximos para o grupo não tratado e tratado de 14300 e 15700, respectivamente, e valores mínimos 8.000 para o grupo não tratado e 8.300 para o grupo tratado.

Tabela 6. Valores observados dos parâmetros leucocitários (Leucócitos, Linfócitos, monócitos, Neutrófilos, Eosinófilos) de receptoras de embrião naturalmente infectadas por *Theileria equi* não tratadas e tratadas com dipropionato de imidocarb.

Parâmetros	Média/DP	Receptoras não	Receptoras	Referências
		tratadas	tratadas	
Leucócitos (célus/ μ L)	Média	11100 ^a	11395 ^a	6000- 12000 (células/ μ L)
	DP ¹	1810,79	1888,32	
Linfócitos (célus/ μ L)	Média	4630,85 ^a	4339 ^a	1500-5000 (células/ μ L)
	DP ¹	1178,03	1426,68	
Monócitos (célus/ μ L)	Média	244,55 ^a	477,7 ^b	0-600 (células/ μ L)
	DP ¹	200,22	365,76	
Neutrófilos (célus/ μ L)	Média	5714,25 ^a	5909,5 ^a	3000-6000(células/ μ L/
	DP ¹	1315,13	1522,02	
Eosinófilos (célus/ μ L)	Média	392,6 ^a	668,65 ^b	0-800(células/ μ L)).
	DP ¹	255,02	406,71	

¹Desvio padrão, ^{ab}Linhas com letras iguais não diferem significativamente ($p > 0,05$).

As médias da contagem de linfócitos do grupo de receptoras não tratadas e do grupo tratado foram de 4.630 e 4.339, respectivamente. O valor máximo para o grupo sem tratamento foi de 6.105 e 6.950 para o grupo tratado e os valores mínimos de 2.136 e 1.875 para os grupos não tratados e tratados, não houve diferença significativa entre as médias estudadas.

Os dados referentes à contagem de monócitos das receptoras de embrião obtiveram médias antes do tratamento de 244 e após o tratamento de 477, apesar dos parâmetros estarem dentro da normalidade esperada, as médias diferem significativamente segundo teste t, com valores máximos para o grupo não tratado de 882 e para o grupo tratado de 1260 e valores mínimos nulos para o grupo não tratado e para o grupo tratado.

As médias da contagem de neutrófilos para o grupo de receptoras não tratadas foi de 5.714 e do grupo de receptoras tratadas foi de 5.909 não houve diferenças significativa nas médias, valores máximos e mínimos do grupo não tratado foram de 8618 e 3040 e do grupo tratado foram de 9625 e 3552 respectivamente. O valor referente à média da contagem de eosinófilos do grupo de receptoras não tratadas foi de 392 e do grupo tratado foi de 668, apesar de esses dados estarem dentro do padrão de normalidade para a espécie equina, eles diferiram significativamente entre si. Os valores máximos observados para o grupo sem tratamento e com tratamento foram de 1068 e 1680 e os valores mínimos foram nulo para o grupo não tratado e 113 para o grupo tratado respectivamente.

Takeet et al., (2009) observou aumento de leucócito em um dos equinos do experimento, corroborando com os resultados desse estudo, entretanto o segundo animal apresentou diminuição da taxa de leucócitos após o tratamento, ambos os valores estavam dentro da normalidade para a espécie. O mesmo autor observou em animais tratados para *T.equi* decréscimo da contagem de neutrófilos para os valores de normalidade, após os tratamentos, mostrando eficácia do produto, observou aumento nas taxas de linfócitos e em contrapartida, observou diminuição na contagem de monócitos e eosinófilo após os tratamentos, o que não foi observado no presente estudo. Entretanto, todas as éguas presentes no estudo em questão em nenhum momento apresentaram sintomatologia clínica para *T.equi*.

Não foram observados neutrófilos bastões na contagem diferencial de leucócitos em éguas receptoras de embrião antes e após tratamento com dipropionato de imidocarb.

Segundo Schein (1988), equinos infectados por *T. equi* desenvolvem uma sólida imunidade que protege contra a doença clínica no caso de re-exposições ao parasito. Esta proteção tem sido atribuída à contínua estimulação do sistema imune por parasitos que persistem no organismo durante a fase crônica da enfermidade, mesmo em baixas parasitemias. Segundo Bruning (1996) o tratamento de *T. equi* com dipropionato de imidocarb tem demonstrado remover o parasita da circulação, porém, os equinos infectados permanecem portadores por toda a vida, sendo estes responsáveis pela propagação e manutenção da infecção.

4.3 Parâmetros Reprodutiva em Éguas Antes e Após Tratamento com Dipropionato de Imidocarb

Previamente ao tratamento com dipropionato de imidocarb, 53,84% (14/26) das éguas doadoras infectadas naturalmente por *T. equi* apresentaram coleta embrionária positiva. Após o tratamento, o número de éguas doadoras com coleta positiva aumentou para 65,38% (17/26). Mesmo com esta superioridade numérica observada pós-tratamento, a realização do teste qui-quadrado não demonstrou diferença significativa ($p > 0,05$).

A recuperação embrionária pode ser afetada por inúmeros fatores inerentes ao programa de TE, como por exemplo: dia da coleta do embrião, idade da doadora, fertilidade da doadora, qualidade do sêmen e experiência do técnico.

Segundo Squires et al. (2003) a taxa de recuperação embrionária está entre 50 e 75%. Alguns estudos demonstram variações nas taxas de recuperação embrionária de: 50,9% e 59,5% Fleury et al. (2001a), 63,4% em 658 coletas, Jacob et al (2002), e 60% de Gusmão et al. (2010).

Em um estudo Squires e Seidel (1995) observaram uma queda em relação à taxa de recuperação de embriões de acordo com a idade da doadora, em éguas jovens (2 a 4 anos) a média observada de recuperação embrionária foi de 85%; em éguas adultas (4 a 18 anos) de 64,4% e para éguas velhas de 24,1%.

O dia da coleta foi avaliado por Fleury (1998), que verificou taxas de recuperação embrionária de 49,3%; 58,0 % e 54,5% em coletas realizadas, no sétimo, oitavo e nono dia pós ovulação. Quando as coletas foram realizadas em D7 e D8, Fleury et al. (2001a) obtiveram recuperação de 37,5% e 62,8%.

Entretanto, dados relativos a um programa comercial de TE em equinos no Brasil com grande número de coletas, não verificaram diferenças significativas na taxa de recuperação embrionária nos dias D7, D8 e D9 pós-ovulação 49,3%; 58,0% e 54,5%, respectivamente reforçando as informações previamente mencionadas segundo Fleury e Alvarenga (1999).

Santos et al. (2008a) utilizaram seis (D6), sete (D7), oito (D8) e nove (D9) dias após ovulação, obtiveram taxa de recuperação embrionária de 40,0% (14/35), 57,9% (136/235), 68,1% (243/357) e 63,0% (17/27), respectivamente, encontrando diferença significativa ($p < 0,05$) entre os dias de coleta D6 e D7 em relação ao D8.

Realizando levantamento retrospectivo de quatro estações reprodutivas em éguas da raça Mangalarga Marchador entre três e vinte e seis anos de idade, Jacob et al. (2010) obtiveram 62% (504/809) de recuperação embrionária com coletas de embriões entre D7 e

D9.

No período de duas estações reprodutivas (2005-2006), Kumar et al. (2008) obtiveram taxa de recuperação embrionária em D7 de 81,19% (95/117), utilizando éguas de quatro a quatorze anos.

Mesmo utilizando gananhões com sêmen dentro dos padrões desejados, pode haver influência na taxa de recuperação embrionária. Em uma análise com 34 gananhões de diferentes raças e 1274 ciclos, promovendo a recuperação dos embriões em D6, D7 e D8 pós-ovulação das doadoras, foi obtida uma variação na taxa de recuperação embrionária de 26,3% a 100% (SAMPER, 2000). Também foi observada diferença significativa em um trabalho utilizando cinco gananhões, cujo resultado obtido variou entre 28,6% a 84% na recuperação embrionária (FLEURY et al., 1997). Os mesmo autores em 2001 utilizaram quatro gananhões com fertilidade comprovada, e observaram taxa de recuperação embrionária entre 44,4% a 73,7%. Diferenças nas taxas de recuperação embrionária também foi reportado por Gomes et al. (2001), utilizando seis gananhões cujo sêmen estava dentro dos padrões exigidos pelo CBRA, obtiveram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre 2 gananhões com variação nas taxas de recuperação de 46,7% a 78,6% .

Os gananhões utilizados em ambos os grupos da presente pesquisa apresentavam fertilidade comprovada, reduzindo assim a influência do sêmen sobre as taxas de recuperação embrionária.

Mortensen et al. (2009), ao avaliarem a influência do exercício físico por 30 minutos em temperatura superior a 30°C e umidade relativa superior a 50%, obtiveram diferença significativa sobre a taxa de recuperação embrionária. A taxa de recuperação obtida no grupo controle foi de 63% (22/35) e no grupo exercitado de 34% (11/32) ($P < 0,05$). Os autores afirmam que o aumento da temperatura promovido pelo exercício físico promoveu alterações na dinâmica do ciclo estral, pois houve alteração na função ou liberação de gonadotrofinas. Esses valores demonstram a grande influência que o estresse pode causar sobre a eficiência reprodutiva em um programa de TE, devido à liberação de glicocorticóides.

O stress causado em animais portadores de babesiose com sinais clínicos da doença tratados com dipropionato de imidocarb em dose terapêutica (4mg/kg, q72h, em 4 aplicações) pode promover grande redução na taxa de recuperação embrionária. Além disto, este fármaco pode levar a quadros de cólica, salivação, irritabilidade, hipermotilidade gastrointestinal, insuficiência renal, hepática, entre outras. Porém, fazendo uso de doses profiláticas (1,2 mg/kg) em éguas portadoras crônicas não causaram efeito colateral indesejável negativo nos animais, bem como não diminuiu a taxa de recuperação embrionária conforme demonstrado no presente trabalho.

Vários fatores influenciam diretamente na taxa de gestação em um programa TE, dentre os mais importantes estão aqueles relacionados com a receptora (manejo e seleção), a qualidade do embrião, dia de inovulação, e o fator técnico. Programas Comerciais de TE no Brasil conduzidos por profissionais criteriosos e experientes na raça Mangalarga Marchador (JACOB et al., 2002; 2010; GOMES et al., 2004) vem mostrando que o método de transferência transcervical gera taxas de gestação em torno de 70% em concordância com os pesquisadores citados, Rocha et al. (2007) ao avaliar seis estações reprodutivas obtiveram média geral para 15 dias de gestação de 73,4%.

A taxa de gestação aos 15, 30, 45 e 60 dias no grupo não tratado foi de 70% (14/20) não havendo perda embrionária. No grupo tratado a taxa de gestação aos 15 dias foi de 85% (17/20) e aos 30, 45 e 60 dias a taxa de gestação foi 80% (16/20), pois houve perda embrionária aos 30 dias de gestação em uma das éguas tratadas. Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) sobre as taxas de gestação.

Santos et al. (2008a) obtiveram 63,6% de gestação aos 60 dias de 382 embriões transferidos para receptoras entre D2 e D8; Jacob et al. (2010) alcançaram 60% de gestação aos 60 dias (274/454). No presente estudo não foi considerado o dia no qual a receptora foi inovulada, uma vez que vários trabalhos demonstram não haver diferenças significativas entre D3 e D8.

O efeito da idade da égua doadora de embrião sobre as taxas de prenhez foram investigados por Vogelsang e Vogelsang (1989). Estes autores verificaram que embriões de éguas entre 2 e 8 anos resultaram em maior taxa de gestação (70%, 59/84) comparados ao de éguas entre 9 e 17 anos (51%, 50/97,) e maiores que 18 anos (55%, 50/90,). Contrariamente, Carney et al. (1991) relataram que embriões de éguas entre 2 a 6 anos, 7 a 12 anos, 13 a 18 anos e éguas com mais que 19 anos resultaram em taxas de prenhez similares ($p>0,05$). No presente experimento, as receptoras utilizadas tinham idade entre três e 12 anos, o que também não teria influência na taxa de gestação, estando de acordo com os resultados reportados acima.

Fleury et al. (2001b) avaliaram a influência do garanhão sobre as taxas de gestação em duas estações reprodutivas, obtendo de 50% a 80,7% de gestação. Os autores não encontraram diferenças significativas ($P>0,05$) sobre as taxas de gestação. Em um estudo similar, também avaliando a taxa de gestação utilizando seis garanhões, Gomes et. al. (2001) não observaram diferença significativa nas taxas de gestação aos 14 e 60 dias. Os valores obtidos na taxa de gestação do presente estudo corroboram com os resultados acima, uma vez que os mesmos garanhões foram utilizados em ambos os grupos.

Em relação ao método de deposição do sêmen no útero, os autores não observaram diferença significativa ($P>0,05$) nos índices de gestação comparando-se a monta natural (87,5%) e a inseminação artificial com sêmen fresco (73,7%) ou refrigerado (80,3%). No presente estudo a Mn e IA foram utilizadas nos dois grupos, portanto este fator não influenciou nos resultados obtidos.

Utilizando da técnica da bainha coberta, que consiste na utilização de uma pipeta de inovulação revestida por uma camisa sanitária para a transferência do embrião, Squires et al. (1982) obteve taxa de gestação de 54%, e quando utilizou a bainha sem estar protegida, a taxa de gestação foi de 23%. Utilizando da mesma técnica, Wilson et al. (1987), Pastorello et al. (1996) obtiveram taxa de gestação de 77% e 80% respectivamente. As inovulações no presente estudo foram realizadas utilizando-se pipeta de IA revestida por camisa sanitária (IMV[®]), e obtendo taxas de gestação compatíveis com as técnicas já relatadas.

A taxa de prenhez e perda embrionária podem ser influenciadas em receptoras que estiverem perdendo peso durante a estação reprodutiva, mesmo com boa condição corporal. Receptoras submetidas à nutrição de boa qualidade obtiveram 70% de prenhez (50/71) e 5,6% de perda embrionária; receptoras submetidas à nutrição de baixa qualidade obtiveram 35,56% de prenhez (85/239) e 21,1% de perda embrionária (SAMPER, 2000). No presente trabalho, as éguas utilizadas apresentavam escore corporal 5 (escala de 1 a 9), aproximadamente entre 350 e 450kg ou seja estavam em boa condição corpórea estando de acordo com (SAMPER, 2000), apesar do grupo tratado ter tido uma perda embrionária.

Ao avaliar taxa de prenhez e perda embrionária precoce em um programa comercial de TE não cirúrgica em éguas da raça Mangalarga Marchador durante seis estações reprodutivas, Rocha et al. (2007) obtiveram aos 30, 45 e 60 dias de gestação, taxas de 69,9 e 4,8%; 66,7 e 9,0%; e 64,5 e 12,2%, respectivamente.

A estimativa da taxa de perda embrionária precoce entre 4 e 14 dias após a ovulação está em torno de 9% para éguas normais ($P<0,001$) e para éguas subfértéis a perda é de aproximadamente 62% (BALL et al., 1989). Segundo Carnevale et al. (2000) a incidência de

morte embrionária precoce foi de 15,5% (65/419) dos 12 a 50 dias de gestação. Neste mesmo experimento, o autores relatam que as taxas de perda embrionária foram significativamente maiores nas receptoras utilizadas de D7 a D9 dias em relação as inovuladas em D5 e D6 após ovulação.

Portanto, as éguas do grupo tratado apresentaram melhora numérica de 15% na taxa de gestação aos 15 dias e de 10% aos 30, 45 e 60 dias de gestação em relação ao grupo não tratado.

5. CONCLUSÕES

- Com base nas observações obtidas conclui-se que a prevalência de equinos positivos à *Theileria equi*, demonstrou que a região é uma área endêmica para theileriose;
- As análises do eritrograma e do leucograma não constituem um parâmetro seguro para se discriminar positividade na fase crônica da infecção por *Theileria equi*.
- O tratamento com dipropionato de imidocarb não promoveu melhora significativa ($p>0,05$) nas taxas de recuperação embrionária e taxas de gestação aos 15, 30, 45 e 60 dias.
- Numericamente houve uma melhora de 11,54% na taxa de recuperação embrionária, 15% na taxa de gestação aos 15 dias e 10% na taxa de gestação aos 30,45 e 60 dias do grupo tratado com dipropionato de imidocarb em relação ao grupo não tratado.

6. BIBLIOGRAFIA

ADAMS, L. G. Clinicopathological aspects of imidocarb dipropionate toxicity in horses. *Research Veterinary Science*, v. 31, p. 54-61, 1981.

ALHASSAN, A.; PUMIDONMING, W.; OKAMURA, M.; HIRATA, H.; BATTSETSEG, B.; FUJISAKI, K.; YOKOYAMA N.; IGARASHI, I. Development of a single-round and multiplex PCR method for the simultaneous detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in horse blood. *Veterinary Parasitology*. v. 129, p. 43–49, 2005.

ALHASSAN, A.; GOVIND, Y.; TAM, N. T.; THEKISOE, O. M.; YOKOYAMA, N.; INOUE, N.; IGARASHI, I. Comparative evaluation of the sensitivity of LAMP, PCR and *in vitro* culture methods for the diagnosis of equine piroplasmiasis. *Parasitology Research*, v. 100, p. 1165–1168, 2007

ALLEN, W. R. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. *Reproduction*, v. 12, p. 513-527, 2001.

ALLEN, W. R.; WILSHER, S.; TURNBULL, C.; STEWART, F.; OUSEY, J.; ROSSDALE, P. D.; FOWDEN, A. L. Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I. Development in utero. *Reproduction*, v. 123; p. 445-53, 2002.

ALLEN, W. R.; WILSHER, S.; TIPLADY, C.; BUTTERFIELD, R. M. The influence of maternal size on pre- and post natal growth in the horse: III Postnatal growth. *Reproduction*, v. 127, p. 67-77, 2004.

ALLSOPP, M. T.; CAVALIER-SMITH, T.; DE WAAL, D. T.; ALLSOPP, B. A. Phylogeny and evolution of the piroplasms. *Parasitology*, v. 108, n. 2, p. 147-152, 1994.

ALONSO, M. A. Efeito das características uterinas e dia do ciclo na taxa de prenhez e níveis séricos de progesterona em éguas candidatas à receptora de embrião. 72p. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista Botucatu, São Paulo, 2007.

ALONSO, M. A. Seleção, manejo e fatores que influenciam as taxas de prenhez em éguas receptoras de embrião In: XXII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, Guarujá. *Acta Science Veterinariae*, v. 36, n. 1, p. 207-214, 2008.

ALVARENGA, M. A.; ALVARENGA, F. C. L.; MEIRA, C. Some modifications in the technique used to recover equine embryo. *Resumos 13rd International Symposium on Equine Embryo Transfer, Buenos Aires, Argentina*. p. 34-35, 1992.

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 7, p. 145-173, 1987.

BALDANI, C. D. *Estudo comparativo de técnicas de diretas (esfregação sanguíneo, cultivo in vitro e reação em cadeia polimerase) e indiretas (reação de imunofluorescência, ensaio imunoenzimático e fixação de complemento) no diagnóstico de Babesia equi em equinos naturalmente infectados, SP.* 93p. Tese (Doutorado)- Universidade Estadual de São Paulo, Jaboticabal, 2004.

BALL, B. A.; LITTLE T. V.; WEBER, J. A.; WOODS, G. L. Survival of day-4 embryos from young mares and aged, subfertile mares after transfer to normal recipient mares. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 85, p. 187-194, 1989.

BASHIRUDDIN, J. B.; CAMMA, C.; REBELO, E. Molecular detection of *Babesia equi* and *Babesia caballi* in horse blood by PCR amplification of part of the 16S rRNA gene. *Veterinary Parasitology*, v. 84, n. 1-2, p. 75-83, 1999.

BATTSETTEG, B.; LUCERO, S.; XUAN, X.; CLAVERIA, F. G.; INOUE, N.; ALHASSAN, A.; KANNO, T.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, H.; MIKAMI, T.; FUJISAKI, K. Detection of natural infection of *Boophilus microplus* with *Babesia equi* and *Babesia caballi* in Brazilian horses using nested polymerase chain reaction. *Veterinary Parasitology*, v. 107, n. 4, p.351-7, 2002.

BERGEFELT, D. R. Estrous synchronization. In: Samper J.C. (Ed) Equine breeding management and artificial insemination. *Saunders Comp, Pennsylvania*, p.229-246, 1999.

BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C. C.; BRINSKO, S. P.; RIGBY, S. L. *Manual of equine reproduction*. Saint Louis: Mosby, 2003.

BOSE, R.; JORGENSEN, W. K.; DALGLIESH, R. J.; FRIEDHOFF, K. T.; de VOS, A. J. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Veterinary Parasitology*, v. 57, p. 61-74, 1995.

BOTTEON, P. T. L.; MASSARD, C. L.; BOTTEON, R. C. C. M.; LOSS, Z. G.; LINHARES, G. F. C. Seroprevalence de *Babesia equi* en tres diferentes sistemas de crianza de equinos. *Parasitologia Latinoamericana*, v. 57, n. 3-4, p. 141-145, 2002.

BRINSKO, S. P.; BALL, B. A.; MILLER, P. G.; THOMAS, P. G.; ELLINGTON, J. E. In vitro development of day 2 embryos obtained from young, fertile mares and aged, subfertile mares. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 102, p. 371- 378, 1994.

BRUNING, A. Equine piroplasmiasis an update on diagnosis, treatment and prevention. *British Veterinary Journal*, v. 152, p. 139-151, 1996.

CAIADO, J. R. C.; FONSECA, F. A.; SILVA, J. F. S.; FONTES, R. S. Hormonal treatment of recipient mares of the Mangalarga Marchador breed for embryo transfer on the second day post ovulation. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 36, n. 2, 2007.

CAMACHO, A. T.; GUITIAN, F. T.; PALLAS, E.; GESTAL, J. J.; OLMEDA, A. S.; HABELA, M. A.; TELFORD, III, S. R.; SPIELMAN, A. *Theileria (Babesia) equi* and

Babesia caballi infections in horses in Galicia, Spain. *Tropical Animal and Production*, v. 37, p. 293-302, 2005.

CAMILO, F.; VANNOZZI, I.; LUZIO, B. D.; ROMANGNOLI, S.; ARIA, G.; ALLEN, W. R. Successful non-surgical transfer of horse embryos to mule recipients. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 38, p. 380-385, 2003.

CARINI, A. Sobre uma piroplasmose equina observada em São Paulo. *Arquivo da Sociedade de Medicina Cirúrgica de São Paulo*, v. 1, p. 63-66, 1910.

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

CARNEY, N. J.; SQUIRES, E. L.; COOK, V. M. Comparison of pregnancy rates from transfer of fresh vs cooled transported equine embryos. *Theriogenology*, v. 36, p. 23-32, 1991.

CARVALHO, G. R. *Estudos de alguns aspectos da transferência de embriões equinos*, 102p. tese (doutorado)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2000.

CARVALHO, G. R.; SILVA FILHO, J. M.; FONSECA, J. R. M.; RUAS, J. R. M.; BORGES, A. M. Influência da técnica de coleta sobre a taxa de recuperação de embriões equinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 53, n. 5, p. 611-617, 2001.

COLES, E. H. *Patologia Clínica Veterinária*. 3. ed. São Paulo: Manole, 1984. 566p.

CORDERO del CAMPILLO, M.; ORDÁZ ALVAREZ, J.; ROJO VÁZQUEZ, F. A.; ESCUDERO DIAZ, A. Equine babesia infection in Spain. *Trabajos de la Estación Agrícola Experimental de León*, v. 11, p. 11-22, 1974.

CRIADO-FORNELIO, A.; MARTINEZ-MARCOS, A.; BULING-SARAÑA, A.; BARBACARRETERO, J. C. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part II. Phylogenetic analysis and evolutionary history. *Veterinary Parasitology*, v. 114, n. 3, p. 173-194, 2003.

CUERVO-ARANGO, J.; AGUILAR, J.; NEWCOMBE, J. R. Effect of type of semen, time of insemination relative to ovulation and embryo transfer on early equine embryonic vesicle growth as determined by ultrasound. *Theriogenology*, v. 71, p. 1267-1275, 2009.

CUNHA, C. W.; SILVA, S. S.; OSÓRIO, B. L.; DUTRA, C. L. Alterações hematológicas e sorológicas em equinos experimentalmente infectados com *Babesia equi*. *Ciência Rural*, v. 28, p. 283-286, 1998.

DAELS, P. F.; HUGHES, J. P. The normal estrous cycle. In: McKinnon, A. O.; VOSS, J. L. *Equine Reproduction*. Philadelphia: Lea e Febiger, p. 121-132, 1993.

DAELS, P. Embryo transfer tips and tricks. *Proceedings 5th European Veterinary Conference, Voorjaarsdagen*, Amsterdam, p. 213-215, 2007.

DE WAAL, D. T.; VAN HEERDEN, J.; POTGIETER, F. T. An investigation into the clinical pathological changes and serological response in horses experimentally infected with *Babesia equi* and *Babesia caballi*. *Onderstepoort Journal Veterinary Research*, v. 54, p. 561-568, 1987.

DE WALL, D. T. Equine piroplasmiasis: a review. *British Veterinary Journal*, v. 148, p. 6-14, 1992.

DE WAAL D. T. Global importance of piroplasmiasis. *Journal of Protozoology Research*, v. 10, p. 106-107, 2000.

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

DOUGLAS R. H. Some aspects of equine embryo transfer. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 32, p. 405-408, 1982.

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

DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals: implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*, v. 55, p. 1211-1239, 2001.

DUCHAMP, G.; BOUR, B.; COMBARNOUS, Y.; PALMER, E. Alternative solutions to hCG induction of the ovulation in the mare. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 35(suppl.), p. 221-228, 1987.

EVANS, A. C. O. Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 38, p. 240-246, 2003.

FAILACE, R. *Hemograma*. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 298p.

FARIAS, N. A. Doenças Parasitárias . Babesiose Equina. In: CORREA, F.R.; SCHILD, A.L.; DEL CARMEN, M. N. *Doenças de ruminantes e equinos*. Pelotas: Editora Universitária . UFPel, 1998, p. 356-360.

FAWCETT, D. W.; YONG, A. S.; LEITCH, B. L. Sporogony in *Theileria* (Apicomplexa: Piroplasmida). A comparative ultrastructural study. *Journal of Submicroscopic Cytology*, v. 17, p. 299-314, 1987.

FIGUEROA, J. V.; CHIEVES, L. P.; JOHNSON, G. S.; BUENING, G. M. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. *Veterinary Parasitology*, v. 50, p. 69-81, 1993.

FLEURY J. J.; ALVARENGA, M. A.; COSTA NETO, J. B. F.; PAPA, F. O. Transferência de embriões em eqüinos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 39, p. 485-487, 1987.

FLEURY, J. J.; PINTO, A. J.; ARRUDA, R. P.; MADUREIRA, E. H.; LIMA, C. G. Efeitos do ganhão e técnica reprodutiva sobre os índices de recuperação e gestação em um programa de transferência de embriões em eqüinos da raça Mangalarga. *Anais... Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS*, v. 25, n. 1, p. 226, 1997.

FLEURY, J. J. Transferência não cirúrgica de embriões equinos colhidos no oitavo dia pós-ovulação. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, UFRGS, 26(Suppl. 1), p. 266, 1998.

FLEURY J. J.; ALVARENGA M. A. Effects of colletion day on embryo recovery and pregnancy rates in a nonsurgical equine embryo recovery and pregnancy rates in a nonsurgical equine embryo transfer program. *Theriogenology*, v. 51, p. 261, 1999.

FLEURY, J. J.; PINTO, A. J.; MARQUES, A.; LIMA, C. G.; ARRUDA R. P. Fatores que afetam a recuperação embrionária e os índices de prenhez após transferência transcervical em eqüinos da raça Mangalarga. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 38, p. 29-33, 2001a.

FLEURY, J. J.; PINTO, A. J.; CELEGHINI, E. C. C.; LIMA, C. G.; ARRUDA, R. P. Influência do ganhão e da técnica de inseminação sobre os índices de recuperação embrionária e de gestação em um programa de transferência de embriões em eqüinos da raça Mangalarga. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 38, n. 1, p. 34-37, 2001b.

FLEURY, P. D. C.; ALONSO, M. A.; BALIEIRO, J. C. C. Avaliação da receptora: efeito de características uterinas e tempo de ovulação. In: XVIII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIOES, Araxá. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 34, n. 1; p. 502, 2006.

FORHEAD, A. J.; OUSEY, J. C.; ALLEN, W. R.; FOWDEN, A. L. Pos natal insulin secretion and sensitivity after manipulation of fetal growth by embryo transfer in the horse. *Journal Endocrinology*, v. 181; p. 459-67, 2004.

FRERICHS, W. M.; ALLEN P. C.; HOLBROOK, A. A. Equine piroplasmosis (*Babesia equi*): therapeutic trials of imidocarb dihydrochloride in horses and donkeys. *Veterinary Record*, v. 93, p. 73-75. 1973.

FRIEDHOFF, K. T. Transmission of *Babesia*. In: RISTIC, M. (Ed). Babesiosis of domestic animals and man. *Boca Raton: CRS Press*, p. 197-208, 1988.

FRIEDHOFF, K. T., TENTER, A. M., MULLER, I. Haemoparasites of equines: impact on international trade of horses. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizoolies*, v. 9, p. 1187-1194, 1990.

GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J. Role of diameter differences among follicles in selection of a future dominant follicle in mares. *Biology of Reproduction*, v. 57, p. 1320-1327, 1997

GASTAL, E. L.; BERGFELT, D. R.; NOGUEIRA, G. P.; GASTAL, M. O.; GINTHER, O. J. Role of luteinizing hormone in follicle deviation based on manipulating progesterone concentrations in mares. *Biology of Reproduction*, v. 61, p. 1492-1498, 1999.

GASTAL, E. L.; SILVA, L. A.; GASTAL, M. O.; EVANS, M. J. Effect of different doses of hCG on diameter of the preovulatory follicle and interval to ovulation in mares. *Animal Reproduction Science*, v. 94, p. 186-190, 2006.

GINTHER, O. J. *Reproductive biology of mare*. Cross Plains: Equiservices, p. 503-509, 1992.

GINTHER, O. J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Animal Reproduction Science*, v. 60, p. 61-79, 2000.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; BERGFELT, D. R.; DONADEU, F. X.; KOT, K. Follicle selection in monovular species. *Biology of Reproduction*, v. 65, p. 638-647, 2001.

GINTHER, O. J.; WOODS, B. G.; MEIRA, C.; BEG, M. A.; BERGFELT, D. R. Hormonal mechanism of follicle deviation as indicated by major versus minor follicular waves during the transition into the anovulatory season in mares. *Reproduction*, v. 126, p. 653-660, 2003.

GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; GASTAL, M. O.; GASTAL, E. L. Follicle dynamics and selection in mares. *Animal Reproduction*, v. 1, n. 1, p. 45-63, 2004.

GINTHER, O. J.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; BEG, M. A. Regulation of circulating gonadotropins by the negative effects of ovarian hormones in mares. *Biology of Reproduction*, v. 73, p. 315-323, 2005.

GOMES, G. M.; SILVA, A. G. S.; MELO, C. M.; GASPARETTO, F.; ZIMMERMANN, M. F.; JACOB, J. C. F. Influência do garanhão sobre a taxa de recuperação embrionária e gestação em éguas da raça Mangalarga Marchador. In: Anais da XI Jornada de Iniciação Científica da UFRRJ, Seropédica, *XI Jornada de Iniciação Científica*, v.11, n.1, p. 273-274, 2001.

GOMES, G. M.; JACOB, J. C. F.; DOMINGUES, I. B. Utilisation of mares after post partum ovulation as embryo recipients. In 6th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE EMBRYO TRANSFER, Rio de Janeiro, Brasil. Proceedings.. Rio de Janeiro, p. 12, 2004.

GOMES, M. G.; GOMES, L. P. M. Fatores que influenciam a produção de embriões em éguas doadoras. In: XXII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, Guarujá. *Acta Science Veterinariae*, v. 36 (supl.2), n. 1, p. 199-206, 2008.

GUERRA, P.; MEDEIROS, S. A. F. O agronegócio da equideocultura no Brasil. *Anais do I Simpósio Mineiro de Equideocultura*, Viçosa, MG, p. 1-7, 2007.

GUIMARÃES, L. M.; ARAÚJO, T. L.; LACERDA, J. R.; P. M. G. de. Ocorrência de nutaliose em equinos puro sangue de corrida, em São Paulo. *Revista da Faculdade de Medicina Veterinária de São Paulo*, v. 4, p. 357-362, 1950.

GUIMARÃES, A. M.; LIMA, J. D.; RIBEIRO, M. F. B. Sporogony and experimental transmission of *Babesia equi* by *Boophilus microplus*. *Parasitology Research*, v. 84, p. 323-327, 1998.

GUSMÃO, A. L.; FEITOSA, T. A. L.; MOURA, J. C. A.; RESENDE, M. V.; MARTINS, L. E. P. M.; BARBOSA, L. P. Recycling of catheter for embryo recovery: a tool for costs Reduction in equine embryo transfer. *Ciência Animal Brasileira*, v. 11, n. 2 p.425-428, 2010.

HAILAT, N. Q.; LAFI, S. Q.; AL-DARRAJI, A. M.; AL-ANI, F. K. Equine babesiosis associated with strenuous exercise: clinical and pathological studies in Jordan. *Veterinary Parasitology*, v. 69, p.1-8, 1997.

HARTWIG, F. P.; TORRES, A. J.; NIZOLI, L. Q.; CORREA, M. N.; SILVA, S. S.; NOGUEIRA, C. E. W. Efeitos do dipropionato de imidocarb no metabolismo de equinos com babesiose crônica. *Anais do XVII Congresso de Iniciação Científica*, Pelotas, Rio grande do Sul, 2008.

HENRY, M. M. Hemolytic Anemia. In: ROBINSON, N. E. Current Therapy in Equine Medicine, Philadelphia: Saunders, v. 3, n. 11, p.495-501, 1993.

HINRICHS, K.; SERTICH, P. L.; PALMER, E. Establishment and maintenance of pregnancy after embryo transfer in ovariectomised mares treated with progesterone. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 80, p. 395-401, 1987.

HINRICHS, K. Embryo transfer in the mare: a status report. *Animal Reproduction Science*, v. 33; p. 227-40, 1993.

HOLBROOK, A. A.; JOHNSON, A. J.; MADDEN, P. A. Equine piroplasmiasis: Intraerythrocytic development of *Babesia caballi* (NUTTALL; STRICKLAND, 1910) and *Babesia equi* (LAVERAN, 1901). *American Journal of Veterinary Research*, v. 2, p. 297-303, 1968.

HOLBROOK, A. A. Biology of equine piroplasmiasis. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 155, p. 453-454, 1969.

HOLMAN, P. J.; Frerichs, W. M.; CHIEVES, L.; WAGNER, G. G. Culture confirmation of the carrier status of *Babesia caballi*-infected horses. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 31, p. 698-701, 1993.

HUDSON, J. J.; McCUE, P. M. How to increase embryo recovery rates and transfer success. *Proceedings 50th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, Denver, Colorado*, p. 1473-1204, 2004.

IMEL, K. J. *Recovery, culture and transfer of equine embryos*. MS Thesis, Colorado State University, Fort Collins, CO, USA, 1981.

IMEL, K. J.; SQUIRES, E. L.; ELSDEN, R. P.; SHIDELER, R. K. Collection and transfer of equine embryos. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 179, n. 10; p. 987-91, 1981.

IULIANO, M. F.; SQUIRES, E. L.; COOK, V. M. Effect of age of equine embryos and method of transfer on pregnancy rate. *Journal of Animal Science*, v. 60, p. 258-263, 1985.

JACOB, J. C. F.; DOMINGUES, I. B.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; SILVA, A. G.; MELLO, C. M.; GASPARETTO, F.. The impact of degree of synchrony between donors and recipients in a commercial equine embryo transfer program. *Theriogenology*, v. 57, n. 1, p. 545, 2002.

JACOB, J. C.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; CARVALHO, G. R.; BEG, M. A.; GINTHER, O. J. Follicle Deviation in Ovulatory Follicular Waves with One or Two Dominant Follicles in Mares. *Reproduction Domestic Animals*, v. 44, p. 248-254 2009.

JACOB, J. C. F.; BEZERRA, L. L.; SANTOS, H. A.; SILVA, P. C. A.; MASSARD, C. L. Inquérito Epidemiológico pelo Nested-PCR para Detecção de *Babesia equi* em um Programa de Transferência de Embrião. In: XXIV REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, Porto de Galinhas. *Acta Science Veterinariae*, v. 38, (supl2), p. 379, 2010.

JAFFER, O.; ABDISHAKUR, F.; HAKIMUDDIN, F.; RIYA, A.; WERNERY, U.; SCHUSTER, R. K. A comparative study of serological testes and PCR for the diagnosis of equine piroplasmiasis. *Parasitology Research*, v. 103, n. 3, p. 709-13, 2009.

KAPPEMEYER L. S.; PERRYMAN L. E.; KNOWLES, D. P. A *Babesia equi* encodes a surface protein with homology to *Theileria* and *Babesia equi*. *Molecular Biochemical Parasitology*, v. 62, p. 121-124, 1993.

KATZER, F.; McKELLAR, S.; KIRVAR, E.; SHIELS, B. Phylogenetic analysis of *Theileria* and *Babesia equi* in relation to the establishment of parasite populations within novel host species and the development to diagnostic tests. *Molecular Biochemical Parasitology*, v. 95, n. 1, p. 33-44, 1998.

KERR, M. G. Glóbulos Brancos (Leucócitos) In.: *Exames Laboratoriais em Medicina Veterinária – Bioquímica Clínica e Hematologia*, 2º ed. São Paulo: Roca, 2003, cap. 3, p. 61-80.

KNOWLES, R. C.; HOURRIGAN, J. L.; HOLBROOK, A. A. Equine Piroplasmiasis. *Equine Practice*, v. 2, n. 1, p. 10-14, 1980.

- KNOWLES, D. P. Jr. Control of *Babesia equi* parasitemia. *Parasitology Today*, v. 12, p. 195-198, 1996.
- KRAUSE, P. J.; TELFORD, S.; SPIELMAN, A.; RYAN, R.; MAGERA, J.; RAJAN, T. V.; CHRISTIANSON, D.; ALBERGHINI, T. V.; BOW, L.; PERSING, D. Comparison of PCR with Blood Smear and Inoculation of Small Animals for Diagnosis of *Babesia microti* Parasitemia. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 34, p. 2791-2794, 1996.
- KUMAR, S.; GUPTA, A. K.; PAL, Y.; DWIVEDI, S. K. In-vivo therapeutic efficacy trial with artemisinin derivative, buparvaquone and imidocarb dipropionate against *Babesia equi* infection in donkeys. *Journal of Veterinary Medical Science*. v. 65, n. 11, p. 1171-1177, 2003.
- KUMAR, D.; JHAMB, D.; KUMAR, N.; BADIAL, D. Foals born through fresh embryo transfer in India. *Proceedings 10th International Congress of World Equine Veterinary Association, Moscow, Russia*. p. 567-568, 2008.
- LAVERAN, A. Contribution a l'étude du *Piroplasma equi*. *C. R. Seances Soc. Biol.*, v. 12, p. 385-389, 1901.
- LEVINE, N. D. Apicomplexa. The Piroplasms. In: *Veterinary Protozoology*. Iowa State University Press Ames, p. 291-328, 1985.
- LIMA, K. V. B.; LOPES, M. L.; LOUREIRO, E. C. B.; COSTA, M. M.; CARDOSO, N. C.; LIMA, G. L. F.; SOUZA, M. S. Nested-PCR do gene que codifica o antígeno b aplicada ao diagnóstico da tuberculose pulmonar. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, n. 2, p. 212-215, 2007.
- LIRA, R. A.; PEIXOTO, G. C. X.; SILVA, A. R. Transferência de embrião equino: Revisão. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 3, n. 4, p. 132-140, 2009.
- LISA, H.M.; MEADOWS, S. Essential management practices in commercial equine embryo transfer. *Proceedings 7th International Symposium on Equine Embryo Transfer, Cambridge, UK*. p.101-102, 2008.
- LOPES, E. P. *Parâmetros reprodutivos de éguas Mangalarga Marchador em projeto comercial de transferência de embrião*. 40p. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2004.
- LOSINNO, L.; ALONSO, C.; CASTANEIRA, C. Escore na biópsia endometrial e aptidão reprodutiva em éguas receptoras de embrião - resultados parciais. In: XVII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, Angra dos Reis. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 1, n. 33; p. 201, 2005.
- LOSINNO, L.; ALVARENGA, M. A. Fatores críticos em programas de transferência de embriões em equinos no Brasil e Argentina. In: XVIII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, Araxá. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 34, p. 39-49, 2006

MACHADO, M. S. *Dinâmica folicular em éguas*. In: Seminário do Curso de Pós-Graduação, São Paulo. *Anais...* São Paulo: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Campus Botucatu, 20p, 2002.

MALINOWSKY, K. Recent advances in reproduction in horses. In <http://www.rce.rutgers.edu/pubs/pdfs/fs717> , 2002. Disponível em: Acesso em: 05 fev. 2008.

McCUE, P. M.; VANDERWALL, D. K.; KEITH, S. L.; SQUIRES, E. L. Equine embryo transfer: influence of endogenous progesterone concentration in recipients on pregnancy outcome. *Theriogenology*, v. 51, n. 1, p. 267, 1999.

McKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; CARNEVALE, E. M. Ovariectomized steroid-treated mares as embryo transfer recipients and as a model to study the role of progestins in pregnancy maintenance. *Theriogenology*, v. 29, p. 1055-1063, 1988.

McKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L. Equine embryo transfer. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 192, p. 305-333, 1988.

McKINNON, A. O.; CARNEVALE, E. M. Reproductive examination of the mare-Ultrasonography. In McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. *Equine Reproduction*, Malvern: Lea e Febigzer, p. 211-220, 1993.

McKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L. Embryo transfer and related technologies. In: *Current Therapy Equine Reproduction*, Saunders, Missouri, p.319-334, 2007.

MEHLHORN, H.; SCHEIN, E. Redescription of *Babesia equi* Laveran, 1901 as *Theileria equi* Mehlhorn, Schein 1998. *Parasitology Research*, v. 84, n. 6, p. 467-475, 1998.

MOLTMANN, U. G.; MEHLHORN, H.; SCHEIN, E.; VOIGT, W. P.; FRIEDHOFF, K. T. Fine structure of *Babesia equi* Laveran, 1901 within lymphocytes and erythrocytes of horses: an *in vivo* and *in vitro* study. *Journal of Parasitology*, v. 69, n. 1, p. 11-120, 1983.

MORENO, M. P.; OLIVEIRA, J. P.; SANTOS, G. O.; SÁ, M. A. F.; ECKER, M. K. C.; JACOB, J. C. F. Avaliação da resposta ovulatória de éguas da raça mangalarga marchador a diferentes doses de hCG. In: XXIV REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIOES, Porto de Galinhas. *Anais...*, p. 381, 2010.

MORRIS, L. H.; ALLEN, W. R. Reproductive efficiency of intensively managed Thoroughbred mares in Newmarket. *Equine Veterinary Journal*, v. 34, p. 51-60, 2002.

MORTENSEN, C. J.; CHOI, Y. H.; HINRICHS, K.; ING, N. H.; KRAEMER, D. C.; VOGELANG, S. G.; VOGELANG, M. M. Embryo recovery from exercised mares. *Animal Reproduction Science*, v. 110, p. 237-244, 2009.

MUJICA LINAREZ, F. F. *Babesia caballi* (NUTTAL; STRICKLAND, 1912): patogenicia, transmissão e alterações no carrapato *Anocentor nitens* (Neumann, 1897), vetor biológico nas Américas. 80 p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2002.

NICOLAIEWSKY, T. B.; RICHTER, M. F.; LUNGE, V. R.; CUNHA, C. W.; DELAGOSTIN, O.; IKUTA, N.; FONSECA, A. S.; SILVA, S. S.; OZAKI, L. S. Detection of *Babesia equi* (Laveran, 1901) by nested polymerase chain reaction. *Veterinary Parasitology*, v. 101, n. 1, p. 9-21, 2001.

NIZOLI, L. Q. *Alteração hematológicas e humorais de equinos expostos à infecção por Babesia equi, na região sul do Rio Grande do Sul*. 39p. Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul, 2005.

NOGUEIRA, C. E. W.; SILVA, S. S.; NIZOLI, L. Q.; RIBAS, L. M.; ALBUQUERQUE, L. P. A. N. Efeito quimioprolático do dipropionato imidocarb na prevenção da agudização de babesiose equina em cavalos portadores da infecção. *A Hora Veterinária*, Porto Alegre-RS, *Trabalhos vencedores do 6º Prêmio Pesquisa Schering-Plough Coopers*, p. 15-18, 2004.

NOGUEIRA, C. E. W.; SILVA, S. S.; NIZOLI, L. Q.; RIBAS, L. M.; ALBUQUERQUE, L. P. A. N. Efeito quimioprolático do Dipropionato de Imidocarb na prevenção da agudização de babesiose em cavalos portadores da infecção. *A Hora Veterinária*, n. 146, p. 14-17, 2005.

NUTTAL, G. H. F.; STRICKLAND, C. On the occurrence of two species of parasite in equine piroplasmiasis or biliary fever. *Parasitology*, v. 12, p. 65-69, 1910.

OGURI, N.; TSUTSUMI, Y. Nonsurgical recovery of equine eggs, and an attempt at nonsurgical egg transfer in horses. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 31, p.187-195, 1972.

OGURI, N., TSUTSUMI, Y. Non-surgical egg transfer in mares. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 41, p. 313-320, 1974.

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

OHTA, M.; KAWASU.; TSUJI, N. Rapid and sensitive methods for detection of newly isolated *Babesia* parasite (*Babesia spp.*) in the anticipated vector-tick using polymerase reaction technique. *Journal of protozoology*, v. 5, p. 108-117, 1995.

OIE (2009). *World Animal Health Information Database Interface*. Disponível em: <www.oie.int/wahis/public.php?page=diseases_timeslines>. Acesso em: 2 dez. 2010.

PASTORELLO, M.; MEIRA, C.; FLEURY, J. J.; DUARTE, M. C. G. Transferência não cirúrgica de embriões em equinos de hipismo. *Arquivo da Faculdade de Veterinária UFRGS*, v. 24, p. 212, 1996.

PEREIRA, M. A. V. C.; MASSARD, C. L.; FACCINI, J. L. H.; SIQUEIRA, de, L. F. G. Ocorrência de *Babesia equi* (LAVERAN, 1901) e *Babesia caballi* (NUTTALL; STRICKLAND, 1912) em equinos da raça Puro Sangue Inglês de pequenos estabelecimentos equestres. *Arquivo do Instituto Biológico de São Paulo*, v. 71, n. 4, p. 405-409, 2004.

PERES, K. R.; TRINQUE, C. L. N.; LIMA, M. M.; DUARTE, M. C.; MEIRA, C. Non-surgical equine embryo transfer: a retrospective study. *Theriogenology*, v. 57, p. 558-558, 2002.

PFEIFER BARBOSA, I.; BOSE, R.; PEYMANN, B.; FRIEDHOFF, K.T. Diagnosis of natural infection with *Babesia cabali* (NUTTAL; STRICKLAND, 1910) in horses and *Anocentor nitens* (NEUMANN, 1897) in Itaguaí, RJ, Brazil. *Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*. v. 15, p. 105-107, 1992.

PFEIFER BARBOSA, I. B. F. *Epidemiologische untersuchungen über infectionen von pferden mit Babesia equi und Babesia caballi in Brasilien*. 109 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária), Instituto de Parasitologia, Escola de Medicina Veterinária de Hannover, Hannover, 1993.

PFEIFER BARBOSA, I.; BOSE, R.; PEYMANN, B.; FRIEDHOFF, K. T. Epidemiological aspects of equine babesioses in a herd of horses in Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 58, n. 1-2, p. 1-8, 1995.

PINTO C.R.F.; MEYERS, P.J. Control and synchronization of the estrous cycle and ovulation. In: Youngquist R.S. & Threlfall W.R. (Ed.) Current therapy in large animal theriogenology. *Elsevier Science, St. Louis*, p. 91-98, 2007.

PORTZ, C.; ALMEIDA, F. Q.; MASSARD, C. L.; BOTTEON, P. F. L. Avaliação da vitamina E como imunomodulador e infecção intrauterina por *Theileria equi* em potro. *Parasitologia Latinoamericana*, v. 62, p. 16-22, 2007.

POSNETT, E. S.; FEHRSEN, J.; DE WAAL, D. T.; AMBROSIO, R. E. Detection of *Babesia equi* in infected horses and carrier animals using a DNA probe. *Veterinary Parasitology*, v. 39, n. 1-2, p. 19-32, 1991.

PYCOCK, J. F.; DIELEMAN, S.; DRIFJIHOUT, P.; VAN DER BRUG, Y.; OEI, C.; VAN DER WEIJDEN, G. C. Correlation of plasma concentrations of progesterone and oestradiol with ultrasound characteristics of the cycling mare. *Reproduction Domestic Animal*, v. 30, p. 224-227, 1995.

RAMPERSAD, J.; CESAR, E.; CAMPBELL, M. D.; SAMLAL, M.; AMMONS, D. A field evaluation of PCR for the routine detection of *Babesia equi* in horses. *Veterinary Parasitology*, v. 114, n. 2, p. 81-87, 2003.

RIBAS, L. M.; SILVA, S. S.; NOGUEIRA, C. E. W.; NIZOLI, L. Q.; KRAUSE, L. Avaliação da eficácia terapêutica do dipropionato de imidocarb no tratamento de eqüinos durante infecção aguda por *Babesia equi*. *A Hora Veterinária*, v. 137, p. 33-36. 2004.

RIBEIRO, M. F. B.; LIMA, J. D. Diagnóstico sorológico da babesiose equina por *Babesia equi* em Minas Gerais. In: *Anais do VI Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Bagé, Rio Grande do Sul*, p. 11, 1989.

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

- RIERA F. L. Equine embryo transfer. In: Samper J.C. (Ed.) Equine breeding and management and artificial insemination. *Saunders Company, Pennsylvania*, p. 229-246, 2000.
- RIERA F. L.; MCDONOUGH, J. Commercial embryo transfer in polo ponies in Argentina. *Equine Veterinary Journal*, v. 15, p. 116-119, 1993.
- ROCHA FILHO, A. N.; PESSÔA, M. A.; GIOSO, M. M.; ALVARENGA, M. A. Transfer embryos into anovulatory recipients supplement with short or long acting progesterone. *Animal Reproduction*, v. 1, p. 91-95, 2004.
- ROCHA, A. N.; LOPES, E. P.; GUIMARÃES, J. D.; SIQUEIRA, J. B.; TORRES, C. A. A.; PINHO, R. O.; CARVALHO, G. R. Pregnancy rates and early embryo loss in a comercial embryo transfer program in Mangalarga Marchador Mares. *Anais do 17º Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*, p. 160, 2007.
- RONCATI, N. V. Ocorrência de *Theileria equi* congênita em potros Puro Sangue Lusitano no Brasil, diagnosticada através da técnica de RT-PCR. 2006. 63f. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- RUDOLPH, W.; CORREA, J.; ZURITA, L. Equine piroplasmiasis: leukocytic response to *Babesia equi* (Laveran, 1901) infection in Chile. *British Veterinary Journal*, v. 131, n. 5, p. 601-609, 1975.
- SAMPAIO, I. B. M. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. 2ª.ed. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002, 265p.
- SAMPER, J. C. Equine breeding management and artificial insemination. Philadelphia: Saunders, 2000.
- SAMPER, J. C.; PYCOCK, J. F.; MCKINNON, A. O. *Current therapy in equine reproduction*. Saint Louis: Saunders, 2007.
- SANTOS, G. O.; NOGUEIRA, B. G.; DEVEZA, R. F. R.; SÁ, M. A. F.; JACOB, J. C. F. Avaliação do efeito de diversos parâmetros sobre a eficiência de um programa comercial de transferência de embriões em eqüinos. In: XXII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, Guarujá. *Acta Science Veterinariae*, v. 36, n. 1, p. 633, 2008a.
- SANTOS, T. M.; SANTOS, H. A.; MASSARD, C. L. Diagnóstico molecular de babesia congênita em potros neonatos no estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia*, v. 17, supl. 1, p. 348-350, 2008b.
- SCHEIN, E. Equine babesioses. In: RISTIC, M. (Ed). Babesiosis of domestic animals and man. *Boca Raton: CRS Press*, p.197-208, 1988.

SILVA, L. A. *Técnica ultra-sonográfica de injeção intrauterina para transferência de embriões em equinos*. 145 p. Tese (Doutorado), Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa- MG, 2003.

SIMPSON, C. F.; NEAL, F. C. Ultrastructure of *Babesia equi* in ponies treated with imidocarb. *American Journal Veterinary Research*, v.41, n.2, p.267-271, 1980.

SOUZA, A. P.; SARTOR, A. A.; BELLATO, V.; SILVA, A. B. Prevalência de anticorpos anti *Babesia equi* em equinos do Planalto Catarinense. *Ciência Rural*, v. 30, p. 119-121, 2000.

SOUZA, F. A. C. S. *Efeitos da gonadotrofina coriônica humana (hCG) sobre as características reprodutivas de fêmeas equinas candidatas a receptoras de embriões*. 64p. Dissertação (Mestrado) Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2006.

SQUIRES E. L.; IULIANO, M. F.; SHIDELER, R. K. Factors affecting the success of surgical and nonsurgical equine embryo transfer. *Theriogenology*, v. 17, p. 35-41, 1982a.

SQUIRES, E. L.; IMEL, K. L.; IULIANO, M. F.; SHIDELER, R. K. Factors affecting reproductive efficiency in equine embryo transfer programme. *Journal of Reproduction Fertility*, v. 32, p. 409-414, 1982b.

SQUIRES, E. L. Progesterone. In: McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. *Equine Reproduction*. Philadelphia: Lea & Febiger, cap. 6, p. 57-64, 1993.

SQUIRES, E. L.; SEIDEL, G. E. Collection and transfer of equine embryos. *Animal Reproduction Biotechnology Laboratory Bulletin 8*. Colorado State University, Fort Collins. p. 397, 1995.

SQUIRES, E. L.; McCUE, P. M.; VANDERWAL, D. K. The current status of equine embryo transfer. *Theriogenology*, v. 51, n. 1, 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.

STANTON, M. B.; STEINER, J. B.; PUGH, D. G. Endometrial cysts in the mare. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 24, n. 1, p. 14-19, 2004.

STILLER, D.; GOFF, W. L.; JOHNSON, L. W.; KNOWLES, D. P. *Dermacentor variabilis* and *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae): Experimental vectors of *Babesia equi* to equids. *Journal of Medical Entomology*, v. 39, n. 4, p. 667-670, 2002.

STOUT, T. A. E. Equine embryo transfer: review of developing potential. *Equine Veterinary Journal*, v. 38, n. 5, p. 467-78, 2006.

SUGIE, T. Successful transfer of a fertilized bovine egg by non-surgical techniques. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 10, p. 197, 1965.

TAKEET, M. I.; ADELEYE, A. I.; ADEBAYO, O. O.; AKANDE, F. A. Haematology and Serum biochemical alteration in stress induced equine Theileriosis. A case report. *Science World Journal*, v. 4, n. 2, p. 19-21, 2009

THE MERCK VETERINARY MANUAL. Hematologic Reference Ranges, Disponível em <http://www.merckvetmanual.com/mvm/index.jsp?cfile=htm/bc/ref_00.htm> em 19 dez. 2010.

THEILER, A. Die pferde malaria. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.*, Zurich, v. 43, p. 252-256, 1901.

THOMPSON, P. H. Ticks as vectors of equine piroplasmiasis. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 155, p. 454-457, 1969.

VANDERWALL, D. K. 2000. Current Equine Embryo Transfer Techniques. In: Ball B.A. (Ed.) Recent Advances in Equine Theriogenology. *International Veterinary Information Service*. Disponível em: <<http://www.ivis.org>> 12 de dez., 2010.

VOGELSANG, S. G.; SORENSEN, A. M.; POTTER, G. D.; BURNS, S. J.; KRAEMER, D. C. Fertility of donor mares following nonsurgical collection of embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 27, p. 383-386, 1979.

VOGELSANG, S. G.; VOGELSANG, M. M. Influence of donor parity and age on the success of commercial equine embryo transfer. *Equine Veterinary Journal Supplement*, v. 8, p. 71, 1989.

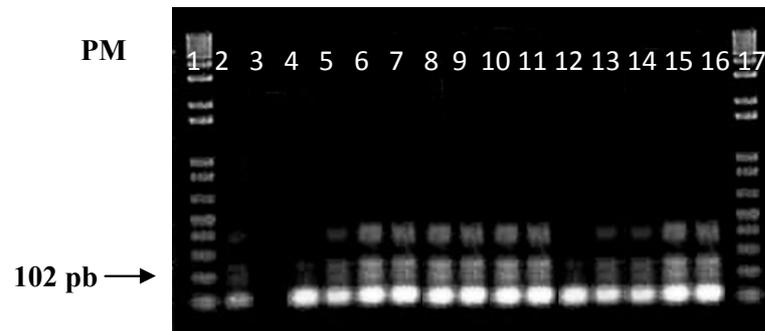
WILSHER, S.; KOLLING, M.; ALLEN, W. R. Meclofenamic acid extends donor-recipient asynchrony in equine embryo transfer. *Equine Veterinary Journal*, v. 38; n. 5; p. 428-432, 2006.

WILSON, J. M.; ROWLEY, W. K.; SMITH, H. A.; WEBB, R. L.; TOLLESON, D. R. Successful non-surgical transfer of equine embryos to post-partum lactating mares. *Theriogenology*, v. 27, p. 295, 1987.

WOODS, G. L.; HILLMAN, R. B.; SCHLAFER, D. H. Recovery and evaluation of embryos from normal and infertile mares. *Cornell Veterinary*, v. 76, p. 386-394, 1986.

YOUNG, A. S.; MORZARIA, S. P. Biologic of *Babesia*. *Parasitology Today*, v. 2, p. 211-218, 1986.

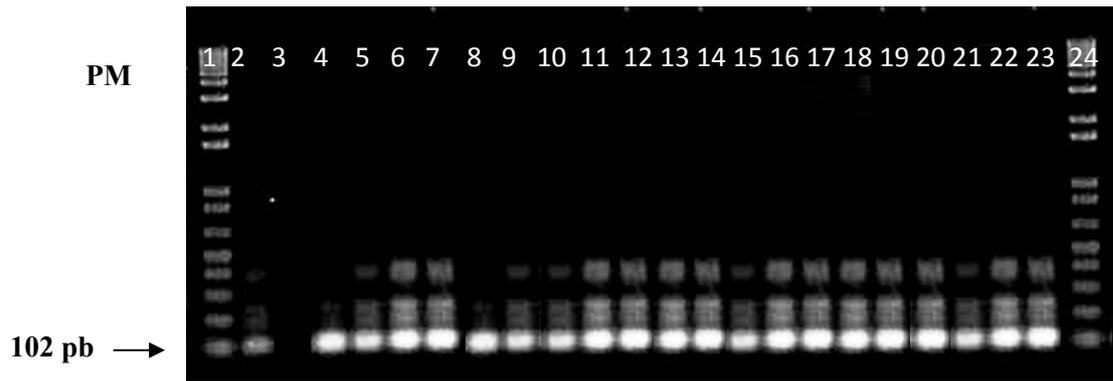
7. ANEXOS



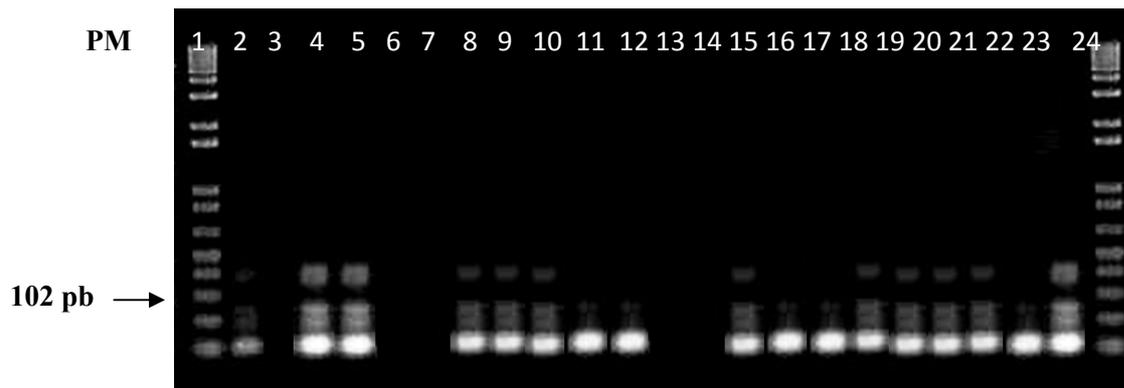
Anexo A. Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *Theileria equi* pela técnica de nested PCR em éguas doadoras de embrião antes do tratamento com dipropionato de imidocarb. Linha 1 marcador de peso molecular; Linha 2, controle positivo; Linha 3, controle negativo; Linha 4 a 16 representam amostras de doadoras positivas antes do tratamento com dipropionato de imidocarb.



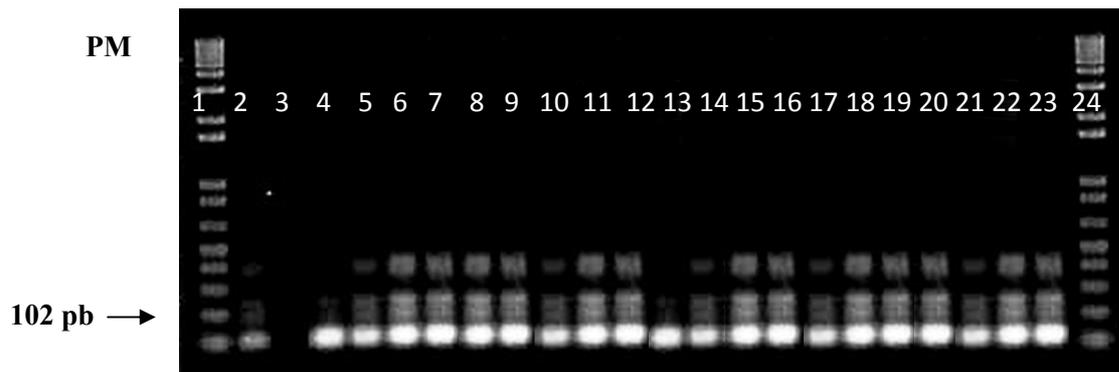
Anexo B. Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *Theileria equi* pela técnica de nested PCR em éguas doadoras de embrião tratadas com dipropionato de imidocarb. Linha 1 marcador de peso molecular; Linha 2, controle positivo; Linha 3, controle negativo; Linhas 5, 6, 8, 11 representam amostras de doadoras positivas, Linhas 4, 7, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16 representam amostras de doadoras negativas ambas após o tratamento com dipropionato de imidocarb.



Anexo C. Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *Theileria equi* pela técnica de nested PCR em éguas receptoras de embrião do grupo não tratado no início do experimento. Linha 1 e 24 marcador de peso molecular; Linha 2, controle positivo; Linha 3, controle negativo; Linha 4 a 23 representam amostras de receptoras de embrião positivas do grupo não tratado no início do experimento.



Anexo D. Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *Theileria equi* pela técnica de nested PCR em éguas receptoras de embrião do grupo não tratado no final do experimento. Linha 1 e 24 marcador de peso molecular ; Linha 2, controle positivo; Linha 3, controle negativo; Linhas 4, 5, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 representam amostras de receptoras positivas, Linhas 6, 7, 13, 14 representam amostras de receptoras negativas do grupo não tratado no final do experimento.



Anexo E. Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *Theileria equi* pela técnica de nested PCR em éguas receptoras de embrião do grupo tratado no início do experimento. Linha 1 e 24 marcador de peso molecular; Linha 2, controle positivo; Linha 3, controle negativo; Linhas 4 a 23 representam amostras de receptoras de embrião positivas do grupo tratado no início do experimento.



Anexo F. Eletroforese dos produtos de amplificação de DNA de *Theileria equi* pela técnica de nested PCR em éguas receptoras de embrião do grupo tratado no final do experimento. Linha 1 e 24 marcador de peso molecular; Linha 2, controle positivo; Linha 3, controle negativo; Linhas 5, 6, 9, 12, 13, 16, 17, 18, 19, 20 representam a Linhas representam amostras de receptoras positivas, Linhas 4, 7, 8, 10, 11, 14, 15, 21, 22, 23 representam amostras de receptoras negativas ambas após o tratamento com dipropionato de imidocarb.

Anexo G. Valores de referência dos parâmetros hematológicos de equinos, segundo Merck Veterinary manual- Hematologic Reference Ranges (2010).

Eritrograma		Leucograma		Outros	
Hemácias (10 ⁶ cels/μL)	6,00-12,00	Leucócitos (cél/s/μL)	6.000-12.000	Plaquetas (cél/s/μL)	100.000-600.000
Hematócrito (%)	32,00-48,00	Mielócitos (cél/s/μL)	0	Proteínas (g/dL)	6,0-8,5
Hemoglobina (g/dL)	10,0-18,0	Metamielócitos (cél/s/μL)	0		
VGM (fentolitros)	34,0-58,0	Bastões (cél/s/μL)	0-100		
CHGM (%)	31,0-37,0	Segmentados (cél/s/μL)	3000-6000		
		Linfócitos (cél/s/μL)	1.500-5.000		
		Monócitos (cél/s/μL)	0-600		
		Eosinófilos (cél/s/μL)	0-800		
		Basófilos (cél/s/μL)	0-300		

