

CENTRO UNIVERSITÁRIO DO SUL DE MINAS
MEDICINA VETERINÁRIA
PAULA JUNQUEIRA FERREIRA

**AVALIAÇÃO DE DADOS RELACIONADOS À TRANFERÊNCIA DE
EMBRIÃO NO HARAS DA CANÇÃO NAS ESTAÇÕES DE 2019/2020 E
2020/2021**

VARGINHA - MG

2021

PAULA JUNQUEIRA FERREIRA

**AVALIAÇÃO DE DADOS RELACIONADOS À TRANFERÊNCIA DE
EMBRIÃO NO HARAS DA CANÇÃO NAS ESTAÇÕES DE 2019/2020 E
2020/2021**

Trabalho apresentado ao curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário do Sul de Minas – UNIS/MG, como pré-requisito para obtenção do grau de Bacharel, sob orientação do Prof.Me. Vinícius José Moreira Nogueira.

VARGINHA - MG

2021

PAULA JUNQUEIRA FERREIRA

**AValiação de dados relacionados à transferência de
embrião no haras da canção 2019/2020 e 2020/2021**

Monografia apresentada ao curso de Medicina Veterinária do Centro Universitário do Sul de Minas, como pré-requisito para obtenção do grau de Bacharel pela Banca Examinadora composta pelos membros:

Aprovado em 00/00/00

Prof. Me. Vinícius José Moreira Nogueira
Orientador

Profa. Ma. Bruna Maria Ribeiro

Profa. Luciane Tavares da Cunha

OBS.:

RESUMO

O ato de transferir embrião é uma biotécnica altamente utilizada no mercado de equinos e vem sendo realizada desde a década de 80, tem sido reconhecida pelo sucesso de sua realização em diversos haras pelo mundo, o Brasil atualmente é um dos maiores produtores mundiais de potros nascidos de TE. A versatilidade da espécie equina explica o desenvolvimento mundial da equinocultura, e a TE permite um avanço maior do setor nos ganhos de eficiência na cadeia reprodutiva e auxilia no melhoramento genético, aprimorando os cruzamentos e suas raças. Essa técnica tem como principal objetivo o nascimento de um número maior de potros por égua/ano, tendo que manter um cuidado com as fêmeas doadoras e as receptoras, cuidar também da condição do sêmen utilizado e a forma correta que realizar essa técnica de transferência de embriões. O objetivo desse trabalho foi realizar uma revisão bibliográfica relacionados à transferência de embriões em equinos, além de analisar os dados desta biotécnica realizada no Haras da Canção, localizado na cidade de Três Pontas/MG nas estações 2019/2020 e 2020/2021, relatando a recuperação dos embriões das diferentes doadoras e taxa de gestação dos animais receptores.

Palavras-chave: Equinos. Taxa de concepção. Taxa de recuperação embrionária.

ABSTRACT

The act of transferring embryos is a highly used biotechnic in the equine market and has been carried out since the 1980s, it has been recognized for the success of its performance in several studs around the world, Brazil is currently one of the world's largest producers of born foals of TE. The versatility of the equine species explains the worldwide development of equine culture, and TE allows for greater advances in the sector in terms of efficiency gains in the reproductive chain and helps in genetic improvement, improving crossbreeding and their breeds. This technique has as its main objective the birth of a greater number of foals per mare/year, having to be careful with the donor and recipient females, also taking care of the condition of the semen used and the correct way to carry out this technique of transference. embryos. The objective of this work was to carry out a literature review related to embryo transfer in horses, in addition to analyzing the data of this biotechnical performed at Haras da Canção, located in the city of Três Pontas/MG at stations 2019/2020 and 2020/2021, reporting the recovery of embryos from different donors and pregnancy rate of recipient animals.

Keywords: Horses. Design fee. Embryonic recovery rate.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Folículo pré-ovulatório.....	14
FIGURA 2: Edema uterino.....	14
FIGURA 3: Égua doadora	16
FIGURA 4: Égua receptora.....	17
FIGURA 5: Sonda esterelizada.....	20
FIGURA 6: Copo coletor.....	20
FIGURA 7: Paleta estéril.....	22
FIGURA 8: Avaliação do embrião na lupa.....	23
FIGURA 9: Meio para cultivo celular.....	23
FIGURA 10: Palheta envasada.....	24
FIGURA 11: BAINHA.....	24
FIGURA 12: Inovulador.....	25
FIGURA 13: Camisinha sanitária.....	25
FIGURA 14: Protocolo doadora.....	27
FIGURA 15: Protocolo receptora.....	28

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Doadoras utilizadas, número de embriões recuperados e taxa de prenhez dos embriões nas receptoras (2019/2020).	29
TABELA 2: Receptoras utilizadas, embriões transferidos e índice de prenhez em éguas receptoras com diferentes idades de corpo lúteo (2019/2020).....	29
TABELA 3: Doadoras utilizadas, número de embriões recuperados e taxa de prenhez dos embriões nas receptoras (2020/2021).	30
TABELA 4: Receptoras utilizadas, embriões transferidos e índice de prenhez em éguas receptoras com diferentes idades de corpo lúteo (2020/2021).....	31

LISTA DE ABREVIATURAS

TE - Transferência de embrião
hCG - Gonadotrofina coriônica humana
P4 - Progesterona
GnRH - Hormônio liberados de gonadotrofina
FSH - Hormônio folículo estimulante
LH - Hormônio luteinizante
mm - Milímetro
CL - Corpo lúteo
PGF2 α - Prostaglandina 2 alfa
US - Ultrassonografia
Ng/ml - Nano gramas por mililitro
IA - Inseminação artificial
ml - Mililitro
 μ m - Micrometro
D - Dia
E2 - Estrógeno
UFO - Ovócito não fertilizado

SUMÁRIO

RESUMO	3
ABSTRACT	4
LISTA DE TABELAS	65
LISTA DE ABREVIATURAS	76
1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1. Fisiologia reprodutiva	11
2.2. Princípios da transferência de embrião	13
2.3. Critérios de seleção da doadora e receptora	14
2.4. Protocolos de sincronização	17 ¹⁷
2.5. Coleta de embriões	18
2.6. Manipulação e classificação do embrião.....	21 ²¹
2.7. Inovulação	23
3 METODOLOGIA	26
3.1 Coleta de dados	26
3.2 Animais	26
3.3 Manejo.....	26
3.4 Protocolo doadoras.....	27
3.5 Protocolo receptoras.....	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29 ²⁹
5 CONCLUSÕES	33
6 REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas tem-se assistido a um enorme incremento de novas tecnologias reprodutivas no mercado do cavalo, sendo a transferência de embriões um procedimento que se tornou cada vez mais frequente nessa área (SQUIRES; HON 2009).

Através da transferência de embriões (TE) pode-se obter múltiplos potros anualmente de éguas geneticamente valiosas, com subfertilidade adquirida, idosas que não conseguem manter uma gestação ou de éguas em competição sem necessidade de interromper a sua carreira desportiva (MONTECHIESI, 2015). Com o desenvolvimento da técnica que se diz respeito à Transferência de Embriões em animais equinos e sua posterior popularização tivemos ao longo das últimas décadas um enorme desenvolvimento na equideocultura nacional, o que se evidencia pelo tamanho do rebanho equino do Brasil (LOPES, 2015).

A TE, assim como qualquer outra biotécnica reprodutiva, apresenta algumas limitações (ALVARENGA; TONGU, 2017). As principais dizem respeito à aplicabilidade do programa que é comprometida principalmente pelos seguintes fatores: dificuldade na sincronização de animais doadores e receptores, dificuldade na indução de superovulação de éguas; elevado percentual de doadoras idosas e éguas problemáticas e manipulação inadequada do sêmen (LIRA et al., 2009). Estes fatores associados ou isolados fazem com que a eficiência de programas de TE nesta espécie sejam baixas, sendo necessários 2 a 3 ciclos para que se obtenha uma gestação (ALVARENGA, 2010).

O conhecimento acerca das partes anatômicas e fisiológicas relacionadas com a parte reprodutiva do animal é muito importante a fim de se obter sucesso no manejo de reprodução (TEZZA; DITTRICH; 2006). Existem procedimentos que são básicos realizados no decorrer da transferência desses embriões que compreendem a seletividade e o preparo da égua que vai receber o embrião, a sincronicidade da ovulação da doadora para a receptora, a inseminação artificial ou cobertura da égua que vai doar, a forma de coleta do embrião pela doadora, até finalmente poder realizar o rastreamento, envase e transferir o embrião na receptora (LEY, 2006).

Dado que esta biotécnica se tornou uma prática recorrente na indústria equina e com uma grande vertente comercial, é de extrema importância identificar os fatores que

interferem na eficiência de um sistema comercial que consta de taxas de transferência de embriões (SILVA et al., 2018).

Dentro desse contexto, os principais fatores a serem avaliados estão relacionados tanto com a doadora como também com relação às receptoras. As condições relacionadas a doadora compreendem o crescimento do folículo associado à presença do mesmo, grau de edema uterino e responsividade aos indutores responsáveis pela ovulação (hCG - Gonadotrofina Coriônica Humana) (SOUZA et al., 2010). Esses mesmos fatores também são avaliados na receptora, mas, além disso, deve-se avaliar também a tensão uterina e vascularização presente no corpo lúteo durante o dia da transferência, e, se necessário avaliar a necessidade da aplicação de P₄ (progesterona) para auxiliar na implantação embrionária e na continuação da gestação (SEGABINAZZI et al., 2015).

Diante disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar os dados relacionados à transferência de embriões no Haras da Canção nas estações reprodutivas de 2019/2020 e 2020/2021.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O ato de transferir embriões entre animais começou por volta de 1890, através do cientista chamado Walter Heape, residente na Inglaterra, que fazia trabalhos com coelhos em seus estudos. O primeiro teste de transferência de embriões em animais equinos foi realizado por alguns pesquisadores e cientistas situados no Japão no ano de 1969 (ANDRADE, 1986). Em contrapartida, a proporção de garantia atingida durante a entrega foi apenas de 40%, onde uma porção dos embriões estavam apresentando complicações e chegando à morte. Em 1972 Allen e Rowson, conseguiram concluir a primeira transferência eficiente entre animais equinos e muaras, onde se coletava os embriões e transferia por cirurgia através da cavidade abdominal, na cidade de Cambridge na Inglaterra (SILVA et al., 2018).

Em 1987 no Brasil, a utilização desta biotécnica teve início com os equinos, tendo como responsáveis o veterinário João Junqueira Fleury, Cezinande Meira e Marc Henry, que utilizaram métodos cirúrgicos e não-cirúrgicos (SILVA et al, 2018). Depois desse ocorrido, tiveram grandes avanços ainda na área biotecnológica da TE nos equinos, elevando a eficiência de prenhez inicialmente de 12,5% para 74,5%. Em 1989 o pesquisador Farinasso registrou no Brasil, eficiência de recuperação do embrião e de

prenhez de 48,3% a 83,3% e 45,5% a 80,0%, respectivamente. Atualmente já se observa taxa de gestação de 74,55% após a TE (MONTECHIESI, 2015).

2.1. Fisiologia reprodutiva

As fêmeas equinas são animais poliéstricos estacionais, recebem essa denominação por normalmente reproduzir na primavera e no verão. Essa característica se dá por 3 fatores principais a fim de se explicar o caráter estacional desses ciclos estrais nas fêmeas, sendo eles a nutrição, a temperatura e o fotoperíodo envolvido (MAIA et al., 2019).

Na fase de transição do anestro para o poliestro fisiológico, o animal tende a apresentar períodos com variações de sinais de comportamento do estro sem de fato apresentar estruturas foliculares de modo significativo ou até mesmo ovularem (LEY, 2006).

Um dos principais fatores relacionados à sazonalidade dos equinos é o efeito antigonadotrófico da melatonina. Como esse hormônio é produzido pela pineal em momentos de menor incidência de luz, no período do outono e inverno tem-se maiores concentrações séricas de melatonina, que inibe o ciclo reprodutivo nas éguas a partir da inibição da produção do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) no hipotálamo. Em contrapartida, períodos de 15 a 16 horas de tempo diurno (ou de estímulo relacionado com a luminosidade), característicos da primavera e verão, atuam diretamente na glândula pineal para interromper a produção do hormônio melatonina, e assim retomar a atividade reprodutiva. A modulação da frequência e da amplitude da liberação de GnRH através do hipotálamo exercida pela melatonina, afeta a produção endócrina hipofisária e a liberação dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH). Uma vez que os receptores ovarianos respondem ao FSH e ao LH induzindo o recrutamento, a seleção e a dominância folicular e a ausência desses hormônios comprometem a atividade reprodutiva da fêmea (SOUZA et al., 2010).

O ciclo estral corresponde ao período entre duas ovulações, sendo seu início tipicamente definido com a ovulação (dia 0) e término o dia anterior a próxima ovulação. O intervalo médio entre as ovulações, no geral para as fêmeas, é de 21 dias, mas pode oscilar entre 18 e 24 dias. O intervalo muito curto ou muito extenso pode ser considerado uma anormalidade. De forma geral o ciclo estral pode estar dividido em

duas fases principais, folicular e luteínica, em assentimento com as estruturas encontradas nos ovários e hormônio predominantemente produzido por essas estruturas (ALVARENGA, 2010).

A fase estral (fase folicular) pode durar de 3 a 7 dias e é dominada por um ou mais folículos pré-ovulatórios grandes maiores que 30mm diâmetro, por concentrações séricas elevadas de 17β -estradiol (estrógeno) e por sinais comportamentais de cio ou receptividade ao garanhão (LEY, 2006). Nesse período a concentração sérica de progesterona é tipicamente menor que 1mg/ml no sangue periférico (ACOSTA et al, 2002). Outra característica importante é sobre o diâmetro folicular na ovulação, o qual pode variar de 30 a 70 mm, sendo mais comum por volta de 40 a 55 mm (SEGABINAZZI et al., 2015).

De maneira geral a égua ovula 24 a 48 horas antes dos sinais de comportamento do cio desaparecerem. Isso é um evento fisiológico muito importante de se lembrar, muitas éguas são cobertas ou inseminadas em seguida à ovulação simplesmente porque ainda demonstram sinais de cio. Se a inseminação ou cobertura ocorrer depois de 12 a 14 horas da ovulação, o óvulo será muito velho para ser prontamente fertilizado ou se fertilizado falhará ao desenvolver um embrião viável (LEY, 2006).

No decorrer do período intermediário de 1 a 4 dias após a ovulação, fase de metaestro, o estrógeno diminui e antes de o corpo lúteo (CL) começar a produzir quantidades significantes de progesterona, a égua demonstra sinais equívocos de cio ou receptividade ao garanhão (SEGABINAZZI et al., 2015). Dessa maneira, o corpo lúteo inicia a produção de quantidades significativas de P_4 iniciando a fase de diestro (fase luteínica). Essa fase dura de 13 a 17 dias, sendo dominada por um corpo lúteo, pela progesterona e por sinais comportamentais indicando ausência de receptividade ao garanhão. O corpo lúteo em desenvolvimento em seguida à ovulação primária, tipicamente tem vida útil por até 85 dias, caso aconteça o reconhecimento materno da gestação. Se o endométrio não liberar a prostaglandina o corpo lúteo continuará a produção do hormônio progesterona e não sofrerá regressão (SILVA et al., 2018).

A égua que ovulou e foi adequadamente coberta ou inseminada, culminando com a fecundação, passa pelo processo de reconhecimento materno da gestação, para que a mesma se mantenha. Em equinos acredita-se que esse processo é resultante da livre movimentação do embrião pelos cornos uterinos, a qual produzirá e secretará estrógeno que suprimirá a liberação endometrial de prostaglandina, impedindo a luteólise. Isso deve ocorrer através dos dias 12º e 14º depois da ovulação produtiva (LEY, 2006).

Na égua que não apresentou concepção o endométrio secreta prostaglandina que, pela circulação sistêmica, afeta o corpo lúteo, induzindo a sua regressão (luteólise) (RAZ; CARLEY; CARD, 2009). A produção do hormônio progesterona declina em 4 a 40 horas seguintes e ainda a égua começa a mostrar sinais de receptividade, indicando o início de outro ciclo estral (SEGABINAZZI et al., 2015).

2.2. Princípios da transferência de embrião

O manejo durante a reprodução da égua doadora abrange o monitoramento do comportamento reprodutivo, através do manejo de palpação transretal e ultrassonografia as quais monitoram a atividade dos folículos e indicam o momento correto de como usar os hormônios exógenos a fim de alinhar o estro com a ovulação (FERREIRA et al, 2011). No momento que o animal está no período fértil, a fêmea que vai doar precisa ser palpada todo dia a fim de monitorar o desenvolvimento do folículo, consentindo com o melhor estágio para inseminar ou fazer a monta de natural, e então poder acompanhar a fase da ovulação (SILVA et al., 2018).

Mesmo com todo acompanhamento folicular, segundo Montechiesi (2015), um fator que pode interferir na eficiência de recuperação dos embriões está relacionado à idade das doadoras. Em éguas que possuem de 2 a 4 anos, a taxa média de recuperação de embriões é de cerca de 85%; já em fêmeas adultas que possuem entre 4 a 18 anos de idade a taxa é de 64,4% e para fêmeas mais velhas, taxa de 24,1%. Éguas novas, com idade inferior a 12 anos, produzem cerca de 10% a mais de embriões quando comparadas com fêmeas que possuem acima de 18 anos de idade. Tais falhas na reprodução vistas em éguas com mais idade, estão ligadas à degradação do oócito, desordens durante a ovulação, pouca eficiência na maturação oocitária, podendo estar em associação ou não com a endometrite crônica, assim como distúrbios relacionados a hormônios.

Figura 1. Folículo pré-ovulatório



Arquivo pessoal.2021.

Figura 2. Edema uterino



Arquivo pessoal.2021.

2.3. Critérios de seleção da doadora e receptora

As éguas selecionadas como candidatas a doar normalmente são fêmeas geneticamente superiores que tenham comprovada atividade reprodutora e/ou atividade atlética, e que, por algum motivo, possam apresentar antecedentes abortivos, retorno repetitivo ao período reprodutivo após a inseminação, ou inclusive fêmeas com mais

idade que comumente apresentam endometrite, podendo levar à perda embrionária, contudo apresentando boa fertilidade. Além disso, é fundamental para a seletividade da fêmea que vai doar, levar em consideração seu histórico de reprodução, a fecundidade, o registro da raça, o possível valor do potro e a quantidade de gestações que se deseja obter (LIRA et al., 2009).

A forma de selecionar a fêmea receptora deve ser com alguns critérios, a fim de se obter a aplicabilidade do programa de TE atrelado ao menor custo. As éguas receptoras selecionadas devem ser saudáveis reprodutivamente, não apresentarem alterações nos músculos esqueléticos, terem os dentes bem cuidados e a visão em bom estado, boa aptidão de úbere, bom comportamento e aptidão materna. Outro fator que deve ser observado para se escolher a receptora modelo, é que a mesma deve apresentar padrões semelhantes de tamanho com a doadora, a fim de evitar distocias. Os animais devem ser identificados de forma permanente a fim de se evitar possíveis confusões na hora de registrar o potro (ALVARENGA; TONGU, 2017).

Fêmeas nulíparas ou consideradas jovens, são mais visadas como receptoras, uma vez que a idade mais avançada se torna um fator de predisposição para a degradação do endométrio, podendo levar ao comprometimento na implantação e permanência durante uma gestação (FUTINO, 2005). Em contrapartida, Losinno (2009), discorda desse resultado, logo, que potrancas que tenham entre 2-4 anos de idade, possam apresentar ciclos estrais com falhas constantes que quando comparadas a fêmeas adultas, e ainda, com frequência, costumam ser mais enérgicas durante o manejo e trato intensivo de exames transretais, aumentando a dificuldade do trabalho do profissional.

Como no decorrer do protocolo e desenvolvimento da técnica é necessário fazer vários manejos na égua, os animais devem estar com cabrestos, porque um animal que está agitado, de difícil manejo, pode ser uma ameaça para os trabalhadores, para o próprio animal e até para o embrião, da mesma maneira que dificulta o trato com a cria e o controle com ultrassonografia (FERREIRA et al, 2019).

Animais que são receptores devem também ser examinados todo dia quando estão no período de reprodução a fim de acompanhar o crescimento do folículo e a fase certa da ovulação. De preferência é necessário que no mínimo duas fêmeas que são receptoras estejam acessíveis para cada doadora, a fim de se permitir no instante da inoculação, ter o discernimento de qual animal está apresentando as condições preferíveis de reprodução e poder assim receber o embrião (LIRA et al., 2009). Essa classificação se baseia através das observações da intensidade uterina e características do CL, obtidas

pela palpação e ultrassonografia transretal, classificando as fêmeas em: aceitáveis, na ocasião em que apresenta corpo lúteo com definição, tonicidade do útero e cervical possuindo uma variação de bom a excelente e sem nenhum tipo de mudança uterina; e em marginalmente com aceitação, ainda que a imagem do corpo lúteo possa ser precária ou com baixa tonicidade uterina e cervical (PALMEIRO, 2013).

No que diz respeito à sanidade das fêmeas que são receptoras, recomenda-se que quando forem introduzidas dentro do rebanho, não possuam anemia infecciosa equina e negativas para mormo. Fazer o controle dos parasitos é uma condição extremamente importante durante o processo de gestação, porque pode ser uma coação à saúde e sanidade dos animais gestantes. Os animais que são mantidos distantes devem ser encaminhados ao local do parto no mínimo um mês de antecedência a fim de se adquirir imunidade e anticorpos que serão úteis para o animal recém-nascido e que sejam produzidos através de antígenos presentes naquele ambiente (FUTINO, 2005).

Figura 3. Égua doadora



Arquivo pessoal.2021.

Figura 4. Égua receptora



Arquivo pessoal.2021.

2.4. Protocolos de sincronização

Existem diversas formas para sincronizar as fêmeas que são doadoras com as fêmeas que são receptoras, podendo ser por ovulação de modo espontâneo e podendo induzir a ovulação com hormônios nas receptoras (SAMPER, 2008). Contudo, o uso de fêmeas simultâneas de modo natural precisa um número maior de animais receptoras para cada doadora. No momento em que isso não seja exequível, a sincronia entre os animais deve ser feita utilizando os diversos tratamentos com hormônios disponíveis nos dias de hoje. Para que a sincronização hormonal dos estros e as ovulações aconteçam de maneira adequada é preciso que tanto as fêmeas doadoras quanto as receptoras já estejam em fase de ciclo (SILVA et al., 2018).

Administrar a prostaglandina, é um costume corriqueiro na conciliação da reprodução em éguas, entretanto o resultado do uso desse agente luteolítico necessita da presença de CL funcional e de forma responsiva, uma vez que o CL se faz responsivo à prostaglandina ($PGF_{2\alpha}$) no momento do quinto dia após o período de ovulação. A aplicabilidade de análogos da prostaglandina consorciado à eficiência de hCG ou GnRH que agiram como promotores da ovulação, tem sido protocolo mais realizado (SEGABINAZZI et al., 2015).

Encontram-se outras regulamentações a fim de se sincronizar que podem ser exequíveis, uma vez que um deles possui uma base de P_4 com curta duração atrelado ao estrógeno conhecido como Estradiol, aplicado todo dia, tanto na doadora como na

receptora, tendo um tempo limite de até 10 dias. Uma vez completado esse tempo, deve-se realizar um uso de $\text{PGF}_{2\alpha}$ ou análogo. Cerca de 3 dias após a aplicação da $\text{PGF}_{2\alpha}$, as éguas entrarão em cio. Então, deve-se iniciar o monitoramento do folículo através da ultrassonografia, e quando um folículo estiver com 35 mm de diâmetro ou mais, realiza-se a indução da ovulação através da aplicação hCG ou GnRH. Entre 36 e 48 horas da aplicação dos indutores realiza-se a inseminação artificial, sendo necessária a verificação da ovulação. Um protocolo hormonal semelhante será realizado na receptora, com exceção da inseminação, o qual deve, preferencialmente, iniciar dois dias após o protocolo utilizado na doadora (LIRA et al., 2009).

Em geral a correspondência de sincronia entre doadoras e receptoras consiste no fato das receptoras encontrarem-se no intervalo do quarto ao oitavo dia após o período de ovulação, ou ainda no nono dia após, e a fêmea que é doadora no sétimo ou oitavo dia após o período de ovulação. Portanto, para a realização da coleta do embrião acontecer no intervalo entre 7 ou 8 dias após o período da ovulação, a fêmea receptora consegue entrar em ovulação um dia anteriormente e até 3 dias após quando comparada com a doadora, sendo assim capaz de receber os embriões neste período. O instante pós-ovulatório, momento esse em que o animal receptor se encontra, possui muita importância e é fundamental a escolha certa da receptora para a TE (SILVA et al., 2018).

As datas dos protocolos devem ser muito bem estabelecidas, uma vez que a sincronidade entre receptora e doadora é primordial para o sucesso da TE. Isso ocorre devido ao fato de que há interação entre embrião com o ambiente do útero estando em completa sintonia, acontecimento essencial para a implantação do embrião (SILVA et al., 2018).

2.5. Coleta de embriões

Embriões de cavalos normalmente são transferidos do oviduto até útero entre os dias 5,5 a 6,0 após o período de ovulação, instante esse onde se encontram na fase de mórula com compactação a blastocisto de modo inicial. Depois da entrada no lúmen do útero, o embrião aumenta de tamanho de forma significativa uma vez que se desenvolve para a expansão da fase de blastocisto. Diversas situações podem influenciar na coleta dos embriões, incluindo o dia em que vai fazer a coleta, a forma de coleta, a contagem

de ovulações, a idade em que o animal se encontra e fertilidade da fêmea que vai doar, a condição do sêmen, a classificação do sêmen, se o sêmen é fresco, resfriado ou congelado, e pôr fim a escolha da técnica de IA (FUTINO, 2005).

Para se fazer a coleta embrionária em equinos, é normal utilizar a metodologia da lavagem transcervical de forma não cirúrgica. No momento em que o animal se encontra imobilizado, deve-se higienizar a região perineal com um detergente de preferência neutro e em seguida enxaguar com água limpa em abundância com posterior secagem. Posteriormente, o técnico que vai manipular deve introduzir um cateter ou sonda que esteja estéril com o uso de um balão inflável pela vagina do animal, atravessando a cérvix e encontrando o corpo do útero. Dessa forma, se infla o balão com cerca de 40 a 80 ml de ar (essa quantidade de ar varia de animal para animal), podendo assim tracioná-lo através da abertura interna da cérvix, a fim de se garantir uma obstrução total, evitando o extravio do líquido (LENZI, 2008).

Uma vez colocada a sonda, injeta-se para o interior do útero cerca de um a dois litros de solução tamponada (Ringer Lactato ou PBS – que é uma solução salina tamponada dentro de fosfato), que é a solução mais utilizada para esse procedimento nos dias de hoje. É feito 3 lavagens usualmente, uma vez que ao colocar o líquido não há onde recuperação embrionária, deve se fazer uso do segundo litro, repetindo o procedimento até dar certo. Logo em seguida a esse procedimento no útero, faz-se a drenagem do fluido com o uso do cateter do tipo sonda, passando o líquido por um filtro de 0.75 μm que está dentro de um copo de coleta, permitindo que a retenção do embrião no copo (LEY, 2006).

Figura 5. Sonda esterilizada



Arquivo pessoal.2021.

Figura 6. Copo coletor



Arquivo pessoal.2021.

2.6. Manipulação e classificação do embrião

Após o término do processo de lavagem do útero, esvazia-se o filtro em uma Placa do tipo Petri fazendo marcações e enxaguando o filtro com o meio que foi utilizado. Para se examinar o fluido a fim de se buscar presença de embriões utiliza-se um microscópio ou uma lupa. Uma vez que o embrião é reconhecido, ele passa por classificação, lavagem e transferido para o animal receptor (FUTINO, 2005).

No momento seguinte a lavagem do útero para a retirada embrionária, deve ser colocado em uma placa de Petri com o mesmo líquido usado na coleta, a fim de se identificar e classificar os embriões. A manipulação dos embriões é feita com o uso de uma palheta que congela sêmen com capacidade de 0,25 ou 0,5 ml (LIRA, 2009).

A maior parte dos embriões normalmente estão no estágio inicial de blastocisto, blastocisto e blastocisto expandido, por conta da data da coleta, por volta dos dias 7 e 9 depois da fase de ovulação do animal doador (LENZI, 2008).

A avaliação morfológica, é a técnica utilizada para se classificar os embriões de cavalos, através da forma, do tamanho, a cor que possui, nível de uniformidade, banimento e degradação dos blastômeros. Durante essa fase, a qualidade dos embriões dos animais é o fator que mais interfere nas taxas de prenhez dentro dos programas de transferência de embrião, sendo extremamente importante para resultados (LOPES, 2015).

Os embriões que possuem uma taxa mais alta de prenhez são assim transferidos ainda no estágio inicial de blastocisto, blastocisto e blastocisto expandido possuindo grau 1 e grau 2, através de uma escala com variação de grau entre 1 a 4 e ainda os embriões UFO que são ovócitos não fertilizados, segundo Mccue et al., (2004), sendo descrita como:

- Embriões que possuem grau 1, sendo os excelentes: sem nenhuma deformação visível; com a forma esférica; células possuindo tamanho, cor e textura de forma uniforme; adequação em tamanho e estágio de desenvolvimento para a idade após o período ovulatório;
- Embriões grau 2, considerado bom: com deformações pequenas, referente a alguns blastômeros banidos; com detalhes pequenos de anomalia em formato, tamanho, cor ou até mesmo textura; pequena divisão entre a camada trofoblástica e a zona pelúcida ou cápsula;

- Embriões grau 3, considerado ruim: possui grau médio de imperfeições, podendo ter grande porcentagem de blastômeros banidos ou degradados; parcial colapso da blastocele ou distanciamento médio do trofoblasto na zona pelúcida ou cápsula;
- Embriões grau 4, degenerado ou morto: possui elevado problema visível, podendo ter alta porcentagem de blastômeros banidos, completo colapso da blastocele, com rachadura da zona pelúcida ou total degradação com morte embrionária;

Uma vez que se termina essa fase que avalia e classifica o embrião, ele passa por lavagem, usualmente passado entre 5 a 10 vezes em meio de conservação, a fim de se retirar impurezas que possam estar na zona pelúcida, sendo feito na placa de Petri para posterior envase e inovulação (OLIVEIRA; SARAPIÃO; QUINTÃO, 2014).

Figura 7. Paleta estéril



Arquivo pessoal.2021.

Figura 8. Avaliação do embrião na lupa



Arquivo pessoal.2021.

Figura 9. Meio para cultivo celular



Arquivo pessoal.2021.

2.7. Inovulação

O embrião pode de ser resfriado e transportado para uma transferência decorrente ou ainda pode ser transferido em seguida da recuperação do embrião, sendo esse procedimento de transferência realizado de forma cirúrgica ou não cirúrgica transcervicalmente (FARIAS et al., 2016).

Nos dias de hoje, a maior parte dos embriões tem sido transferido de maneira não cirúrgica para as fêmeas que vão receber e estão sincronizadas. Para fazer a

transferência, os embriões devem ser dispostos em palhetas de cerca de 0,25 ou 0,5 ml ou pode ser usado também pipetas para inseminação artificial e colocados no corpo uterino através de um inovulador. Assim que ele é sugado para o interior de um instrumento para manipulação, a coluna que contém meio de cultura e o embrião são mantidos cada lado através de colunas de ar (SILVA et al., 2018).

Utiliza-se normalmente pipeta para inseminação normal, inovuladores que são desprezáveis, uma bainha de material plástico sobre o instrumento de uso. Com a fêmea que vai receber ainda imobilizada em tronco de contenção, deve-se higienizar a região perineal, para que então o profissional vista uma luva de plástico por todo seu braço, com uma pequena quantidade de lubrificante no início da vulva (FARIAS et al., 2016).

A ponta mais distante do instrumento utilizado para fazer a transferência coberta pela bainha é então encaixada na palma da mão com a proteção do dedo do manipulador (LOPES, 2015). Enfim, o instrumento é colocado dentro da vagina do animal e a ponta da bainha é colocada na abertura mais externa da cérvix. Nessa etapa o embrião pode ser colocado no corpo do útero ou em um dos cornos uterinos, instante esse que o instrumento é empurrado através da camisa sanitária (SILVA et al., 2018).

Figura 10. Palheta envasada



Arquivo pessoal.2021.

Figura 11. Bainha



Arquivo pessoal.2021.

Figura 12. Inovulador



Arquivo pessoal.2021.

Figura 13. Camisinha sanitária



Arquivo pessoal.2021.

2.1 Classificação do tônus uterino nas receptoras

Segundo Alvarenga e Tongu (2017), o tônus uterino é classificado de um a quatro com modificações, seguindo os seguintes parâmetros:

- Tônus 1: mínimo tônus verificado do anestro até o início da atividade cíclica. O formato e consistência do útero não são bem definidos no exame de palpação retal.
- Tônus 2: o tônus proporcionado pela fase estrogênica do ciclo estral, com útero de consistência macia e formato quase tubular. A contratilidade do útero ainda não é perceptível ao toque.

- Tonus 3: o tônus da fase progesterônica do ciclo estral (diestro). O útero apresenta formato tubular bem definido, com aumento do tônus e consistência, sendo perceptível a contratilidade uterina.
- Tonus 4: máximo tônus do início da prenhez, após o décimo terceiro dia, contratilidade uterina é ainda mais perceptível. O útero mantém formato tubular e consistência mais firme.

3 METODOLOGIA

3.1 Coleta de dados

Os dados foram coletados no Haras da Canção no município de Três Pontas-MG, os estudos foram feitos com o auxílio do Médico Veterinário e proprietário do Haras Bruno Mesquita Campos cadastrado com o CRMV-19666 o qual tinha a função de acompanhar o processo de sincronização até o momento da transferência. Os dados foram obtidos por meio de uma autorização de coleta dele.

Os estudos foram feitos na estação de 2019/2020 com oito éguas doadoras de embriões e na estação de 2020/2021 com dez éguas e foram separadas de duas a três receptoras por doadora.

3.2 Animais

As doadoras utilizadas eram éguas da raça Mangalarga Machador, com faixa etária entre 5 a 18 anos, todas em condições normais de reprodução, saudáveis, bom escore corporal, com genética superior, comprovada na reprodução ou atleta.

As receptoras escolhidas apresentavam idade entre 6 a 15 anos, saudáveis, bom comportamento, boa habilidade materna, boa conformação de vulva e identificação permanente para fazer o registro do potro.

3.3 Manejo

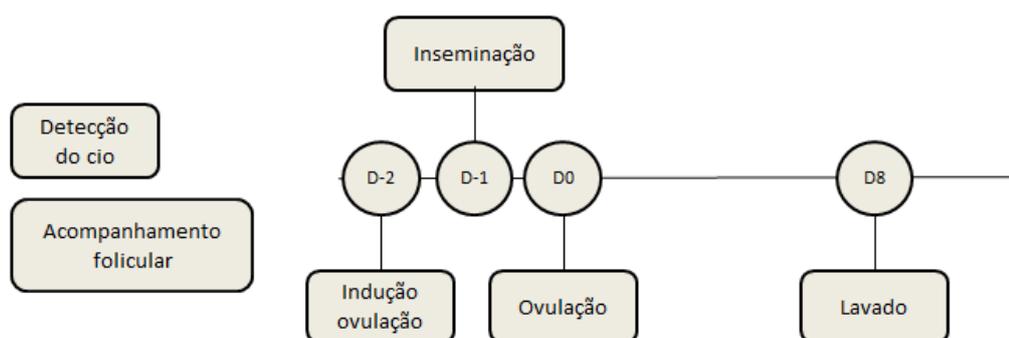
O manejo dessas éguas consistiu em monitorar o comportamento reprodutivo, usar a técnica de palpação transretal e ultrassonografia para monitorar o desenvolvimento folicular e saber o momento certo para o uso dos hormônios exógenos que vão sincronizar a ovulação. Quando detectado o cio, houve monitoramento diário para avaliar o crescimento folicular e saber a melhor hora para a inseminação artificial ou monta natural e acompanhar a ovulação.

3.4 Protocolo doadoras

O protocolo utilizado nas doadoras foi feito da seguinte forma: após detectado o cio houve monitoramento todos os dias, assim quando um folículo estivesse maior ou igual a 36mm, foi utilizado indutor de ovulação, sendo os mais comuns: histrelina, deslorelina e o hCG, dando preferência para o Fertcor[®]. A IA foi feita no dia seguinte da indução, e a ovulação conferida no próximo dia.

O lavado uterino para recuperação de embriões foi feito no D8 ou D9, com solução de Ringer com Lactato e o meio de cultivo utilizado para manipular o embrião foi o holding. O embrião foi avaliado na lupa, analisando a morfologia.

Figura 14. Protocolo doadoras



Fonte: A própria autora, 2021

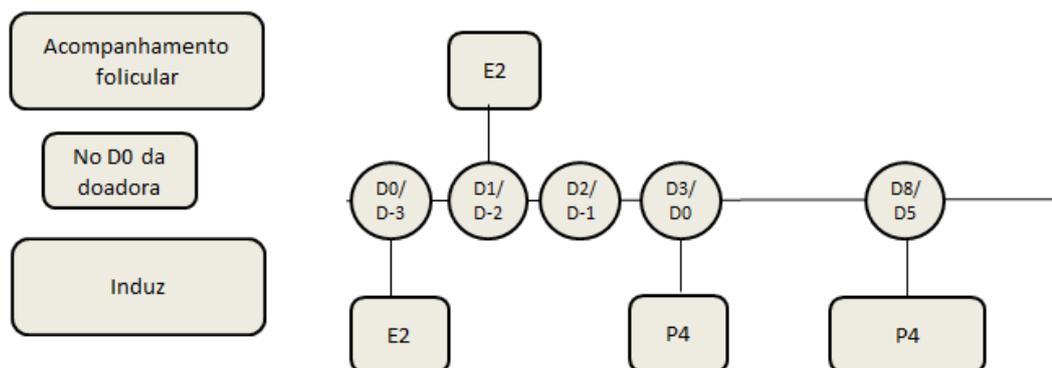
3.5 Protocolo receptoras

As receptoras também foram avaliadas diariamente para acompanhar o ciclo estral, sendo separado de 2 a 3 receptoras por doadora.

As receptoras podem ser sincronizadas com as doadoras de maneira natural ou por protocolos. Na égua em anestro, sem folículo dominante e sem CL maduro pode ser feito o protocolo, que vai iniciar no D0 da doadora, feita aplicação de E₂ durante dois dias consecutivos, com um intervalo de um dia e no próximo aplica P₄. No D8 da doadora vai ocorrer a transferência e aplicação de mais uma dose de P₄ na receptora. Nas receptoras que já tiverem no cio, foram feitas a indução de ovulação no D0 ou D1 da doadora. No haras foi utilizado receptoras que receberam protocolo de ovulação e também aquelas que estavam em anestro e foi feito o protocolo.

No dia da seleção foi avaliada a tensão do útero preconizando aquela que teve tensão maior que 3 e a confirmação do CL. O retoque para confirmar a gestação foi realizado no D12 do embrião

Figura 15. Protocolo receptoras



Fonte: A própria autora, 2021

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizados 23 lavados uterinos para coleta de embriões na estação de 2019/2020 resultando em 19 lavados positivos e 47 lavados na estação de 2020/2021 resultando em 33 lavados positivos. Todas as coletas foram realizadas em éguas doadoras que estavam no oitavo ou nono dia do ciclo estral, ou seja, a partir do dia da ovulação. Todas as éguas receptoras que foram inovuladas receberam 5 ml (1.500 mg) de P₄ por via IM no dia da TE.

Os dados relacionados à estação reprodutiva de 2019/2020 estão apresentados nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Doadoras utilizadas, número de embriões recuperados e taxa de prenhez dos embriões nas receptoras na estação 2019/2020:

Nome da doadora	Nº de coletas	Taxa de recuperação embrionária % (nº)	Taxa de prenhez de 14 a 20 dias % (nº)	Taxa de prenhez acima de 90 dias % (nº)
Vaidade	6	66,6 (4/6)	0 (0/4)	0 (0/0)
Amora	5	100 (5/5)	40 (2/5)	50 (1/2)
Anita	5	60 (3/5)	66,6 (2/3)	100 (2/2)
Atração	2	100 (2/2)	0 (0/2)	0 (0/0)
Olímpia	2	100 (2/2)	50 (1/2)	100 (1/1)
Viola	1	100 (1/1)	100 (1/1)	100 (1/1)
Agatha	1	100 (1/1)	100 (1/1)	100 (1/1)
Astuta	1	100 (1/1)	100 (1/1)	100 (1/1)
Total	23	82,6 (19 /23)	42,1 (8/19)	87,5 (7/8)

Fonte: A própria autora, 2021.

Tabela 2. Receptoras utilizadas, embriões transferidos e índice de prenhez em éguas receptoras com diferentes idades de corpo lúteo na estação 2019/2020:

Receptora	Idade do corpo lúteo	Nº de embriões transferidos	Prenhez	% de prenhez em relação ao número de embriões
-----------	----------------------	-----------------------------	---------	---

R1	D6 / D7	2	- / -	0
R2	D6	1	-	0
R3	D8 / D6	2	- / -	0
R4	D6	1	-	0
R5	D6	1	-	0
R6	D8	1	+	100
R7	D7	1	-	0
R8	D6	1	-	0
R9	D9 / D6	2	- / +	50
R10	D6	1	+	100
R11	D7	1	-	0
R12	D6	1	+	100
R13	D7	1	-	0
R14	D6	1	+	100
R15*	-	1	+	100
R16	D6	1	+	100
Total	16	19	7	36,8

Observação: *receptora (R15) manteve a gestação através de aplicação de P₄ exógena.

Fonte: A própria autora, 2021

D: dias

+: prenhez positiva

-: prenhez negativa

Os dados relacionados à estação reprodutiva de 2020/2021 estão apresentados nas tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Doadoras utilizadas, número de embriões recuperados e taxa de prenhez dos embriões nas receptoras na estação 2020/2021:

Nome da doadora	Nº de coletas	Taxa de recuperação embrionária % (nº)	Taxa de prenhez de 14 a 20 dias % (nº)	Taxa de prenhez acima de 90 dias % (nº)
Cachaça	2	50 (1/2)	100 (1/1)	100 (1/1)
Duna	6	66,6 (4/6)	25 (1/4)	100 (1/1)
Chuva	7	71,4 (5/7)	20 (1/5)	0 (0/0)
Viola	3	66,6 (2/3)	100 (2/2)	100 (2/2)
Atração	9	66,6 (6/9)	0 (0/6)	0 (0/0)

Anita	8	75 (6/8)	33,3 (2/6)	100 (2/2)
Ecologia	4	100 (4/4)	0 (0/4)	0 (0/0)
Onça	1	100 (1/1)	0 (0/1)	0 (0/0)
Verdade	1	100 (1/1)	100 (1/1)	100 (1/1)
Quadrilha	6	50 (3/6)	33,3 (1/3)	100 (1/1)
Total	47	70,2 (33/47)	27,2 (9/33)	88,8 (8/9)

Fonte: A própria autora, 2021

Tabela 4. Receptoras utilizadas, embriões transferidos e índice de prenhez em éguas receptoras com diferentes idades de corpo lúteo na estação (2020/2021):

Receptora	Idade do corpo lúteo	Nº de embriões transferidos	Prenhez	% de prenhez em relação ao número de embriões
R1	D6 / D6/ D6	3	- / - / -	0
R2	D4/D9/D6/D5/ PROTOCOLO	5	- / - / - / - / +	20
R3	D5	1	-	0
R4	D5	1	+	100
R5	D3/D7/D8/D6/D7 PROTOCOLO	6	- / - / - / - / - / -	0
R6	D5	1	+	100
R7	D6	1	+	100
R8	D5	1	+	100
R9	D6	1	+	100
R10	D8/D6	2	- / +	50
R11	D5/D8/D8	3	- / - / -	0
R12	D9/D5/ PROTOCOLO	3	- / - / -	0
R13	D6	1	+	100
R14	PROTOCOLO/ PROTOCOLO	2	- / -	0
R15	D8	1	-	0
R16	D6	1	-	0
Total	16	33	8	24,24

Observação: receptora (R2) manteve a gestação através de aplicação de P4 exógena.

Fonte: A própria autora, 2021

D: dias

+: prenhez positiva

-: prenhez negativa

Na estação de 2019/2020 das 19 transferências realizadas, 8 (42,10%) resultaram em prenhez e na estação de 2020/2021 das 33 transferências realizadas 9 (27,27%) resultaram em prenhez diagnosticadas no 4º dia após a TE.

Resultando em um número inferior aos 70,3% obtidos por Jacob et al., (2002) no 14º dia de gestação, aos 82,5% observados por Jasko (2002) no 8º dia após a TE, aos 73,4% observados por Rocha et al., (2007) no 15º dia de gestação, aos 50% obtidos por Taveiros (2000) 45º dia de gestação, aos 65,7% observados por Carnevale et al., (2000) no 12º dia de gestação e aos 51% registrados por Taveiros et al. (2003) no 30º dia de gestação.

Cada estação resultou em 1 perda embrionária, 2019/2020 (12,5%) e 2020/2021 (11,1%), sendo inferior aos 49% obtidos por Taveiros et al., (2003) no 30º dia de gestação, aos 17,5% observados por Villahoz et al. (1985) no 50º dia pós-ovulação, aos 15,5% referidos por Carnevale et al., (2000) no 50º dia de gestação, e aos 11,9% referidos por Taveiros et al., (2008) aos 45 dias de gestação, porém superior aos 4,8% observados por Rocha et al., (2007) aos 30 dias de gestação, indicando um bom índice de manutenção da gestação.

As coletas embrionárias foram realizadas no 8º dia após a ovulação, fator esse que provavelmente, não interferiu nos resultados, já que não há diferenças nas taxas de perdas de prenhez quando as colheitas são realizadas no 7º, 8º ou 9º dia após a ovulação (FLEURY, 1998; FLEURY et al., 2001), destacando, que a coleta realizada no 8º dia tende a aumentar a taxa de recuperação embrionária (FLEURY, ALVARENGA, 1999)

Segundo Betteridge (2000), considerando que no início da prenhez a manutenção embrionária necessita de alguns processos combinados intrinsecamente, alguns animais podem não conseguir levar a prenhez além da fase embrionária. Podendo resultar em uma grande perda econômica na equideocultura, em que 30-40% das prenhez acabam sendo interrompidas dentro das 2 primeiras semanas da concepção.

A qualidade em que o embrião se apresenta é considerada um dos fatores que mais interfere na taxa de prenhez nos programas de transferência de embrião (SQUIRES et al., 2003). Nos dados de Taveiros et al. (2008) a baixa porcentagem das perdas embrionárias registradas em seus estudos deve-se ao fato de utilizar exclusivamente os

embriões de estruturas classificadas entre grau I e III, fazendo com que a qualidade dos embriões influenciasse positivamente os resultados obtidos.

O mais importante no manejo clínico é reconhecer que ocorrerá perda embrionária em algumas éguas, e o mais adequado seria o diagnóstico precoce de sua ocorrência para que tenha uma nova oportunidade de usar a égua durante a mesma estação de monta. A detecção da perda embrionária precoce pode ser feita através dos exames ultrassonográficos a cada 10 dias ou 2 semanas durante o início da gestação (VANDERWALL, 2008).

Segundo Vanderwall (2008), alguns fatores sobre a taxa de prenhez são classificados em intrínsecos, extrínsecos e embrionários. Sendo os intrínsecos: idade da doadora, horário da inseminação em relação à ovulação, lactação, local onde o a vesícula embrionária se fixa, e anormalidade de cromossomos maternos; extrínsecos: nutrição, tensão, estação, palpação/ultrassonografia transretal, manipulação do embrião; e embrionários: anomalias de cromossomos ou outras características específicas do embrião.

No caso das receptoras (R15) da estação 2019/2020 e a (R2) da estação 2020/2021 utilizadas no Haras da Canção foram feitas 30 aplicações de P₄, dando o intervalo de doses de uma semana devido ao fato da mesma ter passado por um protocolo de sincronização e não ter um CL capaz de manter a gestação até a placenta suprir essa necessidade.

5 CONCLUSÕES

A transferência de embriões é atualmente a biotécnica de reprodução assistida mais utilizada na equinocultura. Com o avanço e acessibilidade a novas biotécnicas, a transferência de embrião torna-se um método interessante a fim de elevar a eficiência reprodutiva da espécie equina. A eficiência reprodutiva, com o uso da transferência de embrião, está relacionada à escolha de uma receptora saudável, que tenha porte físico e condição fisiológica.

Apesar das inúmeras vantagens algumas limitações associadas ao momento ideal da inseminação, sincronidade entre doadora e receptora, e qualidade embrionária e endócrina da receptora, podem afetar os resultados. Por isso, é de suma importância realizar o controle folicular adequado de todas as fêmeas, e avaliar criteriosamente a

situação uterina e ovariana da receptora, a fim de minimizar as perdas na recuperação embrionária e as falhas de transferência.

Embora a transferência de embrião seja uma biotécnica reprodutiva altamente difundida na equinocultura existem algumas limitações, por isso deve ser realizada de maneira rigorosa, pois fatores como a dificuldade no manejo de sincronização entre doadora e receptora, momento ideal da IA em relação a ovulação, além da qualidade dos ovários e úteros das receptoras poderem influenciar no sucesso do protocolo.

Diante dos dados obtidos podemos concluir que a técnica de transferência de embrião no Haras da Canção apresenta uma taxa de recuperação embrionária satisfatória de 70 a 80% nas doadoras de embrião, demonstrando que o controle do processo de ovulação e inseminação ocorrem de maneira adequada. Já, ao avaliar a taxa de prenhez após a transferência, as receptoras não apresentaram um resultado satisfatório quando se trata da manutenção da gestação, visto que no final poucas receptoras conseguiram embrião dar sequência à gestação. Essas falhas podem estar associadas a falha na seleção das mesmas, a qual não estavam devidamente preparadas para o processo. Diante disso, ressalta a importância de uma melhor avaliação da qualidade uterina e ovariana das receptoras no dia de ovulação, a fim de minimizar as perdas gestacionais.

6 REFERÊNCIAS

ACOSTA, T. J.; YOSHIKAWA, N.; OHTANI, M.; MIYAMOTO, A. Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F (2 alpha) injection in the cow. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 651-658, 2002.

ALVARENGA, M. A. Problems and solutions in equine embryo transfer programs in Brazil. **Acta Sci Vet**, v. 38, n.1, p. 319-333, 2010.

ALVARENGA, M. A.; TONGU, E. A. O. Estratégias para melhorar a eficiência reprodutiva em programas de transferência de embrião de equinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 41, n. 1, p. 19-24, 2017.

ANDRADE, L. S. O ciclo estral da égua e o seu controle endócrino. Fisiologia e manejo da reprodução equina, 2º ed, Recife, p. 57-63, 1986.

BETTERIDGE, K. J. Comparative aspects of equine embryonic development. **An. Rep. Sci.**, v. 60, p. 691-702, 2000.

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, n. 6, p. 965-979, 2000.

FARIAS, L. D.; NEVES, A. P.; RECHSTEINER, S. M. E. F.; TAROUXO, A. K. Indução da ovulação em éguas: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 40, n. 1, p. 17-21, 2016.

FERREIRA, J. C.; MEIRA, C. de. Aplicação da ultrassonografia colorida doppler em programas de transferência de embriões equinos. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 6, p. 1063-1069, 2011.

FERREIRA-SILVA, J. C.; SALES, F. A. B. M.; NASCIMENTO, P. S.; MOURA, M. T.; FREITAS-NETO, L. M.; ROCHA, J. M.; FERREIRA, H. N.; OLIVEIRA, M. A. R. Evaluation of embryo collection and transfer days on pregnancy rate of Mangalarga Marchador mares during the breeding season. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, Medellín, v. 32, n. 3, p. 214-220, 2019.

FLEURY, J. J. Transferência não cirúrgica de embriões equinos colhidos no oitavo dia pós-ovulação. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v. 26, n. 1, p. 266, 1998.

FLEURY, J. J.; ALVARENGA, M. A. Effects collection day on embryo recovery and pregnancy rates in nonsurgical equine embryo transfer program. **Theriogenology**, v. 51, n. 1, p. 51:261, 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, n. 1; p. 29-33, 2001.
- FUTINO, D. O., 2005. **TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM EQÜINOS**- Monografia apresentada para a conclusão do Curso de Medicina Veterinária da Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília.
- JACOB, J. C. F.; DOMINGUES, I. B.; GASTAL, E.; GASTAL, M. The impact of degree of synchrony between donors and recipients in a commercial equine embryo transfer program. **Theriogenology**, v. 57, p. 545, 2002.
- JASKO, D. J. Comparison of pregnancy rates following nonsurgical transfer of day 8 equine embryos using various transfer devices. **Theriogenology**, v. 58, p. 713-715, 2002.
- LENZI, C. **TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM EQUINOS** Trabalho de conclusão do Curso de Medicina Veterinária da Universidade de Tuiuti do Paraná, 2008.
- LEY, M. B. Reprodução em Éguas para veterinários de eqüinos, 1ª Ed. Roca, São Paulo, p. 184-191, 2006.
- LIRA, R. A., PEIXOTO, G. C. X., SILVA, A. R. Transferência de embrião em eqüinos: Revisão. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 3, n. 4, p. 132-140, 2009.
- LOPES, E. P. Transferência de embriões equinos: maximizando resultados com a escolha de receptoras. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 39, n. 1, p. 223-229, 2015.
- LOSINNO, L. Factores críticos del manejo embrionario en programas de transferencia embrionaria en eqüinos. Proceedings del I Congreso Argentino de Reproducción Equina, p. 89-94, 2009.
- MAIA, H. G. O.; OLIVEIRA, N. J. F.; CROCOMO, L. F. Fisiologia e fatores interferentes na reprodução de éguas. **Ciência Animal**, v. 29, n. 4, p. 112-123, 2019.
- MCCUE, P. M.; HUDSON, J. J.; BRUEMMER, J. E.; SQUIRES, E. L. Efficacy of hCG at inducing ovulation: a new look at an old issue. Proceedings of the 50th Convention of the American Association of Equine Practitioners, p. 510-513, 2004.
- 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.
- MONTECHIESI, D. F. Transferência de embriões em equinos e os fatores relacionados as taxas de prenhez. **Ciência Animal**, n. 25, p. 187-194, 2015.
- OLIVEIRA, C. S.; SARAPIÃO, R. V.; QUINTÃO, C. C. R. Biotécnicas da Reprodução em Bovinos. EMBRAPA Gado de Leite, p. 52, 2014.

PALMEIRO, A. J. M. Otimização da eficiência reprodutiva numa vacada no alentejo - estudo de caso. Dissertação de mestrado integrado em medicina veterinária, Lisboa, 2013.

RAZ, T.; CARLEY, S.; CARD, C. Comparison of the effects of eFSH and deslorelin treatment regimes on ovarian stimulation and embryo production of donor mares in early vernal transition. **Theriogenology**, v. 71, n. 9, p. 1358-1366, 2009.

ROCHA, A. N. et al. Taxas de Prenhez e perda embrionária precoce em programa comercial de transferência de embriões (TE) em éguas da raça Mangalarga Marchador. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 17., 2007, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: Colégio brasileiro de Reprodução Animal, 2007. p. 160.

SAMPER, J. C. Induction of estrus and ovulation: Why some mares respond and others do not. **Theriogenology**, v. 70, p. 445-447, 2008.

SEGABINAZZI, L. G.; STEIGLEDER, L. F.; KAIPPER, R.; RODRIGUES, T. S.; ARAGÃO, O., DELL'AQUA, J.A., ALVARENGA, M. A. Indução de múltiplas ovulações em éguas com baixas doses de acetato de deslorelina sem acompanhamento folicular prévio. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, v.11, p.1488-1494, 2015.

SILVA, P. C. A.; OLIVEIRA, J. P.; DUTRA, G. A.; PAIVA, S. O.; CARAM, D. F.; JUNQUEIRA, R. G. C.; JACOB, J. C. F. Taxa de recuperação e características morfológicas de embriões muares (*Equus caballus* x *Equus asinus*). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 7, p. 1453-1457, 2018.

SOUZA, F. A.; CANISSO, I. F.; D'OLIVEIRA-SOUSA, A.; DO CARMO PATRÍCIO, F. A.; GOMES, M. G. T.; PINTO, P. F. B. Dinâmica folicular ovariana na égua. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 13, n. 1, 2, 3, p. 17-23. 2010.

SQUIRES, E. L., HON, A. C. T. Changes in Equine Reproduction: Have They Been Good or Bad for the Horse Industry?. **Journal Equine Veterinary Science**, v. 29, p. 268-273, 2009.

SQUIRES, E. L.; CARNEVALE, E. M.; MCCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. Embryo technologies in the horse. **Theriogenology**, v. 59, p. 151- 170, 2003.

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

TAVEIROS, A.W. Transferência de embriões equinos da raça Mangalarga Machador. 40f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) - Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2000.

TAVEIROS, A. W.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F.; TENÓRIO FILHO, F.; BARTOLOMEU, C. C.; SANTOS, M. H. B.; OLIVEIRA, L. R. S.; LUNES-SOUZA, T. C.; FREITAS, J. C. C. Ultrasonographic monitoring of 103 recipient mares of

different reproductive status during the first 30 days after embryo transfers. **Veterinary Record**, v. 153, p. 558-560, 2003.

TAVEIROS, A. W.; MELO, P. R. M.; MACHADP, P. P.; FREITAS NETO, L. M.; SANTOS JUNIOR, E. R.; SANTOS, M. H. B.; LIMA, P. F.; OLIVEIRA, M. A. L. Perda de conceito em programa de inseminação artificial e de transferência de embriões em equinos da raça Mangalarga marchador. **Medicina Veterinária**, v.2, n.2, p.28-33, 2008.

TEZZA, L.; DITTRICH, J., 2006. Reprodução em Equinos, p.1–13, 2006.

VILLAHOZ, M. D.; SQUIRES, E. E.; VOSS, J. L.; SHIDELER, R. K. Some observations on early embryonic death in mares. **Theriogenology**, v. 23, p. 915-924, 1985.

VAZQUEZ, J. J.; ESTELLER-VICO, A.; TEJEDA, A.; MENDEZ, C. Retrospective study on the influence of recipient mare's height on foal height of twin embryos, from birth to three years of age. **Journal of Equine Veterinary Science**, New York, v. 66, p. 214, 2018.

VANDERWALL, D. K. Early embryonic development and evaluation of equine embryo viability. In: **Vet Clin North Am Equine Pract**, v. 12, p. 61-83, 1996.

VANDERWALL D. K. Early embryonic loss in the mare. **J. Eq. Vet. Sci.**, v. 28, p. 691-702, 2008.