

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**FATORES QUE INTERFEREM NA TAXA DE SUCESSO DA TRANSFERÊNCIA DE
EMBRIÕES EM EQUINOS**

NATÁLIA KLEIN SCHMIDT

**PORTO ALEGRE
2015/1**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**FATORES QUE INTERFEREM NA TAXA DE SUCESSO DA TRANSFERÊNCIA DE
EMBRIÕES EM EQUINOS**

NATÁLIA KLEIN SCHMIDT

Trabalho de conclusão de curso apresentado à
Faculdade de Medicina Veterinária como
requisito parcial para a obtenção da Graduação
em Medicina Veterinária

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos
Co-orientador: M.V. Esp. Yura Torres Souza

**POTO ALEGRE
2015/1**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Valter e Lúcia por estarem sempre presentes durante esses anos, me apoiando e incentivando para a realização dessa conquista. Ao meu irmão, Vítor, pelo companheirismo e compreensão nos momentos em que precisei. Amo vocês.

Ao meu orientador e professor, Rodrigo Costa Mattos, pela ajuda com a realização deste trabalho e pelas oportunidades e aprendizagem oferecidas durante meu tempo de estágio no Reprolab.

Ao meu coorientador, Yura Torres Souza, pela paciência e companheirismo nesses anos e por todo ensinamento que me foi proporcionado neste período.

Aos amigos que fiz durante estes 5 anos de faculdade, pelo carinho, pelo amparo e pelos conselhos naqueles momentos difíceis. Aos antigos amigos por toda compreensão e paciência que tiveram comigo nesse período, por partilharem minhas preocupações e por entenderem minhas ausências.

Obrigada a todos que cruzaram meu caminho durante este período, e que de certa forma, contribuíram para essa realização.

*“Um cavalo sem cavaleiro continua cavalo;
um cavaleiro sem cavalo é apenas uma pessoa.”
(Claudia Lein)*

*“Onde senão no cavalo encontramos nobreza sem arrogância,
amizade sem inveja e beleza sem vaidade?”
(Ronald Duncan)*

RESUMO

A transferência de embriões (TE) na espécie equina vem sido realizada comercialmente desde a década de 80 e é considerada uma biotécnica de importância para a equinocultura, além de estar crescendo significativamente a cada ano, sendo o Brasil um dos maiores produtores mundiais de potros nascidos de TE. A versatilidade da espécie equina é uma das razões do desenvolvimento mundial da equinocultura, e a TE permite um avanço maior do setor através do ganho na eficiência reprodutiva e no acréscimo do melhoramento genético, beneficiando o aprimoramento das raças e seus cruzamentos. A técnica tem como objetivo principal a obtenção de um maior número de potros por égua/ano. Alguns fatores, como os cuidados com a égua doadora e receptora, a qualidade e o tipo de sêmen a ser utilizado, a forma como é realizada a técnica de transferência, e as características do embrião, estão associados com o sucesso da taxa de recuperação embrionária. A realização dessa revisão de literatura tem como objetivo analisar alguns dos fatores que interferem no sucesso da TE em equinos.

Palavras-chave: Transferência de embrião, doadoras, receptoras, taxa de sucesso.

ABSTRACT

Embryo transfer (ET) in the equine species has been commercially conducted since the 80s and it is considered an important biotechnique for equine breeding, besides growing significantly each year, with Brazil being one of the world's largest producers of foals born from ET. The versatility of the equine species is one of the reasons for the global development of equine creation, and ET allows a greater advance of the industry through gain in reproductive efficiency and in breeding perfectioning, benefiting the improvement of breeds and their crosses. The technique aims to obtain a greater number of foals per mare per year. Some factors, such as the care with the recipient and the donor mares, quality and type of semen to be used, the way the transfer technique is performed, and the characteristics of the embryo, are associated with the success of the embryo recovery rate. The realization of this literature review aims to analyze some of the factors that affect the success of ET in horses.

Key-words: embryo transfer, donor, recipient, success rate.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	CICLO ESTRAL DA ÉGUA	8
3	TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM EQUINOS	10
4	FATORES QUE INTERFEREM NAS TAXAS DE PREENHEZ APÓS A TE	13
4.1	Doadoras	13
4.2	Receptoras	14
4.3	Sincronização de éguas doadoras e receptoras	15
4.4	Ovulações múltiplas	16
4.4.1	Múltiplas ovulações espontâneas	16
4.4.2	Múltiplas ovulações induzidas na espécie equina	17
4.5	Inseminação artificial	18
4.6	Dia da coleta do embrião	20
4.7	Fatores relacionados ao embrião	21
4.7.1	Idade do embrião	21
4.7.2	Qualidade do embrião	21
4.7.3	Transporte do embrião no oviduto	22
4.8	Médico veterinário	22
5	CONCLUSÃO	23
	REFERÊNCIAS	24

1 INTRODUÇÃO

A transferência de embriões (TE) é uma importante biotécnica que consiste na coleta de embriões de éguas doadoras e posterior transferência (inovulação) para o útero de éguas receptoras, estas levarão a gestação a termo e se responsabilizarão pela lactação e amamentação do potro. O primeiro relato de TE em equinos foi realizado por pesquisadores japoneses no ano de 1972. No Brasil a TE é realizada comercialmente desde a década de 80 (MCKINNON; SQUIRES, 2007), e hoje ocupa lugar de destaque a nível mundial juntamente com os Estados Unidos e a Argentina (CARMO; ALVARENGA, 2003).

Essa ferramenta é utilizada para a produção de mais de um potro por égua durante o ano, permitindo o melhor aproveitamento de éguas que possuem alto valor zootécnico ou das éguas idosas com histórico reprodutivo problemático, bem como aquelas que estejam em atividade esportiva sem que ocorra a necessidade de afastamento das competições. Outras vantagens da TE é a otimização do processo de seleção dentro do plantel e a obtenção de embriões de potras com dois anos de idade, pois nessa fase uma gestação não é indicada por vir a prejudicar o desenvolvimento da potra e comprometer sua vida esportiva. Promove também a capacitação de éguas subférteis por problemas adquiridos (infecção uterina crônica, laminite crônica, artrites, problemas comportamentais, entre outros) de gerarem potros através da TE. O emprego da TE ainda favorece um maior controle de doenças relacionadas à transferência de material genético entre estados ou países, bem como a obtenção de divisas através de exportações de embriões congelados (ARRUDA *et al.*, 2001).

A taxa de recuperação embrionária e a taxa de prenhez após a transferência do embrião são os dois principais fatores que influenciam nas taxas de sucesso de uma TE. No entanto, há elementos que contribuem para o sucesso destes fatores, tais como: o método de coleta e transferência do embrião, o dia da coleta do embrião, a qualidade do sêmen utilizado na fertilização, a sincronização de éguas doadoras e receptoras bem como seus históricos reprodutivos para seleção, o número de ovulações da égua doadora.

Por meio de uma revisão da literatura, o objetivo deste trabalho é realizar uma revisão bibliográfica dos principais fatores que interferem na taxa de sucesso da TE em equinos.

2 CICLO ESTRAL DA ÉGUA

As fêmeas equinas apresentam atividade sexual durante o período correspondente a dias mais longos e por este motivo são classificadas como monovulatórias poliéstricas sazonais, ou seja, sua atividade reprodutiva é regulada primariamente pelo fotoperíodo, assim as éguas tem seus ciclos reprodutivos durante a primavera e o verão. No entanto, algumas éguas podem apresentar atividade sexual durante o final do outono e inverno (DAELS; HUGHES, 1993). A maturidade sexual da égua é atingida por volta dos dois anos de idade, no entanto essa pode variar de acordo com as influências como a condição corporal, os níveis de energia da potra e a estação do ano (MCKINNON; VOSS, 1993).

O ciclo estral é definido como o intervalo entre uma ovulação e a outra, sua média varia entre 19 e 22 dias. O estro (fase folicular ou estrogênica) varia de cinco a sete dias, enquanto o diestro (fase lútea ou progesterônica) varia de 14 a 15 dias. Existe uma considerável variabilidade individual nessas médias (DAELS; HUGHES, 1993).

A fase folicular é o período no qual a égua encontra-se sexualmente receptiva ao garanhão, possui o trato genital preparado para aceitar e transportar os espermatozoides e é o momento em que ocorre a ovulação (considerada dia 0), também é caracterizada pela presença de um folículo ovariano com mais de 25mm de diâmetro (GINTHER, 1992). A elevação dos níveis de estrógenos (produzido pelos folículos em desenvolvimento) durante a fase folicular é responsável pelas características anteriormente citadas e pelo surgimento do edema uterino, o qual tende a diminuir dois dias antes de ocorrer a ovulação. A ovulação, momento onde ocorre a liberação do ovócito, acontece aproximadamente de 24 a 48 horas antes do final da fase estral (DAELS; HUGHES, 1993). Muitas vezes, as éguas são cobertas ou inseminadas após a ovulação devido a persistência dos sinais de cio, se a inseminação ou a cobertura acontecer depois de 12 a 14 horas da ovulação, o óvulo será velho para que ocorra a fertilização, assim, pode ocorrer falhas no desenvolvimento de um embrião viável (LEY, 2006)

No diestro a égua não se apresenta mais receptiva ao garanhão e o ambiente uterino encontra-se nas condições adequadas para permitir o desenvolvimento embrionário. Após o evento da ovulação, ocorre a luteinização das células da granulosa e da teca, dando origem ao corpo lúteo (CL). O CL é responsável pela produção de progesterona em quantidades crescentes do segundo ao décimo dia após a ovulação, esta secreção se mantém estável até o 12º dia, pois este é o momento em que ocorre queda acentuada nas concentrações plasmáticas de progesterona, seguida da luteolise que ocorre entre o 14º e o 16º dia do ciclo estral

(GINTHER, 1992), marcando assim o final da fase lútea. A luteólise ocorre devido à síntese e a liberação de prostaglandina F₂ (PGF₂) pelo endométrio uterino na ausência do reconhecimento materno da gestação (DAELS; HUGHES, 1993).

Observa-se uma maior queda da atividade ovariana a partir dos 15 anos, ocorrendo um atraso na emergência das ondas foliculares, um prolongamento do intervalo interovulatório e a redução da população de folículos nas ondas foliculares (CARNEVALE *et al.*, 1995). Provavelmente estas alterações ocorrem devido a um número menor de folículos, pela disposição dos mesmos a serem recrutados e por uma menor resposta aos estímulos gonadotróficos (ALVARENGA *et al.*, 2013).

Posteriormente a fecundação do ovócito, o embrião chega ao útero no quinto ou sexto dia após a ovulação e nesta fase ocorre a migração pelo útero e a secreção de substâncias pelas células trofoblásticas do zigoto para que ocorra o reconhecimento materno, por fim, próximo do 17º dia ocorre a nidação do embrião, ou seja, seu fixamento na parede uterina. Caso não ocorra o reconhecimento materno, as células endometriais uterinas sintetizarão e liberarão PGF₂ que atuará no CL, determinando sua lise e o fim da produção de progesterona, resultando em um novo ciclo estral (LOPES, 2004).

3 TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM EQUINOS

Os procedimentos para recuperação embrionária permaneceram essencialmente inalterados durante as últimas duas décadas (SQUIRES *et al.*, 2003). A coleta dos embriões é realizada pelo procedimento não cirúrgico transvaginal, descrito primeiramente em equinos por Oguri e Tsutsumi (1972), utilizando um cateter de três vias. O lavado era então realizado no corno ipsilateral à ovulação, inflando o balão do cateter na base deste corno uterino. Atualmente, o balão é inflado no corpo do útero e a lavagem é realizada simultaneamente nos dois cornos uterinos.

A coleta do embrião é realizada entre o sétimo e o oitavo dia após a fertilização e é executada utilizando-se a técnica de lavagem uterina transcervical. Primeiramente realiza-se a higienização da genitália antes da introdução do cateter. Há diversos tipos de cateteres para a realização do lavado, o mais utilizado atualmente é o de silicone com o balão para inflar. Uma vez o cateter inserido no corpo do útero, o órgão é lavado. Têm-se utilizado a solução de Ringer com Lactado (por possuir melhor osmolaridade) para a realização do lavado uterino, estudos condizem que a solução de Ringer com Lactato apresenta taxas de prenhez de 64%, comparadas as taxas de 57% quando o lavado é realizado com a solução salina acrescida com fosfato puro modificado (DPBS), em embriões coletados por essas soluções (ALVARENGA *et al.*, 1992).

O útero normalmente é infundido com 1 ou 2 litros de solução em cada lavado, realizando-se este procedimento em média 3 vezes. Logo, de 3 a 6 litros de solução são utilizados durante todo o processo de recuperação embrionária (DAELS, 2007). O volume necessário para o lavado varia conforme o tamanho do útero da égua doadora. Uma sonda ou um cateter é acoplado ao circuito, permitindo o fluxo constante da recuperação da solução. O volume recuperado representa normalmente de 95% a 98% do volume infundido (SILVA, 2003).

Depois de realizada a coleta, localiza-se o embrião com o auxílio de um microscópio estereoscópico (lupa) sob o aumento de 10 vezes e a classificação embrionária, feita de forma subjetiva, é realizada utilizando-se o aumento de 40 vezes na lupa. A classificação é feita de acordo com os parâmetros de estágio de desenvolvimento e qualidade, conforme recomendações da *International Embryo Transfer Society* (MCKINNIN; SQUIRES, 1988). Geralmente, encontra-se nas coletas realizadas entre os dias sete e oito o embrião na forma de mórula, blastocisto inicial, blastocisto ou blastocisto expandido.

Após a avaliação e a classificação, o embrião é lavado, realizando-se cerca de 10 passagens consecutivas no meio de manutenção (DAELS, 2007). Este procedimento objetiva eliminar as sujidades presentes na zona pelúcida do embrião antes de aspirá-lo na palheta de inovulação.

Embriões equinos têm sido transferidos pelo método cirúrgico através da incisão no flanco e pelo método não-cirúrgico via transcervical. Segundo Silva (2003), os resultados da técnica transcervical variam entre 26% a 83%, tendo como vantagens a facilidade e o baixo custo. O método cirúrgico permite taxas mais altas, em torno de 65% a 80%, tendo como desvantagens ser mais oneroso por necessitar de instalações apropriadas para as intervenções cirúrgicas. No entanto, a técnica não cirúrgica executada em diversas raças e em projetos comerciais, tem alcançado taxas de prenhez em torno de 70%, não justificando a utilização da TE cirúrgica (LOPES, 2004), além de ser uma técnica menos invasiva do que a cirúrgica e mais prática, consistindo apenas em depositar o embrião no corpo do útero com o uso do inovulador.

O embrião é envasado em palheta plástica em porções alternadas de solução de manutenção e ar. Essa intercalação é necessária, pois minimiza os movimentos do embrião dentro da palheta e assegura a perfeita expulsão do embrião para dentro do útero (SILVA, 2003).

Existem vários equipamentos para a inovulação como o modelo Hannover, o aplicador modelo Francês, a pipeta para inseminação artificial e uma adaptação de tubo de aço mais um tubo de polietileno. O modelo mais utilizado atualmente é a pipeta para inseminação artificial (LIRA *et al.*, 2009). Segundo Peres *et al.* (2002) não foi observadas diferenças significativas nas taxas de prenhez pós-transferência com a utilização do transferidor francês (59%, 217/371 éguas), pipeta de inseminação artificial (54%, 95/176 éguas), transferidor alemão (44%, 17/39 éguas) ou a adaptação constituída por um tubo de aço inox dentro do qual passava um tubo de polietileno contendo o embrião (62%, 64/103 éguas).

Deve-se realizar a técnica coberta que consiste na utilização de uma bainha plástica sobre o equipamento de transferência, com objetivo de proteger o embrião da contaminação vaginal, pois esta possui a flora diferente da flora uterina. Foi relatado por Squires (1982) taxas de 54% de prenhez quando se utiliza a bainha plástica comparado com 23% sem o uso da mesma.

A avaliação da receptora antes da transferência é importante, devendo-se selecionar a égua mais adequada para receber o embrião. A avaliação é realizada por palpação transretal juntamente do exame ultrassonográfico e deve-se notar a cérvix firme e fechada, o aumento

do tônus uterino e o útero sem evidências de dobras endometriais ou secreção uterina no exame ultrassonográfico (CARNEVALE *et al.*, 2000).

A manipulação da cérvix ou do útero no momento da inovulação pode desencadear a liberação de agentes útero-cinéticos e luteolíticos que podem colaborar em conjunto para a queda da taxa de prenhez em receptoras de embrião da espécie equina (SILVA, 2003). Portanto, deve-se cuidar no momento da transferência tanto com a manipulação quanto com a assepsia para que não ocorram quedas nas taxas de prenhez em receptoras de embrião.

4 FATORES QUE INTERFEREM NAS TAXAS DE PREENHEZ APÓS A TE

4.1 Doadoras

Em um programa de TE, são diversos os elementos considerados para a eleição das éguas doadoras de embriões. Avalia-se o histórico reprodutivo da doadora, a sua fertilidade, seu genitor, as diretrizes do registro de raça, o número de gestações desejadas e o valor potencial do potro resultante (SQUIRES *et al.*, 1999). Além disso, devem-se considerar as condições uterinas e a conformação vulvar da égua doadora.

A monitorização do comportamento reprodutivo é considerada importante para esta categoria, e consiste na realização da palpação transretal com o auxílio da ultrassonografia para o acompanhamento da atividade folicular. Pode-se também utilizar a hormonioterapia para o manejo de éguas doadoras. Hormônios exógenos são empregados para realizar a sincronização de estros entre doadoras e receptoras e induzir a ovulação das éguas.

Um fator importante na seleção de éguas doadoras é a idade, pois comumente as éguas mais velhas apresentam fertilidade baixa quando comparadas as éguas jovens, conseqüentemente, os índices de recuperação embrionária também são pequenos. Segundo Carnevale e Ginther (1992), além das éguas mais velhas apresentarem menor tônus e contratilidade uterina, também apresentam maior incidência de inflamação endometrial e morte embrionária.

As éguas idosas com histórico de obtenção de prenhez e posterior perda embrionária são consideradas melhores doadoras do que as éguas repetidoras de cio (SQUIRES; SEIDEL, 1995). Estas éguas normalmente apresentam endometrite crônica degenerativa, dificultando a manutenção e o desenvolvimento embrionário adequado, resultando na perda embrionária (MEIRA, 2007).

Ball (2011) examinou a relação do ambiente uterino com a sobrevivência embrionária em éguas jovens e com idade avançada, no qual a histologia endometrial foi avaliada. O resultado observado foi que as éguas idosas alcançaram uma maior incidência de doenças degenerativas e alterações inflamatórias no endométrio. O autor também analisou a maturação dos ovócitos *in vitro* de éguas jovens e senis e concluiu que os ovócitos das éguas jovens chegaram a metáfase II, enquanto que os ovócitos das éguas idosas não saíram da metáfase I, sugerindo que a divisão meiótica dos ovócitos das éguas de mais idade é irregular.

Não há uma quantitativa redução na mitocôndria em ovócitos de éguas senis em relação às jovens, mas sim uma maior prevalência de anormalidades estruturais, pois os

eventos de maturação e fertilização são dependentes de energia, e pelo fato de ocorrer uma grande mudança na distribuição mitocondrial durante a maturação do ovócito, torna-se um elemento relacionado com a qualidade reduzida do ovócito nas éguas mais velhas (BALL, 2011).

Outro fator relacionado com ovócitos anormais em éguas senis é a ovulação tardia e o envelhecimento pré-ovulatório de ovócitos. As éguas idosas passam por um envelhecimento reprodutivo caracterizado por um alongamento da fase folicular, ovulações irregulares, morte embrionária precoce e eventualmente cessação da atividade folicular (CORRÊA, 2012).

4.2 Receptoras

Em um programa de TE são necessários critérios rigorosos para a escolha das éguas receptoras, uma vez que esta categoria é de grande influência para que se obtenham bons resultados durante a temporada reprodutiva. Um bom plantel de receptoras representa a parte mais difícil e dispendiosa de um programa de TE, sendo que a cada ano se torna mais raro e caro pelo aumento da demanda de receptoras (ALVARENGA *et al.*, 2009).

Os critérios para a seleção das éguas receptoras englobam a escolha de um animal calmo, com histórico de serem boas mães e fáceis de manejar, facilitando assim o trabalho do médico veterinário por diminuir os riscos ao profissional e para o embrião posteriormente inovulado. A receptora deve ter o peso e a altura semelhantes com a doadora, deve-se considerar a idade da égua, a conformação perineal e realizar-se a avaliação reprodutiva pela palpação retal com o auxílio da ultrassonografia, necessita-se também realizar a cultura, a citologia e a biopsia uterina para melhor avaliação da receptora (ALONSO, 2007). A égua precisa estar livre de quaisquer doenças infecto-contagiosas, principalmente a Anemia Infecciosa Equina, a babesiose, a leptospirose e a adenite equina (LOSINNO; ALVARENGA, 2006).

Preconizam-se éguas com a idade variando entre 3 a 10 anos, visto que a idade é um importante fator predisponente para a degeneração endometrial (ALONSO, 2008). Segundo Caixeta *et al.* (2008) as modificações no endométrio e cistos grandes podem desenvolver uma barreira física, dificultando o reconhecimento materno da gestação e ocasionando à morte embrionária.

É importante a realização da avaliação ginecológica das éguas antes da TE, assim, pode-se efetuar a escolha ideal da égua receptora a qual será inovulada o embrião. Considera-se na avaliação da receptora o número de dias pós-ovulação, a avaliação através da palpação

transretal do tônus uterino e cervical, a avaliação ultrassonográfica da morfoecogenicidade uterina e o tamanho e ecogenicidade do CL. Segundo Alvarenga *et al.* (2009) a receptora capaz de receber o embrião deve apresentar a cérvix fechada e firme, o útero com tônus adequado e formato tubular sem a presença de dobras endometriais ou líquidos e o CL visível e de tamanho adequado.

O manejo nutricional das éguas receptoras é outro fator que pode afetar as taxas de prenhez após a transferência. Após a TE, as éguas devem receber um manejo nutricional distinguido, pois as taxas de prenhez e perdas embrionárias podem ser comprometidas em receptoras que estão perdendo peso (ALONSO, 2008).

4.3 Sincronização de éguas doadoras e receptoras

Na tentativa de otimizar a mão de obra do médico veterinário e de se obter uma maior precisão no controle da fase estral e do tempo de ovulação, realiza-se a sincronização do estro de éguas doadoras e receptoras. É uma técnica vantajosa por facilitar a implantação de programas de inseminação artificial (IA) e TE, além de potencializar a utilização de garanhões durante a estação de monta (COSTA, 2003).

A dificuldade de sincronização do estro e da ovulação pode ser explicada devido ao fato de que as fêmeas da espécie equina possuem características específicas como uma longa fase folicular (a ovulação pode ocorrer em um intervalo amplo e variável) e as dificuldades de se adequarem ao controle de crescimento folicular (CAMARGO, 2008). Sobre a ação da progesterona acontecem significativas modificações no útero, sendo que o útero quando não está em sincronia com o embrião pode deixar de oferecer as condições adequadas para a sobrevivência deste embrião (ALONSO, 2007).

Segundo o trabalho de Lopes (2004), foi alcançado o resultado de 63% de prenhez após a transferência não cirúrgica para receptoras que ovularam 48 horas depois da doadora, contra 0% de prenhez para receptoras que ovularam 48 horas antes da doadora. Sendo assim, preconiza-se a transferência de embriões para receptoras que ovularam um dia antes ou até dois dias depois da doadora. As taxas de gestação são similares para as receptoras que ovularam um dia antes a dois dias depois da doadora, mas a maioria dos profissionais preferem receptoras que ovularam depois da doadora (COSTA, 2010). Fleury *et al.* (2006), notaram ser possível a utilização de receptoras no 3º dia pós ovulação desde que estas apresentem tônus uterino adequado na avaliação ginecológica que antecede a inovulação.

Observa-se um efeito melhor na resposta a sincronização do cio do que a sincronização da ovulação, este fato é explicado porque se considera mais fácil controlar a meia vida do CL do que o controle do desenvolvimento folicular. Os tratamentos realizados podem ser associados à gonadotrofina coriônica humana (hCG) ou ao fator liberador de gonadotrofina (GnRH), com o propósito de um melhor índice de sincronização das ovulações entre doadoras e receptoras. Alonso (2007) relata que o número de dias após a ovulação da receptora acompanhado de uma avaliação antes da inovulação do embrião, é de maior importância na taxa de prenhez pós transferência do que a sincronia entre doadora e receptora.

O tratamento diário com progesterona iniciado no dia da ovulação da égua receptora permitiu que essa fosse usada já no segundo dia após sua ovulação, tendo sido obtidas taxas de prenhez próximas a 70% quando utilizada a progesterona e de 30% quando não utilizada (CAIADO, 2007).

Receptoras que ovularam de dois a cinco dias antes da doadora foram tratadas com ácido meclofenâmico a partir do 9º dia pós-ovulação, uma ajuda significativa na manutenção da prenhez foi observada nas receptoras tratadas que ovularam de dois ou três dias antes da doadora. (COSTA, 2010).

Outra possibilidade é a utilização de receptoras com o ciclo artificial. São aplicados estrógeno e progesterona para mimetizar um ciclo natural em éguas que se encontram em período de transição ou anestro (ALONSO, 2007).

4.4 Ovulações múltiplas

Conhecer as particularidades fisiológicas e os aspectos da foliculogênese, bem como a incidência de múltiplas ovulações, é essencial para a otimização da eficiência reprodutiva e econômica em um programa de TE, além de prevenir as gestações gemelares nas matrizes (CARMO *et al.*, 2002).

4.4.1 Múltiplas ovulações espontâneas

A espécie equina é considerada monovulatória; diferentes características, no entanto, são observadas entre as raças como no caso do Puro Sangue Inglês, o Polo Argentino, o Quarto de Milha e o Apaloosa, que apresentam ocorrência de múltiplas ovulações por ciclo estral de 15% a 30%, 38%, 9% e 8% respectivamente (GINTHER, 1992). Além disso, outros fatores

como a genética, a nutrição e a idade da égua estão relacionados com a frequência de múltiplas ovulações (GINTHER, 1992).

A evidência de ovulações múltiplas unilaterais e bilaterais tem sido motivo de estudos, pois este acontecimento pode ser determinante na incidência de gestações gemelares ou na recuperação de dois embriões em apenas um lavado uterino. Quanto mais próximas ocorrerem uma ovulação da outra, maior será a frequência de dupla fecundação. A maioria das ovulações múltiplas ocorre sincronicamente, sendo 75% das ovulações ocorrendo entre as primeiras 24 horas, 15% entre as primeiras 48 horas e 10% após as 48 horas (HUGHES *et al.*, 1972).

Pascoe *et al.* (1987) em sua pesquisa, avaliaram 1.015 éguas de raças europeias e Puro Sangue Inglês e certificaram-se de que 38,2% das ovulações múltiplas encaminharam-se para gestações gemelares. Sertich (1989) relatou que a incidência de múltiplas ovulações em éguas europeias (55,9%) é maior do que em éguas de raças americanas (8% a 9%).

Pimentel *et al.* relatou a incidência de múltiplas ovulações na raça Crioula (foram analisadas 3.631 éguas Crioulas). Os resultados apresentaram a frequência média de múltiplas ovulações de 7,1%, sendo 6,5% ovulações duplas, 0,5% de ovulações triplas e 0,1% ovulações quadruplas.

Ginther (1992) comparou o diâmetro médio dos folículos pré-ovulatórios em ovulações simples e duplas e observou que as ovulações simples apresentavam folículos com diâmetro médio de 44 mm e as ovulações duplas unilaterais e bilaterais apresentaram diâmetro médio de 35 mm e 40 mm. O menor diâmetro dos folículos múltiplos pode ser explicado pelo aumento da concentração sérica de inibina, resultando na liberação de FSH e um menor crescimento dos folículos pré-ovulatórios.

Um aumento na concentração sérica de progesterona nas ovulações duplas pode ser observado, no entanto não se evidencia alterações sobre a duração do estro, diestro e ciclo estral em éguas com múltiplas ovulações (SQUIRES *et al.*, 1987).

4.4.2 Múltiplas ovulações induzidas na espécie equina

A superovulação é estudada desde a década de 70, atualmente, sabe-se que este procedimento é inapropriado para a espécie equina, utiliza-se protocolos para a indução de múltiplas ovulações somente de dois folículos por se demonstrarem mais eficientes no aumento da taxa de sucesso em coletas de embrião.

Em 1974 foi publicado o primeiro relato de sucesso na indução de superovulação em éguas (DOUGLAS *et al.*, 1974). A superovulação pode auxiliar melhorando os resultados

quando se trabalha com éguas inseminadas com sêmen congelado ou de baixa fertilidade. O processo superovulatório também pode ser usado para aumentar a taxa de fertilidade de garanhões subférteis e de éguas subférteis por propiciar um maior número de ovulações e conseqüentemente uma maior expectativa para a fertilização (MCCUE, 1996).

Utilizando da técnica de superovulação, pode-se aumentar a eficiência reprodutiva e econômica de programas de TE, pois com a multiplicação do número de ovulações e conseqüentemente do número de ovócitos para a fertilização, teríamos um maior número de embriões por éguas doadoras a serem recuperados em um único lavado.

A superovulação pode ser realizada em éguas usando FSH e a média de ovulações alcançadas é de 3,4 a 5,2 por ciclo, Alvarenga *et al.* (2001) com o uso do extrato de pituitária equina demonstrou uma melhora na porcentagem de ovulações, com uma média de quatro a sete ovulações por égua em um ciclo.

Um estudo realizado por Nagao *et al.* (2012) avaliou o efeito de 100 g de acetato de deslorelina intramuscular na indução de ovulações duplas em éguas. O hormônio foi aplicado de 12 em 12 horas quando observados dois folículos medindo cerca de 25 mm e 20 mm, durando em média 3,5 dias o tratamento. Este estudo demonstrou o número de ovulações, o número médio de ovulação por ciclo estral, o número de embriões recuperados e o número de embriões recuperados por ciclo estral no grupo tratado: 102 ovulações, 1,82 ovulações por ciclo, 63 embriões, 1,12 embriões recuperados por ciclo e no grupo controle: 56 ovulações, 1,0 ovulação por ciclo, 32 embriões, 0,57 embriões recuperados por ciclo.

Carmo (2003) observou que a partir de duas ovulações a liberação e transporte de ovócitos através do oviduto é prejudicada pela formação de um grande coágulo de sangue na fossa de ovulação, ocorrendo com maior frequência em éguas com ovulações múltiplas no mesmo ovário. Portanto, um protocolo para induzir a ovulação de apenas dois folículos por ovário pode fornecer o mais eficiente método de ovulações múltiplas na égua.

4.5 Inseminação artificial

A qualidade do sêmen que será utilizado é de grande importância nas taxas de sucesso de um programa de reprodução. Na prática, quando o garanhão é selecionado para a realização dos cruzamentos no programa de TE, normalmente leva-se em consideração a sua aptidão atlética ou sua morfologia, deixando de lado seu potencial reprodutivo.

A IA é a biotécnica que melhor se adequou as necessidades de um programa de TE, pois permite a melhor otimização do ejaculado de um garanhão, possibilitando a inseminação

de mais de uma égua com um único ejaculado. No entanto, em alguns programas ainda se utiliza a monta controlada como forma de reprodução.

O ideal é realizar um rígido controle folicular com acompanhamento ultrassonográfico para prever a ovulação e realizar a IA no melhor momento possível (BRINSKO; VARNER, 1993). Sendo assim, reduz-se o número de inseminações ou monta natural e obtém-se um melhor resultado no programa de TE.

As inseminações com sêmen fresco e refrigerado são frequentemente utilizadas na maioria dos programas de TE, pois possibilitam resultados satisfatórios e trazem certas vantagens como:

- Reduz a disseminação de doenças sexualmente transmissíveis.
- Possibilita a reprodução para éguas e garanhões que estão impossibilitados de realizar a monta natural.
- Otimiza a utilização de garanhões, pois se consegue obter uma maior quantidade de produtos durante a vida reprodutiva do garanhão.
- Reduz a possibilidade da égua ou do garanhão se machucarem.

Quando se utiliza o sêmen fresco de garanhões sem afecções reprodutivas, as inseminações podem ser realizadas a cada 48 horas até a detecção da ovulação, com a uma dose de 250 a 500 milhões de espermatozoides viáveis, sendo os resultados semelhantes aos obtidos com a monta natural (BRINSKO; VARNER, 1992).

Os melhores resultados na inseminação com sêmen refrigerado são obtidos quando o procedimento é realizado em um intervalo de zero a 24 horas antes da ovulação, com uma dose de 500 milhões a um bilhão de espermatozoides. As taxas de concepção para os garanhões que possuem uma boa qualidade de sêmen após 24 horas de refrigeração é aproximadamente 10% menor do que as taxas obtidas com sêmen fresco (SQUIRES *et al.*, 1999).

A utilização do sêmen congelado ainda é restrita, pois seu tempo de fertilidade é mais curto e assim exige um melhor controle do momento da ovulação, sendo assim obtêm-se resultados inferiores quando comparados aos resultados com sêmen fresco e refrigerado (SQUIRES *et al.*, 1999). A porcentagem de prenhez com a inseminação de sêmen congelado é baixa e bastante variável, sendo que esta variação se deve a diferentes protocolos de inseminação (BRINSKO; VARNER, 1992). É aconselhável que a IA com sêmen congelado seja realizada de zero a 12 horas antes da ovulação, ou até 6 horas após (SQUIRES *et al.*,

1999). A dose inseminante com sêmen congelado varia de acordo com a fertilidade do sêmen após o procedimento de descongelamento.

Com a finalidade de melhorar os índices de fertilidade de animais subfêrteis, maximizarem o aproveitamento de animais férteis de alto potencial e conseguir melhores resultados com a aplicação do sêmen congelado, alguns autores tem realizado a IA histeroscópica em equinos. Nesta técnica realiza-se a deposição do sêmen sobre a junção útero-tubária com o auxílio de um endoscópio. Morris *et al.*(2000) obtiveram um índice de prenhez de 60%, inseminando com sêmen fresco 15 éguas com 10 milhões de espermatozoides, os quais foram depositados sobre a papila tubária com auxílio de um endoscópio.

4.6 Dia da coleta do embrião

O embrião equino, ainda em estágio de mórula compactada, é transportado da tuba uterina para o útero entre os dias cinco e seis após a ovulação, dando sequência ao seu desenvolvimento para blastocisto inicial. O embrião, já presente no lúmen uterino, aumenta rapidamente seu tamanho, desenvolvendo-se para blastocisto expandido. A coleta do embrião pode ocorrer entre os dias seis a nove, no entanto, o período ideal para a recuperação embrionária é nos dias sete ou oito após a fertilização. A indicação primária para recuperação embrionária no dia seis é para congelamento de embrião (SQUIRES; SEIDEL, 1995).

Estudos têm indicado que quando as éguas são inseminadas após a ovulação, a entrada do embrião no útero parece ser mais demorada do que o esperado (LISA; MEADOWS, 2008). Desse modo, foi observado um atraso no desenvolvimento embrionário, no qual as vesículas embrionárias foram avaliadas menores – equivalentes a um dia de crescimento – para éguas inseminadas após a ovulação, quando comparadas as éguas inseminadas antes da ovulação. Assim, conclui-se que o lavado uterino não deve ser realizado antes dos dias 7,5 a 8 (CUERVO-ARANGO *et al.*, 2009). Iuliano *et al.* (1985) em seu trabalho obtiveram taxas de recuperação embrionária menores no 6º dia pós ovulação (66%) do que no 8º dia (82%). As taxas de coleta de embrião no 7º dia pós-ovulação (75%) não diferiram significativamente dos dias seis e oito.

Quando a recuperação embrionária é realizada em éguas mais velhas, preconiza-se as coletas nos dias oito ou nove pós-ovulação (Squires *et al.*, 1999), pois o desenvolvimento embrionário e o transporte uterino podem estar retardado nessas éguas.

4.7 Fatores relacionados ao embrião

4.7.1 Idade do embrião

A coleta de embrião é realizada normalmente entre os dias sete e oito após a ovulação da doadora. Alguns estudos realizados com embriões pequenos e mórulas demonstraram que as taxas de prenhez após a transferência desses embriões jovens foram menores. No entanto, os resultados não sugerem que a variabilidade desses embriões seja menor, mas sim que muitos desses embriões encontravam-se com um atraso no desenvolvimento no momento da coleta (SQUIRES *et al.*, 2003)

Os embriões mais velhos, coletados com cerca de 10,5 dias após a ovulação, são mais frágeis e por consequência mais difíceis de serem manipulados. As perdas com embriões coletados entre 10,5 dias e 13,5 dias após a ovulação são em torno de 50% (LOPES, 2004).

4.7.2 Qualidade do embrião

No momento subsequente a coleta do embrião, realiza-se a avaliação do estágio de desenvolvimento e da morfologia do embrião. É atribuído um escore de qualidade de 1 (excelente) a 5 (degenerado ou morto). Avalia-se a forma e a coloração do embrião, a viabilidade dos blastômeros, os danos à zona pelúcida e o estágio de desenvolvimento do embrião comparado a sua idade.

Segundo Squires (1993) a qualidade do embrião antes da transferência afeta consideravelmente as taxas de prenhez. As taxas de prenhez para embriões grau 1 e 2 foram melhores (77%) quando comparados com embriões de graus maiores do que 3 (27%) (SQUIRES; SEIDEL, 1995).

Tabela 1 – Classificações do grau de qualidade de embriões equinos

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

Fonte: MCKINNON; SQUIRES, 1988

4.7.3 Transporte do embrião no oviduto

Um fenômeno exclusivo dos equinos é a retenção de ovócitos não fecundados ou embriões não viáveis no oviduto, sendo que estes podem ser retidos por até sete meses ou mais e são eventualmente degenerados (CAIXETA *et al*, 2008). Por outro lado, quando ocorre a fecundação do ovócito, resultando em um embrião, esse atravessa a junção útero-tubária, entrando no útero entre 144 e 168 horas após a ovulação no estágio de desenvolvimento de mórula tardia ou blastocisto inicial (ALLEN, 2000).

O embrião viável começa a secretar grande quantidade de PGE2 quando atinge o estágio de mórula compacta, no quinto dia após a ovulação (ALLEN, 2000). Essa PGE2 tem a é responsável pelas contrações locais e relaxamento da musculatura lisa, atuando na parede do oviduto, permitindo assim que o embrião viável se mova progressivamente com o auxílio do batimento ciliar rítmico, adentrando no útero por este processo (GASTAL *et al.*, 1998). Sendo assim, para o embrião chegar ao lúmen uterino, esse necessita ser viável para que ocorra a secreção de PGE2.

4.8 Médico Veterinário

A habilidade e a experiência do médico veterinário afetam diretamente a taxa de prenhez na TE (ALONSO, 2007). Esta taxa frequentemente é mais alta para aqueles técnicos que realizam um grande número de transferências de embriões (HINRICHS; CHOI, 2005).

No entanto, a variação na taxa de prenhez não está restritamente relacionada à experiência do medico veterinário, mas também se inclui a esterilização do material utilizado, a higiene e as condições oferecidas no ambiente de trabalho, o cuidado com as formas de acondicionamento dos meios de embriões e a utilização adequada dos equipamentos para a manipulação e a inovulação do embrião (ALVARENGA, 2009).

5 CONCLUSÃO

A TE é cada vez mais utilizada na indústria equina e por esse motivo é importante para o profissional saber reconhecer e ter o conhecimento dos fatores que afetam a taxa de sucesso de um programa de TE. Sendo assim, ao avaliar estes elementos, o médico veterinário estará apto para a detecção de problemas dentro de um programa de reprodução, bem como realizar a intervenção de forma efetiva e produtiva.

REFERÊNCIAS

- ALLEN W. R.. The physiology of early pregnancy in the mare. *In: AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS. Proceedings...*, 2000, P. 338-354.
- 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.** 2007. 72 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, 2007. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/98250>>. Acesso em: 15 Maio 2015.
- ALONSO, M. A. Seleção, manejo e fatores que influenciam as taxas de prenhez. **Acta Scientiae Veterinariae**, Piracaia, v. 36, supl. 2, p.207-214, 2008.
- ALVARENGA, M. A.; ALVARENGA, F. C. L.; MEIRA, C. Some modifications in the technique used to recover equine embryo. *In: 13rd INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE EMBRYO*, 1992, Buenos Aires, **Resume...**, Buenos Aires, 1992. p.34-35.
- ALVARENGA, M. A. *et al.* Improvement of ovarian super stimulatory. Response and embryo production in mares treated with equine pituitary extract twice daily. **Theriogenology**, Los Angeles, v.56, p.879-887, 2001.
- ALVARENGA, M. A.; CARMO, M. T.; OLIVEIRA, J. V. Principais fatores que interferem em programas de transferência de embriões equinos. *In: Transferência de embriões na espécie equina*, Botucatu, 2009, p.33.
- ALVARENGA, M. A.; CARMO, M. T.; OLIVEIRA, J. V. **Transferencia de Embriões na Espécie Equina.** Botucatu, 2013.
- ARRUDA R. P. *et al.* Existem relações entre tamanho e morfoecogenicidade do corpo lúteo detectados pelo ultra-som e os teores de progesterona plasmática em receptoras de embrião equinos? **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science.** v.38, n.5, p.233-239, 2001.
- BALL, B. A. Embryonic Loss. *In: McKinnon, A.O., et al. Equine Reproduction.* 2. ed. Iowa: Blackwell Publishing, 2012.v.2, p.2327-2338.
- BRINSKO, S. P.; VARNER, D. D. Artificial insemination. *In: McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. Equine Reproduction.* 1. ed. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1993. p.790-797.
- CAIADO, J. R. C. *et al.* Tratamento de éguas de embriões visando sua utilização no segundo dia pós-ovulação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.36, n.2, p.360-368, Mar. 2007.
- CAIXETA, E. S. *et al.* Desenvolvimento embrionário inicial equino. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 103, p.25-34, 2008. Disponível em: <<http://www.fmv.vtl.pt/spcv/tb>>. Acesso em: 10 Maio 2015.

CAMARGO, C. E. **Fatores reprodutivos que interferem em um programa comercial de transferência de embriões em éguas de hipismo.** 2008. 76f. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

CARMO, M. T. *et al.* Estudo da incidência de múltiplas ovulações em éguas da raça Brasileiro de Hipismo e suas implicações em um programa de transferência de embriões. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 26, n. 3, pg. 252 – 254, 2002.

CARMO, M. T. **Comparação entre doses constantes e decrescentes de extrato de pituitária equina na indução de superovulação em éguas.** 2003. 156f. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina veterinária e Zootecnia de Botucatu, 2003. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/94590>>. Acesso em: 13 Maio 2015.

CARMO, M. T.; ALVARENGA, M. A. Evoluções da transferência de embriões em equinos no Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31, p.280, 2003.

CARNEVALE, E. M.; GINTHER, O. J. Relationships of age to uterine function and reproductive efficiency in mares. **Theriogenology**, v.37, n.5, p.1101- 1115, May 1992.

CARNEVALE, E. M.; GINTHER, O. J., Defective oocytes as a cause of subfertility in old mares. **Biology of Reproduction Monogram**, v.1, p. 209-214, 1995.

CARNEVALE, E. M. *et al.* Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. **Theriogenology**, v.54, n.6, p.965-979, Oct 2000.

CORRÊA, K. R. A. **Morte embrionária precoce em éguas: fatores implicados.** 2012. 29f. Dissertação (Pós Graduação) – Instituto Brasileiro de Veterinária, Belo Horizonte, 2012.

COSTA, W. P. *et al.* Sincronização, indução ao estro e à ovulação em éguas Quarto de Milha atletas no nordeste brasileiro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.27, n.3, p.502-504, 2003.

COSTA, A. L. A. **Controle reprodutivo e transferência de embriões eqüinos.** 2010. 33f. Relatório final de estágio (mestrado integrado em medicina veterinária) – Universidade do Porto, Instituição de Ciências Biomédicas Abel Salazar. Porto, 2010.

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, n.8, p.1267-1275, May 2009.

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

DAELS, P. Embryo transfer tips and tricks. *In*: PROCEEDINGS 5th EUROPEAN VETERINARY CONFERENCE, 2007, Amsterdam, **Proceedings...**, 2007, p.213-215.

DOUGLAS, R. H.; NUTI, L.; GINTHER, O. J. Induction of ovulation and multiple ovulation in seasonally-anovulatory mares with equine pituitary fractions. **Theriogenology**, Los Altos, v.2, n.6, p.133-142, Dec 1974.

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, supl. 1, p.502, 2006.

GASTAL M. O. *et al.* Effect of PGE2 on uterine contractility and tone in mares. **Theriogenology**, v. 50, n.7, p. 989-999, 1998.

GINTHER, O. J. **Reproductive Biology of the Mare. Basic and applied aspects**. 2.ed. Cross Plains: Equiservices, 1992, p.640- 642

HINRICHS, K.; CHOI, Y. Assisted reproductive techniques in the horse. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v.4, n.3, p.210-218, Sept 2005.

HUGHES, J. P.; STABENFELDT, G. H.; EVANS, J. W. Clinical and endocrine aspects of the estrous cycle of the mare. *In: PROCEEDING ANNUAL CONVENCION OF AMERICAM PRACTITIONERS*, 1972, San Francisco, **Proceedings...**, San Francisco, 1972. p. 119-148.

IULIANO, M. F.; SQUIRES, E. L.; COOK, V. M. Effect of age of equine embryo and method of transfer on pregnancy rate. **Journal of Animal Science**,v.60, n.1, p.258-263, 1985.

LEY, M. B.; **Reprodução em Éguas Para Veterinários de Equinos**, 1ª Ed. Roca, São Paulo, 2006, p.68-69.

LIRA, R. A.; PEIXOTO, G. C. X.; SILVA, A. R. Transferência de embriões em eqüinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoró, v.3, n.4, p.132-140, 2009.

LISA, H. M.; MEADOWS, S. Essential management practices in commercial equine embryo transfer. *In: PROCEEDING 7th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON EQUINE EMBRYO TRANSFER*, 2008, Cambridge, **Proceedings...**, Cambridge, 2008. p.101-102.

LOPES, E. P. **Parâmetros reprodutivos de éguas Mangalarga Machador em projeto comercial de transferência de embriões**. 2004. 47f. Tese (Pós-graduação) - Universidade Federal de Viçosa, Faculdade de Medicina veterinária, Viçosa, 2004.

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.

MCCUE, P. M. Superovulation. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, Los Altos, v.12, n.1, p.1-11, 1996.

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, n.5, p.1055-1063, 1988..

MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.

MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L. Embryo Transfer and Related Technologies. *In: SAMPER, J. C.; PYCOCK, J.F.; MCKINNON, A. O. **Current therapy in equine reproduction***. Philadelphia: W.B. Saunders, 2007. cap. 51, p. 319-334.

MEIRA, C. Endocrinologia da Reprodução, Dinâmica Folicular, Superovulação e Transferência de Embriões na Espécie Equina . 2007. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu, SP, 2007.

MORRIS, L. H. A.; HUNTER, R. H. F.; ALLEN, W. R. Hysteroscopic insemination of small number of spermatozoa at the uterotubal junction of preovulatory mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.118, p. 95-100, 2000.

NAGAO, J. F. *et al.* Induction of double ovulation in mares using deslorelin acetate. **Animal Reproduction Science**, v.136, p. 69 – 73, Dec 2012.

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.87-195, 1972.

PASCOE, R. R.; PASCOE, D. R.; WILSON, M. C. Influence of follicular status on twinning rate in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, Colchester, v. 35, p. 183 - 189, 1987.

PERES, K. R.; TRINQUE, C. L. N.; LIMA, M. M. Non-surgical equine embryo transfer: a retrospective study. **Theriogenology**, v.57, n.1,p.558, 2002.

PIMENTEL, C. A.; TAROUCO, A. K. J.; HAMMES, A. M. Ovulações múltiplas em éguas abatidas em Pelotas. **Ars Veterinária**, Jaboticabal, v.10, p. 253, 1994.

SILVA, L. A. **Técnica ultrassonográfica de injeção intrauterina para transferência de embriões em equinos**. 2003. 145f. Tese (Pós-graduação) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Zootecnia, 2003.

SERTICH, P. L. Transcervical embryo transfer in performance mares. **Journal of the American Association**. v.195, n.7, p.940 – 944, 1989.

SQUIRES E. L. *et al.* Factors affecting reproductive efficiency in equine embryo transfer programme. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.32, p.409-414, 1982.

SQUIRES, E. L. *et al.* Reproductive characteristics of spontaneous single and double ovulating mares and superovulated mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cochester, v.35, p.399 – 403, 1987.

SQUIRES, E. L. Embryo transfer. *IN: McKINNON, A. O; VOSS, J. L. **Equine reproduction***. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 357-367.

SQUIRES, E. L.; SEIDEL, G. E. Superovulation. *In: **Colletion and transfer of equine embryos. Animal Reproduction And Biotechnology Lababoratory***. Bulletin n.8, Fort Collins, 1995, p. 32-38.

SQUIRES, E.L.; MCCUE, P.M.; VANDERWALL, D. The current status of equine embryo transfer. **Theriogenology**, Los Altos, v. 51, p.