

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

**BIOTÉCNICAS DA REPRODUÇÃO ASSOCIADAS À TRANSFERÊNCIA DE
EMBRIÃO NA ÉGUA**

Autor: Paula Fagundes Rosa

PORTO ALEGRE

2018/02

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

**BIOTÉCNICAS DA REPRODUÇÃO ASSOCIADAS À TRANSFERÊNCIA DE
EMBRIÃO NA ÉGUA**

Autor: Paula Fagundes Rosa

Monografia apresentada à Faculdade de Veterinária como requisito parcial para obtenção da graduação em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Gustavo Henrique Zimmermann Winter

PORTO ALEGRE

2018/02

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus por toda oportunidade dada ao longo desse caminho. Toda adversidade foi superada e toda conquista foi comemorada. Obrigada senhor por todas as vitórias ao longo desses 8 anos e meio.

Obrigada família pelo apoio emocional e financeiro, pela parceria, pela amizade, pela paciência e por todo amor que recebi. Vocês foram fundamentais na minha criação, na minha educação e na minha vida. Amo vocês! Obrigada mãe Sinara, mano Lucas e mana Laís.

Ao meu filho Lorenzo, obrigada por ser minha luz, minha força, meu desejo de vitória, minha superação e o motivo por eu querer ser todos os dias uma pessoa melhor. Tu és o amor da minha vida! Te amo!

Ao Richer, que foi incansável, que nunca me deixou desistir e que sempre me animou quando eu fraquejei. Obrigada por me apoiar sem medidas!

Colegas queridos de longos anos, vocês foram meus cúmplices nessa caminhada desafiadora que foi a graduação. Tantos momentos difíceis e outros tantos a mais de alegria e realizações. Obrigada!

Ao laboratório de reprodução animal – Reprolab ao qual fiz parte por dois anos. Agradeço pela oportunidade de me achar dentro da medicina veterinária, agradeço por todo aprendizado e oportunidades de crescimento profissional. Obrigada pela amizade e parceria de todos, estagiários, pós-graduandos, professores e funcionários.

Agradeço ao meu professor orientador Dr. Gustavo Henrique Zimmermann Winter por todo apoio na elaboração desse trabalho. Sempre muito disposto e compreensivo. Obrigada de coração.

Por fim, agradeço a instituição de ensino UFRGS, pela qual me formo, por toda minha formação como médica veterinária.

RESUMO

A indústria do cavalo é um ramo do agronegócio que movimenta expressivamente o setor financeiro do país gerando emprego e renda. Sendo assim, as biotécnicas são utilizadas visando maximizar resultados e otimizar a vida reprodutiva dos animais melhorando o retorno financeiro de quem investe nesta atividade. A transferência de embrião (TE) é uma biotécnica da reprodução que consiste em retirar um embrião ou mais do útero de uma égua doadora e depositá-lo no útero de uma égua receptora, que levará a gestação a termo. Para isto, várias etapas são executadas até que se atinja o objetivo final: avaliação de doadoras, seleção de receptoras, sincronização das mesmas, coleta e avaliação do sêmen, fertilização da doadora, coleta do embrião do útero da doadora, avaliação e classificação do embrião, deposição do embrião no útero da receptora e diagnóstico de gestação para confirmação de prenhez. O Brasil é um dos líderes mundiais em transferência de embrião, juntamente com a Argentina e os Estados Unidos. Devido aos resultados satisfatórios desta técnica, melhorias nos programas de TE estão sendo estudadas cada vez mais, assim como os fatores que afetam as taxas de sucesso. A TE é muito utilizada devido a relevância da técnica em ajudar a solucionar problemas reprodutivos como subfertilidade, idade avançada, impossibilidade de gestar, etc., sendo muito utilizada também em éguas em que não se deseja interromper a atividade esportiva, e também para difundir uma genética com mais rapidez. Cada etapa é de fundamental importância para o sucesso final da técnica sendo essencial a correta execução de cada uma delas.

Palavras-chave: Doadora; Receptora; Sêmen; Eficiência reprodutiva.

ABSTRACT

The horse industry is one of the agribusiness fields expressively responsible for the movement of the country economy, once it generates employment and income. Biotechnology is used to maximize results and reproductive life of breeding animals in order to improve the financing return of the investors. Embryo transfer is a reproductive biotechnology that consists of withdrawing an embryo or more from the uterus of a donor mare and depositing it in the uterus of a recipient mare, which will lead to term gestation. Different steps are required in order to accomplish the embryo transfer: donor evaluation, selection and synchronization of receptors, collect and evaluation of semen, donor fertilization, embryo collect from inside the donor uterus, evaluation and classification of the embryo, input the embryo at the receptor uterus, and ultrasound evaluation to gestation diagnosis. As well as United States of America and Argentina, Brazil is one of the world leaders in embryo transfer. Hence the satisfactory results of these technical, possible improvements in the embryo transfer programs keep being studied as the factors that influence its success rates. The technic is deeply used once its relevance has showed to help in different situations as subfertility, old mares, and gestation incapacity, between others. It's also used in mares that are not wanted in sports, and to spread genetic faster. Every single step of the embryo transfer is absolutely fundamental to get a successful procedure.

Key words: Donor; Receptor; Semen; Reproductive efficiency.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Categorias de biópsia endometrial Kenney-Doig e prognóstico em éguas.	18
-----------------	---	-----------

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Técnica de Caslick.	13
Figura 2	Forma adequada de percorrer a lâmina no exame de patologia espermática.	22
Figura 3	Embrião na placa de petri.	26

LISTA DE ABREVIACÕES

CH – Corpo hemorrágico.

CL – Corpo lúteo.

DPBS – Tampão fosfato salino de Dulbecco.

ECG – Gonadotrofina coriônica equina.

EPE – Extrato de pituitária equina.

FSH-e - Hormônio folículo estimulante equino.

FSH-p – Hormônio folículo estimulante suíno.

hCG – Gonadotrofina coriônica humana.

IA – Inseminação artificial.

MN – Monta natural.

MSC – Células troncos mesenquimais.

P4 – Progesterona.

PEP – Perda embrionária precoce.

PGF2 α – Prostaglandina F2 α .

PRP – Plasma rico em plaquetas.

SLC – centrifugação em camada única.

TE – Transferência de embrião.

US – Ultrassom.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 MANEJO DA DOADORA E RECEPTORA	11
2.1 Seleção da Doadora	11
2.2 Avaliação da doadora	12
2.3 Tratamentos referentes à doadora	12
2.4 Seleção da receptora	14
2.5 Avaliação da receptora	17
2.6 Sincronização do estro e indução da ovulação	18
3 ASPECTOS REFERENTES AO GANHÃO E FERTILIZAÇÃO DA DOADORA	20
3.1 Coleta do sêmen	20
3.2 Análise do Sêmen	20
3.3 Fertilização da doadora	22
3.4 Inseminação artificial	22
3.5 Monta natural	23
4 TÉCNICA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÃO	23
4.1 Coleta	23
4.2 Manipulação	24
4.3 Avaliação e classificação	25
4.4 Envase	25
4.5 Métodos de preservação do embrião	26
4.6 Deposição do embrião no útero da receptora	26
4.7 Diagnóstico de gestação	28
5 FATORES QUE AFETAM E AS ESTRATÉGIAS PARA MAXIMIZAR RESULTADOS NOS PROGRAMAS DE TE	29
5.1 Fatores que afetam a taxa de recuperação embrionária	29
5.2 Fatores que afetam a taxa de prenhez	30
5.3 Estratégias para maximizar os resultados nos programas de TE	32
5.4 Superovulação	32
5.5 Manejo de éguas idosas e/ou subfêrteis	33
5.6 Progesterona de longa ação	35
5.7 Cio do potro e Ciclicidade	36
5.8 Qualidade do sêmen	37
6 CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS	39

1 INTRODUÇÃO

A indústria do cavalo é um ramo do agronegócio que movimentava expressivamente o setor financeiro do país gerando emprego e renda (LIMA, 2016). Sendo assim, as biotécnicas da reprodução são utilizadas visando maximizar resultados e otimizar a vida reprodutiva dos animais melhorando o retorno financeiro de quem investe nesta atividade. O Brasil é um dos líderes mundiais de transferência de embrião (TE) em equinos, juntamente com a Argentina e os Estados Unidos (ALVARENGA, 2010). Devido aos resultados satisfatórios desta técnica, melhorias nos programas de transferência de embrião estão sendo estudadas cada vez mais, assim como os fatores que afetam as taxas de sucesso. A TE é muito utilizada devido a relevância da técnica em ajudar a solucionar problemas reprodutivos como subfertilidade, idade avançada, impossibilidade de gestar, etc., sendo muito utilizada também em éguas em que não se deseja interromper a atividade esportiva, e também para difundir uma genética com mais rapidez. Outras utilidades da técnica são: quando se deseja obter mais de um potro por égua durante o ano, quando se deseja preservar a égua por algum problema de saúde como laminite, artrites, cólicas ou quando a égua apresenta problemas comportamentais mais sérios que ofereça risco ao potro, a outros cavalos ou aos tratadores (LIRA, 2009; ALVARENGA, 2017).

O crescimento mundial da equinocultura é devido a versatilidade do cavalo, que anteriormente era utilizado como meio de transporte e tração animal e passou a ser utilizado em diversas práticas de esporte e lazer (MARIZ, 2008). Com esse crescimento, houve um aumento na procura das técnicas de reprodução assistida. A TE gera um ganho na eficiência reprodutiva e incrementa o melhoramento genético, otimizando as produções. Com isso, cresce a procura por animais de genética superior e com bom desempenho esportivo para os programas de TE (MONTECHIESI, 2015).

A transferência de embrião é uma biotécnica da reprodução que consiste em retirar um embrião ou mais do útero de uma égua doadora e depositá-lo no útero de uma égua receptora, que levará a gestação a termo (DAVIES MOREL, 2003). Para isto, várias etapas são executadas até que se atinja o objetivo final: avaliação de doadoras, seleção de receptoras, sincronização das mesmas, coleta e avaliação do sêmen, fertilização da doadora, coleta do embrião do útero da doadora, avaliação e classificação do embrião, deposição do embrião no útero da receptora e diagnóstico de gestação para confirmação de prenhez. Cada etapa é de fundamental importância para o sucesso final da técnica sendo essencial a correta execução de cada uma delas.

Esta biotécnica tem um grau de complexidade razoável quando comparado a técnicas mais avançadas. O grande desafio da TE é a organização de todo o programa de transferência, a coordenação de todas as etapas da técnica para que se obtenha êxito no final (LIRA, 2009).

Portanto, o seguinte trabalho tem por objetivo detalhar e ressaltar a importância de todas as etapas envolvidas no processo de transferência do embrião, desde a obtenção e seleção dos indivíduos participantes do programa até depositar o embrião no útero da égua receptora, como também elucidar os fatores que afetam o desempenho final da técnica, comprometendo ou não o seu sucesso.

2 MANEJO DA DOADORA E RECEPTORA

A égua doadora será o indivíduo que terá material genético difundido através da técnica. Ela será inseminada ou coberta por um garanhão, e logo após, terá seu embrião coletado e transferido para a égua receptora. É indicado que a doadora tenha características desejáveis para a prole e também características que se acredita serem altamente herdáveis (RIERA, 2009). Porém, fica a critério do criador investir ou não em qualquer indivíduo que ele deseje.

A receptora é a égua que receberá o embrião da égua doadora e levará a gestação a termo, posteriormente parindo um potro saudável e amamentando-o. Este indivíduo tem a missão de reconhecer o embrião e fornecer as condições necessárias ao seu desenvolvimento (FLEURY *et al.*, 2007). Essa égua precisa ter qualidade reprodutiva, pois sua participação no programa de TE é um fator que interfere diretamente no sucesso da técnica (VANDERWALL & WOODS, 2007; MCKINNON & SQUIRES, 2007).

2.1 Seleção da Doadora

A seleção desse indivíduo normalmente é baseada em desempenho esportivo, morfologia, preferência dos donos em certas características ou indivíduos e por avaliação reprodutiva do médico veterinário. Alguns fatores são importantes e devem ser levados em consideração na hora de selecionar a doadora: histórico reprodutivo, fertilidade, diretrizes da raça, valor genético, número de gestações desejadas, idade, conformação da vulva e condição uterina (SQUIRES *et al.*, 1999; SQUIRES & SEIDEL, 1995).

A maioria das éguas selecionadas têm idade avançada, pois se espera alcançar êxito no desempenho esportivo para agregar valor e assim torná-la uma doadora (ALONSO *et al.*, 2005). Sabemos que a idade é altamente relacionada com a queda na qualidade uterina. Éguas mais velhas tendem a ter todos os seus mecanismos de defesa mais prejudicados em relação a éguas mais jovens. Woodward *et al.* (2012), observou que éguas mais velhas tem piores resultados do exame histopatológico/biópsia endometrial e tendem a acumular líquido no lúmen do útero. Outros estudos mostram que somente a idade já é um fator que compromete a qualidade uterina, pois éguas virgens de idade avançada também apresentavam alterações endometriais (GRÜNINGER, *et al.* 1998). Em resumo, éguas mais velhas tem menor eficiência reprodutiva. Este fato também está associado a distúrbios de ovulação e maturação oocitária e/ou endometrite crônica (LOSINO & ALVARENGA, 2006). Quando a doadora tem endometrite crônica degenerativa, a condição uterina acaba por dificultar a manutenção e desenvolvimento embrionário com posterior perda embrionária (MCKINNON & SQUIRES, 2007). A presença

de cistos reflete senilidade uterina e normalmente acompanham alterações endometriais. Estes são associados com idade avançada e um escore de biópsia maior. Stanton *et al.* (2004) verificou que éguas que apresentavam cistos tinham idade superior a 10 anos, e que de todos os animais que apresentavam cistos, 73,1% eram éguas com mais de 14 anos, e 29,1% eram éguas entre 7 e 14 anos.

A doadora deve estar saudável zootecnicamente. Deve estar bem alimentada e mantendo condição corporal adequada durante a estação de monta. É indicado que a doadora esteja sanitariamente bem, com todas as vacinas e vermífugos em dia.

2.2 Avaliação da doadora

A doadora, assim como a receptora, deve passar por um exame geral e reprodutivo completo, o que inclui a observação da conformação vulvar, palpação retal avaliando o tamanho e o tônus do útero, a cérvix e os ovários. Posteriormente é realizado um exame ultrassonográfico do útero e dos ovários. É indicado realizar cultura, citologia e biópsia em cada uma das éguas afim de conhecer o estado em que se encontra o trato reprodutivo da fêmea e quais são as chances dela emprenhar.

O objetivo principal deste manejo é monitorar o comportamento reprodutivo para avaliar as condições reprodutivas, estabelecer a fase do ciclo estral e aproximar-se ao máximo do momento da ovulação, o qual é importante para a inseminação ou cobertura ocorrer no momento certo e também para uma correta sincronização da receptora com a doadora (LIRA, 2009). Quando em estro, a partir do terceiro dia, as doadoras devem ser examinadas diariamente para controle da evolução do ciclo acompanhando as mudanças uterinas e foliculares.

Alguns hormônios específicos são utilizados para o manejo do ciclo estral. Normalmente, utiliza-se se luteolíticos e indutores de ovulação para facilitar o manejo e também escolher o melhor momento para a inseminação artificial (IA) ou monta natural (MN). O item 6 do presente trabalho abordará mais amplamente esse assunto.

2.3 Tratamentos referentes à doadora

Quando a doadora possui algum problema reprodutivo, seja patológico ou não, podemos lançar mão de alguns tratamentos para corrigir, solucionar ou melhorar o seu estado sem comprometer o desempenho da técnica. Esses tratamentos devem ser feitos antes do seu ingresso no programa de TE (VANDERVALL, 2000). Todo tempo e esforços gastos em prol

do reestabelecimento de um ambiente uterino saudável é compensado pelo aumento da taxa de sucesso da TE (HARTMAN, 2011).

A primeira barreira física da égua é a vulva. Além dela, a prega vestibulo-vaginal e a cérvix também fazem esse papel. As barreiras físicas são responsáveis por impedir que microorganismos cheguem a luz do útero (TROEDSSON, 2011). É comum que algumas éguas apresentem problemas no posicionamento e na coaptação vulvar. Isso se deve principalmente à idade, pois além dos lábios se tornarem mais finos, com a retração do ânus e a perda considerável de peso, ocorre uma inclinação anterior do períneo (BRADECAMP, 2011). Essa alteração angular da vulva predispõem a égua a desenvolver pneumovagina o que carrega organismos patogênicos para o trato reprodutivo (CASLICK, 1937). Quando é detectada essa coaptação inadequada, podemos fazer cirurgias corretivas para melhorar o fechamento vulvar, procedimentos conhecidos por vulvoplastias. Uma técnica muito utilizada é a *Caslick* (figura 1) que consiste em suturar os lábios vulvares em sua comissura dorsal. Para isto é necessário anestesiá-lo localmente a vulva, reavivar os bordos através de incisão e divulsão e suturá-los com pontos simples isolados (PASCOE, 2007).

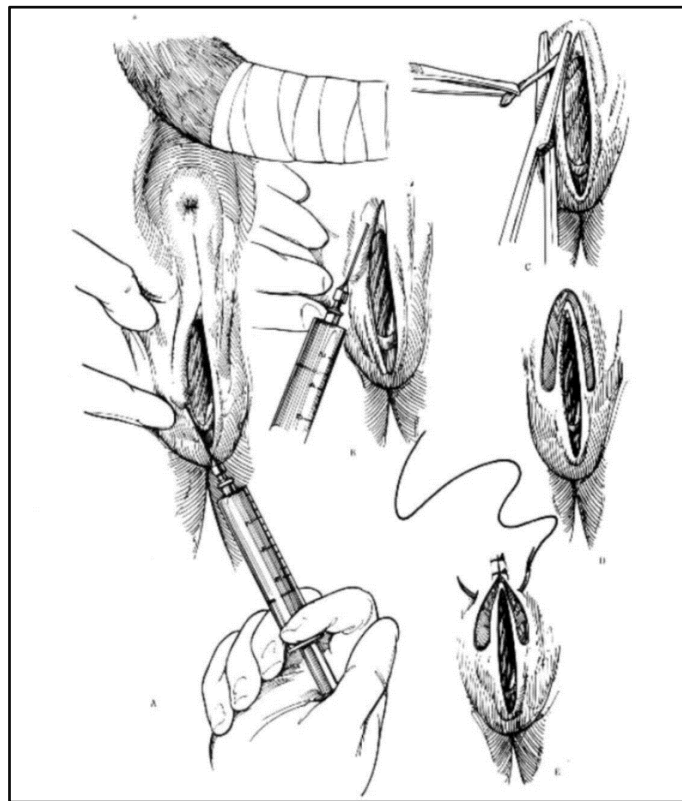
Quando essas alterações nas barreiras físicas persistem ou não são corrigidas, deixam a égua predisposta à endometrite. A deposição do sêmen na espécie equina é intrauterina o que causa reações inflamatórias geradas pelo próprio sêmen, espermatozoides e plasma seminal, além de carrear bactérias presente no pênis do garanhão para dentro do útero (TROEDSSON, 1997). A endometrite mais comum é a endometrite persistente pós-cobertura (LEBLANC, 2010). Essa endometrite pode ocorrer com associação de infecção bacteriana (KENNEY, 1992). A bactéria *S. zooepidemicus* é o patógeno mais isolado em culturas do ambiente uterino (RIDDLE, 2007; NIELSEN, 2005) e causa morte embrionária, sendo essa informação relevante para o programa de TE, pois precisamos evitar essas perdas. Éguas mais velhas, com o passar das gestações, tendem a ter o útero mais baixo do que o assoalho da pelve o que dificulta a drenagem do fluido intrauterino e predispõe à endometrite persistente (LEBLANC, 1998).

A contratilidade miometrial é de extrema importância para a limpeza pós-cobertura do ambiente uterino, sendo o primeiro mecanismo de defesa responsável por eliminar rapidamente o fluido acumulado e produtos inflamatórios (LEBLANC, 1995). Éguas velhas tem esse mecanismo comprometido, o que acarreta em acúmulo de líquido intrauterino (LEBLANC, 1989).

O tratamento terapêutico para essa afecção será específico conforme diagnóstico de cada indivíduo (LEBLANC, 2010). O tratamento tradicional para endometrite vai passar por lavagem uterina, combinação de antimicrobianos, vulvoplastia e drogas ecbólicas. O controle

reprodutivo em associação com drogas indutoras da ovulação reduz o número de inseminações artificiais, reduzindo a contaminação e a resposta inflamatória. Outra medida que auxilia a égua é a higienização da região perineal na hora da monta natural ou inseminação artificial, pois diminui a contaminação. A inseminação artificial quando permitida é de grande valia a éguas susceptíveis a endometrite persistente pós-cobertura. Essas éguas tiveram aumento na taxa de prenhez quando realizada IA ao invés de MN (MATTOS *et al.*, 1996).

Figura 1: Técnica de Caslick.



Fonte: https://www.researchgate.net/figure/Figura-07-Tecnica-cirurgica-de-Caslick-Procedimentos-basicos-desde-a-anestesia-dos_fig4_277847702

2.4 Seleção da receptora

Diversos fatores influenciam no sucesso da técnica, mas a seleção da receptora é considerado o mais importante. Uma boa escolha respeitando todos os critérios de seleção influenciará no sucesso da TE, aumentando a taxa de prenhez e reduzindo a taxa de perda embrionária (ALONSO, 2008). Alguns critérios de seleção são: nutrição e condição corporal adequadas, idade entre 3 e 10 anos, boa índole, para facilitar o manejo da mesma e do seu potro,

desenvolvimento mamário adequado (SQUIRES *et al.*, 1999), ciclos estrais normais e boas características uterinas e ovarianas (VANDERWALL & WOODS, 2007). Outros critérios de seleção seriam não ter alterações musculó esqueléticas, ter boa saúde dentária e boa visão (HARTMAN, 2011). Em resumo, a receptora deve ter uma boa saúde geral e reprodutiva, muitas vezes melhor que a própria doadora, não devendo nunca ser uma égua de descarte.

Na técnica de TE, doadora e receptora devem estar sincronizadas para o embrião sair de um ambiente uterino para o outro, na mesma fase do ciclo, o diestro (DAVIES MOREL, 2003). Para este ambiente ser o mais aproximado possível uma correta e precisa sincronização deve ser feita entre doadora e receptora, porém nem sempre se obtém essa precisão. Por isso, é importante ter no mínimo duas receptoras por égua doadora para que se possa escolher o melhor e mais aproximado ambiente uterino para o embrião no momento da transferência (MCKINNON & SQUIRES, 2007).

O grupo de receptoras deve ser formado antes do início da temporada e deve-se evitar introduzir novos indivíduos. Equinos são animais que formam hierarquia dentro dos grupos. Ao introduzir novos indivíduos, essa hierarquia tem que ser reorganizada, o que gera estresse para os indivíduos. Por esse motivo também, deve-se evitar a mudança de rotina entre as éguas receptoras.

Além disso, existe a questão sanitária, pois pode ocorrer a introdução de novas doenças. Caso seja necessário o ingresso de mais receptoras no programa de TE, estas devem passar por quarentena para não pôr em risco os demais animais e deve-se fazer um manejo sanitário adequado, controle de endoparasitas/ectoparasitas e vacinação. As receptoras devem ter boa sanidade não apresentando nenhuma doença infectocontagiosa (LOSINO & ALVARENGA, 2006).

A idade interfere no desempenho reprodutivo, pois predis põem a degeneração do endométrio, o que dificulta a manutenção da gestação (RICKETTS & ALONSO, 1991). Além disso, éguas mais velhas apresentam uma maior taxa de perda da gestação (BARBACINI, 1999). Quanto mais velha a receptora, menos temporadas ela permanecerá no plantel, e seu custo inicial será menos diluído ao longo dos anos (LOSINO & ALVARENGA, 2006). Embora éguas jovens tenham boas taxas de prenhez, podem não apresentar boa habilidade materna, podendo ser um problema no parto e cuidados com o potro. Por esse fato, adquirir receptoras de 1 ou 2 parições e habilidade materna comprovada seja uma opção mais interessante. Éguas virgens, entre 2 a 4 anos, que nunca conceberam, eram indicadas como melhor escolha de receptora, pois teriam maior fertilidade. Porém, estudos comprovaram que elas apresentam placenta e potros com menor peso ao nascimento quando comparadas a éguas adultas e

pluríparas (ALLEN *et al.*, 1994). Associado a este fato, potrancas apresentam ciclos erráticos com maior frequência, além de não serem de fácil manejo pela indocilidade. Sendo assim, a utilização de potrancas como receptoras não é recomendada (LOSINO & ALVARENGA, 2006).

Em relação ao tamanho ou porte físico, é indicado que doadora e receptora sejam iguais ou a receptora seja maior, pois o tamanho da égua é relacionado com o tamanho do útero (LOSINO & ALVARENGA, 2006). Tanto o excesso de espaço uterino quanto a falta dele são prejudiciais ao potro, levando a um tamanho aumentado ou diminuído respectivamente (ALLEN *et al.*, 2002). Também não é indicado receptoras de raças pesadas para embriões de raças médias a leves, pois estas receptoras produzem muito leite o que gera problemas de crescimento, além do potro nascer com peso maior que o esperado para sua raça (LOSINO & ALVARENGA, 2006).

A condição corporal em éguas pode influenciar a eficiência reprodutiva. Pode determinar o início da estação reprodutiva para aquele indivíduo, o tempo de duração do ciclo estral, taxa de concepção, intervalo entre partos e reabsorção embrionária. Quando as éguas iniciam a temporada de monta com escore corporal bom, obtêm taxas de concepção mais elevadas. Já as éguas com escore corporal ruim tem intervalo entre partos maiores e necessitam de mais ciclos para ficarem prenhas. Éguas que são bem alimentadas durante a lactação ou com restrição na gestação, mas com boa alimentação na lactação apresentam índice de concepção superior e taxa de mortalidade embrionária inferior em comparação a éguas que sofreram restrição alimentar durante a gestação e lactação. Quando há restrição durante a lactação, utilizam a reserva corporal para compensar os efeitos negativos pondo em risco a sobrevivência do embrião (HENNEKE *et al.*, 1984). As receptoras que receberam embrião devem estar em piquetes com melhor disponibilidade e qualidade de pastagem (RIERA, 2009). A maioria das receptoras são éguas gestantes ou paridas, e devido ao alto custo de manutenção destas, deve-se preconizar o menor intervalo entre partos possível (LOPES, 2004).

Quando a receptora é submetida a estresse como privação de alimento, variações climáticas, brigas, redução do espaço físico, transporte ou condição gerada por um estado fisiológico (parição, lactação ou desmame) pode levar a uma excessiva secreção de cortisol, que poderá alterar ou inibir a secreção de hormônios reprodutivos (LEITE, 2002). Segundo Rivier & Rivest (1991), todo o eixo hipotálamo-hipófise é alterado, pois a secreção desses hormônios durante situações de estresse inibe a secreção de GnRH e, por consequência, não há secreção de FSH e LH. Quanto mais desafios ela passar maior será o estresse e maior as

consequências, pois a resposta ao estresse é modulada pela intensidade, duração e frequência do estímulo (LEITE, 2002).

Outra característica importante em relação a receptora é referente ao seu temperamento. A receptora deve ser de fácil manejo, pois além de ensinar o potro a se comportar, seu comportamento pode ser um risco aos tratadores, ao veterinário e ao próprio embrião e futuro potro (ALONSO, 2008). As receptoras devem aceitar bem serem cabresteadas (RIERA, 2009), devem permitir serem examinadas através de palpação retal e exame ultrassonográfico, e na hora do manejo com o potro, devem apresentar comportamento tranquilo não dificultando o trabalho dos tratadores (LOSINO & ALVARENGA, 2006).

As receptoras devem ser identificadas para facilitar o manejo e para organização do programa, pois assim se tem o controle de qual égua recebeu qual embrião. Devemos ter todos os cuidados com as receptoras se queremos que elas estejam aptas ao programa e que desempenhem ao máximo seu potencial reprodutivo. Devemos assegurar suas saúdes físicas e mentais através de um bom manejo o que inclui boa alimentação, qualidade da água, atividade física, espaço físico adequado, sanidade, salubridade do ambiente, bons tratos, entre outros.

2.5 Avaliação da receptora

Antes do início da temporada de monta é importante avaliar as condições reprodutivas em que a receptora se encontra através de um exame reprodutivo completo. Verifica-se a anatomia vulvar e perineal, a funcionalidade da cérvix, ultrassonografia para avaliar a presença ou não de fluido intrauterino, citologia e cultura uterina para verificar a existência de neutrófilos e agentes patogênicos (WATSON, 2000). A biópsia endometrial associada ao exame histopatológico nos fornece informações importantes sobre as condições do ambiente uterino em que o embrião ficará e também quantificar as chances dessa égua gestar e parir um potro a termo saudável (QUEIROZ, 1991). Este procedimento é realizado coletando um fragmento endometrial com o auxílio de uma pinça tipo Yeoman e as amostras devem ser conservadas em formalina a 10% (KELLER, 2004). O resultado (tabela 1) é obtido através da classificação em graus, sendo levados em consideração a fibrose glandular, inflamação aguda ou crônica, angiose, lacuna linfática, etc. Esta classificação foi relacionada com o potencial reprodutivo das éguas (KENNEY & DOIG, 1986). A biópsia endometrial é uma técnica fácil e segura, não proporcionando dor ou desconforto ao animal. Deveriam ser usadas como receptoras apenas éguas com biópsias de graus IA e IB e sem evidência de endometrite crônica ou aguda (SQUIRES & SEIDEL, 1995).

As receptoras, assim como as doadoras, também são avaliadas por palpação retal e ultrassonografia transretal. Através desses exames podemos classificar as receptoras conforme sua qualidade reprodutiva. Segundo Carnevale *et al.* (2000), quando a receptora apresenta tônus uterino e cervical de bom a excelente, e nenhuma outra alteração no útero classificamos essa égua como aceitável. Já quando apresenta pouca tonicidade uterina e cervical, classificamos como marginalmente aceitável. No exame ultrassonográfico do útero e dos ovários, quando observa-se alterações como presença de fluido uterino, cistos, ar ou debris no útero, tumores ou outras anormalidades ovarianas esta receptora será descartada. O ideal seria que as receptoras fossem acompanhadas por um ou dois ciclos antes de serem utilizadas no programa. Outro motivo para descarte é se apresentam ciclos erráticos ou ciclo estral anormal, falha de ovulação, ou períodos de diestro curto, com menos de 12 dias. Receptoras não prenhez após duas transferências também serão descartadas (SQUIRES, 1993). Não é aconselhado usar exclusivamente a ultrassonografia para compra ou descarte de receptoras, pois nem sempre uma égua sem fluido uterino não apresenta um processo inflamatório. Sendo assim, é aconselhável que pelo menos o exame citológico seja realizado (LOSINNO & ALVARENGA, 2006). Além disso, as receptoras são diariamente examinadas com o fim de monitorar o crescimento folicular e ovulação (VANDERWALL & WOODS, 2007).

Tabela 1: Categorias de biópsia endometrial Kenney-Doig e prognóstico em éguas.

Categoria	Achados	Taxa de parição esperada (%)
I	Normal, inflamação ou fibrose leve, escassamente espalhada.	80-90
IIA	Suave inflamação dispersa, fibrose leve, atrofia do endométrio na estação reprodutiva.	50-80
IIB	Moderada inflamação dispersa, fibrose moderada.	10-50
III	Severas alterações irreversíveis, incluindo fibrose e inflamação.	<10

Fonte: Kenney & Doig.

2.6 Sincronização do estro e indução da ovulação

A sincronização entre doadora e receptora consiste em fazer o uso de hormônios para que elas ovulem o mais próximo possível para as condições uterinas serem as mais parecidas possíveis. A janela de sincronização permite a variação do dia da ovulação de receptora em relação a doadora garantindo uma margem de segurança para o êxito da técnica, pois não há diferença na taxa de prenhez dentro deste intervalo. Essa margem é de -1 a +3 dias após

ovulação da doadora, ou seja, a receptora pode ovular 1 dia antes ou até 3 dias depois da doadora.

Em éguas cíclicas, a sincronização é uma técnica realizada de forma simples. Para qualquer protocolo utilizado monitora-se por ultrassonografia o crescimento folicular com a indução da ovulação da receptora 48h após a indução da doadora. Para a indução pode-se fazer uso de alguns hormônios como gonadotrofina coriônica humana (hCG), análogos do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) ou extrato de pituitária equina (EPE).

A maioria das receptoras em programas de TE são éguas não castradas, porém com o uso de progesterona exógena éguas ovariectomizadas podem ser utilizadas (HINRICHS, 1987). Outra possibilidade é a utilização de receptoras no período de transição ou anestro, com o uso de um ciclo artificial. Esses animais recebem estrógeno e progesterona exógenos para mimetizar um ciclo natural. As taxas de prenhez alcançadas foram semelhantes às de éguas cíclicas (55,6% versus 67,8%), respectivamente (CARNEVALLE *et al.*, 2000).

3 ASPECTOS REFERENTES AO GARANHÃO E FERTILIZAÇÃO DA DOADORA

Assim como nas doadoras, a seleção dos garanhões não é feita baseada em características reprodutivas, e sim em desempenho esportivo, morfologia e preferência dos criadores em manter certas características no plantel. A qualidade do sêmen tem se mostrado relacionada com as taxas de prenhez por ciclo, por isso torna-se importante a avaliação do mesmo para obtermos boa taxa de sucesso no programa de TE (LOVE *et al.*, 2015).

3.1 Coleta do sêmen

A coleta do sêmen é feita por vagina artificial, sendo que o animal deve ter um condicionamento prévio para que monte em uma égua em cio ou em um manequim. Há vários modelos de vagina artificial, mas normalmente são compostas de um tubo rígido, uma mucosa de látex, que entre esses componentes se adiciona água quente. Uma mucosa descartável é colocada por cima da mucosa de látex e é trocada a cada coleta. O copo coletor é acoplado em uma das extremidades da vagina e é preso a mucosa descartável. De preferência deve estar protegido da luz e alterações de temperatura. A vagina deve ser preenchida com água quente, para permanecer com a temperatura de 42-45°C. No salto, o animal deve ter o pênis desviado e introduzido na vagina artificial. A ejaculação pode ser verificada pelas seguintes constatações: movimento da cauda para cima e para baixo, contração dos músculos perianais, sapatear e fluxo pulsátil uretral da ejaculação (CBRA, 2013).

3.2 Análise do Sêmen

Nenhum teste isolado é capaz de predizer a fertilidade de uma amostra de sêmen. Uma série de exames são feitos para se aproximar ao máximo da fertilidade verídica da amostra. Após a coleta a análise do sêmen é feita o mais rápido possível, por isso se preconiza que em centrais de coleta de sêmen o ambiente de coleta seja próximo ao laboratório. Os exames realizados são divididos em imediatos e mediatos.

Os exames imediatos consistem em avaliar características macro e microscópicas, sendo eles: 1. Volume, podendo variar de 20 a 100 ml. 2. Cor, desde branco acinzentado até um branco leitoso. 3. Densidade, de aquoso até leitoso estando diretamente relacionado a concentração espermática. 4. Odor, “sui-generis”, ou seja, característico da espécie. 5. Motilidade espermática, avaliada com uma gota de sêmen fresco entre lâmina e lamínula aquecidas a 37°C e analisa-se a amostra com microscópio em aumento de 200x. Então se estipula a porcentagem de 0 a 100 de espermatozoides com movimento (motilidade total), sendo que uma motilidade boa fica em torno de 70%. 6. Vigor espermático, avalia-se junto com a motilidade e é

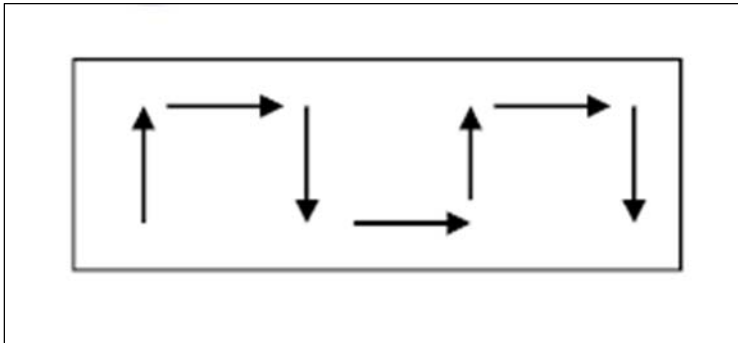
classificado de 0 a 5, de acordo com a velocidade com que o espermatozoide se desloca, sendo um vigor mínimo desejável de classificação 3 (PAPA, 2014).

Já os exames mediatos podem ser realizados logo após a coleta ou posteriormente, sendo eles a concentração espermática e a patologia espermática. Para a concentração espermática utilizamos 20 µl do ejaculado e adiciona-se 1 ml de água destilada (ou 1 gota de sêmen para 19 gotas de água destilada) para se obter uma concentração de 1:20. Homogeneiza-se a amostra, monta-se a câmara de Neubauer e preenche-se a mesma com a amostra (PAPA, 2014).

Conta-se todos os espermatozoides presentes em 5 quadrados de cada retículo, e escolhe-se dois lados, formando um “L” para contar as cabeças de espermatozoides que estiverem encima da linha de dentro do retículo. A variação entre cada um dos lados da câmara não pode ser mais que 10%, senão repete-se a montagem e contagem da câmara. Após a operação calcula-se a média aritmética, o valor encontrado é representado pela letra (n). Quando a diluição efetuada for de 1:20, basta multiplicar o “n” por milhão e tem-se direto a concentração em milhões de espermatozoides por ml. A concentração espermática média para um garanhão adulto colhido na vagina artificial é de 100 a 200 milhões de espermatozoides por ml (CBRA, 2013).

Para realizar a patologia espermática é necessário realizar esfregaço de uma gota de sêmen diluído, fixar o material na lâmina através do uso de metanol e depois cora-se com corantes. Existem kits prontos específicos para esse preparo disponíveis no mercado. As colorações utilizadas para sêmen são: coloração pelo vermelho congo (CEROVSKY, 1976) e eosina-nigrosina (BARTH & OKO, 1989). A lâmina é avaliada por microscopia de luz (óptica) no aumento de 1000x. Conta-se 200 células, percorrendo a lâmina da forma como demonstrada na figura 2, e classificamos os espermatozoides conforme suas patologias. No final, obtém-se as porcentagens de espermatozoides normais e a porcentagem de cada patologia.

Figura 2: Forma adequada de percorrer a lâmina no exame de patologia espermática.



Fonte: Manual de Andrologia e Manipulação de sêmen equino – Botupharma, 2014.

Uma maneira de classificar os defeitos encontrados neste exame é dividi-los em defeitos maiores, relacionados com a infertilidade e defeitos menores que não interferem diretamente sobre a fertilidade (PAPA, 2014).

Os exames abordados são os mais básicos e facilmente executados na rotina de coleta. Porém, existem outros exames complementares que podem ser realizados e auxiliam na avaliação mais completa de um ejaculado.

3.3 Fertilização da doadora

Trata-se do momento em que utilizaremos de alguma técnica de fertilização para obter a fecundação do óócito da égua doadora e posterior coleta do embrião.

3.4 Inseminação artificial

A inseminação artificial (IA) é a técnica mais utilizada nos programas de TE. Consiste em através de uma pipeta plástica atravessar a cérvix e depositar o sêmen no útero da égua. Existem duas técnicas de IA: a técnica pós-cervical, onde o sêmen é depositado no corpo do útero, e a técnica de IA profunda com deposição do sêmen na ponta do corno uterino. Nas duas técnicas a cola da égua é enfaixada e a região do períneo é higienizada com água e algum produto sanitizante, logo após, a secagem é feita com papel absorvente.

A pipeta utilizada na técnica pós-cervical é rígida, sendo que a utilizada na profunda é flexível. Quando utilizado sêmen congelado, é necessário ter um mandril de inseminação que vai por dentro da pipeta e que deve acompanhá-la sendo flexível ou rígido.

Normalmente, utiliza-se se prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) para lisar o corpo lúteo, encurtar o diestro e adiantar o estro. Indutores de ovulação são utilizados para se aproximar ao máximo

do momento da ovulação e realizar apenas uma IA. Sêmen fresco e refrigerado se preconiza IA até 24h antes da ovulação e sêmen congelado imediatamente após a ovulação.

3.5 Monta natural

A monta natural (MN) é uma prática menos comum nos programas de TE atuais. É utilizada quando as diretrizes da raça não permitem o uso da inseminação artificial, como por exemplo, na raça Puro Sangue Inglês. Mesmo assim, o médico veterinário conduz a técnica de maneira a melhorar as condições da prática.

Este método deve ser evitado, pois não há como avaliar previamente a qualidade do sêmen não podendo garantir boas taxas de concepção.

4 TÉCNICA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÃO

Embriões equinos são transportados da tuba uterina para o útero entre os dias 5 e 6 pós ovulação. Após entrar no lúmen uterino, o tamanho do embrião aumenta desenvolvendo-se para blastocisto expandido.

4.1 Coleta

O período ideal para coleta é em D7 e D8. A indicação para recuperação no dia 6 é para criopreservação do embrião (SQUIRES & SEIDEL, 1995). Éguas inseminadas pós-ovulação tem a entrada do embrião no útero atrasada (LISA & MEADOWS, 2008), sendo observado um retardo no desenvolvimento embrionário, equivalentes a 1 dia de crescimento. Dessa forma, o lavado uterino não deve ser realizado antes do dia 7,5 – 8 (CUERVO-ARANGO *et al.*, 2009).

Através de lavagem uterina transcervical o embrião é coletado utilizando um cateter de silicone com balão com diâmetro de 8,0 mm. O balão é inflado no corpo do útero com aproximadamente 60 ml de ar. O cateter é tracionado caudalmente ajustando-se à cérvix para evitar refluxo, lavando-se os dois cornos simultaneamente (FLEURY *et al.*, 2001; SQUIRES *et al.*, 2003; SILVA, 2003). O útero é lavado três ou quatro vezes com solução salina tamponada de Dulbecco (DPBS), aquecido a 30 - 35° C, contendo 1% (v/v) de soro fetal bovino, penicilina (100 unidades/ml) e estreptomicina (100 µg/ml) (VANDERWALL, 2000). Outra opção para o lavado é o Ringer Lactato, obtendo taxas de prenhez de 64% quando comparadas a 57% obtidas pelo DPBS, conforme Alvarenga *et al.*, (1992), sendo a solução de lavado mais utilizada no Brasil.

É utilizado de 1 a 2 litros em cada lavado, dependendo do tamanho do útero de cada indivíduo, sendo utilizados ao todo, em média, de 3 a 6 litros. O objetivo é provocar expansão

total do lúmen uterino para que o fluido chegue a todas as suas áreas inclusive entre ou sob as pregas endometriais. Um filtro coletor para embriões de 75µm é acoplado ao equipo de saída. Um conjunto estéril de equipo em Y é empregado para conectar o cateter ao frasco de fluido e ao filtro coletor. Durante o procedimento de recuperação do meio de lavagem, o conteúdo retorna pelo cateter por gravidade, passando pelo filtro coletor, podendo-se massagear o útero por via retal. O volume recuperado normalmente fica entre 95% a 98% do volume infundido (SILVA, 2003). A monitoração do retorno do fluido de lavagem pode ser feita empregando um frasco graduado para mensuração do efluente associado ao exame ultrassonográfico do útero ao final do procedimento. A procura pelo embrião pode ser iniciada após cada lavagem ou após a recuperação do volume final. Na ausência de embriões, pode-se realizar uma quarta infusão de meio e medicar a égua com ocitocina, com o intuito de estimular as contrações uterinas e ajudar na expulsão do meio. Nesta última lavagem o meio é mantido no útero da égua por aproximadamente 3 minutos. Massagem retal do útero pode ser aplicada (HINRICHS *et al.*, 1990; MCCUE *et al.*, 2003). Após o final do procedimento de lavagem do embrião, a égua doadora recebe prostaglandinas para lisar o corpo lúteo e iniciar um novo ciclo.

4.2 Manipulação

Após ser coletado o embrião vai para uma placa de petri previamente riscada (figura 3) para facilitar a sua procura. A busca é feita com o auxílio de um microscópio estereoscópico (lupa) com aumento de 10x. Quando encontrado, é transportado para uma nova placa que contém gotas do meio de manutenção. Então ele é transferido por aspiração de uma gota para a outra com o objetivo de eliminar as impurezas da zona pelúcida. Após a lavagem, o embrião é colocado em uma pequena placa de petri contendo o mesmo meio de manutenção para ser avaliado. O embrião pode ser mantido a temperatura ambiente por 2 a 3 horas em meio de manutenção sem comprometimento da viabilidade até a hora da transferência (RIERA, 2011).

Figura 3: Embrião na placa de petri.



Fonte: Med. Veterinário Felipe Hartwig.

4.3 Avaliação e classificação

A avaliação do embrião é subjetiva, e relativamente simples, não necessitando de equipamentos sofisticados. A classificação embrionária é realizada com um microscópio estereoscópico (lupa) utilizando-se aumento de 40x. A classificação é feita de acordo com o estágio de desenvolvimento e qualidade do embrião, sendo que esta última leva em consideração a morfologia relacionando-a com a viabilidade. Então é atribuído um escore de 1 a 5 (sendo 1 excelente e 5 degenerado ou morto) avaliando o formato, simetria, coloração, extrusão celular e integridade de zona pelúcida (MCKINNON & SQUIRES, 1988).

A principal característica que influi na taxa de prenhez é a qualidade do embrião. Embriões com escores 3 resultam em baixa taxa de prenhez (SQUIRES & SEIDEL, 1995). Taxas de 70 a 75% de prenhez foram obtidas com transferência de embriões de grau 1, diagnosticado ao exame ultrassonográfico aos 12 dias (SQUIRES *et al.*, 2003; SQUIRES & SEIDEL, 1995). A maioria dos embriões coletados são de graus 1 ou 2. A classificação do embrião é um método para avaliar a viabilidade do embrião e estimar a probabilidade de gestação após a transferência (CARNEVALE *et al.*, 2000).

4.4 Envase

Esta etapa deve ser feita com cuidado e de maneira correta para preservar o embrião e assegurar que ele chegue em perfeitas condições até o momento da transferência. O embrião é envasado em palheta de 0,25 ml, de 0,5 ml ou ainda em pipetas de inseminação, dependendo

do tamanho do embrião, em uma sequência alternada de solução de manutenção e ar. Assim, minimizamos os movimentos do embrião dentro da palheta, evitando danos e ajudamos na expulsão do embrião para dentro do útero (SILVA, 2003).

4.5 Métodos de preservação do embrião

Uma das maiores dificuldades no programa de TE consiste na sincronização de receptoras com as doadoras. O que ocorre por vezes é ter o embrião e não ter uma receptora apta a recebê-lo. Viu-se então a necessidade de desenvolver um método que permitisse a conservação dos embriões pelo tempo necessário para transporte dos mesmos (FLEURY, 2002).

O resfriamento é o método mais aplicável comercialmente e proporciona conservação do embrião por curtos períodos. A congelação é outro método de conservação, porém as taxas de prenhez para embriões congelados ainda são baixas (FLEURY, 2002). Oguri e Tsutsumi (1974) mantiveram embriões coletados no dia 6 pós ovulação em solução salina com 2% de gelatina ou em mistura de Ringer com soro de égua a 30° C pelo período que varia de 29 a 70 minutos antes da transferência. Não detectaram diferença entre as taxas de prenhez entre os dois meios de manutenção.

Embriões equinos também podem ser congelados por vitrificação onde altas concentrações de crioprotetores permeáveis são utilizados. O que ocorre é o aumento da viscosidade dos fluidos intracelulares e extracelulares durante o resfriamento, ao invés da formação de cristais, não sendo necessário o resfriamento lento do embrião (SQUIRES, 2005).

4.6 Deposição do embrião no útero da receptora

Existem três técnicas para realizar a transferência do embrião da égua doadora para a receptora. Uma delas é a cirúrgica e é realizada através de uma incisão pelo flanco, outra é a técnica não cirúrgica que ocorre via cervical e a mais nova delas, a técnica de Wilsher que usa fórceps e uma pinça para fixar a cérvix. Destas, a mais utilizada atualmente é a técnica não cirúrgica (FLEURY *et al.*, 2007) por ser menos invasiva, ser rápida e de alto percentual de prenhez.

A técnica não cirúrgica consiste em, através de uma pipeta de inseminação, atravessar a cérvix e depositar o embrião no corpo do útero da receptora. Além da pipeta de inseminação, que é a mais utilizada, existem vários outros aplicadores, como o modelo Hannover (transferência de embriões bovinos), e o aplicador modelo Francês e uma adaptação de tubo de

ação + tubo de polietileno. Esses quatro equipamentos foram testados por Peres *et al.* (2002) e não foi observada diferença significativa entre os modelos.

O uso da bainha plástica ou camisinha sanitária envolvendo o equipamento de transferência, denomina a técnica como técnica coberta e tem o objetivo de proteger o embrião da contaminação vaginal. Squires (1982a) relatou que atingiu 54% de gestação utilizando a bainha na transferência, enquanto que sem o uso dela atingiu 23%.

A técnica de Wilsher é uma técnica nova de deposição do embrião na receptora, que consiste em utilizar o espéculo de Polansky e a pinça cervical de Wilsher no momento da transferência do embrião. No estudo de Cuervo-Arango (2018), a taxa de prenhez foi maior em éguas que foram transferidas pelo método de Wilsher comparado com o método tradicional. Esse estudo obteve taxas de prenhez maiores de 90% com o método de Wilsher. Outro ponto favorável observado nesse estudo foi a influência do operador sobre as taxas de prenhez. Enquanto o método tradicional sofre influência da experiência do operador o método de Wilsher resulta em mesmas taxas de prenhez para operadores de diferentes experiências ou nenhuma.

Outro fator muito importante neste momento é a avaliação das receptoras, que ocorre anteriormente à transferência, tem o objetivo de selecionar a égua mais apta a receber esse embrião. Um critério de seleção pode ser a concentração plasmática de progesterona naquele momento. O fato da égua que estar com melhores concentrações contribui para que ela esteja em melhores condições reprodutivas. Outros critérios são avaliados através de palpação da cérvix (firme e fechada), palpação transretal do útero (tônus uterino alto, formato cilíndrico e tubular) e ultrassonografia (útero sem secreções ou dobras endometriais) (CARNEVALE *et al.*, 2000). Caiado *et al.*, (2007) administrou progesterona em éguas receptoras durante o período de D0 (dia da ovulação) a D5. Esse procedimento possibilitou a deposição do embrião nestas receptoras no D2, atingindo taxa de prenhez similar, estatisticamente, às éguas consideradas excelentes a boas para transferência no D5.

Éguas estressadas no momento da deposição do embrião podem apresentar produção de cortisol e prostaglandina F_{2α}, agente luteolítico primário em éguas (LEITE, 2002). Sendo assim, alguns técnicos preferem realizar uma leve sedação na receptora na hora da transferência, visando uma redução do estresse e relaxamento da musculatura da vulva (ALONSO, 2008).

4.7 Diagnóstico de gestação

O diagnóstico de gestação é feito na égua receptora por meio de ultrassonografia transretal. A partir do 12º dia já é possível enxergar o embrião. Este tem formato esférico e está localizado na luz do útero, se movimenta pelos cornos até o 14º dia e cresce de tamanho diariamente.

Após a confirmação da prenhez, Vanderwall, 2008 sugere que o acompanhamento da gestação deve ser feito a cada 10 dias ou duas semanas, para certificar-se de que a receptora mantém esse embrião. Porém, quanto antes diagnosticarmos a perda, mais cedo ela volta pro programa e ainda pode aproveitar a temporada de monta. Sendo assim, deve-se tornar a examinar a receptora no máximo em D18. Depois, verificar crescimento e desenvolvimento do embrião, posição e coração, sendo necessário para tal manejo intervalos menores de 10 dias. Quando ocorre perda embrionária precoce (PEP), é necessário investigar os motivos a fim de corrigi-los ou excluir essa égua do programa de TE. Éguas que não conseguem sustentar a gestação além da fase embrionária geram enorme perda econômica para os criadores. A estatística é de que 30-40% das gestações encerram dentro das duas primeiras semanas da concepção (BETTERIDGE, 2000).

São vários os fatores que podem contribuir para a morte embrionária precoce. Vanderwall (2008) classificou esses fatores em intrínsecos (idade materna, lactação, tempo de inseminação relativo a ovulação, local de fixação da vesícula embrionária e anormalidades de cromossomas maternas); extrínsecos (estresse, nutrição, estação, palpação, ultrassonografia transretal, manipulação do gameta) e embrionários (anomalias de cromossomas ou outras características do embrião).

5 FATORES QUE AFETAM E AS ESTRATÉGIAS PARA MAXIMIZAR RESULTADOS NOS PROGRAMAS DE TE

O sucesso da técnica se dá quando se obtém um potro nascido saudável. No programa de TE diversos são os desafios e cada etapa tem sua importância, maior ou menor. Alguns fatores influenciam diretamente algumas taxas afetando o sucesso da técnica. A taxa média de prenhez esperada é de 75%, porém sempre se objetiva atingir melhores desempenhos através de estratégias que influenciem diretamente essas taxas. (MCKINNON & SQUIRES, 2007).

5.1 Fatores que afetam a taxa de recuperação embrionária

A taxa de recuperação embrionária é a porcentagem de embriões coletados por lavado uterino e normalmente é de 50% por tentativa (SQUIRES, 2005). Essa taxa pode ser influenciada por vários fatores, como: (1) dia da coleta do embrião, (2) doadora, (3) número de ovulações, (4) garanhão e (5) manejo nutricional.

A respeito do dia da coleta do embrião, este é geralmente realizado entre D7 e D8 após a ovulação (D0), sendo D8 considerado o dia ideal para a coleta. Recomenda-se realizar o lavado em D9 para éguas idosas ou que foram inseminadas com sêmen congelado (MCKINNON & SQUIRES, 2007).

Referente à doadoras, fatores importantes como condição uterina e idade tem alta influência na taxa de recuperação embrionária (ALONSO *et al.*, 2005). É notável uma queda de acordo com a idade da doadora. Em éguas jovens (2 a 4 anos) a média é de 85%, em éguas adultas (4 a 18 anos) de 64,4% e em éguas velhas (acima de 18 anos) de 24,1% (SQUIRES & SEIDEL, 1995). Éguas com menos de 12 anos produzem 10% mais embriões do que éguas com mais de 18 anos (ULIANI *et al.*, 2010).

Observa-se uma grande influência do garanhão em relação à recuperação embrionária. O sêmen deve ser de qualidade e fertilidade comprovada com exames pré IA ou pré MN. A qualidade seminal é fundamental para a fertilização do oócito e posterior formação do embrião. Outro fator que interfere na fertilidade é o sistema em que se encontra acondicionado o sêmen, pois sem o adequado armazenamento o sêmen sofre estresse térmico e decai em qualidade (FLEURY *et al.*, 1997).

Em relação ao número de ovulações, as chances de recuperação embrionária aumentam quando a doadora apresenta mais de uma ovulação. Quando a égua teve ovulação dupla, as chances de recuperar dois embriões é maior quando a ovulação foi bilateral (MONTECHIESI, 2015).

Sobre manejo nutricional, as éguas devem estar ganhando peso durante a estação de monta, pois as taxas de prenhez e perda embrionária podem ser afetadas se as mesmas estiverem perdendo peso, mesmo com boa condição corporal (RIERA, 2009).

5.2 Fatores que afetam a taxa de prenhez

São fatores relacionados a acontecimentos durante ou pós transferência do embrião para a égua receptora. Durante a transferência, a variabilidade do método utilizado pode influenciar nas taxas de gestação. A habilidade do técnico pode ser um fator muito importante no método não cirúrgico (SQUIRES & SEIDEL, 1995). Aqueles técnicos com maior experiência prática, maior número de transferências, tende a ter taxas maiores de prenhez (HINRICHS & CHOI, 2005). Taxas de prenhez entre diferentes técnicos foram comparadas. Trinta e nove embriões foram transferidos por dois técnicos diferentes e 13 resultaram em gestação. O primeiro técnico transferiu 26 embriões e 12 resultaram gestação (46,1% de gestação) e o segundo técnico transferiu 13 e 1 embrião resultou em gestação (7,7% de gestação) (SQUIRES *et al.*, 1982a).

Pós transferência do embrião temos diversos fatores relacionados à receptora, à doadora e ao embrião que afetam a taxa de prenhez. Começando pelos fatores relacionados às receptoras, a seleção das mesmas é o fator mais importante não só para as taxas de prenhez, mas também

para o sucesso de todo o programa de TE, sendo que a receptora deve ter saúde geral e reprodutiva em dia. Portanto, também se faz importante as características uterinas da receptora no dia da TE, devendo apresentar boa morfoecogenicidade ao exame de US e bom tônus uterino.

Com a variabilidade da duração do estro, a sincronização da ovulação entre receptora e doadora nem sempre é precisa (GINTHER, 1992), afetando as taxas de prenhez em transferência cirúrgica e não cirúrgica (SQUIRES, 1993). Isso ocorre, pois o embrião em um útero não sincronizado está sujeito a níveis hormonais e fatores de crescimento não correspondentes a fase na qual ele se encontra, ainda que os equinos tolerem uma maior janela de assincronia comparando com os bovinos (WILSHER *et al.*, 2006). O dia em que a receptora se encontra faz diferença na hora da transferência. A janela de utilização vai do D3 ao D8 desde que apresentem bom tônus uterino (FLEURY *et al.*, 2006), sendo que receptoras que ovularam no mesmo dia ou nos 2 dias subsequentes a ovulação da doadora obtiveram taxas de prenhez mais altas (DOUGLAS, 1982; IULIANO *et al.*, 1985).

Já os fatores relacionados ao embrião, qualidade do embrião afeta as taxas de prenhez semelhante ao que acontece em bovinos (SQUIRES, 1993). Embriões de grau 1 e 2 tem melhores taxas de prenhez (77%) quando comparados com embriões de grau maior ou igual a 3 (27%) (SQUIRES & SEIDEL, 1995). Não há muitos estudos disponíveis sobre o efeito da idade do embrião na taxa de gestação (SQUIRES, 1993) e o tamanho do embrião parece não influenciar a taxa de prenhez (CARNEY *et al.*, 1991). Carnevale *et al.* (2000) observou que menores taxas de prenhez são obtidas quando se transferia embriões pequenos (100 a 299 mm). As coletas eram efetuadas nos dias 7 e 8 pós ovulação e, portanto, os embriões pequenos que foram coletados estavam com o desenvolvimento atrasado. As causas podem ser defeitos intrínsecos do embrião, ambiente inadequado no oviduto ou útero, ou inseminação pós ovulação (GINTHER, 1992). Também há a possibilidade destes embriões serem provenientes de éguas idosas. Estes quando comparados aos de éguas jovens apresentam um atraso de desenvolvimento de cerca de 36hs (CARNEVALE *et al.*, 1993). O método de preservação do embrião pode alterar sua estrutura e qualidade afetando assim as taxas de prenhez.

Sobre as doadoras, uma das sugestões para fêmeas com alta taxa de perda embrionária é transferirem seu embrião para outras fêmeas com trato reprodutivo sadio. Receptoras que receberam embriões de éguas inférteis possuem taxa de perda embrionária maior entre os 35 e 50 dias, sugerindo que esses embriões possuíam alguma alteração antes da TE (SQUIRES, 1993). Segundo Woods *et al.* (1986), a qualidade dos embriões recuperados de éguas normais comparados aos de éguas inférteis foi mais alta. Nos lavados de éguas inférteis, 53% deles

continham apenas embriões anormais, sendo que apenas 3% dos lavados de éguas normais tinham embriões com alguma anormalidade.

Reduzidas concentrações de progesterona podem ser associadas com perda embrionária espontânea e podem ter causas como luteólise por endometrite, falha do reconhecimento materno e a insuficiência luteal primária (BERGFELT *et al.*, 1992). Knowles *et al.* (1993) verificou que altas concentrações de progesterona (>20 µg/ml) não incrementam as taxas de prenhez e concentrações entre 2,2 e 25,2 µg/ml não afetaram as taxas de prenhez e a perda embrionária. Dependendo da estação do ano pode haver mais ou menos hormônios circulantes, sendo que uma baixa concentração de P4 pode dificultar a manutenção da gestação ocorrendo perda embrionária precoce o que impacta diretamente a taxa de prenhez.

5.3 Estratégias para maximizar os resultados nos programas de TE

Com o aumento da procura dessa técnica, melhorias são necessárias para aumentar a eficiência dos programas, atender a demanda e satisfazer os criadores. Para isso, algumas estratégias de manejo reprodutivo e geral podem ser tomadas. O ideal é que o médico veterinário sempre observe e avalie todas as etapas do programa de TE e identifique em quais pontos pode-se melhorar.

5.4 Superovulação

A superovulação trata-se de uma estimulação da égua a desenvolver o máximo possível de folículos dominantes com o intuito de produzir mais embriões. Este tratamento aumenta significativamente a eficiência da técnica e diminui potencialmente o custo de um programa de TE. Conseguimos isso através do uso de hormônios específicos. Porém, na espécie equina esse procedimento é menos eficaz do que em outras espécies. O principal obstáculo é a refratariedade da égua aos preparos hormonais à base de FSH suíno. O extrato de pituitária equina (EPE), o FSH equino purificado ou o FSH recombinante são os preparados mais indicados para o caso das fêmeas equinas. Os protocolos são eficientes em induzir múltiplas ovulações (4 a 5 ovulações/égua), porém a recuperação embrionária é baixa (30% embriões/ovulação) (ALVARENGA *et al.*, 2008).

A própria anatomia do ovário da égua, medular pra fora e cortical pra dentro, o fato de ovular somente na fossa de ovulação, e ainda a falta de um produto que seja confiável para induzir superovulações torna essa prática pouco usual na reprodução equina (SQUIRES, 2006). Estudos estão feitos com o intuito de melhorar os índices recuperação embrionária. Fatores liberadores de gonadotrofinas (GnRH), FSH suíno (FSH-p) e equino (FSH-e), gonadotrofina

coriônica equina (ECG), imunização contra inibina, extrato de pituitária equina (E.P.E.) são alguns deles, porém, os que apresentam melhores resultados são FSH-e e o EPE. A taxa de recuperação embrionária se mostra melhor em éguas que ovularam 3 ou menos vezes. Isto indica que com baixas doses de hormônios como EPE ou de FSH-e obtém-se menor resposta ovariana progredindo assim em relação ao número de embriões (ALVARENGA *et al.*, 2008). Seguindo o mesmo raciocínio, Nagao *et al.*, (2012) demonstrou que utilizando acetato de deslorelina em baixas doses perto do momento da dominância folicular induziam duplas ovulações em éguas da raça brasileira de Hipismo e aumentavam as taxas de recuperação embrionária. Administrando FSH-e na dose e frequência correta e selecionando os animais conforme o número de folículos é possível induzir duplas e triplas ovulações recuperando satisfatoriamente embriões e ainda reduzindo custos em relação a outros protocolos convencionais (ARAÚJO *et al.*, 2009).

Alguns produtos novos estão surgindo no mercado, mas além de não terem muitos estudos sobre o seu uso e resultados e também não serem comercializados no Brasil, não estão inseridos no cotidiano dos profissionais da área.

Erros podem ocorrer na captação dos oócitos para o oviduto em éguas pela obstrução da fossa de ovulação. O motivo pode ser em consequência dos sangramentos das demais ovulações ou corpos lúteos (CL) e corpos hemorrágicos (CH) quaisquer.

5.5 Manejo de éguas idosas e/ou subférteis

Os equinos permanecem nos programas de reprodução por um longo período da vida. Não há uma padronização de classes quanto a faixa etária, exemplo: éguas jovens ou éguas idosas, o que dificulta a comparação entre os experimentos (BONIN *et al.*, 2010).

Carnevale *et al.* (1993), descreveram uma taxa de fertilização significativamente maior em éguas jovens (88%) do que éguas idosas (45%). O mesmo observa-se quando comparamos a taxa de recuperação embrionária dessas éguas. Éguas idosas apresentam uma menor taxa de recuperação (embriões recuperados/ciclo) do que éguas jovens, 81,5%, 46,2% respectivamente (LOSINO & ALVARENGA, 2006). Éguas senis possuem um intervalo interovulatório maior, quando comparadas a éguas jovens. O que ocorre é uma longa fase folicular sendo que a fase luteal se mantém. Isso se deve ao atraso de 3 dias na emergência do folículo dominante e também devido ao crescimento lento do folículo ovulatório (CARNEVALE *et al.*, 1993). Na recuperação de embriões de éguas com mais de 15 anos notou-se decréscimo maior (FLEURY *et al.*, 1999; MARINONE *et al.*, 2017). Melhores taxas de recuperação embrionárias foram encontradas quando se tardava esses lavados realizando-os entre os dias 8,5 a 10. Isso ocorre

devido a maturação oocitária mais demorada nessas éguas com mais de 15 anos (LOSINO & UROSEVIC, 2015).

Problemas na maturação folicular interferem na maturação do oócito, levando a problemas na capacidade de desenvolvimento do embrião de éguas idosas (SAMPER *et al.*, 2007). Carnevale & Ginther (1995) demonstraram há uma relação entre a idade cronológica da égua com danos causados a oócitos e embriões em estágios iniciais de desenvolvimento. Esses danos ao oócito o conferem baixa qualidade podendo causar baixas taxas de recuperação embrionária (MARINONE *et al.*, 2017).

Alguns fatores relacionados ao manejo reprodutivo da égua idosa são importantes estratégias para melhorar os índices reprodutivos. Monitoração folicular por US, IA em ponta de corno, meios diluidores de sêmen com antibiótico, diminuição do número de inseminações por ciclo, utilização de sêmen com alta taxa de fertilidade e a utilização de indutores de ovulação são importantes ferramentas para melhorar esses índices (LOSINO & ALVARENGA, 2006).

O uso de plasma rico em plaquetas (PRP) e de células-tronco vêm crescendo como técnicas alternativas promissoras (PAVÃO, 2013). PRP intrauterino pós inseminação artificial reduz a porcentagem de neutrófilos no fluido uterino modulando a resposta inflamatória (REGHINI *et al.*, 2016). Ao ser utilizado em éguas subférteis no momento da indução da ovulação, aumentou de 20% para 80% a taxa de prenhez dessas éguas (METCALF, 2014).

As células tronco utilizadas são as mesenquimais (MSC). Elas são injetadas no útero de éguas com alterações no endométrio. Mambelli *et al.* (2013) desenvolveram um método muito simples de entrega de MSC através pipetas de inseminação, descartável através do colo do útero no corpo do útero. O método é minimamente invasivo e tecnicamente simples. Pavão (2013) observou redução de 30% de fibrose endometrial de éguas tratadas com células tronco. A utilização de MSC é considerado um procedimento seguro sem nenhuma alteração clínica ou reprodutiva (ALVARENGA *et al.*, 2016a).

Um importante diagnóstico diferencial é a obstrução de oviduto. Este diagnóstico é dado quando a égua para de produzir embriões e outras causas de infertilidade são descartadas. O lúmen da tuba uterina é ocluído por uma massa gelatinosa o que impede que os espermatozoides cheguem até o oócito ou impede que o embrião chegue a luz uterina. A Prostaglandina E2 (PGE2) é secretada pelo embrião para promover a sua passagem para o útero. Para o transporte precoce do embrião para o útero é necessário a administração tópica de PGE2 na superfície da tuba uterina (ORTIS *et al.*, 2013).

A suplementação alimentar vem sendo cada vez mais utilizada para suprir as carências e necessidades de cada animal. As concentrações de FSH, LH e P4 são menores em éguas de

idade avançada, sendo que, quando suplementadas com arginina essas concentrações aumentam (RESENDE, 2014).

O manejo das éguas idosas doadoras de embrião é de extrema importância para o sucesso da técnica. Elas devem permanecer em ambiente climatizado ou dispor de sombras nos piquetes visando o conforto térmico e evitando o estresse calórico. Caso não haja sombra natural recomenda-se estruturas artificiais (tela de sombrite). Também devem ter acesso a água à vontade e de qualidade e ração adequada. Todo esse manejo visa o conforto da doadora seja qual for a região onde é criada. A alimentação deve ser de fácil acesso, sem competições com outros indivíduos e, principalmente, de fácil mastigação (normalmente trituradas) (DITTRICH *et al.*, 2010).

5.6 Progesterona de longa ação

A progesterona é fundamental na manutenção da gestação, influenciando nas secreções histotróficas uterinas auxiliando a sobrevivência do embrião (SPENCER *et al.*, 2004). Alonso (2008) hipotetiza sobre o envolvimento da expressão dos receptores de progesterona no endométrio. Uma maior concentração de receptores associado a níveis séricos de progesterona poderia determinar uma melhor secreção histotróficas do endométrio, melhorando as condições nutricionais do embrião e aumentando as taxas de prenhez.

Éguas receptoras de embriões em anestro ou em fase transicional tem os seus níveis de hormônios menores, seja pela estação do ano ou pela própria fisiologia. Os níveis de progesterona podem estar mais baixos o que se torna um risco à manutenção da gestação. Sendo assim, o uso da progesterona nessas éguas vem se tornando frequente com o fim de garantir que essa égua vai ter um aporte de P4 adequado para manter a gestação.

A progesterona (P4) de longa ação trata-se de um progestágeno com veículos biodegradáveis de liberação lenta e controlada. Assim, com uma única aplicação, mantêm-se os níveis plasmáticos de progesterona por até 14 dias, permitindo um melhor manejo das receptoras (GRECO *et al.*, 2016). Rocha Filho *et al.* (2004) e Testa *et al.* (2005) avaliaram éguas receptoras em anestro ou receptoras na fase transicional tratadas uma vez por semana com progesterona de longa ação (P4 LA). Concluíram que este tratamento é seguro para a manutenção da gestação, obtendo-se altas taxas de prenhez após a transferência de embriões. O protocolo consistia em: receptoras em anestro recebiam por 3 dias consecutivos (a partir do D0 da doadora) 2,5 mg por dia estrógeno (benzoato de estradiol). A progesterona de longa duração era iniciada um dia após a última aplicação de estrógeno e continuada uma vez por semana até

os 120 dias de gestação da receptora. É imprescindível ter organização no programa de TE, pois a falha em uma aplicação pode implicar na perda da gestação. A sugestão é que se tenha o dia da progesterona no programa (exemplo: quinta feira), para que se faça a supervisão dos tratamentos e se garanta que todas as éguas receberam as medicações necessárias.

5.7 Cio do potro e Ciclicidade

Ambas as estratégias visam maximizar o uso das receptoras. Sabemos que a maneira mais efetiva de atingir esse objetivo é diminuindo o intervalo entre partos.

Sendo assim o uso do cio do potro torna-se uma alternativa muito interessante. O cio do potro é o primeiro cio pós-parto e torna-se atrativo pelo fato de possibilitar a geração de um potro por ano (BARROS, 2017). Nesse manejo é importante a avaliação da égua logo após o parto para identificar rapidamente possíveis problemas, como lacerações e retenção de placenta, para prontamente intervir. O uso do cio do potro depende da boa involução uterina e esse fato é constatado através de exames como palpação transretal e ultrassonografia. Esperamos na palpação identificar tamanho reduzido do útero e bom tônus uterino, e na ultrassonografia um útero sem conteúdo em sua luz. Vários fatores influenciam as taxas de prenhez no cio do potro como: idade, escore corporal, evolução do parto, integridade do trato reprodutivo no pós-parto e presença de lóquios uterinos (BARROS, 2017). O tratamento com ocitocina para estimular as contrações miométriais e expulsar o conteúdo influencia também positivamente na oferta de leite. A queda nos níveis de progesterona e o aumento dos níveis de estrógeno favorece a involução uterina, e estimula os mecanismos de defesa do endométrio (GINTHER, 1992). Essa possibilidade de uso do cio do potro deve ser analisada com devida atenção. Quando a cobertura no cio do potro é feita de maneira inadequada, pode prejudicar as taxas de prenhez nos cios subsequentes e provocar lesões permanentes no endométrio (BARROS, 2017). Mas, tendo em vista as boas taxas de prenhez no cio do potro, recomenda-se sua utilização no programa de TE com o objetivo de maximizar o uso da receptora.

Sobre ciclicidade, sabemos que a égua é um animal poliestral sazonal fotoperíodo dependente, sendo assim, podemos afirmar que umas das formas de maximizar seu uso é fazendo com que ela entre em atividade reprodutiva mais cedo na estação de monta ou não entre em anestro estacional. Fazemos isso através do uso de fotoperíodo artificial. O uso de 16 horas de luz total por dia (natural + artificial), 2 meses antes do início da estação, garantem o início da ciclicidade. O fotoperíodo artificial é uma alternativa eficiente e mais natural, além de ser um método confiável (HARTMANN, 2011).

5.8 Qualidade do sêmen

A qualidade sêmen, ou da dose inseminante, é fundamental para a fecundação e obtenção do embrião. Em relação ao sêmen refrigerado alguns erros cometidos são os principais: processamento inadequado (dose, proporção do diluente); tipo ou qualidade do diluente; transporte inadequado (temperatura inadequada, sem proteção contra choque térmico); não respeito as características do próprio ganhão (qualidade do sêmen, resistência ao transporte, regime de coletas); momento e frequência das IA inadequados (LOSINO & ALVARENGA, 2006; VARNER, 2016).

Assim como acontece no processo de congelamento, na refrigeração alguns ganhões têm sua fertilidade mais ou menos preservada em função do tempo, ou seja, são mais ou menos resistentes ao processo, podendo chegar até 48 horas ou mais (ALVARENGA *et al.*, 2016b). Quando o sêmen está refrigerado (24 horas ou mais), as inseminações devem ser realizadas no máximo 24 horas antes da ovulação (RAMIRES *et al.*, 2013).

É importante o uso de recipientes específicos para armazenar o sêmen. Estes recipientes devem obedecer as curvas de refrigeração adequadas. O objetivo pós refrigeração é que a motilidade espermática e a fertilidade do sêmen sejam mantidas da melhor forma possível. Para isso a temperatura ideal de refrigeração deve ser obtida. Geralmente era é de 5°C, porém alguns ganhões preservam melhor a temperaturas próximas de 15° (AURICH, 2005).

Algumas estratégias para melhorar a eficiência da IA com sêmen resfriado devem ser tomadas com base em cada indivíduo, cada ganhão. Elas são: determinar o melhor regime de coleta semanal; determinar o melhor diluente; determinar a temperatura ideal de transporte (5 x 15°C); determinar o tempo máximo para transporte; utilizar sistemas de transportes que protejam o conteúdo da mudança de temperatura ambiente; IA o mais próximo possível da ovulação; remoção do plasma seminal (ALVARENGA, 2017).

Outra estratégia de relevância é a seleção espermática, que vem sendo utilizada para aumentar a qualidade e fertilidade do sêmen fresco, além de aumentar a resistência dos espermatozoides a processos de criopreservação. Esta estratégia consiste em selecionar os espermatozoides para que resulte em uma amostra onde se tenham somente espermatozoides com motilidade progressiva e sem alterações morfológicas.

A técnica de centrifugação em camada única (SLC) é umas das mais utilizadas. Este método envolve a centrifugação prolongada do sêmen através de um colóide que separa os espermatozoides com boa motilidade, morfologia normal e cromatina intacta do resto da

população de espermatozoides e do plasma seminal. A separação não é perfeita, como por exemplo, alguns espermatozoides imóveis podem estar presentes no pellet de sêmen, mas é uma técnica muito boa e válida, que melhora a qualidade final da amostra a ser utilizada (MORELL & NUNES, 2018). Utilizando deste método podemos ter doses de melhor qualidade aumentando as chances de se obter gestação.

6 CONCLUSÃO

Com o avanço dos estudos e pesquisas em biotecnologias da reprodução equina, mais especificamente sobre transferência de embriões, houve um avanço científico e comercial o que acarretou uma melhora na eficiência da técnica. Em decorrência dos fatos, houve maior procura por esses serviços, pois o custo benefício se torna cada vez melhor para os criadores. Com o aumento da demanda do serviço, os profissionais da área conseguem elevar sua experiência prática que, juntamente com o conhecimento teórico, tornam o profissional melhor capacitado.

REFERÊNCIAS

ALLEN, W. E. **Fertilidade e Obstetrícia Equina**. Varela, São Paulo. p.143-149, 1994.

ALLEN, W. R.; *et al.* Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I. Development in utero. **Reproduction**, 2002; 123; p. 445-453.

ALONSO, M. A. **Seleção, manejo e fatores que influenciam as taxas de prenhez em éguas receptoras de embriões**. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 36, p. s207-s214, 2008. Suplemento 2.

ALONSO, M. A.; *et al.* Efeito da idade da égua doadora na taxa de perda embrionária. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, p. 204, 2005. Suplemento 1.

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

ALVARENGA, M. A.; CARMO, M. T.; SEGABINAZZI, L. G.; GUASTALI, M. D.; MAIA, L.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. Feasibility and Safety of Endometrial Injection of Autologous Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Mares. **J Equine Vet Sci**, v.42, p.12-18, 2016a.

ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O.; RAMIRES NETO, C. Advances in Stallion Semen Cryopreservation. **Vet Clin North Am Equine Prac**, v.32, p.521-530. 2016b.

ALVARENGA, M.A. Problems and solutions in equine embryo transfer programs in Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 38, p. s319-s333, 2010. Suplemento 1.

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, jan./mar. 2017. Disponível em www.cbra.org.br.

ALVARENGA, M.A.; CARMO, M.T.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. Superovulation in mare: limitations and perspectives. **Pferdeheilkunde, Pferdeheik**, p.88-91, 2008.

ARAUJO, G. H. M.; ROCHA FILHO, A.N.; LOPES, E. P.; MOYA, C. F.; ALVARENGA, M. A. 2009. Use of a low dose to equine purified FSH to induce multiple ovulations in mares. **Reprod. Dom. Anim.** 44:380-383.

AURICH, C. Factors affecting the plasma membrane function of cooled-stored stallion spermatozoa. **Anim Reprod Sci**, v.89, p.65-75, 2005.

BARBACINI, S.; GULDEN, P.; MARCHI, V.; ZAVAGLIA, G. Incidence of embryo loss in mares inseminated before and after ovulation. **Equine Veterinary Education**. v.11, p. 251-254, 1999.

BARROS, B. S.; OLIVEIRA, R. A. Cio do potro: o que é e quando utilizar? **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.41, n.3, p.665-670, 2017. Disponível em: www.cbra.org.br

BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Ames, IA: Iowa State University Press, 1989. 285p.

BERGFELT, D. R.; WOODS, J. A.; GINTHER, O. J. Role of the embryonic vesicle and progesterone in embryonic loss in mares. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.95, p.339-347, 1992.

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

BONIN, B. F.; DELL'AQUA JÚNIOR, J. A.; FIORATTI, E. G.; ALVARENGA, M. A. Efeito do tratamento com extrato de pituitária equina na resposta ovariana e eficiência reprodutiva de éguas idosas em programa de transferência de embriões. **Veterinária e Zootecnia**, v.17, p.94-103, 2010.

BRADECAMP, E. A. Pneumovagina. In: MCKINNON, A. O., *et al.* **Equine Reproduction**. 2nd ed. West Sussex, United Kingdom: Wiley-Blackwell; 2011. cap. 262. p. 2538–2544.

CAIADO, J. R. C.; FONSECA, F. A.; SILVA, J. F. S.; FONTES, R. S. Tratamento de éguas receptoras de embriões visando sua utilização no segundo dia pós-ovulação. **R. Bras. Zootec.**, v.36, n.2, p.360-368, 2007.

CARNEVALE, E. M.; BERGFELT, D. R.; GINTHER, O. J. Aging effects on follicular activity and concentrations of FSH, LH, and progesterone in mares. **Anim Reprod Sci**, v.31, p.287-299, 1993.

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

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

CARNEY, N. J.; SQUIRES, E. L.; COOK, V. M.; SEIDEL, G. E.; JASKO, D. J. Comparison of pregnancy rates from transfer of fresh versus cooled, transported equine embryos. **Theriogenology**, v.36, no1, p.23-32, 1991.

CASLICK, E. A. The vulva and the vulvo-vaginal orifice and its relation to genital health of the thoroughbred mare. **Cornell Vet.** v. 27. p. 178-187. 1937.

CBRA, Manual para Exame Andrológico e Avaliação de sêmen Animal. 3ª Ed. Belo Horizonte, 2013.

CEROVSKY, J. Metoda barveni kancich spermu pro morlogizine harmocem. *Ziv Vy*, v. 21, p.361, 1976.

CUERVO-ARANGO, J.; AGUILAR, J.; NEWCOMBE, J. R. 2009. 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** 71:1267-1275.

CUERVO-ARANGO, J.; CLAES, A. N.; STOUT, T.A. Effect of embryo transfer technique on the likelihood of pregnancy in the mare: a comparison of conventional and Wilsher's forceps-assisted transfer. **Veterinary Record**. 10.1136/vr.104808, 2018.

DAVIES MOREL, M. C. G. Selection of the mare and stallion for breeding. In: **Equine reproductive physiology, breeding and stud management**. Wallingford, CAB International, 2003. Cap.12, p. 105-130.

DITTRICH, J. R.; MELO, H. A.; AFONSO, A. M. C. F.; DITTRICH, R. L. Comportamento ingestivo de equinos e a relação com o aproveitamento das forragens e bem-estar dos animais. **Rev Bras Zootec**, v.39, p.130-137, 2010.

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

FLEURY, J. J. O dia da colheita na taxa de recuperação de embriões em equinos em uma central de transferência de embriões comercial. **Arq Fac Ve. UFRGS**, v.26, p.268, 1999.

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

FLEURY, J. J.; PINTO, A. J.; MARQUES, A.; LIMA, C. G.; ARRUDA, R. P. 2001. Fatores que afetam a recuperação embrionária e os índices de prenhez após transferência transcervical em equinos da raça Mangalarga. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** 38:29-33.

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

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.

FLEURY, P. D. C.; ALONSO, M. A.; SOUSA, F. A. C.; ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R. P. 2007. Uso da gonadotrofina coriônica humana (hCG) visando melhorar as características reprodutivas e fertilidade de receptoras de embriões eqüinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** 31:27-31.

GINTHER, O. J. Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects (2nd ed). **EquiServices**, Cross Plains, WI, p.299-300, p. 499-545, 1992.

GRECO, G. M.; FIORATTI, E. G.; SEGABINAZZI, L. G.; DELL'AQUA JR, J. A.; CRESPILO, A. M.; CASTRO-CHAVES, M. M. B.; ALVARENGA, M. A. Novel Long-Acting Progesterone Protocols Used to Successfully Synchronize Donor and Recipient Mares With Satisfactory Pregnancy and Pregnancy Loss Rates. **J Equine Vet Sci**, v.39, p.58-61, 2016. Hembrooke T. Feeding the Mare for Fertility and Reproduction. **Informativo Técnico Platinum Performance**, 2008.

GRÜNINGER, B.; *et al.* Incidence and morphology of endometrial angiopathies in mare in relationship to age and parity. **J. Comp Pathol.** v. 119. p. 293-309. 1998.

GUTJAHR, S.; *et al.* Effect of dose and day of treatment on uterine response to oxytocin in mares. **Theriogenology**. v. 54. p.447-456. 2000.

HARTMAN, D. L. Embryo Transfer. In: McKinnon, A.O. *et al.* **Equine Reproduction**. 2nd ed. Oxford: Wiley- Blackwell, 2011. v. 2, cap. 303, p. 2871-2879.

HEMBROOKE, T. Feeding the Mare for Fertility and Reproduction. **Informativo Técnico Platinum Performance**, 2008.

HENNEKE, D. G.; POTTER, G. D.; KREIDER, J. L. Body condition during pregnancy and lactation and reproductive efficiency in mares. **Theriogenology**. v.21, p.897-909, 1984.

HINRICHS, K. A simple technique that may improve the rate of embryo recovery on uterine flushing in mares. In: **Theriogenology**, 1990. 33 . p. 937-942.

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

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

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

KELLER, A.; NEVES, A.P.; AUPPERLE, H.; STEIGER, K.; SCHOON, H. A.; KLUG, E.; GREGORY, R.M.; MATTOSa, R.C. Exame histopatológico do endométrio da égua após

infecções experimentais repetidas e cinco diferentes tratamentos: aspectos inflamatórios. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p.215–223, 2004.

KENNEY, R. M. The etiology, diagnosis and classification of chronic degenerative endometritis. **Equine Veterinary Journal**, v. 25, n. 3, p. 185-186, 1992.

KENNEY, R. M.; DOIG, P. A. Equine endometrial biopsy. In: Morrow, D.A. **Current Therapy in Theriogenology**. W. B. Saunders Comp., p. 723-729, 1986.

KNOWLES, J. E.; SQUIRES, E. L.; SHIDELER, R. K.; TARR, S. F.; NETT, T. M. Relationship of progesterone to early pregnancy loss in mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.13, n.9, p.528-533, 1993.

LEBLANC, M. M. Advances in the Diagnosis and Treatment of Chronic Infectious and Post-Mating-Induced Endometritis in the Mare. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin. v.45. n.2. p.21-27. Jun. 2010.

LEBLANC, M. M.; ASBURY, A. C.; LYLE, S. K. Uterine clearance mechanisms during the early postovulatory period in mares. **Am J Vet Res**. v. 50. p. 864-867. 1989.

LEBLANC, M. M.; *et al.* Differences in Uterine Position of Reproductively Normal Mares and Those with Delayed Uterine Clearance Detected by Scintigraphy. **Theriogenology**, v. 50. p. 49-54. 1998.

LEBLANC, M. M.; *et al.* Lymphatic clearance of India Ink in reproductively normal mares and mares susceptible to endometritis. **Biology of Reproduction**, v. 1. p. 501-506. 1995.

LEITE, D. M. G. Efeitos negativos do estresse sobre o desempenho reprodutivo. 2002. Pós Graduação em Ciências Veterinárias, UFRGS.

LIMA, R. A. S.; CINTRA, A. G. Revisão do agronegócio do cavalo. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Brasília, 2016. Disponível em: www.agricultura.gov.br/assuntos/camarassetoriaistematicas/documentos/camaras-setoriais/equideocultura/anos-anteriores/revisao-do-estudo-do-complexodoagronegocio-do-cavalo.

LIRA, R. A.; PEIXOTO, G. C. X.; SILVA, A. R. Transferência de embrião em equinos: revisão. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.3, n.4, p.132-140, 2009.

LISA, H. M.; MEADOWS, S. 2008. Essential management practices in commercial equine embryo transfer. **Proceedings 7th International Symposium on Equine Embryo Transfer**, Cambridge, UK. p.101-102.

LOPES, E. P. Parâmetros reprodutivos de éguas Mangalarga marchador em projeto comercial de transferência de embriões. 2004. Dissertação (mestrado). Viçosa, 2004.

LOSINO, L.; ALVARENGA, M. A. Fatores críticos em programas de transferência de embriões em equinos no Brasil e Argentina. In: **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões**, 18., 2006, Araxá. *Acta Scientiae Veterinariae*, Porto Alegre, v. 34, p. 39-49, 2006.

- LOSINO, L.; UROSEVIC, I. M. Equine embryo transfer. Technical and practical considerations for application on horse production programs. Proceedings...19th International Congress on Biotechnology in Animal Reproduction (ICBAR). Novi Sad, Serbia, p.23-30, 2015.
- LOVE, C. C.; NOBLE, J. K.; STANDRIDGE, S. A.; BEARDEN, C. T.; BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D.; CAVINDER, C. A. The relationship between sperm quality in cool-shipped semen and embryo recovery rate in horses. **Theriogenology** 84, 587-593, 2015.
- MAMBELLI L. I; WINTER, G. H. Z.; KERKIS, A.; MALSCHITZKY, E.; MATTOS, R. C.; KERKIS, I. A novel strategy of mesenchymal stem cells delivery in the uterus of mares with endometriosis. **Theriogenology**, v.79, p.744–750. 2013.
- MARINONE, A. I.; MUCCI, N.; KAISER, G.; LOSINNO, L.; ARMENDANO, J.; RODRIGUEZ, E. M.; MUTTO, A.; REDOLATTI, C.; CANTATORE, S.; HERRERA, M. F.; HERRERA, J. M.; FUMUSO, E. Reproductive Characteristics in Old and Young Subfertile Mares: Are They Really Different? **J Equine Vet Sci**, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2017.02.012>.
- MARIZ, T. M. A.; ANJOS, A.G.; FLOR, J. M.; FLOR, L. M. A. M.; LIMA, C. B.; GIVISIEZ, P. E. N.; AZEVEDO, P. S. 2008. Influências do clima sobre a atividade reprodutiva de éguas da Raça Mangalarga Machador no Estado de Sergipe. **Acta Veterinaria Brasilica** 2:39-43.
- MATTOS, R.C.; *et al.* Monta natural e inseminação artificial com sêmen fresco diluído em éguas árabe. **Arq Fac Vet UFRGS**. v.24. p.57-64. 1996.
- MCCUE, P. M.; NISWENDER, K. D.; MACON, K. A. Modification of the flush procedure to enhance embryo recovery. In: **J Equine Vet Sci**, 2003. 23 . p. 1-2.
- MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L. Embryo transfer and related technologies. In: **Current therapy equine reproduction**. Saunders Elsevier, 2007, p.319-334.
- MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L. Morphological assessment of the equine embryo. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v.192, p.406-416, 1988.
- METCALF, E. S. The effect of Platelet-Rich Plasma (PRP) on intraluminal fluid and pregnancy rates in mares susceptible to Persistent Mating-Induced Endometritis (PMIE). **J Equine Vet Sci**, v.34, p.128, 2014.
- MONTECHIESI, D. F. Transferência de embriões em equinos e os fatores relacionados as taxas de prenhez. **Ciência Animal**, 25(1); 187-194, 2015 – Edição Especial.
- MORRELL, J. M.; NUNES, M. M. Practical guide to single layer centrifugation of stallion semen. **Equine vet. Educ.** v.30, p.392-398, 2018.
- NAGAO, J. F.; NEVES NETO, J. R.; PAPA, F. O.; ALVARENGA, M.A.; FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; DELL'AQUA, J. A. Induction of double ovulation in mares using deslorelin acetate. **Anim Reprod Sci**, v.136, p.69-73, 2012.

NIELSEN, J.M. Endometritis in the mare: A diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy. **Theriogenology**, v. 64, p.510-518, 2005.

OGURI, N.; TSUTSUMI, Y. 1972. Nonsurgical recovery of equine eggs, and an attempt at nonsurgical egg transfer in horses. **J. Reprod. Fertil.** 31:187-195.

OGURI, N.; TSUTSUMI, Y. Nonsurgical egg transfer in the mare. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 41, p.313-320, 1974.

ORTIS, H. A.; FOSS, R. R.; MCCUE, P. M.; BRADECAMP, E. A.; FERRIS, R. A.; HENDRICKSON, D. A. Application of PGE2 to the Uterine Tube Surface Enhances Fertility in Selected Subfertile Mares. **J Equine Vet Sci**, v.33, p.896--00, 2013.

PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A.; DELL'AQUA JR, J. A.; MONTEIRO, G. A.; SILVA, Y. F. R. S.; NETO, C. R. **Manual de Andrologia e Manipulação do sêmen**. Botupharma, 2014. Disponível em: www.botupharma.com.br.

PASCOE, R. R. Vulvar conformation. In: **Current Therapy in Equine Reproduction**. Saunders Elsevier, 2007, p.140-45.

PAVÃO, G. D. A. Utilização de células tronco mesenquimais autólogas para tratamento de éguas com endometrite crônica degenerativa. 2013.66f. Dissertação (Doutorado em Medicina Veterinária). **Universidade Estadual Júlio Mesquita Filho (UNESP)**, Botucatu, SP, 2013.

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

QUEIROZ, F. J. R. Biópsia endometrial como método auxiliar de diagnóstico da subfertilidade e da infertilidade na égua (*Equus caballus*, L. 1728), 1991. 75f. Dissertação (Mestrado em Reprodução), **Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária**, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ.

RAMIRES, NETO C.; MONTEIRO, G.A.; SOARES, R.F.; PEDRAZZI, C.; DELL'AQUA JR, J. A.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. Effect of Removing Seminal Plasma Using a Sperm Filter on the Viability of Refrigerated Stallion Semen. **J Equine Vet Sci**, v.33, p.40-43, 2013.

REGHINI, M. F.; RAMIRES NETO, C.; SEGABINAZZI, L. G.; CASTRO CHAVES, M. M.; DELL'AQUA, C. P.; BUSSIÈRE, M. C.; DELL'AQUA, J. A. JR.; PAPA, F. O.; ALVARENGA, M. A. Inflammatory response in chronic degenerative endometritis mares treated with platelet-rich plasma. **Theriogenology**, v.86, p.516-522. 2016.

RESENDE, H. L. Comparação da perfusão vascular folicular, luteal, uterina e perfil hormonal plasmático entre éguas jovens e idosas suplementadas ou não com L-arginina comparação da perfusão vascular folicular, entre éguas. Dissertação (Mestrado). 118f. **Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Botucatu, São Paulo, 2014.

RICKETTS, S. W.; ALONSO, S. The effect of age and parity on the development of equine chronic endometrial disease. **Equine Veterinary Journal**, Newmarket, v. 23, n. 3, p. 189-192, May, 1991.

RIDDLE, W. T.; LEBLANC, M. M.; STROMBERG, A. J. Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a Thoroughbred practice. **Theriogenology**, v. 68, p. 395-402, 2007.

RIERA, F. L. **Equine embryo transfer**. In: SAMPER, J. C. Equine breeding management and artificial insemination, Philadelphia: Saunders Elsevier, 2009. P.185-199.

RIERA, F. L. General techniques and organization of large commercial embryo transfer programs. **Clinical Theriogenology**, Philadelphia, v. 3, p. 318-324, 2011.

RIVIER, C.; RIVEST, S. Effect of estress of the activity of the hypothalamicpituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms. **Biology Reproduction**, v.45, p.523-532, 1991.

ROCHA FILHO, A. N.; PESSÔA, M. A.; GIOSO, M. M.; ALVARENGA, M. A. Transfer of equine embryos into anovulatory recipients supplemented with short or long acting progesterone. *Anim Reprod*, v.1, p.91-95, 2004. Samper JC. Induction of estrus and ovulation: Why some mares respond and others do not. **Theriogenology**, v.70, p.445-447, 2008.

SAMPER, J. C.; PYCOCK, J. F.; MCKINNON, A. O. **Current therapy in equine reproduction**. Sant Louis: Saunders Elsevier, p.319-334, 2007.

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

SPENCER, T. E.; JOHNSON, G. A.; BURGHARDT, R. C.; BAZER, F. W. Progesterone and placental hormone actions on the uterus: insights from domestic animals. **Biology of Reproduction**, v.71, p.2-10, 2004.

SQUIRES, E. L. 2006. Superovulation in Mares. **Vet. Clin. Equine** 22:819-830.

SQUIRES, E. L. Perspectiva para o uso de biotecnologias na reprodução equina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33 (Supl 1), p.69-82, 2005.

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

SQUIRES, E. L.; IMEL, K. L.; IULIANO, M. F.; SHIDELER, R. K. 1982a. Factors affecting reproductive efficiency in equine embryo transfer programme. **J. Reprod. Fertil.** 32:409-414.

SQUIRES, E. L.; MCCUE, P. M.; VANDERWALL, D. K. The current status of equine embryo transfer. **Theriogenology**, 1999; v.51; p.91-104.

SQUIRES, E. L.; SEIDEL, G. E. Collection and transfer of equine embryos. Fort Collins: Colorado State University. **Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory**, n.8, 1995, n.08, p.24-31.

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

STANTON, M. B.; STEINER, J. B.; PUGH, D. G. Endometrial cysts in the mare. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.24, no.1, p,14-19, 2004.

TESTA, A. C.; CARMO, M. T.; ALVARENGA, M. A. Early embryonic death in anovulatory recipients mares supplemented with long acting progesterone. **Acta Sci Vet**, v.33, p.335, 2005.

TROEDSSON, M. H. T. Diseases of the Uterus. *In*: ROBINSON, N.E. (Ed.) **Current Therapy in Equine Medicine 4**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1997. Cap.12. p.517-524.

TROEDSSON, M. H. T. Endometritis. *In*: MCKINNON, A. O. *et al.* (Ed.) **Equine Reproduction**. Philadelphia: Wiley- Blackwell, 2011. cap. 271, p. 2608 – 2619.

ULIANI, R. C.; RAMIRES, C. N.; DELL'AQUA, J. R.; PESSOA, M. A.; CAMARGO, A. L.; ALVARENGA, R.; ALVERENGA, M. A. Effect of mare breed and age on embryo transfer efficiency, **Animal Reproduction Science**, 2010; 121S;p.303-304.

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

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

VANDERWALL, D. K.; WOODS, G. L. 2007. Embryo transfer and newer assisted reproductive techniques for horses, p 211-219. *In*: Youngquist R.S. & Threlfall W.R. (Eds) **Current Therapy in Large Animal Theriogenology**. Saunders, Missouri.

VARNER, D. D. Strategies for Processing Semen from Subfertile Stallions for Cooled Transport. **Vet Clin North Am Equine Pract**, v.32, p.547-560, 2016.

WATSON, E. D. Post-breeding endometritis in the mares. **Equine Reproduction Science**, v.60-61, p.221-22, 2000.

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

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

WOODWARD, E. M.; *et al.* Susceptibility to persistent breeding-induced endometritis in the mare: relationship to endometrial biopsy score and age, and variations between seasons. **Theriogenology**. v.78. p.495–501. 2012.