



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS

VINÍCIUS FERREIRA DE ALMEIDA

TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM EQUINOS: O ESTADO DA ARTE

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

2014

VINÍCIUS FERREIRA DE ALMEIDA

TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM EQUINOS: O ESTADO DA ARTE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Médico Veterinário.

Orientadora: Prof^a Dr^a. Larissa Pires Barbosa

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
COLEGIADO DE MEDICINA VETERINÁRIA

COMISSÃO EXAMINADORA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

VINÍCIUS FERREIRA DE ALMEIDA

TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM EQUINOS



Profa. Dra. Larissa Pires Barbosa
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



Prof. MSc. Carmo Emanuel Almeida Biscarde
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



Profa. Msc. Patrícia Alves Dutra
Doutoranda da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Cruz das Almas, 25 de março de 2014.

AGRADECIMENTO

À Deus, pela sua presença em minha vida, e por mais um sonho realizado.

Aos meus pais, por sempre me incentivarem e me apoiarem em todos os momentos, pelos seus ensinamentos, conselhos, e por todos os esforços realizados para eu conseguir chegar até aqui.

Aos meus irmãos; tios e tias; primos e primas por estarem sempre ao meu lado, me aconselhando e incentivando para seguir o meu caminho.

A Elaine, minha namorada, agradeço pelo seu amor e pelo incentivo, além de sempre estar ao meu lado nessa vitória e nas demais que estão por vim. Aos seus pais, irmãos e demais parentes, também agradeço pelo apoio e preocupação durante todo esse tempo.

Agradeço muito a equipe da Clínica do Rancho, como também a equipe Ciclos Reprodução animal, pois seus ensinamentos foram de grande valia na constituição de meu conhecimento teórico e prático na área em que pretendo atuar.

Agradeço a todos os amigos conquistados durante esses anos, em especial; Hélio, Fellipe, Anderson (Cebola), Joelmo Jr, Laís, Claudinéia, Monna, Mariana, Raisal, Tiago (Pedrita), pelo apoio e incentivo em todos os quesitos, tanto profissionais como também no âmbito pessoal.

Agradeço também a todos os estagiários que foram contemporâneos a mim, por seu companheirismo, e pela constituição de novas amizades.

Aos meus professores, também agradeço, pelos conhecimentos passados tanto dentro como fora das salas, pois além da relação aluno-professor, pudemos construir grandes amizades.

Um grande agradecimento, tenho a prestar à minha orientadora, Prof^a Dr^a Larissa Pires, por seus direcionamentos e conselhos, que de forma brilhante nos guiou durante todos esses anos de graduação.

RESUMO

A transferência de embriões equinos é uma biotecnologia em ascensão no mercado equestre global, o Brasil representa um lugar de destaque, tornando-se o maior produtor mundial de embriões. Esta técnica possibilitou a utilização na reprodução tanto de éguas idosas e aquelas que a rotina esportiva, não possibilita uma gestação; como também aquelas fêmeas geneticamente superiores que apresentam alguma patologia, cuja gravidade dificultaria que sua gestação chegue a termo. Com isso, o emprego dessa biotecnologia permite a transferência dos embriões dessas éguas geneticamente superiores denominadas de doadoras, para as denominadas de receptoras, que passaram por uma criteriosa avaliação e sincronização, tornando-se aptas para gestar e criar novos potros. Esta técnica vem mostrando excelentes resultados quando bem executada, revelando um mercado promissor dentro da veterinária.

Palavras chave: Doadoras, Receptoras, Sincronização de estro.

ABSTRACT

Equine embryo transfer is a biotechnology that is on the rise in the global equestrian market, Brazil is one of the countries where it is mostly used, becoming the largest embryo producer. This technique is can be used in both old mares and those that sport routine, that don't all own a pregnancy, as well as those genetically superior females who have some disease, whose severity would not allow a successful birth, the use of this biotechnology allows the transfer of these genetically superior embryos from donor mares to recipients, who went through a thorough evaluation and synchronization, making it suitable for gestating and creating new foals. This technique has shown excellent results when properly performed, revealing a promising market in veterinary medicine.

Keywords: Estrus Synchronization, Donor, Receiving

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FSH	Hormônio Folículo Estimulante
TE	Transferência de Embriões
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofina
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
LH	Hormônio Luteinizante

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	08
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
2.1 Fisiologia reprodutiva da égua.....	10
2.2 Seleção de doadoras para Programa de Transferência de Embriões.....	12
2.3 Seleção de receptoras para Programa de Transferência de Embriões.....	14
2.4 Sincronização de estro entre doadoras e receptoras de embriões.....	17
2.5 Técnica de transferência de embriões em equinos.....	20
2.6 Resultados dos Programas de TE em equinos.....	23
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	25
4 REFERÊNCIAS.....	26

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas tem ocorrido um avanço expressivo do uso de novas biotecnologias reprodutivas na espécie equina, sendo a transferência de embriões (TE) um dos procedimentos que tem se tornado cada vez mais utilizado (SQUIRES, 2005; LOSINNO; ALVARENGA, 2006; KUMAR et al., 2008). Sendo hoje, o Brasil o maior produtor mundial de embriões, responsável por 41% do total das transferências de embriões na espécie equina (GOMES, 2013). Esta biotécnica envolve a coleta de embrião de uma égua doadora, geneticamente superior e sua inováção para o útero de uma égua receptora, geneticamente inferior, que levará a gestação a termo (KUMAR et al., 2008; ALVARENGA, 2010).

O desenvolvimento desta técnica na espécie equina foi bastante lento comparado a outras espécies domésticas, alcançando uma escala comercial apenas no início dos anos 90 (PASHEN et al., 1993; ALLEN, 2005). A partir desta década, verificou-se um crescimento na utilização da TE, uma vez que houve um aumento das taxas de gestação com a aplicação desta técnica. Outro fator de grande relevância para o crescimento da TE esta relacionado às associações de criadores de cavalos (ABCC's), que em 2002 passaram a registrar potros nascidos a partir da TE, pois anterior a essa data apenas era aceito o nascimento de um produto registrado por égua/ano (FLEURY; ALVARENGA, 2000; PERES et al., 2002; ALLEN, 2005; MCKINNON; SQUIRES, 2007).

Com o advento da TE, éguas com idade avançada puderam ser utilizadas novamente na reprodução, melhorando seus resultados de fertilidade, aumentando assim o número de seus descendentes. O que não era observado com a utilização dos métodos de reprodução natural, devido uma elevação da taxa de perda embrionária e decréscimo da fertilidade à medida que os animais envelhecem (LOPES, 2002; SQUIRES et al., 2003).

Outra indicação para TE seriam éguas de competição, já que a gestação seria um fator de impedimento para participação desses animais na rotina esportiva (SQUIRES et al., 2003). Podendo também atender à éguas subférteis por problemas adquiridos: tais como idade; danos cervicais, adquiridos a partir de partos distócicos; ou de forma menos comum, sendo indicada para

reproduzir éguas que apresentam alguma outra patologia; que incluem laminites, cólicas, artrite severa, amputações, égua com baixa produção de leite e baixa habilidade materna (LIRA, 2009). No entanto é importante conhecer a hereditariedade de cada patologia para que não se faça a seleção de animais com características indesejáveis para o meio produtivo.

A complexidade da TE é relativamente baixa quando comparada com técnicas mais avançadas. As dificuldades do programa estão relacionadas com a organização e coordenação de etapas como: o manejo da égua doadora; qualidade da égua receptora; da sincronização de estro entre doadora e receptora e habilidade técnica na transferência dos embriões, o que afeta diretamente o sucesso da sobrevivência dos embriões transferidos (LIRA, 2009).

Desta forma, objetiva-se apresentar uma revisão literária sobre a transferência de embriões em equinos, demonstrando os principais pontos a serem avaliados na fisiologia reprodutiva dos eqüinos, na seleção das doadoras e receptoras, na sincronização de estro entre elas; bem como, a descrição da técnica utilizada na transferência e os resultados alcançados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fisiologia reprodutiva da égua

A égua é considerada poliéstrica estacional de fotoperíodo positivo, apresentando o seu período reprodutivo durante os meses que constituem a primavera e o verão, quando há maior disponibilidade de forragem e uma maior relação claro/escuro (PERES et al., 2006).

Como nas estações de primavera e verão os períodos de escuro são reduzidos, há também uma redução na secreção de melatonina pela glândula pineal, afetando direta e indiretamente o hipotálamo e a produção de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH). Quando produzida em altos níveis a melatonina inibe a liberação de GnRH pelo hipotálamo, afetando assim, a produção de hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) pela hipófise, influenciando a função ovariana e o ciclo estral da égua (GINTHER et al., 2004).

O sítio exato da ação da melatonina ainda não foi completamente elucidado em equinos, todavia seu papel na sazonalidade reprodutiva ocorre pelo aumento de sua secreção durante as horas de escuro, o que é presenciado nos meses que compõem o outono e inverno (NAGY et al., 2000; PERES et al., 2006).

As éguas apresentam ciclo estral com duração de 21 dias +/- 3,5 dias. Este ciclo é subdividido em fase folicular que apresenta uma duração média de 5 a 7 dias e uma fase luteal, com média de 12 a 16 dias durante a estação reprodutiva (GINTHER., 1992). A duração da fase folicular é primariamente influenciada pela estação do ano, podendo também sofrer variações individuais ou raciais.

A duração do estro decresce com o decorrer da estação, coincidindo com o pico do verão, época no qual os dias são mais longos e a foliculogênese ocorre de forma mais rápida, devido à presença de maiores concentrações de FSH e LH, influenciadas pelo fotoperíodo positivo e redução da concentração

de melatonina (GINTHER et al, 2004). A duração média do estro, ou fase folicular, para observações individuais varia de 2 a 12 dias e parece ter repetibilidade dentro de cada indivíduo (DAELS et al., 2002).

A fêmea equina apresenta receptividade sexual ao garanhão, durante o estro, estando o trato genital preparado para aceitar a copula, transportar os espermatozoides e o oócito (ALVARENGA, 2000). O endométrio equino apresenta-se edemaciado e o útero apresenta aumento da sua contratilidade durante o estro, fazendo com que a pressão intrauterina se eleve e auxilie o transporte dos espermatozoides até a base do corno uterino (ALLEN et al., 2002).

Já no diestro ocorre a secreção de progesterona pelo corpo lúteo, e mesmo que os folículos em desenvolvimento secretem estrogênio, haverá um predomínio de progesterona produzido pelo corpo lúteo, o qual imprime suas características sobre o trato reprodutivo feminino, preparando-o para receber e nutrir o conceito (DAELS; HUGHES, 1993; ALVARENGA, 2000). Na presença da progesterona, há uma alteração no edema uterino, reduzindo tanto sua quantidade a zero, como também a sua permanência deste adema (PELEHACH et al., 2002).

Os exames de palpação retal e/ou ultrassonografia por via retal podem ser utilizados como ferramenta para a determinação das fases do ciclo estral das éguas, assim como para diagnosticar possíveis alterações fisiológicas. Durante o estro, o tônus uterino é relativamente flácido, tornando-se mais tenso durante o diestro, por volta do 16º ao 25º dia de gestação, quando o útero apresenta sua tensão máxima, o que é de suma importância para implantação da vesícula embrionária (HAYES; GINTHER, 1986). No exame de palpação via retal não se consegue distinguir o tônus uterino de éguas vazias tratadas com progesterona, das éguas que estão com prenhez de até 30º dia (WATSON et al., 2003).

No ovário haverá o desenvolvimento dos folículos devido a sua dependência às gonadotrofinas, as quais serão expressas após o aparecimento dos receptores de FSH nas células da granulosa e de receptores de LH nas células da teca interna, acarretando no crescimento de diversos folículos em sincronia (WEBB et al., 1999), apresentando posteriormente um crescimento preferencial de um, ocasionalmente de dois, ao qual denomina-se

de folículo dominante. As ovulações ocorrem quando o folículo atingem por volta de 35mm a 60mm, com média de 45 mm, na presença do LH, essa variação de tamanho esta relacionada ao tamanho da égua, além da influencia dos níveis de FSH e LH(GINTHER, 1993).

Diferente dos demais mamíferos, a secreção de LH pela hipófise na égua não ocorre em forma de pico. Na maioria dos casos, a liberação do LH ocorre 6 a 8 dias antes da ovulação, observando assim de modo crescente a sua produção, chegando ao seu nível mais alto por volta do dia 1 a 3 pós ovulação (GINOTHER, 1993). Camargo et al. (2008) sugeriram que a queda na liberação de LH pós-ovulação ocorre devido a progesterona agir sobre a hipófise, alterando a responsividade da glândula a ação do GnRH, o que acarreta na diminuição da secreção do LH.

Mesmo apresentando como uma variação individual, as ovulações múltiplas podem ocorrer normalmente num plantel, evidenciando que há um fator hereditário envolvido. A incidência de ovulações múltiplas em um determinado ciclo estral em éguas está entre 4 e 43%, que podem ser influenciados por vários fatores como, raça, predisposição genética e estágio reprodutivo, assim como, devido a intervenção farmacológica com a utilização de aplicações de FSH equino (GINOTHER, 1992; SQUIRES et al.,1993).

2.2 Seleção de doadoras para programa de transferência de embriões

A técnica de TE foi tradicionalmente usada em doadoras idosas, com dificuldade de gestação, com incidência de alta mortalidade embrionária ou aborto. Contudo, ainda há limitações para a utilização da TE nessa categoria de éguas, já que há uma redução na probabilidade delas produzirem um embrião normal e apto para ser transferido para éguas reprodutivamente saudáveis (MCKINNON; SQUIRES, 2007).

Mais recentemente, a TE tem sido usada tanto em éguas idosas, como também, em éguas campeãs nas modalidades esportivas as quais participam, valendo salientar que tais éguas são dotadas de uma genética de grande aceitação dentro de cada raça (SQUIRES et al., 1999; SQUIRES, 2005; LOSINNO; ALVARENGA, 2006; MCKINNON; SQUIRES, 2007).

A TE possibilita que éguas dotadas de patologias crônicas tais como: laminites, cólicas, artrites severas, amputações, até mesmo infecções uterinas e danos cervicais, possam doar seu material genético, gerando novos produtos em receptoras sadias (LIRA, 2009). O ideal seria a utilização de éguas livres de qualquer patologia, todavia algumas das doadoras acabam por adquirir alguma patologia uterina bem como a endometrite, que constitui uma das barreiras para a produção de embriões.

Segundo Malschitzky *et al* (2007) a inflamação uterina pode ser gerada a partir de uma reação imunológica onde tanto bactérias e fungos, como o próprio espermatozoide são identificados como antígenos; para melhorar o índice de gestação, assim como recuperação embrionária nessa éguas com endometrite, o pesquisador utilizou de uma lavagem uterina, utilizando ringer com lactato, 6 a 12 horas após a cobertura, sem prejuízo para o transporte espermático.

Batista *et al* (2008) descreveu que no momento da recuperação embrionária o líquido obtido tinha uma característica turva, ou límpido dotados de grumos e após as análises laboratoriais, puderam notar a presença de alguns microrganismos bem como: *Streptococcus zooepidemicus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Candida sp*, estabelecendo um alerta para que a técnica de TE obtenha o máximo de cuidado no manuseio de materiais, gerando redução dos níveis de contaminantes tanto de origem fecal, como também da pele. Visando assim uma menor contaminação por agentes infecciosos, bem como aumentar os índices de recuperação embrionária na espécie.

Além do manejo sanitário, as doadoras participam de um programa que é constituído por monitoramentos tanto do comportamento reprodutivo, juntamente com a dinâmica folicular ovariana, bem como a observação de algumas patologias ovarianas com o emprego da palpação retal e ultrassonografia transretal (VANDERWALL; WOODS, 2007). As éguas devem apresentar um bom funcionamento ovariano, haja vista que deles partirão os oocistos a serem fecundados, cujo objetivo é a produção dos embriões

Com o auxílio do ultrassom pode ser feita a avaliação da dinâmica folicular da égua, onde se observa o crescimento dos folículos, que segundo Peres *et al* (2006) esta em torno de 2,19 +/- 0,86mm por dia, chegando ao

estágio de folículo dominante cujo tamanho ideal para ovulação esta por volta de 32 a 35mm, quando haverá a expressão de receptores para LH, tornando o folículo sensível a ação dos indutores de ovulação.

Muitas vezes podemos encontrar doadoras que já ovularam, estas apresentam um corpo lúteo em formação, ou até mesmo já formado, neste caso faz-se uso de hormônios exógenos, bem com a prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), lisando o corpo lúteo e reiniciando a foliculogênese (RIERA, 2009; MELO et al., 2012).

Para a seleção das doadora normalmente se leva em conta o ganho genético empregado por ela(SQUIRES, 2005; LOSINNO; ALVARENGA, 2006; MCKINNON; SQUIRES, 2007), mesmo que essas fêmeas apresentem alguns distúrbios patológico, bem como os danos cervicais e as endometrites, não interferindo na foliculogênese e manutenção dos embriões nos primeiros dias (RIERA, 2009).

2.3 Seleção de receptoras para programa de transferência de embriões

A seleção das receptoras deve ser criteriosa, por interferir diretamente no sucesso do programa de transferência (VANDERWALL; WOODS, 2007; MCKINNON; SQUIRES, 2007), haja vista que elas são responsáveis pela gestação dos embriões transferidos, fornecendo condições ótimas para a sua manutenção e desenvolvimento (FLEURY et al., 2007).

As receptoras devem ser reprodutivamente saudáveis; ou seja, tanto livre de anormalidades uterinas e ovarianas, como também com ciclo estral normal (VANDERWALL; WOODS, 2007). É importante também avaliação do seu estado nutricional, sua saúde dentária, musculoesquelética, boa visão, qualidade de úbere e boa habilidade materna (SQUIRES et al., 1999; HARTMAN, 2011).

Um bom programa de sanidade deve ser requerido das receptoras, devendo ser livres das principais enfermidades infectocontagiosas, em especial anemia infecciosa equina, babesiose, leptospirose e adenite equina. Além desse controle, é importante que na propriedade em que estejam alojadas, as éguas que ingressarem recentemente sejam submetidas à quarentena,

evitando assim o comprometimento das outras receptoras e doadoras (LOSINNO; ALVARENGA, 2006).

Outro critério de seleção segue um preceito básico, preconizando a escolha de uma receptora cujo porte físico se assemelhe ao da doadora (VANDERWALL, 1999; SQUIRES, 2003; RIERA, 2009). Segundo Allen et al. (2002) um maior tamanho da receptora em relação à doadora acarreta em um maior tamanho do potro ao nascer, o que também é visto quando se utiliza um tamanho menor da receptora, tornando o tamanho do potro ao nascer mais reduzido, já que o espaço uterino é proporcional ao tamanho da égua. Todavia, não se indica a utilização de raças muito pesadas gestando potros de raças consideravelmente menores, pois o potro pode nascer com um peso além do desejado para sua raça.

Outro problema está relacionado à produção excessiva de leite pela receptora da raça de grande porte, que é maior do que a doadora, trazendo ao potro alguns distúrbios digestivos, devido à grande produção de leite; além de desencadear também alguns problemas de crescimento, bem como os defeitos flexurais adquiridos, fechamento precoce das epífises e um ganho de peso diário muito superior ao de sua raça (LOSINNO; ALVARENGA, 2006).

A avaliação completa do aparelho genital externo e interno da receptora deve ser levando em conta, para que qualquer alteração possa ser diagnosticada, avaliando por palpação retal ou ultrassonografia se há algum distúrbio no tamanho e tônus uterino; na cérvix e ovários. Os animais que apresentarem alguma alteração, tanto anatômica como também funcional, devem ser descartados (SQUIRES, 1993).

Há inúmeros tipos de receptoras que podem ser utilizadas no programa: aquelas cujo ciclo estral é normal, éguas em fase transicional ou em anestro. Preferencialmente utiliza-se éguas cíclicas, que apresentam as fases do ciclo estral bem definidas, onde observa-se algumas alterações no útero devido à influência dos hormônios envolvidos em cada fase (SQUIRES, 2003; RIERA, 2009).

Essas alterações ocorrem em cada fase do ciclo estral. No diestro as dobras endometriais individuais não são distinguidas, quando comparada com o período do estro, onde a ecogenicidade é homogênea. Após o estro, já no início do diestro, o edema desaparece, a densidade tecidual aumenta, e os

cornos ficam mais tubulares, sendo de intensidade intermediária em relação ao tônus e espessura encontrados na fase de estro e no início da prenhez (GINTHER; BERGFELT, 1993). Carnevale et al. (2000) afirmam que o tônus uterino reduzido pode indicar um ambiente não totalmente compatível com o crescimento e desenvolvimento embrionário, acarretando em um alto índice de perda embrionária.

Pode-se também utilizar éguas que se enquadram em uma fase transicional ou em anestro, já que no início da temporada reprodutiva não encontram facilmente éguas cíclicas em abundância. Para usá-las no programa é necessária a administração diária ou semanal de progesterona, já que este progestágeno prepara o útero para receber o embrião e garante a manutenção da prenhez. Contudo esta terapia deve se estender até os 100 – 120 dias de gestação, quando a placenta passa a produzir progesterona em níveis adequados (SQUIRES, 2003; RIERA, 2009).

Um bom programa de fotoperíodo artificial vem se mostrando um método confiável para garantir a entrada das éguas em ciclicidade normal no início da temporada, evitando gastos com progestágenos. Como protocolo, as éguas são expostas a um total de 16 horas de luz a cada 24 horas, com início do dia 21 de junho, já que esse é o dia do solstício de inverno, considerado o dia com a menor incidência de luminosidade solar (HARTMAN, 2011). A suplementação das éguas com luz artificial acarreta na diminuição da produção de melatonina pela pineal, evitando que este neurohormônio atue inibindo a produção do GnRH e assim do LH e FSH, sucessivamente (GINTHER et al., 2004).

Após a observação da ciclicidade das éguas receptoras é necessária à avaliação do estro de cada uma, para o monitoramento do crescimento folicular e ovulação, assim como a avaliação do corpo lúteo no momento da inovulação. É preferível que duas ou mais receptoras estejam disponíveis para cada doadora (MCKINNON; SQUIRES, 2007).

Carnevale et al. (2000) classificou as receptoras por meio da palpação e ultrassonografia transretal em: aceitáveis, quando apresentaram corpo lúteo bem definido, tônus uterino e cervical variando de bom a excelente, e nenhuma outra alteração no útero; e marginalmente aceitáveis, quando a imagem do corpo lúteo é pobre ou com pouca tonicidade uterina e cervical. Estes critérios

avaliativos permitiram escolher no momento da inovulação aquela que apresenta as melhores condições reprodutivas para receber o embrião, já que um corpo lúteo de melhor qualidade é responsável por uma maior produção de progesterona (WILSHER et al., 2006; VANDERWALL; WOODS, 2007).

O ideal é que no momento da coleta dos embriões as receptoras estejam sincronizadas com as doadoras e aptas para receber os embriões. Onde é preferível realizar a transferência na égua que estiver com as condições uterinas melhores e corpo lúteo mais bem formado, oferecendo condições ótimas para a manutenção do embrião, além disso, a égua deve ter uma boa habilidade materna para criar os novos potros até sua separação em definitivo (LIRA et al.,2009).

2.4 Sincronizações de estro entre doadoras e receptoras de embriões

A sincronização entre doadoras e receptoras de embriões vem se mostrando um fator marcante para o sucesso da técnica de TE, sendo recomendada a utilização de no mínimo duas receptoras para cada doadora, garantindo a escolha do melhor ambiente uterino para a recepção do embrião (MCKINNON; SQUIRES, 2007). Losinno e Alvarenga (2006) afirmaram que, uma melhor relação doadora:receptora, é estimada em um número de éguas receptoras 50% maior que o total de gestações desejáveis, pois cada égua pode gerar mais que um embrião por estação, com isso, a mesma deve ser contada em relação ao número de embriões que se planeja gerar.

A espécie equina dentre as espécies de animais de grande porte, é a que demonstra ser menos rigorosa quanto às exigências para a sincronização da ovulação entre doadoras e receptoras no momento da TE, para o alcance de altas taxas de prenhez (ALLEN, 2005). Os métodos utilizados para sincronização das éguas doadoras e receptoras são: ovulação espontânea, ovulação induzida e terapias hormonais para as receptoras que não ovularem. Contudo, um número mais elevado de receptoras é exigido quando se trabalha com ovulações espontâneas das doadoras, já que uma avaliação previa demonstrará qual das receptoras estará apta para receber em seu ambiente uterino o embrião da doadora (ZERLOTTI, 2012).

A sincronia entre o embrião e o ambiente uterino é essencial para o desenvolvimento de uma gestação, já que o ambiente uterino se altera sob a influência da progesterona, com isso, um embrião, em um estágio diferente do útero ao qual foi transferido, pode estar sujeito a níveis hormonais e fatores de crescimento que não correspondem à exigência de sua fase. Além disso, o embrião assincrônico pode ser impedido de realizar ou realizar de forma deficiente o reconhecimento materno e com isso, não suprimir adequadamente a ação luteolítica da $PGF_{2\alpha}$ (WILSHER; KOLLING; ALLEN, 2005).

Estudos mostram que para uma melhor sincronização entre as doadora e as receptoras, as éguas receptoras devem ovular um dia antes ou até três dias após a ovulação da égua doadora (VANDERWALL, 2000; SQUIRES, 2003; LOSINNO; ALVARENGA, 2006; MCKINNON; SQUIRES, 2007; HARTMAN, 2011). Contudo, Jacob et al. (2012) demonstraram que as receptoras que ovulam um dia antes até cinco dias depois das doadoras podem ser utilizadas em programas de TE sem alterar os resultados. Com esse aumento de intervalo, um número menor de receptoras deve ser avaliado para atingir um sucesso na taxa de prenhez desejada.

Segundo Carnevale et al. (2000), o tempo de ovulação entre as doadoras e receptoras pode ser importante no momento da escolha de qual receptora será utilizada para a transferência. Sugerindo também que o tônus uterino reduzido pode indicar um ambiente não inteiramente adequado para o desenvolvimento do embrião. Alonso (2007) confirmou que a utilização de éguas com endométrio homogêneo, uniforme, com útero tubular e de bom tônus obtiveram melhores resultados e índices de prenhez.

Devido uma ampla variação entre a duração do período de cio da égua, é difícil obter uma precisão ao determinar o momento exato da ovulação, já que as éguas costumam ovular 24 a 48 horas antes do término do cio. Para tentar superar essa barreira, iniciou-se o emprego de indutores de ovulação, reduzindo o período de estro e sincronizando as inseminações ou utilização do garanhão, já que o serviço do reprodutor passa a ser empregado em até 48 horas após a indução (MELO et al., 2012).

De modo geral, a administração de indutores de ovulação depende da avaliação ovariana, com análise do tamanho do folículo dominante, que se

encontra responsivo ao LH a partir de 32 mm em éguas (PALMER et al., 1993). A gonadotrofina coriônica humana (hCG) é amplamente utilizada em éguas que apresentam folículos pré-ovulatórios de no mínimo 32mm, acarretando na ovulação em até 48h, em 80% dos casos (BERGFELT et al., 2000). Contudo, apesar de sua ampla utilização, a hCG tem demonstrado uma inconveniente, que é a formação de anticorpos após sua aplicação sucessiva, já sendo encontrado estes anticorpos após até mesmo da segunda aplicação (MELO et al., 2012).

Outro indutor de ovulação utilizado é o GnRH sintético, que durante o estro e na presença de um folículo dominante, estimula a liberação de LH, induzindo assim a ovulação em até 48 horas após a sua administração (BERGFELT et al., 2000).

Quando as receptoras apresentam condições uterinas inadequadas mesmo no diestro, protocolos de progesterona são utilizados com a função principal de melhorar o ambiente uterino para a recepção do embrião; pois em níveis elevados, mantém o corpo lúteo e a égua em diestro; alterando o tônus uterino para uma condição ideal (SQUIRES, 2003; RIERA, 2009).

Caiado et al (2007) demonstraram outra aplicabilidade para a progesterona, relacionando-a com a função de sincronização e regulação do estro, onde são necessárias aplicações diárias de curta ação, a fim de manter o corpo lúteo, até o dia 10 do ciclo, momento pelo qual se realiza a aplicação de $PGF_{2\alpha}$ para lisar o corpo lúteo e assim reiniciar o ciclo adequadamente.

Até os dias atuais a progesterona vem veiculada por uma solução oleosa, cuja aplicação se faz intramuscular com intervalos de sete dias até o 100° e 120° dias de gestação, mantendo seus níveis séricos adequados para a manutenção da prenhez, sem obrigatoriedade da existência de um corpo lúteo (BRINGEL et al., 2003). Hinrichs e Kenney (1987) demonstraram que éguas ovariectomizadas tratadas com 300 mg/dia de progesterona em óleo mantiveram a gestação após a transferência de embrião, protocolo seguido até no mínimo 100 dias onde a placenta passa a atuar, mantendo assim a gestação.

Outro método de sincronização utilizado é dependente da administração de $PGF_{2\alpha}$ ou um de análogo, em éguas que apresentam um corpo lúteo

durante a avaliação. Este método é utilizado quando há um número grande de receptoras, e estas recebem uma dose luteolítica de $\text{PGF}_{2\alpha,1}$ ou 2 dias após a administração nas doadoras, já que as receptoras devem ter seu ciclo igual ou atrasado em relação as doadoras, apresentando assim uma melhor condição uterina para recepção do embrião (RIERA, 2009).

Mesmo após a sincronização o veterinário responsável deve realizar um exame transretal para que se possa escolher a receptora que possua as condições uterinas e ovarianas mais próximas da doadora correspondente (MCKINNON; SQUIRES, 2007).

2.5 Técnicas de transferência de embriões em equinos

A técnica de TE consiste na coleta de um embrião, produto do acasalamento de uma égua e um reprodutor geneticamente superior, para uma posterior transferência para uma égua receptora (DAVIES, 2003).

Após o acasalamento ou inseminação, as doadoras terão seus úteros lavados para recuperação do embrião no dia sete ou oito, haja vista que este demanda de cinco a seis dias para ser transportado até o útero, chegando na forma de mórula ou blastocisto inicial, e logo se desenvolva para a fase de blastocisto expandido. Muito embora seja possível coletar embriões no dia nove, o sucesso da taxa de transferência é, geralmente, inferior ao alcançado quando da recuperação entre os dias sete ou oito (SQUIRES; SEIDEL, 1995). Para Wilsher et al. (2010) embriões de nove e 10 dias têm sido considerados muito grandes e frágeis para sobreviver à rotina dos procedimentos que envolvem a TE.

Durante muitos anos os procedimentos realizados para recuperação dos embriões equinos permaneceram inalterados (SQUIRES et al., 2003). Consistindo de uma coleta não cirúrgica transcervical, descrita primariamente por Oguri e Tsutsumi em 1972, onde se realizou a lavagem do corno ipsilateral à ovulação, inflando um balão na base deste corno. Nos dias atuais, o balão é inflado no corpo do útero e tracionado caudalmente para que se ajuste e tampona o óstio cervical, lavando-se os dois cornos simultaneamente, pois o

embrião equino movimentar-se por todo o útero da doadora, aumentando assim a chance de recuperá-lo (FLEURY et al., 2001; SQUIRES et al., 2003; SILVA, 2003).

A lavagem uterina ocorre após a introdução de um cateter de silicone (Sonda bivona) guiado pelo dedo indicador através da cérvix, utilizando em seguida de uma seringa para inflar o balão com o ar e ajustá-lo no óstio cervical. Logo depois, o útero é lavado com uma solução de ringer com lactato. Outra solução utilizada é o DPBS (solução fosfato tamponada modificada por Dulbecco), que consiste num composto de solução salina, soro fetal bovino, penicilina (100 UI/ml) e estreptomicina (100 µg/ml) (VANDERWALL, 2000). Alvarenga, em 1992, demonstrou que embriões coletados através de lavado contendo ringer com lactato obtiveram taxa de penhez de 64%, comparados com 57% das prenhez obtidas da utilização do DPBS. Devido sua eficiência, o ringer com lactato vem sendo a solução de escolha para a maioria dos lavados uterinos.

Dependendo do tamanho do útero da doadora, infunde-se de 1 até 2 litros em cada lavado, realizando uma média de 3 lavagens por animal. Em seguida acopla-se ao circuito, e quando montado o sistema poderá ter o fluxo de recuperação constante, sendo o fluido recuperado em um copo com filtro de milipore (REIRA; MCDONOUGH, 1993; REIRA, 2000), recuperando normalmente de 95% a 98% do volume infundido, podendo ser auxiliado com uma massagem uterina via retal (IMEL, 1981; CARVALHO, 2000; SILVA, 2003).

Após as lavagens e recuperação do embrião, o mesmo é envasado, juntamente com o meio de manutenção, em palheta plástica de 0,25mL ou 0,5mL, a depender do tamanho do embrião coletado. Distribuindo assim, de forma alternada, porções de solução de manutenção; ar; solução de manutenção e o embrião; ar novamente; e solução de manutenção. Este procedimento minimiza os movimentos do embrião dentro da palheta e assegura a perfeita expulsão do embrião para dentro do útero (SILVA, 2003).

Novos estudos vêm nos mostrando resultados positivos a respeito da inovulação não cirúrgica associada à avaliação e seleção das receptoras (FLEURY et al., 2007), esta é uma técnica muito menos invasiva, rápida e com grau considerável de prenhez, na qual consiste em depositar o embrião no

corpo do útero com o uso de uma pipeta de inseminação que atravessa a cérvix, guiada pelo dedo indicador. Contudo, vários outros aplicadores também tem sido descritos, como o modelo Hannover de transferência de embriões bovinos, o aplicador modelo Francês e uma adaptação de tubo de aço + tubo de polietileno.

A complexidade da TE é relativamente baixa quando comparada com técnicas mais avançadas, desde que os embriões sejam transferidos por técnica não cirúrgica no útero de éguas receptoras, permitindo ao clínico executar facilmente tal procedimento na fazenda, uma vez que este seja proficiente no manejo reprodutivo equino (HINRICHS, 2005).

A avaliação das receptoras deve ser realizada num período antes da transferência, para que se possa selecionar a égua mais adequada para receber o embrião. Tal seleção fundamenta-se na avaliação ovariana e característica de corpo lúteo, onde este deve se apresentar com ecogenicidade uniforme e seu contorno bem delimitado, presumindo assim que esta apresenta uma melhor produção de progesterona naquele momento, contribuindo assim, para que estas apresentem as melhores condições reprodutivas. Então, por palpação deve-se observar a cérvix firme e fechada, aumento de tônus uterino (cilíndrico e tubular). Além disso, não pode haver nenhuma evidência de dobras endometriais ou secreção uterina no exame ultrassonográfico (CARNEVALE et al., 2000).

Apesar da rigorosa seleção de uma receptora adequada para o momento da inovulação, a manutenção embrionária requer vários fatores combinados, que podem ser influenciados pelo método de transferência, o técnico, tamanho e idade do embrião, morfologia embrionária, estação do ano, sincronização entre doadoras e receptoras, procedimentos para armazenagem de embriões, idade e histórico reprodutivo de doadoras de embrião (CARNEY et al., 1991; VANDERWALL, 2000; SQUIRES, 1995; MCKINNON; SQUIRES, 2007). Com isso, algumas éguas podem não sustentar a gestação além da fase embrionária, resultando em uma enorme perda econômica na indústria de cavalos, em que 30-40% das perdas embrionárias ocorrem dentro das duas primeiras semanas da concepção (BETTERIDGE, 2000).

Um aspecto importante dentro do manejo reprodutivo do programa de TE é o reconhecimento que a perda embrionária ocorrerá inevitavelmente em

algumas éguas, entretanto, o diagnóstico deve ser realizado com brevidade, haja vista que é crucial a utilização da égua receptora ainda na mesma estação de monta, minimizando os custos. A descoberta da perda embrionária precoce pode ser realizada através de exames ultrassonográficos a cada 10 dias ou duas semanas durante o início da gestação (VANDERWALL, 2008).

Após a confirmação da gestação, as receptoras devem ser elevadas para uma categoria de importância dentro do sistema produtivo. Sabendo que as transferências normalmente são realizadas no verão, as éguas devem receber água e alimento de qualidade e em boa quantidade, além disso, as pastagens devem dispor de boas sobras. Outra questão importante, é evitar movimentações desnecessárias do grupo de éguas, impedindo ao máximo a inserção de novos indivíduos ao grupo, o que geraria novas disputas de dominância e estresse, aumentando assim os riscos de uma perda embrionária (LOSINNO; ALVARENGA, 2006).

Segundo Riera (2011), as receptoras devem receber as melhores pastagens, especialmente nos primeiros 40 dias após a transferência, pois as taxas de prenhez são afetadas drasticamente durante esse período se elas apresentarem perda de peso excessivo, mesmo se as mesmas estiverem em boa condição corporal. Squires, em 2003, salienta que as éguas receptoras devem receber, além de uma pastagem de qualidade, um programa de arraçãoamento que consiste em um alimento concentrado similar ao de manutenção durante os dois primeiros terços da gestação, aumentando para um com energia extra no terço final da gestação, onde há uma demanda maior para o desenvolvimento fetal.

2.6 Resultados dos programas de TE em equinos

A aplicabilidade desta biotecnologia vem tomando seu espaço dentro do mercado em decorrência de a um grande avanço científico nos últimos tempos, refletindo em um aumento da eficiência da técnica, tornando assim, a relação custo/benefício cada vez mais atraente, e com isso a TE torna-se cada vez mais comum na indústria do cavalo (LIRA, 2009).

Muito embora os resultados encontrados em relação a taxa de gestação com o uso da técnica de transferência de embriões varie bastante, os

resultados provavelmente estão relacionados com inúmeras medidas que devem ser tomadas dentro do programa de TE, como uma seleção adequada das receptoras, e a minuciosa execução da técnica. Os dados encontrados por Carnevale et al. (2000) referem-se a taxas de gestação de 67,8% e 57,6% aos 14 e 50 dias, respectivamente. Já Fleury et al. (2001) e McKinnon e Squires (2007) referem-se a taxas de gestação aos 15 dias de 74,8% e 75%, respectivamente.

Eulálio et al (2013) encontrou uma taxa gestacional com média de 85%, em éguas mangalarga marchador examinadas no 15º dias de gestação, números superiores aos encontrados por Fleury et al(2001) e McKinnon e Squires (2007). Entretanto seu dados corroboram aos resultados obtidos por Taveiros et al (2008), que obteve resultados de 88,3% de prenhes.

Já quanto as perdas gestacionais, Eulálio et al (2013) apresentou números girando em torno de 15,3% entre o 15º e 60º dias, semelhante ao encontrado por Carnevale (2000) com 16% entre os dias 12 e 50 de gestação, todavia ainda superiores aos resultados encontrados por Taveiros et al (2008) que estavam por volta de 11,7 % de perda embrionária, do 15º até o 45º dia de gestação. Duarte et al (2002), chegou a obter o resultado de perda embrionária em torno de 8,53%, muito abaixo dos demais, haja vista que as éguas foram também examinada dentro do intervalo de 11 e 50 dias de gestação

Dentro dos programas comerciais de TE no Brasil conduzidos por profissionais criteriosos e experientes nas raças Mangalarga (FLEURY e ALVARENGA, 1999) e Mangalarga Marchador (JACOB et al., 2002; GOMES et al., 2004) foi demonstrado que o método transcervical gera taxas de prenhez consistentes em torno de 70%. Assim como uma taxa de perda embrionária entre 5 e 45% descrita em 1993 por Ball (DUARTE et al., 2002).

Tendo como base as constantes pesquisas na área da tecnologia de embriões equinos, e com elas, os seus resultados cada vez melhores, tanto os criadores de cavalos, bem como os médicos veterinários vem se mostrando motivados a concentrar seus investimentos nessa biotecnologia (LIRA, 2009).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os novos e expressivos resultados sobre a transferência de embriões equinos, a técnica vem sendo cada vez mais empregada na rotina dentro da criação tanto nacional quanto mundial. Com as novas pesquisas, o método atualmente desenvolvido vem se mostrando de menor complexidade, denotando uma maior atenção para a sincronização entre as doadoras e receptoras, bem como a avaliação das receptoras no momento da inovulação dos embriões, que é considerado um fator determinante para o sucesso da técnica.

Com essa difusão, a tecnologia de embriões vem sendo empregada em consequência do constante interesse de criadores em obter um maior número de produtos anuais tanto das éguas doadora, como também dos garanhões, com isso o mercado vem se mostrando receptivo para os profissionais capacitados de desenvolver essa biotecnologia tão rica em detalhes.

4 REFERÊNCIAS

ALLEN, W.R. The Development and Application of the Modern Reproductive Technologies to Horse Breeding. *Reproduction of Domestic Animals*, v.40, pg310-329. 2005.

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

ALONSO, M.A. et al. Efeito das características uterinas e dia do ciclo na taxa de prenhez e níveis séricos de progesterona em éguas candidatas á receptoras de embriões. Faculdade de medicina veterinária e zootecnia, UNESP, Botucatu, 2007.

ALVARENGA M.A.; ALVARENGA F.C.L.; MEIRA C. Some modifications in the technique used to recover equine embryo. *Resumos 13rd Internaional Symposium on Equine Embryo Transfer*, Buenos Aires, Argentina. pg. 34-35.1992.

ALVARENGA, M.A. Problemas e soluções no programa de transferência de embriões equinos no Brasil I. *Acta Scientiae Veterinariae*, pg38 (2), 319-323.2010.

ARRUDA, R. P. Manejo reprodutivo das fêmeas equinas. In: *Semana de Zootecnia*, 13. 1990, Pirassununga. In: *REPRODUCAO E MELHORAMENTO ANIMAL*, Campinas. Anais... Campinas: Fundação Cargill, pg 126. 1990.

BATISTA, I.O.; OLIVEIRA, A.A.F.; PINEIRO JUNIOR, J.W.; PEIXOTO, R.M.; TALES, J.A.A.; MOTA, R.A. Endometrite por *Candida* sp e outros microrganismos associados em éguas doadoras de embrião na Zona da Mata do Estado de Pernambuco – Brasil. *Medicina Veterinária*, Recife, v.2, n.4, p.41 44, out-dez, 2008.

BERGFELT D. R.; Estrous synchronization mare. In: Equine breeding management and artificial insemination. Philadelphia: Saunders; pg.195-228.2000.

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

BRINGEL, B.A.; JACOB, J.C.F.; ZIMMERMAN, M. Biorelease progesterone LA 150 and its application to overcome effects of premature luteolysis on progesterone levels in mares.Rev. Bras. Reprod. Anim., v.27, pg.498-500. 2003.

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. Zootecnia. 36: pg 360-368. 2007.

CAMARGO C.E.; WEISS, R.R.; KOZICKI, L.E.; DUARTE M.P.et al. Aspectos relacionados com a recuperação embrionária em éguas da raça Brasileiro de hipismo, utilizadas em programa comercial de transferência de embrião. Vet. e Zootec. 20(4): 74-83. 2013.

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

CARNEY N.J.; SQUIRES E.L.; COOK V.M.; SEIDEL G.E.; JAKSON D.J. Comparison of pregnancy rates from transfer of fresh versus cooled, transported equine embryos. Theriogenology. v.36:pg23-32.1991.

DAELS, P. F.; HUGHES, J. P.The Normal Estrous Cycle. In: MCKINNON, A. O.;VOSS, J. L. Equine Reproduction. Philadelphia: Lea &Febiger, cap. 14, pg. 121-132. 1993.

DAVIES MOREL, M.C.G. Selection of the mare and stallion for breeding. In: Equine reproductive physiology, breeding and stud management. CAB international, cap 12, pg 105-130, 2003.

DUARTE, M.B.; VIEIRA, R.C.; SILVA, F.O.C.; Incidência de perda de prenhez até o 50º dia em éguas Quarto de Milha. *Ciência Rural*, Santa Maria, V32, n 4, pg 643- 647, 2002.

EULÁLIO, N.C.; BORGES, L.M.; LOPES, E.P.; GOMES, P.S.; VALLE, G.R.; Taxas de perda gestacional até 60 dias são afetadas por características cíclicas da égua receptora de embrião Mangalarga Marchador. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.65, n.2, p.397-403, 2013.

FLEURY J.J.; PINTO A.J.; MARQUES A.; LIMA C.G.; ARRUDA R.P. Fatores que afetam a recuperação embrionária e os índices de prenhez após transferência transcervical em eqüinos da raça Mangalarga. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 38. Pg29-33.2001.

FLEURY P.D.C.; ALONSO M.A.; SOUSA F.A.C.; ANDRADE A.F.C. ; ARRUDA R.P. Uso da gonadotrofina coriônica humana(hCG) visando melhorar as características reprodutivas e fertilidade de receptoras de embriões eqüinos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* Pg27-31.2007.

GINTHER, O.J.; BERGFELT, D.R. Growth of small follicles and Concentrations of FSH During the equine estrous cycles. *Journal of Reproduction and Fertility*, v 99, pg. 105-111, 1993.

GINTHER, O.J. *Reproductive Biology of the Mare, Basic and Applied Aspects.* (2th ed.). Wiscosin: Equiservices Publishing. 1992.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O; BEG, M.A. Seasonal influence on equine follicle dynamics. *Animal Reproduction*, pg 31-44. 2004.

GOMES, J.L. Avaliação de receptoras para transferência de embriões em equinos –Monografia – Universidade de Brasília / Faculdade de Agronomia
Orientação Prof. Dr. Rodrigo Arruda de Oliveira – BRASÍLIA DF 2013. 52 p. II.

GONSALVES, P.B.D; FIGUEIREDO, J.R; FREITAS, V.J.F. Biotécnicas Aplicadas á Reprodução Animal. Sao Paulo: Varela, pg. 340, 2002.

HARTMAN, D.L. Embryo Transfer. In: MCKINNON, A.O. et al. Equine reproduction. 2nd ed. Oxford: Wiley- Blackwell, V.2, cap 303, p 2871-2879. 2011.

HAYES, K. E. N.; GINTHER, O. J. Role of progesterone and estrogen in development of uterine tone in mares. Theriogenology, v. 25, p. 581-590, 1986.

HINRICHS K. & CHOI Y.H. Assisted reproductive techniques in the horse. Clin. Tech. Equine Pract. 4:210-218. 2005.

JACOB J.C.F. et al. Effect of embryo age and recipient asynchrony on pregnancy rates in a commercial equine embryo transfer program. Theriogenology, Stoneham, v.77, n 6, pg 1159-1166, 2012.

KUMAR, D.; JHAMB, D.; KUMAR, N.; BADIAL, D. Foals born through fresh embryo transfer in India. In Proceedings of the 10th International Congress of World Equine Veterinary Association Jan. 28 – Feb. 1, - Moscow, Russia, 567-56, 2008.

LIRA. R.A.; PEIXOTO G.C.X.; SILVA A.R. Transferência de embrião em equinos: Revisão. Acta Veterinária brasílica, v.3, n.4, pg. 132-140, 2009.

LOPES, E.P. Desmistificando a transferência de embriões. Top 2000 Mangalarga Marchador. v.1, n.1, pg .6, 2002.

LOSINNO, L. & ALVARENGA, M.A. Fatores críticos em programas de transferência de embriões em equinos no Brasil e Argentina. *Acta Scientiae Veterinariae*, 34 (1), pg39-49. 2006.

MALSCHITZKY, E.; JOBIM, M.I.M.; GREGORY, R.M.; MATOS, R.C.; Endometrite na égua, novos conceitos. XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Curitiba, 2007.

MARONDE, E.; STEHLE, J.H. 2007: The mammalian pineal gland: Known facts unknown facets. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 18(4): 142-149.

MCKINNON, A.O. & SQUIRES, E.L. Embryo transfer and related technologies. In Samper, J.C., Pycock, J.F. & McKinnon, A.O., *Current Therapy in Equine Reproduction*.pg. 319-334. 2007.

MEIRA C. & HENRY M. Evaluation of two non-surgical equine embryo transfer methods. *J. Reprod. Fertil.* V.44:pg712-713.1991.

MELO CM. et al. Eficiência do acetato de deslorelina e do extrato de pituitária eqüina na indução da ovulação em éguas. *Vet. e Zootec. set.*; 19(3). Pg392-398. 2012

NAGY, P.; GUILLAUME, D.; DAELS, P. Seasonality in mares. *Animal. Reproduction Science*, v. 60-61, p. 245-262, 2000.

PALMER E. Induction of ovulation. In: McKinnon AO, Voss JL. *Equine reproduction*.Malvern: Lea &Febiger; pg.344-347. 1993.

PASHEN, R.L.; LASCOMBES, F.A.; DARROW, M.D. The application of embryo transfer to polo ponies in Argentina. *Equine Veterinary Journal*, 25,pg 119–121. 1993.

PELEHACH, L. M.; GREAVES, H. E.; PORTER, M. B.; DESVOUSGES, A.; SHARP, D. C. The role of estrogen and progesterone in the induction and dissipation of uterine edema in mares. *Theriogenology*, v. 58, p. 441-444, 2002.

PERES, K.R.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; ALVARENGA, M.A. Utilização do primeiro ciclo ovulatório da estação reprodutiva para produção de embriões em éguas sob condições tropicais. *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, São Paulo, v. 43, n. 2, pg. 270-279, 2006.

PERES, K.R.; TRINQUE, C.L.N.; LIMA, M.M.; DUARTE, M.P., DUARTE, M.C.G.; MEIRA, C. Non surgical equine embryo transfer: a retrospective study. *Theriogenology*, 57 (1), pg558. 2002.

RIERA F.L. & MCDONOUGH J. Commercial embryo transfer in polo ponies in Argentina. *Equine Vet.J.* 15 pg116-119.1993.

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

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

SILVA L.A. Técnica ultra-sonográfica de injeção intrauterina para transferência de embriões em eqüinos. Tese (Pós-graduação em Medicina Veterinária), Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa- MG, Brasil, pg 145.2003.

SILVEIRA L.L, SOUZA R.V., MELO N.S.S. , PEZZINI T.G., MCMANUS C. RUMPF R., A bipartição como alternativa para melhorar os índices de gestação na transferência de embriões equinos. *Ciência Rural*, Santa Maria, v 35, n.2, pg.412-416, mar- abr, 2005.

SQUIRES, E.L.; CARNEVALE, E.M.; McCUE, P.M. Embryo technologies in the horse. *Theriogenology* , v.59, pg.151-170, 2003.

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

SQUIRES E.L. & SEIDEL G.E. Collection and transfer of equine embryos. *Animal Reproduction Biotechnology Laboratory Bulletin. Colorado State University, Fort Collins*.pg.397.1995.

TAVEIROS, A.W.; MELO, P.R.M.; MACHADO, P.P.; FREITAS NETO, L.M. et al. Perda de conceito em programa de inseminação artificial e de transferência de embriões em eqüino da raça Mangalarga Marchador. *Medicina Veterinária, Recife*, v.2, n.2, p.28-33, abr-jun, 2008.

VANDERWALL D.K. Current Equine Embryo Transfer Techniques. In: Ball B.A. (Ed.) *Recent Advances in Equine Theriogenology*. International Veterinary Information Service.2000.

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

VANDERWALL D.K. Early embryonic loss in the mare. *Eq. Vet. Sci.* 28.Pg691-702.2008.

WATSON, E. D.; THOMASSEN, R.; NIKOLAKOPOULOS, E. Association of uterine edema with follicle waves around the onset of the breeding season in pony mares. *Theriogenology*, v. 59, p. 1181-1187, 2003.

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

WILSHER, S.; CLUTTON-BROCK, A. ALLEN, W.R. Successful transfer of day 10 horse embryos; influence of donor-recipient asynchrony on embryo development. *Reproduction*, Cambridge, v.139,n 3, pg 575-585, Mar. 2010.

ZERLOTTI, M. Como selecionar e preparar éguas receptoras para a transferência de embriões. In: Conferência anual da ABRAVEQ. Anais da Revista Brasileira de Medicina Veterinária Equina, campinas, v.41, pg 68-71, 2012.