



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

**WELLBER ALMEIDA CARDOSO SANTOS**

**EFEITO DA IDADE DE ÉGUAS DOADORAS EM PROGRAMAS DE  
TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES**

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA**  
**DEZEMBRO – 2020**

**WELLBER ALMEIDA CARDOSO SANTOS**

**EFEITO DA IDADE DE ÉGUAS DOADORAS EM PROGRAMAS DE  
TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES**

Trabalho de Conclusão de Curso  
submetido ao Colegiado de Graduação em  
Medicina Veterinária do Centro de Ciências  
Agrárias, Ambientais e Biológicas da  
Universidade Federal do Recôncavo da  
Bahia como requisito parcial para obtenção  
do título de Médico Veterinário.

Orientadora: Profa. Dra. Larissa Pires Barbosa

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA**

**DEZEMBRO – 2020**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
COLEGIADO DE MEDICINA VETERINÁRIA  
CCA 620 - TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO  
COMISSÃO EXAMINADORA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

WELLBER ALMEIDA CARDOSO SANTOS

EFEITO DA IDADE DE ÉGUAS DOADORAS EM PROGRAMAS DE  
TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES



---

Profa. Dra. Larissa Pires Barbosa

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



---

Profa. Dra. Evani Souza de Oliveira Strada

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



---

Dra. Rosileia Silva Souza

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Cruz das Almas, BA, 17 de dezembro de 2020.

## DEDICATÓRIA

Dedico a Deus, pelo dom da vida, por ter me permitido lutar por meus objetivos, ter sido presente em minha vida em todos os momentos, me capacitando para enfrentar todos os obstáculos e adversidades da vida e por conceder a benção de concluir este curso tão sonhado.

Aos meus pais Claudio e Marilene, zelarem por mim, me apoiando em todos os momentos e sendo refúgio e fortaleza nas horas difíceis.

A Luma, minha irmã, que de forma impar, sempre me incentivou a ser alguém melhor e a buscar por meus sonhos e meu irmão Evandro, que foi gerado por outra família, mas aprouve ao senhor me presentear com a sua amizade, muito do que sou e serei é reflexo da sua pessoa.

Aos meus tios Edvando, Antônio, Elival, Vanda e Antônia.

A todos os amigos e colegas que indireta e diretamente somaram para que isso acontecesse, não citarei todos, mas preciso evidenciar alguns pela sua relevância, contribuição e convívio. Quero iniciar por Evanildo *in memoria*, seus conselhos foram os grandes motivadores para que eu pudesse chegar até aqui e jamais serão esquecidos, você sempre estará vivo em minha memória, agradeço a Roberto, que desde o primeiro momento me acolheu como filho em Cruz das Almas, sempre presente e contribuído de forma espontânea e protetora, aos amigos que foram meus colegas de casa, dentre todas as mudanças durante todo tempo vivido ali, de forma particular, dedico também a Valmiro, Caio e Victor, um verdadeiro quarteto fantástico, á Maria Luiza por tudo compartilhado, apoio, incentivo e por sua amizade.

## EPÍGRAFE

“Mas Deus escolheu as coisas loucas deste mundo para confundir os sábios; e Deus escolheu as coisas fracas para confundir as fortes.”

I Coríntios 1:27

SANTOS, Wellber Almeida Cardoso, Efeito da idade de éguas doadoras em programas de transferência de embriões.

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2020.

Orientadora: Profa. Dra. Larissa Pires Barbosa

## RESUMO

O estudo teve como objetivo avaliar a influência da idade das doadoras equinas na eficiência de programa de transferência de embriões. Foram utilizadas 57 doadoras da raça Quarto de Milha, com idade entre cinco e 25 anos, divididas em três tratamentos (T), sendo: T1 (n=27): fêmeas com idade entre cinco e 15 anos; T2 (n=24): entre 16 e 19 anos e T3 (n=6): entre 20 e 25 anos. Utilizou-se sêmen fresco diluído de dois garanhões da raça Quarto de Milha. As doadoras foram inseminadas mediante apresentação de um folículo de 30-35 mm de diâmetro e presença de edema uterino. No dia oito após a ovulação, foi realizado lavado uterino para recuperação embrionária e inovulação em uma égua receptora. Foi realizado um total de 208 lavados uterinos, distribuídos nos três tratamentos: T1 (68); T2 (114) e T3 (26). Foi avaliada a taxa de recuperação embrionária, número de embriões por ciclo e taxa de gestação aos 60 dias. Os dados não apresentaram distribuição normal, utilizou-se o teste de Kruskal Wallis, a 5% de significância. A taxa de recuperação embrionária foi superior para fêmeas entre 5 a 15 anos, com 92,75% de recuperação e não houve diferença entre éguas de 16 a 19 anos, com 58,77% e acima de 20 anos, com 65%. O número de embriões recuperados por ciclo foi maior em éguas com 5-15 anos (1,14 embriões/ciclo), quando comparado com éguas entre 16-19 anos (1,02) e acima de 20 anos (1,0), sem diferença entre esses dois últimos grupos. A taxa de gestação alcançada com os embriões transferidos foi superior para éguas mais jovens (62,32%), em relação às éguas entre 16-19 anos (34,21%) e acima de 20 anos (23,08%). O avanço da idade exerce ação negativa sobre a eficiência reprodutiva de éguas em programas de TE, sendo notado declínio na taxa de recuperação embrionária, redução no número de embriões por ciclo e taxa de gestação a partir dos 16 anos de idade.

Palavras-Chave: Éguas idosas, embrião, taxa de gestação.

SANTOS, Wellber Almeida Cardoso, Embryo transfer programs using donor mares at different ages.

Federal University of Recôncavo of Bahia, Cruz das Almas, 2020.

Advisor: Dr. Larissa Pires Barbosa.

### **ABSTRACT**

The study aimed to evaluate the influence of the age of equine donors on the efficiency of the Embryo Transfer Program. 57 donors of the Quarter Horse breed were used, aged between five and 25 years, divided into three treatments (T), being: females aged five to 15 years; T2 (n=24): between 16 and 19 and T3 (n=6): between 20 and 25 years. Fresh semen diluted from 2 Quarter Horses stallions was used. The donors were inseminated through a follicle of 30-35 mm in diameter and the presence of uterine edema, on day 8 after ovulation, uterine lavage was performed in order to recover one or more embryos, when recovered, they were evaluated, manipulated and innovated in a recipient in order to obtain a pregnancy. A total of 208 uterine lavages were performed, distributed in the three treatments, T1 (68); T2 (114) e T3 (26). Embryonic recovery rate, number of embryos per cycle and pregnancy rate at 60 days were evaluated. The data did not present a normal distribution, the Kruskal Wallis test was used, at 5% significance level. The rate of embryonic recovery was higher for females aged 5-15 years, with 92.75% recovery and there was no difference between 16-19 year old mares, with 58.77% and over 20 years old, with 65%. The number of embryos recovered per cycle was higher in mares aged 5-15 years (1.14 embryos / cycle), when compared to mares aged 16-19 years (1.02) and over 20 years (1.0), no difference between these last two groups. The gestation rate achieved with the embryos transferred was higher for younger mares (62.32%), compared to mares aged 16-19 years (34.21%) and above 20 years (23.08%). The advancement of age has a negative effect on the reproductive efficiency of mares in ET programs, with a decline in the rate of embryonic recovery, a reduction in the number of embryos per cycle and a gestation rate from 16 years of age.

Keywords: Elderly mares, embryo, pregnancy rate

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Influência da idade na taxa de recuperação embrionária de éguas doadoras de embriões.....21
- Tabela 2. Número de lavados uterinos, número total de embriões recuperados e número de embriões por lavado em éguas doadoras em diferentes faixas etárias.....22
- Tabela 3. Taxa de gestação aos 60 dias de embriões provenientes de éguas doadoras em diferentes faixas etárias em programa de transferência de embriões.....24



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CL	Corpo Lúteo
ICSI	Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide
IOI	Intervalo Interovulatório
PGF <sub>2</sub> $\alpha$	Prostaglandina F <sub>2</sub> $\alpha$
TE	Transferência de Embrião

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>11</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>12</b>
2.1. Transferência de embriões em equinos.....	12
2.2. Fisiologia da puberdade, maturidade e senescência na égua .....	14
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>22</b>
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>28</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>29</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A transferência de embriões (TE) é uma biotécnica que possibilita transferir um ou mais embriões no estágio inicial de desenvolvimento, de uma doadora de alto padrão genético, para o útero de éguas receptoras previamente sincronizadas, com o intuito de obter uma prenhez (ARISTIZÁBAL, 2017). A técnica em equinos foi implementada no Brasil por volta dos anos de 1987, apresentando-se desde então, como técnica eficiente para reprodução equina (FLEURY et al., 1987).

O Brasil tornou-se um país de destaque na produção de embrião *in vivo* na espécie equina. Em 2018, liderou esse *ranking*, tendo transferido 18.764 dos 21.321 embriões produzidos no mundo nessa espécie (CHAIR, 2019).

Os programas de TE tem como objetivo aumentar o plantel e o número de indivíduos produzidos por fêmeas de interesse econômico; manter éguas em reprodução, sem impacto na campanha esportiva desses animais, devido ao alto valor investido na aquisição, por ser de uma genética muito requisitada e pouco disponível, ou por alguma incapacidade adquirida de gestar (ALVARENGA e TONGUM, 2017).

Todavia, diversos são os fatores que podem interferir negativamente nos índices caracterizadores da eficiência do programa de TE, como exemplo a idade da doadora. Foi observado que éguas idosas tem impacto negativo na taxa de recuperação embrionária, tanto no que diz respeito às éguas doadoras, analisado a partir dos números de embriões recuperados, como às éguas receptoras, verificado por meio das taxas de gestação (PANZANI et al., 2016).

No que se refere ao plantel de éguas idosas doadoras no Brasil, estima-se uma ordem superior a 30%. Este índice significativo é justificado em razão da elevada demanda por progênes de determinadas fêmeas, pela superioridade genética destes animais e alto investimento na aquisição de certas doadoras, justificando assim, a necessidade de se obter por meio da TE, um maior número de descendentes possíveis para cada indivíduo (JACOB; GUERSON; FERRAZ, 2019).

A idade das éguas doadoras e/ou receptoras é um fator relevante de análise no programa de TE, pela correlação direta com a eficiência da técnica. Desta forma, o estudo teve como objetivo avaliar a influência da idade de éguas doadoras na eficiência de programa de TE.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Transferência de embriões em equinos

Os primeiros relatos da biotécnica de TE na espécie equina, foi em 1972, em Cambridge, na Inglaterra, onde ocorreu a primeira coleta e transferência de embrião por meio de técnica cirúrgica descrita por Allen (2005). No entanto, foram os pesquisadores, Oguri e Tsutsumi, na década de 70, no Japão, que obtiveram o primeiro produto nascido vivo derivado da técnica de TE pelo método cirúrgico (OGURI; TSUTSUMI, 1972)

No que se refere ao cenário brasileiro, a técnica de TE, utilizando método cirúrgico, consolidou-se um pouco mais tarde, apenas a partir de 1987, por Fleury (1987). No mesmo ano, Meira e Henry, repetiram o feito, porém, utilizaram o método não cirúrgico, sendo assim, um marco importante para ascensão e consolidação do programa no país (MEIRA; HENRY, 1987).

Em 2018, o Brasil ocupou lugar de destaque no cenário internacional, no que diz respeito a produção de embrião *in vivo*, sendo transferido no país 18.764, de um total de 21.321 produzidos no mundo, sendo seguido pelo Estados Unidos da América e França, que produziram respectivamente 1.105 e 736 embriões (CHAIR, 2019).

A TE é uma das ferramentas para o melhoramento genético que potencializa o uso das fêmeas juntamente com o uso dos machos, sendo comumente utilizada em animais de características superiores e desejáveis, pois a técnica permite obter um maior número de descendentes de determinadas éguas em uma estação de monta. Além de poder acasalar éguas com o mesmo garanhão por mais de uma vez ou com machos diferentes em uma mesma estação, quando comparado à monta natural, que em situações ideais possibilita a obtenção de uma prole por ano, proveniente do acasalamento com um garanhão (MARIONE et al., 2015).

Tem-se observado aumento na demanda por serviços de TE, pois a técnica possibilita obter um maior número possível de produtos descendentes de determinadas éguas, que se destacaram por apresentar elevado desempenho atlético, ou que produziram progênes de destaques, mediante a este fato tem se verificado o intuito por partes dos criadores em obter o máximo de aproveitamento das doadoras no que diz respeito a reprodução, mediante a sua relevante

contribuição genética para a raça e valor econômico associado (MARIONE et al., 2015).

A técnica de TE em equinos tem seu fundamento na recuperação de um ou mais embriões do útero de uma égua doadora, antes da implantação destes no endométrio, sendo esta previamente coberta por um garanhão ou inseminada artificialmente. Entre seis a nove dias após a ovulação, é realizado um lavado uterino transcervical na fêmea, visando a recuperação do (s) produto (s), e de modo sincrônico com a doadora uma égua de menor valor genético (receptora) é preparada para receber e gestar o embrião. Assim, a receptora é responsável por levar a gestação a termo e amamentar o produto (DAVIESMOREL, 2003).

É também, por meio da TE, que se torna possível a reprodução de éguas durante as campanhas esportivas, sem interferência no seu desempenho, ao mesmo tempo em que dispensa a necessidade de submetê-las a um processo de gestação e lactação. Além disso, é devido ao programa de TE que éguas idosas, cuja gestação oferece risco de vida tanto para mãe quanto para o potro, permaneçam reprodutivamente ativas. Desse modo, outro feito importante, é a obtenção de embriões em éguas com patologias reprodutivas ou de baixa fertilidade. Por fim, a técnica permite que uma égua produza mais de um potro por ano (ALVARENGA; TONGUM, 2017).

A taxa de recuperação embrionária por égua é a medida em percentagem do número de embriões recuperados por lavado uterino. Todavia, a égua é uma espécie monovulatória e não responde bem a protocolos de superovulação, esperando-se, portanto, um embrião por cada lavado, sendo que a taxa média de embriões recuperados é de 50% na espécie equina, média que é variável a depender dos múltiplos fatores determinantes para a eficiência da TE (SQUEIRES, 2003).

Além disso, o número de embriões recuperados é um parâmetro importante para avaliar a eficiência de um programa de TE, destaca-se alguns dos fatores que podem variar a taxa de desempenho da técnica, dentre eles, cita-se: idade e histórico das doadoras, manejo de receptoras, sincronia entre doadoras e receptoras, equipe técnica, tamanho e idade dos embriões, entre outros (CARNEVALE et al., 2000).

Algumas dessas características podem apresentar-se como limitadoras das taxas de eficiência da TE, influenciando negativamente os resultados da biotécnica. Desses fatores influenciadores, alguns podem apresentar-se isoladamente, e outros de maneira associada, como: o elevado percentual de doadoras idosas nos plantéis, presença de fêmeas com baixa fertilidade, dificuldades no manejo da indução de superovulação das doadoras e a manipulação de sêmen de forma inadequada, provocando assim, a necessidade de realizar de dois a três ciclos para obtenção de uma gestação (ALVARENGA, 2008; JACOB et al., 2010).

Sendo, portanto, a presença de éguas idosas no programa de TE, um fator com potencialidade para interferir na taxa de eficiência, destaca-se, que embora não se tenha precisão da quantidade de éguas com idade superior a 20 anos utilizadas para TE no Brasil, estima-se, que o percentual de utilização desses animais é superior a 30% (JACOB; GUERSON; FERRAZ, 2019).

## **2.2. Puberdade, maturidade e senescência na égua**

Na espécie equina, as fêmeas atingem a puberdade por volta dos 15 meses de idade, sendo marcado pela primeira exteriorização da manifestação de sinais específicos de estro, acompanhado de uma ovulação com formação de um corpo lúteo funcional. Alguns fatores podem antecipar ou retardar este evento, sendo influenciada pela nutrição, genética, mês do nascimento, latitude, fotoperíodo, entre outros (GUILLAUME et al., 2006).

Embora alguns indivíduos apresentem precocemente a manifestação de atividade reprodutiva, por meio do primeiro estro, não é recomendado o aproveitamento deste, a fim de se obter uma gestação, pois se entende a necessidade de outras características necessárias para que uma fêmea seja capaz de levar uma gestação a termo, como equilíbrio hormonal e desenvolvimento corporal, que na maioria das vezes são alcançados aos 36 meses (SILVA, 1998).

Em programas de TE, fêmeas jovens entre dois a quatro anos, apresentam desempenho satisfatórios no que diz respeito a taxa de gestação. Em seu estudo, Marione et al. (2015) afirmam que a taxa de recuperação embrionária foi de 70,01% para doadoras de dois a quatro anos. Para esta mesma categoria foi encontrada por Squieres e Seidel (1995) taxa de recuperação de 85%. Nesse mesmo contexto foi

de 81,5% a taxa de recuperação embrionária para esta categoria, encontrada por Alvarenga e Losino (2006).

Ainda no que diz respeito às éguas e à taxa de recuperação embrionária em função da idade, Panzani et al. (2016), estudando um plantel de doadoras com idade variando de dois a 24 anos, encontraram para as doadoras de dois a 10 anos, taxa de recuperação embrionária de 77,6%.

Com base na ciclicidade das éguas, apesar de muitas dessas ainda apresentarem atividade reprodutiva mesmo ultrapassando 20 anos de idade, a curva da atividade folicular de modo ascendente, limita-se, ao período da puberdade, ou seja, até os cinco anos de idade. Então esta atividade, estabiliza-se entre seis e 15 anos da idade do animal, e começa a apresentar-se em número decrescente, a partir daí, caminhando para a senescência (GINTHER, 1992).

Valle (1999), buscando avaliar o efeito da idade sobre a fertilidade de éguas com idade variando de três a 19 anos, observou ocorrência de diminuição da taxa de fertilidade das éguas com idade superior a 15 anos, destacando ainda, que apenas pode-se falar em senescência em fêmeas equinas, após alcançarem idade superior a 20 anos.

É evidente a existência de uma correlação negativa entre o avanço da idade e a redução no percentual da taxa de fertilidade da fêmea equina, comportamento de desenvolvimento, semelhante, portanto, as demais espécies de mamíferos. Constata-se que os menores índices de fertilidade são encontrados em éguas mais velhas (GINTHER, 1992; MARIONE et al., 2015).

Sabe-se que a senescência evolui obedecendo a uma sequência de eventos, representados pelo: alongamento da fase folicular, diminuição do número de folículos, aumento do intervalo interovulatório e inatividade ovariana persistente com predominância de folículos de diâmetro inferior a 0,5cm (MARIONE et al., 2015).

No entanto, apesar da taxa de eficiência de TE ser inferior em éguas idosas, comumente, constata-se, pela utilização dessas de forma ininterrupta, ainda que jamais tenham ficado gestantes, mesmo quando submetidas ao manejo adequado (ALVARENGA, 2010).

Entretanto, percebeu-se que as sucessivas intervenções podem predispor os animais a elevado risco em adquirirem problemas no aparelho genital, seja por ações mecânicas, como as lesões cervicais, seja por contaminações, como as infecções uterinas. Tais problemas têm apresentado números ainda mais agravantes

em éguas com idade avançada, indicando assim, que éguas idosas podem caracterizar-se como um gargalo para a eficiência do programa de TE (ALVARENGA, 2010).

Um estudo de TE avaliou a influência da idade sobre o intervalo interovulatório (IOI) em fêmeas de diferentes idades e identificou que éguas idosas (idade superior a 18 anos), registraram acréscimo de até três dias para IOI, em relação às éguas mais jovens (idade inferior a 18 anos), comprovando assim, que há uma menor taxa de crescimento folicular em éguas idosas. Além disso, os autores salientaram que éguas idosas apresentaram atividade folicular reduzida, assim como, o número de folículos e menor diâmetro destes (GUINTER et al., 2008).

Foram realizadas análises morfológicas através da microscopia de luz e eletrônica em oócitos de folículos pré-ovulatórios de éguas jovens (3-19 anos) e idosas (>19 anos), constatando que os ovócitos de éguas idosas possuem um maior número de vesículas no núcleo e no citoplasma, quando comparado às éguas jovens. Essa vacuolização foi justificada, pelo maior acúmulo de danos causados no ovócito (CARNEVALE, 2008).

Notou-se, também, que nos oócitos de éguas idosas, há uma significativa redução no número de mitocôndria quando comparado a éguas jovens, sem falar em uma maior prevalência de alterações estruturais. Sendo que os eventos de maturação e mudança na atividade mitocondrial durante a maturação do ovócito é um elemento relacionado com a baixa qualidade do mesmo (RAMBAGS et al., 2014).

Losinno e Urosevic (2015) verificaram ocorrência de maturação oocitária mais lenta e demorada em éguas mais velhas. Observou-se também, que nas doadoras com idade superior a 15 anos de idade, as melhores taxas de recuperações embrionárias foram obtidas quando realizado o lavado uterino nos dias 8,5; 9,5 e 10.

Todavia, nas doadoras com idade inferior a 15 anos de idade, os melhores dias são 6; 7 e 8, resultando, portanto, em um atraso de até quatro dias quando comparado ao melhor momento para as éguas mais novas. Tal fato, justifica-se, pela velocidade das clivagens celulares e em razão do desenvolvimento embrionário ser mais lento em éguas idosas (LOSINNO; UROSEVIC, 2015).

Algumas éguas ao apresentarem quadro de infertilidade, e tendo descartado as principais causas da ocorrência deste problema, a obstrução da tuba uterina, pode ser um diagnóstico diferencial, podendo ser pronunciado em éguas idosas. Há



uma formação de conteúdo gelatinoso, que pode ocluir parcial ou totalmente o lúmen da tuba uterina, funcionando como uma barreira mecânica para o transporte dos gametas, impedindo a fecundação (ORTIS et al., 2013).

Outro componente que tem se demonstrado como melhorador do equilíbrio hormonal das éguas é o ômega 3, atuando ainda, como agente oxidante, imunestimulante e anti-inflamatório em inflamações crônicas (LINDINGER et al., 2017).

Diante do exposto, verifica-se a necessidade de maior atenção por partes dos criadores ao optar por incluir éguas doadoras de embriões com idade avançada no programa de TE. Pois, conforme observou-se, tais animais, requisitam de maiores cuidados e atenção, tanto no que tange a nutrição, sanidade, como no seu bem estar (DITTRICH et al., 2010).

Por fim, é necessário ainda, promover o fornecimento de alimentos de fácil trituração e digestão, com elevado valor biológico, água de boa qualidade e fácil acesso, fornecimento de suplementação mineral de qualidade e principalmente maior atenção com ambiência e conforto térmico (DITTRICH et al., 2010).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado na Fazenda São Francisco, localizada no município de Cabaceiras do Paraguaçu no Recôncavo do Estado da Bahia, situada na latitude 12° 31' 32" Sul e longitude 39° 10' 45" oeste, com altitude de 160m acima do nível do mar e precipitação pluviométrica de 1.000 mm. No período de agosto de 2020 a dezembro de 2020. Foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB) sob o número 23007.00007926/2020-48.

Foram utilizadas 57 éguas doadoras, sendo todas fêmeas cíclicas da raça Quarto de Milha, variando entre 5 e 25 anos. As fêmeas foram divididas em três tratamentos (T), sendo: T1 (n=27): fêmeas com idade entre 5 e 15 anos; T2 (n=24): fêmeas com idade entre 16 e 19 anos e T3 (n=6): fêmeas com idade entre 20 e 25 anos. O delineamento foi baseado no estudo de Ginther (1992), que considera que a atividade folicular cresce até os 5 anos em éguas, estabiliza até os 15 anos e a partir dos 15 anos de idade observa-se um declínio, caracterizando senescência.

Foram realizados um total de 208 lavados uterinos, distribuídos nos três tratamentos, T1 (68); T2 (114) e T3 (26). Foram utilizadas 180 receptoras pré-selecionadas quanto à saúde reprodutiva, além de ter se verificado, que todas as fêmeas possuíam idade entre quatro e 9 anos.

As doadoras foram mantidas em sistema de pastejo rotacionado irrigado de *Tifton 86* com 29 piquetes de aproximadamente um hectare cada, sendo o período de ocupação de um dia. Os animais receberam suplementos diariamente por meio do sistema de lanchonete no piquete, sendo fornecido dieta concentrada na razão de 1% do peso vivo (PV) ao dia, além da suplementação mineral e água *ad libidum*. Já no que se refere às éguas receptoras, essas foram mantidas em pasto formado por *Buffel grass* com acesso à água e sal mineral.

Durante a estação de monta, utilizou-se dois garanhões como doadores de sêmen, ambos da raça Quarto de Milha. As coletas de sêmen foram realizadas por meio do método de vagina artificial e da utilização de uma fêmea como manequim.

Os garanhões foram alojados em instalações da própria fazenda em sistema de confinamento, sendo alimentados com feno de *Tifton 86*, ração concentrada 1% do PV, com acesso a mineralização e água *ad libidum*, além de terem sido submetidos ao exame andrológico.

O sêmen foi previamente avaliado quantos aos aspectos físicos (volume seminal, vigor espermático, motilidade espermática progressiva e concentração espermática), sendo do tipo fresco e diluído.

O sêmen foi diluído com diluente BotuSêmen® (Botupharma, Brasil), em consonância com as exigências previstas para manejo de sêmen fresco pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA), com dose inseminante de 200 - 500 milhões de espermatozoides e um volume médio de 20mL para realização das inseminações artificiais.

Inicialmente, as doadoras receberam um luteolítico no início da estação reprodutiva, com intuito de encurtar a fase luteal do ciclo estral, 5mg de prostaglandina F<sub>2α</sub> (Lutalyse® Zoetis, Brasil), via intramuscular (IM). Realizou-se palpação retal, além de ultrassonografia modo B em todas as doadoras e receptoras. Todas as fêmeas foram monitoradas a cada 48 horas, com inclusão de avaliação do crescimento folicular, presença de ovulação, acompanhamento de *status* uterino.

Para realização da inseminação artificial (IA), aguardou-se a detecção positiva de um ou mais folículo dominante com diâmetro igual ou superior a 30mm, além da constatação de edema uterino. As doadoras, portanto, foram avaliadas após 48h da inseminação, a fim de conferir se haviam ovulado a partir da presença de formação de corpo lúteo (CL). Após a avaliação, se constada a permanência de folículo uma nova IA foi realizada.

Confirmada a presença de CL no momento da avaliação, a ovulação tornou-se o parâmetro balizador para data de início do desenvolvimento embrionário, ou seja, constatada a ovulação, caracterizava o dia zero (D0) do embrião.

No dia 8 (D8), após a ovulação, a doadora inseminada foi conduzida para realização de um lavado uterino não cirúrgico (transcervical) por meio de utilização de um cateter tipo Foley de duas vias. O cateter foi introduzido no útero da fêmea, transpondo a cérvix, com fixação na entrada do útero por um balão inflável, com volume de 40mL. Seguindo infusão de solução estéril ringer lactato de acordo com a capacidade do útero. O volume de solução variou de acordo com a capacidade individual uterina de cada doadora, variando de 1 a 2L.

Após a infusão, mediante o preenchimento total do corpo e cornos uterinos, foi acoplado ao cateter um copo coletor com filtro para retenção do embrião, e subsequentemente, realizou-se a drenagem por gravidade de todo conteúdo

infundido através do cateter. Após passar pelo copo, descartava-se o conteúdo por meio de uma válvula de escape, desprezando quase que a totalidade da solução infundida, restando no copo apenas o embrião e um volume médio de 100mL do fluido.

Realizou-se também por meio de palpação retal, movimentos no útero da égua doadora com objetivo de auxiliar e facilitar a drenagem total do volume da solução infundida. No final do procedimento, avaliou-se, se o embrião estava presente no copo coletor. Estando o embrião presente, o balão foi desinflado, o cateter foi removido e a égua doadora foi liberada. No entanto, quando não se identificava a presença do embrião no copo, repetia-se o procedimento de infusão e drenagem.

Realizada a lavagem uterina, o conteúdo retido no copo coletor foi transferido para uma placa de Petri descartável, que foi conduzida à uma lupa de observação, com aumento de 10x para localização e identificação do embrião. Uma vez localizados, foram avaliados quanto à sua formação morfológica e classificados como apto ou não apto para transferência, sendo que todos foram identificados como aptos.

Os embriões foram classificados de acordo com os parâmetros de estágio de desenvolvimento e qualidade, conforme recomendações da International Embryo Transfer Society (IETS) descrito por McKinnon e Squires(1988), classificando-os em uma escala de escore variando de 1 a 5 baseado no formato, simetria, coloração, extrusão celular e integridade da zona pelúcida em ordem decrescente onde embrião apenas embriões Grau 1 (Excelente) e 2 (Bom) foram manipulados para serem transferidos.

Os embriões classificados como aptos para transferência, foram submetidos ao processo de higienização com uso de meio de manutenção específico Holding® Vitrocel Brasil. Assim, com auxílio de uma pipeta, o embrião foi transferido gota a gota, por em média 10 gotas do meio em placa de Petri a fim de uma higienização segura. Posteriormente, o embrião foi acondicionado em palheta apropriada para o seu diâmetro, encontrando-se, finalmente, pronto para ser inovulado na receptora.

Para início do procedimento de inovulação, as receptoras passaram a ser monitoradas frequentemente através de ultrassonografia modo B, com o objetivo de identificar a fêmea dentre as selecionadas, com maior índice de sincronização possível com o ciclo estral da doadora. Como parâmetro para a sincronização,

utilizavam-se as fêmeas receptoras que tinham ovulado um dia antes ou até três dias após, em relação à ovulação da doadora.

Ocorrida a avaliação e identificação da receptora com melhores características para receber o embrião, ovulação sincrônica junto a ovulação da doadora, avaliou-se também, a qualidade e saúde do útero e presença de CL, sendo esses os principais parâmetros para seleção, mediante ao plantel de receptoras disponíveis para o programa.

Avaliação precoce do embrião inovulado foi realizada ainda aos 16 dias, por meio de ultrassonografia. Todavia, esclarece-se, que para fins de diagnóstico de gestação, a avaliação embrionária apenas ocorria aos 60 dias.

Foi utilizado um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), com três tratamentos e número de repetições diferentes entre tratamentos. Os dados foram avaliados quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Os dados não apresentaram distribuição normal então foi utilizado o teste de Kruskal Wallis, a 5% de significância. Foi utilizado o programa SPSS versão 23 (1989 – 2015).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A idade das doadoras influenciou na taxa de recuperação embrionária ( $P < 0,05$ ) (Tabela 1), com melhores taxas de recuperação obtidas em éguas com idade entre 5 e 15 anos, porém entre as categorias de doadoras entre 16-19 anos e acima de 20 anos, não houve diferença.

**Tabela 1.** Influência da idade na taxa de recuperação embrionária de éguas doadoras de embriões.

Faixa etária da doadora (anos)	Lavado (+)	Lavado (-)	Total
5 – 15	92,75% (63/68) <sup>a</sup>	7,25% (05/68) <sup>a</sup>	68
16 – 19	58,77% (67/114) <sup>b</sup>	41,23% (47/114) <sup>b</sup>	114
20 – 25	65,38% (17/26) <sup>b</sup>	34,62% (09/26) <sup>b</sup>	26

Números seguidos por letras diferentes na mesma coluna diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade.

A taxa de recuperação embrionária em Programas de TE de equinos apresenta grande variação entre os relatos dos autores, sendo influenciável por inúmeros fatores, incluindo a idade da doadora, dia da coleta, atividade física, entre outros. Esses estudos apresentam taxa de recuperação de 63% (JACOB et al., 2010; 2012); 46,8% a 60,6% (PINTO et al., 2017); 55% (GOMES et al., 2014) e 71% a 76% (PESSOA et al., 2011). As taxas observadas no presente estudo se encontram dentro do esperado para a espécie, variando de 58,77% a 92,75%.

Marione et al. (2015) avaliaram a influência da idade sobre parâmetros reprodutivos em programas de TE com éguas doadoras de diferentes idades, subdividiu sua população em 3 grupos de acordo com a faixa etária, sendo G1 animais de 2 a 4 anos, G2 de 5 a 10 anos e G3 de 13 a 25 anos, demonstraram que a taxa de recuperação embrionária foi, respectivamente, de 70,1%, 71,6% e 54,9% e concluiu que não houve diferença para os grupos G1 e G2, porém ambos foram superiores ao G3. Demonstrando que há uma redução na eficiência reprodutiva de

éguas a partir dos 13 anos, corroborando com os resultados encontrados neste estudo que mostram uma queda nessa taxa a partir de 16 anos das idades das doadoras.

Dessa forma, o resultado do presente trabalho corrobora com a colocação de Ginther (1992) que afirma haver uma diminuição da atividade folicular para éguas a partir dos 15 anos de idade. Fato que justifica a semelhança existente entre o grupo de éguas com idade entre 16 a 19 anos e o grupo de fêmeas acima de 20 anos, sendo apurado neste trabalho, resultado inferior no que diz respeito da taxa de recuperação embrionária quando comparado a categoria de doadoras mais jovens. Além disso, em concordância com o trabalho supracitado, Valle (1999) afirma que há uma queda na taxa de fertilidade em éguas com mais de 15 anos.

No que se refere a quantidade de embriões recuperados em função do número de lavados realizados, gerando os dados do número de embriões por ciclo (Tabela 2), as doadoras com idade entre cinco e 15 anos apresentaram resultados superiores quando comparadas às demais categorias ( $P < 0,05$ ), sendo 1,14 o número de embriões recuperados por ciclo para esta categoria, já para éguas com 16-19 anos e acima de 20 anos não houve diferença entre elas, sendo de 1,02 e 1,00; respectivamente. Isso demonstra que éguas com mais de 16 anos apresentam menor número de embriões recuperados por ciclo.

**Tabela 2.** Número de lavados uterinos, número total de embriões recuperados e número de embriões por lavado em éguas doadoras em diferentes faixas etárias

Faixa etária da doadora (anos)	Lavados (+)	Embriões recuperados	Embriões por lavado
5 – 15	63	72 <sup>a</sup>	1,14 <sup>a</sup>
16 – 19	67	69 <sup>b</sup>	1,02 <sup>b</sup>
20 – 25	17	17 <sup>b</sup>	1,00 <sup>b</sup>

Números seguidos por letras diferentes na mesma coluna diferiram entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade.

A égua é um animal monovulatório, isso significa dizer que normalmente apenas um folículo completa seu desenvolvimento e é ovulado a cada ciclo, nesse sentido tem-se desejado aumentar a ocorrência de ovulação múltiplas, por meio de tratamentos hormonais, para tentar aumentar a taxa de recuperação embrionária por ciclo (ALVARENGA et al., 2008). Porém, Ginther (1992) afirma ser frequente a ocorrência de ovulação dupla em éguas, fato este que contribui para o aumento na taxa de recuperação embrionária por ciclo.

Apesar de se desejar aumentar a o número de ovulações por ciclo, para reduzir o custo de produção em programa de TE em equinos, através do uso de protocolos de superovulação, há um fator anatômico que tem limitado o sucesso da técnica referente a taxa de recuperação embrionária, pois na espécie a ovulação ocorre em apenas uma região, a fossa de ovulação. Portanto, este evento provoca um grande coágulo de sangue, que compromete a captação e transporte do oócito liberado subsequente (CARMO et al., 2006).

Marione et al. (2015) concluíram que o avançar da idade exerce relação positiva com a taxa de múltiplas ovulações (MO) sendo que éguas idosas apresentaram taxas superiores quando comparadas a éguas de meia idade e jovens. O estudo de Losino et al. (2000) afirma concordância, que de fato éguas mais velhas apresentam maior taxa de MO. Porém, os autores não informaram haver correlação entre elevada taxa de MO e aumento no número de embriões recuperados por ciclo. No presente estudo não foi avaliado a taxa de MO entre os tratamentos, entretanto encontrou-se número de embriões recuperados por ciclo na ordem superior a um, fato esse que se justifica pela ocorrência de MO por alguns animais, ressalta-se que esta foi superior na categoria jovem.

A taxa de gestação aos 60 dias das receptoras foi diferente entre as categorias etárias ( $P < 0,05$ ) (Tabela 3). As doadoras com até 15 anos apresentaram maior taxa de gestação, demonstrando que 62,32% dos embriões transferidos evoluíram para uma gestação, já as fêmeas com idades superiores a 16 anos, incluindo os outros dois tratamentos, apresentaram menor taxa de gestação, sendo iguais ente si e representadas, respectivamente, por 34,21% e 23,08%.

Este cenário de discrepância se repete para taxa de gestação em outros estudos, sendo de: 61% a 77% (JACOB et al., 2010; 2012), 76,3% (CUERVO-ARANGO et al., 2017), 62,2% (CAMARGO et al., 2013) e 80% a 100%(GOMES et al., 2014).



Foi avaliada a taxa de prenhez aos 40 dias, em programa de TE contendo doadoras com diferentes idades, divididas em quatro grupos de acordo com a idade, sendo: G1 por fêmeas de 2 a 10 anos (73,7%), G2 de 11 a 15 anos (71,3%), G3 de 16 a 20 anos (67,6%) e G4 de 21 a 24 (63,8%), demonstrando um decréscimo na taxa de prenhez com o avançar da idade das doadoras (PANZANI et al., 2016). Corroborando com o observado no presente estudo.

**Tabela 3.** Taxa de gestação aos 60 dias de embriões provenientes de éguas doadoras em diferentes faixas etárias em Programa de Transferência de Embriões.

Faixa etária da doadora (anos)	Taxa de gestação aos 60 dias
5 – 15	62,32% (43/68) <sup>a</sup>
16 – 19	34,21% (39/114) <sup>b</sup>
20 – 25	23,08% (6/26) <sup>b</sup>

Números seguidos por letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade.

Neste mesmo experimento foi avaliado a taxa de absorção embrionária para os 4 grupos, identificou-se uma relação crescente entre o avançar da idade e a perda embrionária 14 dias após a transferência, sendo G1 (5,1%), G2 (8,9%), G3 (9,0%) e G4 (22,8%) não houve diferença entre os grupos 1,2 e 3, o grupo 4 foi diferente dos demais (PANZANI et al., 2016).

Ginther (2009), em seu estudo, para avaliar a dinâmica folicular em éguas com diferentes idades, dividiu éguas em três grupos: éguas jovens de 4 a 6 anos, éguas com idade intermediária de 10 a 14 anos e éguas velhas com idade acima de 18 anos. O autor concluiu que há uma redução no número de folículos, com o avançar da idade, demonstrando que éguas jovens apresentam maior número de folículo, sendo portanto reflexo de uma maior fertilidade por reserva folicular, entretanto, o diâmetro folicular não foi influenciado pela idade.

Um estudo avaliou a taxa de gestação ao decorrer de uma estação de monta, verificou que para cada ano acrescido na idade da égua, exercia uma redução na

taxa de gestação no primeiro ciclo a um fator de 0,94 e de 0,91 no final da estação. Éguas com mais de 14 anos necessitaram mais tempo para se tornarem gestantes após o início da estação em comparação com as éguas mais jovens. As chances de concepção para éguas com 14 anos ou mais foram 0,64 vezes menores que as éguas com menos de 9 anos (HANLON et al., 2012).

Panzani et al. (2016), avaliando a taxa de perda embrionária em função do dia da coleta, identificaram que embriões recuperados nos dias 9 e 10, foi maior, quando comparado aqueles recuperados no dia 8. Notou-se também que embriões com diâmetro menor 399 $\mu$ m, tiveram maiores taxas de perdas, assim como aqueles cujo diâmetro foi superior a 1.200 $\mu$ m, quando comparado aos de diâmetro variando entre 400- 1.200 $\mu$ m. Doadoras mais velhas são lavadas mais tardiamente, devido ao atraso no desenvolvimento embrionário e por isso éguas com mais de 20 anos tiveram perdas significativamente maiores quando comparadas as éguas jovens.

Em seu estudo, Marione et al. (2015) avaliaram a taxa de prenhez após a transferência de embrião, não observaram diferença significativa para os embriões provenientes de doadoras de idade variando de 3 a 26 anos. Contrapondo os resultados encontrados neste trabalho, que demonstrou uma redução na taxa de concepção após transferência do embrião de doadoras com o avançar da idade.

Diversos pesquisadores já demonstraram diminuição na eficiência reprodutiva a partir dos 15 anos, porém é preciso entender como se comportam as fêmeas posteriormente a tal idade, uma vez que o técnico de campo recebe por embrião efetivado, ficando evidente que estes animais apresentam menor eficiência e necessitam de maior número de intervenções para que se obtenha uma gestação, torna-se necessário um ajuste no valor do serviço prestado para a categoria.

É relevante avaliar também a viabilidade da utilização de sêmen de garanhões que estejam distantes das doadoras, levando em consideração o custo com coleta e transporte, o tempo decorrente desde a coleta até inseminação e ovulação, enfatizando ainda mais a necessidade de um estudo apurado da viabilidade econômica de se realizar um procedimento nesta categoria de doadoras, objetivando a obtenção de uma prenhez.

Outro quesito importante a ser avaliado, é quanto à utilização de sêmen criopreservado de garanhões em éguas idosas, cujo material genético seja escasso, visto que as mesmas são menos eficientes e necessitarão de mais palhetas para obtenção de um produto. Quando este for necessário, deve-se optar por técnicas

que potencializem o uso dos mesmos, sendo a ICSI (injeção intracitoplasmática de espermatozoide) a mais indicada.

## **5. CONCLUSÃO**

O avanço da idade exerce ação negativa sobre a eficiência reprodutiva de éguas em programas de TE, sendo notado declínio na taxa de recuperação embrionária, redução no número de embriões por ciclo e taxa de gestação a partir dos 16 anos de idade.

## REFERÊNCIAS

- ALLEN, W.R. The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. **Reproduction in Domestic Animal**, Berlin, v.40, n.4, p.310-329, 2005.
- ALVARENGA, M. A.; TONGU, E.A.O. Estratégias para melhorar a eficiência reprodutiva em programas de transferência de embrião de equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 41, n. 1, p. 19-24, mar. 2017.
- ALVARENGA, M.A.; CARMO, M.T.; LANDIM-ALVARENGA, F.C. Superovulations in mares: limitations and perspectives. **Pferdeheikunde**, v.24, p. 88-91, 2008.
- ALVARENGA, M.A.; LOSINNO.L. Fatores críticos em programas de transferência de embrião em equinos no Brasil e na Argentina. **Acta Scientiare Veterinariae**, v. 34, p. 39-49, 2006.
- ALVARENGA, M.A. Problems and solutions in equine embryo transfer program in Brazil. **Acta Sci Vet**, v.38, n.1, p.319-333, 2010.
- ARISTIZÁBAL, V.H.V.; GARCÍA, H.D. M.; SILVA, E.S.M.; DELL' AQUA, J.A. Transferência de embriões em éguas receptoras anovulatórias. **Revista de Medicina Veterinária**, v. 33, p. 137-147, jun. 2017.
- CAMARGO, C.E.; WEISS, R.R.; KOZICKI, L.E.; DUARTE, M.P.; GARCIA, D.M.C.; LUNELLI, B. Some factors affecting the rate of pregnancy after embryo transfer derived from the Brazilian Jumper horse breed. **J Equine Vet Sci**, v. 33, n. 11, p. 924-929, 2013.
- CARMO, M.T.; LOSINO, L.; AQUILAR, J.J.; ARAUJO, G.H.M.; ALVARENGA, M.A. Oocyte transfer to the oviduct of superovulated mares. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 337-339, 2006.
- CARNEVALE, E.M. The mare model for follicular maturation and reproductive aging in the woman. **Theriogenology**, v.69, p. 23-30, 2008.
- CARNEVALE, E.M.; RAMIREZ E.L.; SQUIRES, E.L.; ALVARENGA, M.A.; VANDERWALL, D.K.; MCCUE, P.M. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. **Theriogenology**, v. 54, p. 965-979, 2000.
- CHAIR, J,V.; Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. **Embryo Technology Newsletter**, v. 36, n. 4. 2019.
- CUERVO-ARANGO, J.; CLAES, A.N.; RUIJTER-VILLANI, M.; STOUT, T.A. Likelihood of pregnancy after embryo transfer is reduced in recipient mares with a short preceding oestrus. **J Equine Vet Sci**, v. 50, n. 3, p. 386-390, 2017.

DAVIES MOREL, M.C.G. **Equine reproductive physiology, breeding and stud management**: Selection of mare and stallion of breeding. Wallingford, CAB International, 3 ed, 2003. Cap. 12, p. 105-130.

DITTRICH J. R.; MELLO, 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. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.130-137, 2010.

FLEURY, J.J.; ALVARENGA, M. A.; FIGUEREDO, J.B.; PAPA, F.O. Transferência de embriões em equinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Porto Alegre, v.39, n.3, p.485-487, 1987.

GINTHER, O.J. **Reproductive biology of the mare**: Basic and applied aspects. Croos Plains: Equiservices, 2 ed, 1992.

GINTHER, O.J.; GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L., JACOB, J.C.F.; SIDDIQUI, M.A.R.; BEG, M.A. Age effects on follicle and hormone dynamics during the mares. **Reprod Fertil Dev**, v.20, n.8, p.955-963, 2008.

GINTHER, O.J.; GASTAL, M.O.; JACOB, J.C.F.; BEG, M.A. Age-related dynamics of follicles and hormones during an induced ovulatory follicular wave in mares. **Theriogenology**, v.71, n.5, p.780-788, 2009..

GOMES, L.P.M.; GAVIOLI, D; JACOB, J.C.F.; CRESPILO, A.M.; CARDOSO, C.E.; MOMES, G.M. Taxa de gestação de embriões equinos mantidos em dois meios comerciais diferentes de manutenção pós-transferência de embriões. **Revista saúde**, v.5, p.23-27, 2014.

GUILLAUME, D.J.; SALAZAR, O.W.; MARTIN, R. Effects of nutrition level in mares' ovarian activity and in equines puberty. **Wageningen Academic Publishers**, n. 16, p. 1-18, 2006.

HANLON, D.W.; STEVENS, M.; EVANS, M.J.; FIRTH, E.C.; Reproductive performance of Thoroughbred mares in the Waikato region of New Zealand: Multivariable analyses and sources of variation at the mare, stallion and stud farm level. **N Z Vet J**, v.60, n.6, p. 335-343, 2012.

JACOB, J.C.F.; GUERSON, Y.B.; FERRAZ, P.J. Como melhorar os índices reprodutivos em um programa de transferência de embrião equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Gramado, v. 43, n. 2 p. 222-228, mai. 2019.

JACOB, J.C.F.; HAAG, K.T.; SANTOS, G.O.; OLIVEIRA, J.P.; GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L. Effect of embryo age and recipient asynchrony on pregnancy rates in commercial equine embryo transfer program. **Theriogenology**, v. 77, n. 6, p.1159-1166, 2012.

JACOB, J.C.F.; SANTOS, G.O.; OLIVEIRA J.P.; GASTAL, E.L. Evaluation of reproductive parameters in a commercial equine embryo transfer program. **Anim Reprod Sci**, v. 121, p. 305-306, 2010.

LINDINGER, M.I.; MACNICOL, J.M.; KARROW, N.; PEARSON, W. Effects of a novel dietary supplement on indices of muscle injury and articular GAG release in horses. **J Equine Vet Sci**, v.48, p.52-60, 2017.

LOSINO, L.; AGUIAR, J.J.; LISA, H. Impacto f multiple ovulations in a comercial equine embriy transfer program. **Havemeyer Found Monor Ser**, v.3, p. 80-83, 2000.

LOSINO, L.; UROSEVIC, I.M.; Equine embryo transfer. Technical and pratctical considerations for applicatio on horse production programs. **J Equine Vet Sci**, v. 32, p. 23-30, 2015.

MARIONE, A.I.; LOSINO, L.; FUMOSO, E.; RODRÍGUEZ, E. M.; REDOLATT, C.; CANTATORE, S.; CUERVO-ARANGO, J. The effect of mare's age on multiple ovulation rate, embryo recovery, post-transfer pregnancyrate, and interovulatory interval in a commercial embryo trasfer program in Argentina. **Animal Reproduction Science**, v. 158, p. 53-59 may. 2015.

McKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L. Ovariectomized steroid-treated mares as embryo transfer recipients na as a model to study th role of progestins in pregnancy maintenance. *Theriogenology* , v. 29. P.1055-1063, 1998.

MEIRA, C.; HENRY, M. Evolution of two non-surgical equine embryo trasfer methods. **J Reprod Fertil, Colchester**, V.44, p. 712-713, 1991.

OGURI, N.; TSUTSUMI, Y. Non-surgical recovery of equine eggs, andattempt at non-surgical egg trsfer in hors. **Jornal of Reproductionand Fertility**, v.31, n.2, p.187-195, 1972

ORTIS, H. A.; FOSS, R.R.; MCCUE, P.M.; BRANDECAMP, E.A.; FERRIS, R.A.; HENDRICKSON, D.A. Application of PGE2 to the uterine tube surfasse enhances fertility in selected subfertile mares. **J Equine Vet Sci**, v. 33, p. 896- 900, 2013.

PANZANI, D.; VANNOZZI, I.; MARMORINI, P.; ROTA, A.; CAMILLO, F.; Factors affecting recipients pregnancy loss and foaling rates in a comerecial equine embryo transfer program. **Jornal of Equine Veterinary Science**, v. 37, p. 17-23, jan. 2016.

PESSOA, M.A.; CANNIZZA, A.P.; RIGHINI, M.F.Z.; ALVARENGA M.A. Embryo transfer efficiency of quarter horse athletic mares. **J Equine Vet Sci**, v. 31, p. 703-705, 2011.

PINTO, M.R.; MIRAGAYA, M.H.; BURNS, P.; DOUGLAS, R.; NEILD, D.M. Strategies increasing reproductive efficiency in a comercial embryo trasfer program whist high performance donor mares under taining. **J Equine Vet Sci**, v. 54, p.93-97, 2017.

RAMBRANGS, B.B.; BOXTEL, D.C.; THARASANIT, T.; LENSTRA, J.A.; COLENBRANDER, B.; STOUT, T.A. Advancing maternal age predisposee to

mitochondrial damage and loss during maturation of equine oocytes in vitro. **Theriogenology**, v.81, p. 959-965, 2014.

SILVA, A.E.D.F.; UNAIAN, M.M.; ESTEVES, S.N. **Criação de equinos: Manejo reprodutivo e da alimentação**. Brasília: Embrapa1º ed. 1998.

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

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

VALLE, G.R.; FILHO, J.M.S.; OLIVEIRA, H.N.; PALHARES, M.S.; MELLO, M.A.; GOLOUBEFF, B. Efeito da idade sobre a fertilidade de éguas inseminadas com sêmen diluído resfriado a 14 °C e transportado. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 28, n. 5, p. 1031-1036, 1999.