

SARA MENEGATTI ZOCA

FATORES QUE INTERFEREM NAS TAXAS DE RECUPERAÇÃO
EMBRIONÁRIA EM ÉGUAS.

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado
à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, SP,
para obtenção do grau de Médico Veterinário

Preceptor: Prof. Adj. Marco Antonio Alvarenga

Botucatu

2009

SARA MENEGATTI ZOCA

FATORES QUE INTERFEREM NAS TAXAS DE RECUPERAÇÃO
EMBRIONÁRIA EM ÉGUAS.

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado
à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, SP,
para obtenção do grau de Médico Veterinário

Área de concentração: Reprodução Animal

Preceptor: Prof. Adj. Marco Antonio Alvarenga
Coordenador de Estágios: Prof. Ass. Dr. Francisco José Teixeira Neto

Botucatu

2009

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA
INFORMAÇÃO

DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: SELMA MARIA DE JESUS

Zoca, Sara Menegatti.

Fatores que interferem nas taxas de recuperação embrionária em éguas / Sara Menegatti Zoca. – Botucatu : [s.n.], 2009.

Trabalho de conclusão (bacharelado – Medicina Veterinária) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2009

Preceptor: Marco Antonio Alvarenga

1. Eqüino - Reprodução 2. Inseminação artificial

Palavras-chave: Éguas; Recuperação embrionária; Reprodução; Transferência de embrião

ZOCA, SARA MENEGATTI. Fatores que interferem nas taxas de recuperação embrionária em éguas. Botucatu, 2009. 20p. Trabalho de conclusão de curso de graduação (Medicina Veterinária, Área de Concentração: Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

O sucesso na implantação de um programa de transferência de embrião deriva de um conjunto de fatores, sendo de grande influência a taxa de recuperação embrionária das doadoras que permite a execução da inovulação na égua receptora. Essa taxa provém de um grupo de elementos, tais como, características da doadora, dia da colheita do embrião, manejo reprodutivo, qualidade do sêmen utilizado, habilidade do técnico, entre outros. Sobretudo devido a grande importância dessa interferência direta sobre os resultados de um programa de embrião, objetivou-se neste trabalho revisar os fatores que interferem nas taxas de recuperação embrionária em éguas doadoras perante a técnica de transferência de embrião, sugerindo algumas formas de melhoria desses resultados.

Palavras – Chave:

Éguas; Recuperação embrionária; Reprodução; Transferência de embrião.

ZOCA, SARA MENEGATTI. Factors affecting the embryo recovery rates in mares. Botucatu, 2009. 20p. Trabalho de conclusão de curso de graduação (Medicina Veterinária, Área de Concentração: Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

ABSTRACT

The success in implementing an embryo transfer program derives from many factors. The embryo recovery rate is one of the most important factors, and allows the transfer to the recipient mare. This rate comes from a group of elements such as donor's characteristics, collection date, reproductive management, semen quality, technician skill. Mainly because of the great importance of this direct interference on the results of an embryo recovery program, this study aimed to review the factors involved in embryo recovery rates in donor mares during an embryo transfer, suggesting some ways of improving these results.

Key words:

Embryo recovery, Embryo transfer, Mares, Reproduction

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	5
2. REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1. Método de Coleta	7
2.2. Dia da Coleta	8
2.3. Doadora	9
2.4. Manejo Reprodutivo	10
2.4.1. Controle Folicular	10
2.4.2. Nutrição	11
2.4.3. Sanidade	11
2.5. Garanhão	13
2.6. Técnico	13
2.7. Outros Fatores	13
2.7.1. Condições Climáticas	13
2.7.2. Número de Ovulações	14
2.7.3. Adaptação do Animal	14
3. CONCLUSÃO	15
4. REFERÊNCIAS	16

1. INTRODUÇÃO

A primeira transferência de embrião (TE) em eqüinos foi realizada experimentalmente no início da década de 1970, contudo só foi considerada comercialmente viável como procedimento clínico a partir da década de 1980.

No Brasil, foi popularizada a partir da década de 1990, com a sua introdução comercial e início da legalização como técnica reprodutiva por parte das associações de criadores.

Inúmeras são as vantagens da utilização da técnica de TE em eqüinos e, por esse motivo, a maioria das associações de criadores de cavalos permite o uso desta, reconhecendo seus benefícios.

Cabe ao médico veterinário esclarecer e orientar o criador quanto ao seu uso, já que o sucesso na implantação de um programa de TE pode ser variável.

As taxas de coleta de embriões têm variado de 40 a 80% (FLEURY, 1998). Segundo Squires et al. (1999), estão em torno de 50% para éguas que apresentam uma única ovulação.

Para otimização de programas de TE em eqüinos, faz-se necessária a utilização de técnicas que aumentem a taxa de recuperação embrionária, assim como a taxa de prenhez.

As biotécnicas atuais, no geral, permitem a ampliação de bons resultados, porém há muitos itens a serem monitorados, os quais determinam a precisão do procedimento, sendo que o inicial será sempre a obtenção do embrião a partir da égua doadora selecionada.

Diversos fatores podem interferir nas taxas de coleta e até explicar a grande amplitude de resultados observados. Dentre eles pode-se citar: idade da égua, fertilidade da doadora, dia de coleta, multiplicidade de ovulações, garanhão, sêmen e época da estação de monta.

Este trabalho teve como objetivo revisar cada aspecto que interfere na taxa de recuperação embrionária em éguas doadoras perante a técnica de transferência de embrião, mostrando assim sua importância, e sugerindo algumas práticas para que bons resultados sejam obtidos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A transferência de embriões (TE) é uma importante ferramenta que visa acelerar o melhoramento genético, conferindo maior precisão e rapidez no processo de seleção animal, permitindo uma maior influência das linhagens maternas, pois promove a obtenção de um maior número de produtos ao ano, além de permitir que potras com dois anos de idade sejam utilizadas como doadoras, levando à diminuição do intervalo entre gerações e, conseqüentemente aumentando a velocidade e eficiência do melhoramento genético do plantel.

Essa técnica também permite a obtenção de gestações de éguas que se tornaram subférteis por problemas adquiridos, cuja causa não tenha relação direta com a fertilização do oócito e seu transporte até o útero. E promove ainda o melhor aproveitamento de éguas de alto valor zootécnico, idosas ou que estejam participando de competições hípcas.

Para se obter sucesso em um programa de TE, os médicos veterinários e técnicos dependem de diversos fatores relacionados à égua doadora, ao garanhão, à manipulação e manutenção dos embriões, à técnica de transferência, à receptora, às condições climáticas, entre outros.

Uma outra maneira de obter maior chance de sucesso na obtenção de embriões seria através da superovulação, porém em éguas ainda não foi definida com sucesso, apesar de vários experimentos realizados (ALVARENGA et al., 2003).

Assim, o número de embriões por coleta em eqüinos é limitado. Para otimização de programas de transferência de embriões eqüinos, faz-se necessária a utilização de técnicas que aumentem as taxas de prenhez por coleta realizada, e a bipartição de embriões é uma biotécnica que poderá vir a suprir esta lacuna, favorecendo a taxa de recuperação embrionária.

A taxa de recuperação embrionária por égua é a porcentagem de embriões coletados por lavado uterino, sendo muito importante para o sucesso na implantação de um programa de TE. A maioria dos embriões recuperados é

oriunda de ovulações simples espontâneas, resultando em uma taxa de 50% de embrião recuperado por tentativa (SQUIRES, 2005).

Diversos fatores podem interferir nas taxas de coleta e até explicar a grande amplitude de resultados observados. Dentre eles podem-se citar: idade da égua (SQUIRES et al., 1999), fertilidade da doadora (KATILA et al., 1989; SQUIRES et al., 1999), dia de coleta (MCKINNON & SQUIRES, 1988), multiplicidade de ovulações (SQUIRES et al., 1987; ROSA et al., 1998), garanhão (PASHEN et al., 1993), sêmen (SQUIRES et al., 1999) e época da estação de monta (MCKINNON & SQUIRES, 1988; PASHEN et al., 1993).

2.1. MÉTODO DE COLETA

O útero da égua suporta a introdução de grande quantidade de meio de coleta e o expulsa com relativa facilidade sem a necessidade de manipulação uterina. Essa particularidade do miométrio poderia ser utilizada como instrumento capaz de facilitar a recuperação de embriões durante a lavagem uterina. Entretanto, como se utilizam filtros com pequena capacidade volumétrica durante as coletas, não se pode aproveitar dessa característica em sua plenitude, pois o grande fluxo expelido transbordaria no filtro, levando a perdas embrionárias.

O fluxo interrompido é o método tradicional que utiliza filtro de embrião e o fluxo direto é o método sem interrupção do fluxo e sem utilização do filtro.

A utilização do fluxo direto não apresenta vantagens em relação ao fluxo indireto que justifique sua adoção, apesar da pequena redução do custo de transferência. Não houve diferenças entre tratamentos em relação à taxa de recuperação de embriões (58,9% e 44,8%), à qualidade dos embriões (3,56 e 3,53), à taxa de recuperação do meio de coleta (98,1% e 98,1%) e à taxa de gestação (52,9% e 81,8%), respectivamente, para fluxo interrompido e fluxo direto. Observaram-se diferenças entre tratamentos quanto ao tempo de duração da coleta (10,3 e 7,4 minutos) e ao intervalo de tempo da coleta à inovulação (39,5 e 65,7 minutos) (CARVALHO, 2001).

Assim, o método de coleta não possui tanta interferência, embora o mais utilizado ainda seja o fluxo interrompido com o uso do filtro.

2.2. DIA DA COLETA

A determinação do dia da coleta se torna imprescindível para o sucesso da transferência de embrião. Coletas no sétimo (D7) e oitavo (D8) dia após ovulação são as eleitas por apresentarem as melhores taxas de recuperação e viabilidade de embriões (CASTLEBERRY et al., 1980; MCKINNON & SQUIRES, 1988; SQUIRES et al., 1999).

Quanto aos índices de recuperação de embriões das doadoras no D7 ou D8, os resultados de Fleury et al. (2001) foram semelhantes aos obtidos por Vogelsang et al. (1985), que realizaram colheitas nos dias 5, 6, 7 e 8 após a ovulação (D0), e relataram taxas de recuperação de embriões de 55, 51, 33 e 50% respectivamente, indicando efeito não-significativo. Iuliano et al. (1985) obtiveram recuperação de 75,5 e 81,8% de embriões, quando as colheitas foram realizadas no D7 ou D8, e não tendo encontrado diferença significativa.

Porém, Fleury et al. (2001) relatam que as colheitas de embriões realizadas no D8 apresentaram tendência ($p = 0,051$) de melhores resultados nas taxas de recuperação embrionária, quando comparados com os colhidos no D7.

Geralmente a recuperação embrionária é realizada entre D7 e D8 após a ovulação (D0), exceto quando se deseja congelar o embrião. Neste caso, a recuperação embrionária deverá ser realizada no 6º dia (D6) após a ovulação, tendo um decréscimo de 10% a 15% no índice de recuperação embrionária (SQUIRES, 1995). O D8 é considerado o dia ideal para a coleta, entretanto recomenda-se o D6 ou D7 para doadoras que apresentam infecção uterina e D9 para éguas idosas (GOMES & GOMES, 2008).

A única vantagem da recuperação embrionária no D6 é que os embriões estão menores e são mais viáveis para congelamento e descongelamento do que no D7 (SLADE et al., 1985).

2.3. DOADORA

A condição uterina e a idade das éguas doadoras são fatores importantes que influenciam na taxa de recuperação embrionária.

As éguas idosas podem constituir uma grande parte do contingente de doadoras de embriões, principalmente quando se trata de éguas de genética superior previamente comprovada na reprodução pela progênie apresentada (ALONSO et al., 2005).

Em relação à taxa de recuperação de embriões, observa-se uma queda de acordo com a idade da doadora. Em éguas jovens (2 a 4 anos) a média de recuperação embrionária é de 85%; em éguas adultas (4 a 18 anos) de 64,4% e para éguas velhas de 24,1% (SQUIRES, 1995).

A recuperação de embriões em éguas subférteis é reduzida. Além disso, estes embriões recuperados apresentaram tamanho reduzido quando comparados aos embriões de éguas férteis (BALL, 1993) e alguns estudos comprovam que possuem mais defeitos morfológicos do que os embriões de éguas férteis (GOMES & GOMES, 2008).

As alterações nos embriões de éguas subférteis podem ser resultado de um ambiente uterino inadequado ou ainda de alterações na tuba uterina (BALL, 1993).

As taxas de recuperação embrionária também diminuem com o aumento da idade da doadora. A recuperação embrionária em éguas idosas é consistentemente menor e menos avançada em termos de desenvolvimento (MEADOWS, 1999).

As falhas reprodutivas observadas em éguas velhas estão normalmente associadas a distúrbios da ovulação e maturação oocitária associadas ou não à endometrite crônica, bem como distúrbios hormonais. Alguns sintomas são distúrbios de ovulação, obesidade (metabolismo baixo), baixa recuperação embrionária, perdas embrionárias precoce, associadas ou não a idade avançada. Se forem animais em atividade esportiva podem apresentar queda no desempenho, anormalidades sistêmicas, fraquezas e miopatias.

O maior fator de interferência na taxa de recuperação embrionária em éguas está relacionado com seu status reprodutivo (CARNEVALE & GINTHER, 1995; SQUIRES, 1982). Éguas idosas com histórico ruim produzem poucos embriões. As causas disso podem ser devido a patologias uterinas, de oviduto, e aumentam as taxas de morte embrionária precoce (BALL et al., 1989) sendo que Carnevale et al. (1995) relatou que oócitos defeituosos de éguas idosas levam a uma baixa fertilidade.

Camillo et al. (2000) relatou ainda que éguas de 2 anos de idade podem ser utilizadas com sucesso como doadoras de embriões, assim antecipando o início da retirada de potros de éguas valiosas, e ainda assim, sem nenhum efeito negativo relacionado a sua eficiência reprodutiva.

Mortensen et al. (2009) realizaram um trabalho recentemente mostrando a interferência do aumento da temperatura retal da égua doadora, que provavelmente está relacionado com alteração da dinâmica do ciclo estral, com a taxa de recuperação embrionária. No estudo, exercitou éguas por 30 minutos, atingindo um acréscimo de 2 °C, e assim obtendo significativamente menos embriões e de menor qualidade. Um valor aceitável de 63% de recuperação embrionária foi obtido no grupo controle de éguas não exercitadas diariamente, comparado a uma taxa de 34% no grupo exercitado.

2.4. MANEJO REPRODUTIVO

2.4.1. CONTROLE FOLICULAR

O controle folicular eficiente tem papel fundamental em um programa de TE. É necessário que seja diário para as doadoras podendo ser a cada 48 horas para as receptoras.

O uso do ultrassom é recomendado para se detectar com maior precisão o momento da ovulação, favorecendo assim o momento da fertilização.

Visando obter bons índices de recuperação de embriões, recomenda-se no caso de monta natural ou inseminação artificial com sêmen fresco que seja

realizada a cada 48 horas, para o sêmen resfriado a cada 24 horas e preferencialmente utilizar sêmen com até 24 horas de refrigeração.

Huhtinen *et al.* (1996) relataram que as taxas de recuperação embrionária decrescem quanto mais o momento da inseminação se distancia do momento da ovulação, mas éguas inseminadas com 16 horas de ovulação apresentam taxas similares a éguas inseminadas antes da ovulação. Assim, é de grande importância identificar com maior precisão o momento da ovulação da égua doadora.

É válido o uso do hCG (Gonadotrofina Coriônica Humana) ou GnRH (Hormônio Liberador de Gonadotrofina) para induzir a ovulação, pois desta forma apenas uma inseminação artificial (IA) é necessária, antes da ovulação ou eventualmente até 6 horas após, especialmente quando se utiliza sêmen congelado.

Assim, além de aumentar os índices de recuperação embrionária, facilita o processo e diminui os gastos contabilizados.

2.4.2. NUTRIÇÃO

A nutrição animal interfere em qualquer atividade a ser desenvolvida com a égua, não diferente, na reprodução, a alimentação de qualidade é fundamental para doadora. A deficiência alimentar das receptoras é um dos principais problemas encontrados, já que estas éguas necessitam de um balanço energético tanto quanto as doadoras, elevando os custos da técnica, como afirmam Gomes & Gomes (2008).

2.4.3. SANIDADE

As doadoras e receptoras necessitam ser vacinadas e vermifugadas regularmente de acordo com as necessidades recomendadas. O exame detalhado através da ultrassonografia é necessário não só para detectar a ovulação, mas também para avaliar se há resquício ou excesso de resposta inflamatório, através

da presença de fluido uterino após a IA e para identificar alguma outra patologia macroscópica.

2.5. GARANHÃO

Geralmente se observa uma grande influência do garanhão em relação à recuperação embrionária, visto que alguns animais apresentam sêmen de qualidade e fertilidade melhor quando comparados a outros. Os efeitos do garanhão podem ser minimizados com utilização de reprodutores com fertilidade comprovada.

A qualidade do sêmen utilizado para inseminar as éguas também afeta a recuperação embrionária (FRANCL, 1987). Embora Squires et al. (1982), após 3 anos de trabalho, não observaram influência do garanhão nos resultados de recuperação embrionária, diversos outros estudos atuais mostram o contrário.

Em um estudo realizado por Fleury et al., (1997) observou-se diferença significativa entre cinco garanhões utilizados, cujo resultado de recuperação embrionária variou de 28,6% a 84,2%. Outro fator de grande influência na fertilidade se refere ao sistema que se encontra acondicionado o sêmen que será utilizado para inseminação nas doadoras, seja sêmen fresco, refrigerado ou congelado, lembrando-se que o índice de recuperação embrionária diminui quando se utiliza sêmen refrigerado ou congelado comparado ao sêmen fresco.

Woods e Steiner (1986) utilizaram sêmen resfriado de três garanhões para inseminar doadoras de embriões. Após as colheitas, obtiveram taxas de recuperação embrionária de 29% (2/7), 63% (10/16), 93% (14/15). Embora o trabalho não apresente análises estatísticas, houve diferença numérica significativa nas taxas de recuperação embrionária entre os garanhões.

A taxa de recuperação embrionária observada por Douglas (1979) foi de 36 e 72%, quando as éguas foram cobertas por dois garanhões diferentes.

McKinnon e Squires (1988) citam que o número de embriões recuperados diferiu quando foram utilizados quatro garanhões com características seminais normais.

Fleury et al. (2001) concluíram que os ganhões podem influenciar a taxa de recuperação embrionária. E que a monta natural e a inseminação artificial com sêmen fresco ou refrigerado proporcionam bons resultados na taxa de recuperação embrionária.

2.6. TÉCNICO

O técnico tem influência direta nos resultados do programa de transferência de embriões através do conhecimento, experiência e destreza em relação à realização da técnica, assim como enfatizam Gomes & Gomes (2008).

2.7. OUTROS FATORES

Diversos outros fatores interferem direta ou indiretamente na taxa de recuperação embrionária, como as variações climáticas, número de ovulações e a adaptação da doadora na central de reprodução e, muitas vezes, estes passam despercebidos.

2.7.1. CONDIÇÕES CLIMÁTICAS

Nos últimos anos, inúmeras variações climáticas têm sido observadas em todos os continentes, como consequência das mudanças no meio ambiente, causadas pela poluição, efeito estufa, desmatamento, queimadas, etc. As estações do ano eram bem definidas e hoje se pode observar em alguns momentos períodos de seca durante época de chuva e até mesmo índices pluviométricos acima da média durante a estação de monta.

Gomes & Gomes (2008) relatam uma diferença estatística relevante de 66% para 45% na taxa de recuperação embrionária comparando os meses com índices pluviométricos normais (setembro, outubro, novembro, dezembro e janeiro) e atípicos acima da média (fevereiro, março e abril), respectivamente.

Esses fatores, bem como períodos de seca prolongados, podem atrasar o início da estação de monta. Estas mudanças climáticas podem influenciar as taxas de recuperação embrionária ao longo da estação de monta como demonstrado por McCue & Squires (2002).

2.7.2. NÚMERO DE OVULAÇÕES

Sabe-se que a chance de recuperar dois embriões de uma égua que apresentou dupla ovulação, sem considerar o procedimento de superovulação, é maior quando as ovulações ocorrerem em ovários diferentes (ovulações bilaterais) comparadas a ovulações em um só ovário (ovulações unilaterais).

Como explanado com Gomes & Gomes (2008), a possibilidade de induzir ovulações múltiplas em éguas utilizando Extrato de Pituitária Equina (EPE) ou FSH_e (Hormônio Folículo Estimulante) purificado equino, visa obter mais de um embrião por coleta na dependência da dose utilizada. No caso de baixa dose, objetiva-se obter pelo menos um embrião por coleta.

2.7.3. ADAPTAÇÃO DO ANIMAL

Quando há mudança de local de alguma doadora de embriões para outra região com condições climáticas (temperatura, umidade e luminosidade) muito diferentes a que está adaptada (exemplo da região sul para o nordeste) é necessário um tempo de adaptação de duração variável para cada indivíduo. Sendo em alguns casos, necessário até um ano, o que pode levar a perda da estação. Nas adaptações mais prolongadas, o animal apresenta ciclos irregulares, baixo índice de recuperação embrionária, e em casos extremos pode entrar anestro.

3. CONCLUSÃO

A influência de todos os fatores, idade da égua, fertilidade da doadora, dia de coleta, multiplicidade de ovulações, ganhão, sêmen, época da estação de monta, etc. é de extrema relevância no resultado final de uma transferência de embrião. Pôde-se observar grande influência de todos eles, direta ou indiretamente na taxa de recuperação embrionária.

Há alguns pontos que se pode adaptar para tentar melhorar esses índices, levando em consideração os fatores todos citados.

Aumentar o número de ovulações por ciclo, encurtar a fase folicular e melhorar maturação folicular e/ou oocitária com uso de GnRH e EPE, para aumentar a probabilidade de fertilização.

Inseminar com baixa dose na extremidade do útero, realizar tratamentos periovulatórios com antibiótico sistêmico, verificar possibilidade de endometrite fúngica, realizar lavagens uterinas pré e pós-coberturas diminuindo assim o processo inflamatório pós inseminação, e aumentando o índice de fertilização.

Equilibrar a dieta, minimizar o estresse social, proteger contra o estresse calórico ambiental através de sombreamento.

Para o ganhão, determinar o melhor diluente, a temperatura ideal de transporte ($5 \times 15^{\circ}\text{C}$), o seu tempo máximo, assim como melhor tipo de transporte e inseminar o mais próximo possível das ovulações com remoção do plasma seminal através da centrifugação.

Essas são maneiras de readequar a técnica e de, com poucas alterações, conseguir obter resultados cada vez melhores. Assim, é possível demonstrar os diversos fatores que interferem na técnica da coleta de embrião em éguas, mas não todos, afinal é preciso sempre mais pesquisas para avaliar e obter resultados aplicáveis a melhoria da transferência de embrião.

Portanto, pode-se concluir que é de grande importância o desenvolvimento de estudos sobre a recuperação embrionária que venham contribuir cada vez mais para melhora dos seus índices e, conseqüentemente, a melhora nos resultados da técnica de transferência.

4. REFERÊNCIAS

ALONSO, M. A.; FLEURY, P. D. C.; NEVES NETO, J. R.; MACHADO, M. S. Efeito da idade da égua doadora na taxa de perda embrionária. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33 (Supl 1), p. 204, 2005.

ALVARENGA, M.A.; SQUIRES, E.L.; MACHADO, M.S.; ARANTES, M.; PERES, K.R.; LEÃO, K.M.; OLIVEIRA, J.V.; ROSER, J.F. Avaliação da resposta superovulatória em éguas tratadas com FSH eqüino purificado. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 216-217, 2003.

BALL, B.A. Embryonic death in mares. **Equine Reproduction** McKINNON, A.O., VOSS, J.L., p. 517-531, 1993.

BALL, B.A.; LITTLE, T.V.; WEBER, J.A.; WOOD, G.L. Survival of Day-4 embryos from young, normal and aged, subfertile mares after transfer to normal recipient mares. **J. Reprod. Fertil.**, v. 85, p. 187-209, 1989.

CAMILLO, F.; VANNOZZI, I.; ROTA, A.; ROMAGNOLI, S.; ARIA, G. Comparison of embryo recovery rates from two years old and mature mares. **Equine Embryo Transfer**. Havemeyer Foundation Monograph, n.3., p. 86-88, 2000.

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

CARVALHO, G.R.; SILVA FILHO, J.M.; FONSECA, F.A.; RUAS, J.R.M.; BORGES, A.M. Influência da técnica de coleta sobre a taxa de recuperação de embriões eqüinos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 2001, n.5, 2001.

CASTLEBERRY, R. S.; SCHEIDER Jr., H. J.; GRIFFIN, J. L. Recovery and transfer of equine embryo. **Theriogenology**, v. 13, n. 1, p. 90, 1980.

DOUGLAS, R.H. Review of induction of superovulation and embryo transfer in the equine. **Theriogenology**, v. 11, n. 1, p. 36-46, 1979.

FLEURY, J.J. O dia da colheita na taxa de recuperação de embriões em equinos em uma central de transferência de embriões comercial. **Arq. Fac. Vet. UFRGS**, v. 26, p. 268, 1998.

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

FLEURY, J. J.; PINTO, A.J.; MARQUES, A.; LIMA, C.G.; ARRUDA, R.P. Fatores que afetam a recuperação embrionária e os índices de prenhez após transferência transcervical em equinos da raça Mangalarga. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.**, v. 38, n. 1, p. 29-33, 2001.

FRANCL, A.T.; AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Motility and fertility of equine spermatozoa in a milk extender over 24h at 20°C. **Theriogenology**, v. 27, p. 517-526, 1987.

GOMES, G.M.; GOMES, L.P.M. Fatores que influenciam a produção de embriões em águas doadoras. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.36 (Supl. 2), p.199-206, 2008.

HUHTINEN, M.; KOSKINEN, E.; SKIDMORE, J.A; ALLEN, W.R. Recovery rate and quality of embryos from mares inseminated after ovulation. **Theriogenology**, v.45, p. 719-726, 1996.

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

KATILA, T.; OIJALA, M.; KOTILAINEN, T. Embryo transfer in subfertile mares. **Acta Vet. Scand.**, v. 30, p. 329-333, 1989.

MCCUE, P. M. & SQUIRES, E. L. Persistent anovulatory follicles in the mare. **Theriogenology**, v. 58, p. 541- 543, 2002.

McKINNON, A.O; SQUIRES, E.L. Equine embryo transfer. **Vet. Clin. North Am.**, v. 4, p. 305-333, 1988.

MEADOWS, S.; LISA, H.; WELSH, C. Factors affecting embryo recovery, embryo development and pregnancy rate in a commercial embryo transfer programme. **Equine European Gamete Group (EEG)**. Havemeyer Foundation Monograph Series n .1, p. 61-62. 1999.

MORTENSEN A.C.J.; CHOI B. Y.H.; HINRICHS B. K.; ING A.N.H.; KRAEMER B.D.C.; VOGELSANG C.S.G.; VOGELSANG M.M. Embryo recovery from exercised mares. **Animal Reproduction Science**, v. 110, p. 237–244, 2009.

PASHEN, R.L.; LASCOMBES, F.A.; DARROW, M.D. The application of embryo transfer to polo ponies in Argentina. **Equine Vet. J.**, v. 15 (Supl), p. 119-121, 1993.

ROSA, C.A.; ALBERIO, R.H.; BARAÑAO, J.L. Evaluation of two treatments in superovulation of mares. **Theriogenology**, v. 49, p. 1257-1264, 1998.

SLADE, N.P.; TAKEDA, T.; SQUIRES, E.L.; ELSDEN, R.P.; SEIDEL, G.E. Jr. A new procedure for the cryopreservation of equine embryos. **Theriogenology**, v. 24, p. 45-58, 1985.

SQUIRES, E.L.; IMEL, K.J.; IULIANO, M.F. Factors affecting reproductive efficiency in equine embryo transfer program. **J. Reprod. Fertil.**, v. 30 (Supl), p.409-414, 1982.

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.; McKINNON, A.O.; CARNEVALE, E.M. Reproductive characteristics of spontaneous single and double ovulation mares and superovulated mares. **J. Reprod. Fert.**, v. 35 (Supl), p. 399-403, 1987.

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

SQUIRES, E.L.; SEIDEL, G.E.Jr. Collection and transfer of equine embryos. **Animal reproduction and Biotechnology**, n. 08, p. 27-31, 1995.

VOGELSANG, S.G.; BANDIOLO, K.R.; MASSEY, J.R. Commercial application of equine embryo transfer. **Equine Veterinary Journal**, v.3 (Supl. 27), p. 89-91. 1985.

WOODS, G.L.; STEINER, J.V. Embryo transfer from mares in athletic competition. **Cornell Veterinarian**, v. 76, n. 2, p. 149-155, 1986.