

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO – UEMA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - CCA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL - PPGCA

ANDRESSA MENDES ALVES

**SINCRONIZAÇÃO DE ÉGUAS RECEPTORAS EM ANESTRO TRATADAS COM
ALTRENOGEST INJETÁVEL NO PROGRAMA DE TRANSFERÊNCIA DE
EMBRIÕES EQUINOS**

São Luís - MA
2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS – CCA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL - PPGCA

ANDRESSA MENDES ALVES

**SINCRONIZAÇÃO DE ÉGUAS RECEPTORAS EM ANESTRO TRATADAS COM
ALTRENOGEST INJETÁVEL NO PROGRAMA DE TRANSFERÊNCIA DE
EMBRIÕES EQUINOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciência
Animal – PPGCA/CCA/UEMA, como do
requisito para obtenção do título de Mestre
em Ciência Animal

Área de concentração: Reprodução e
Conservação Animal

Orientador (a): Prof. Dr. Felipe de Jesus
Moraes Júnior

São Luís – MA
2020

ANDRESSA MENDES ALVES

**SINCRONIZAÇÃO DE ÉGUAS RECEPTORAS EM ANESTRO TRATADAS COM
ALTRENOGEST INJETÁVEL NO PROGRAMA DE TRANSFERÊNCIA DE
EMBRIÕES EQUINOS**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal –
PPGCA/CCA/UEMA, como requisito
para obtenção do título de Mestre em
Ciência Animal

Orientador (a): Prof. Dr. Felipe de Jesus
Moraes Júnior

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

(Orientador)

Prof. Dr. Felipe de Jesus Moraes Júnior

(1º Membro)

Prof. Dr. Cláudio Luís Nina Gomes

(2º Membro)

Dr. Yatta Linhares Boakari

*Dedico este trabalho aos meus pais Anagaí Mendes e James
Pereira por todo amor e cuidado a mim oferecido.*

AGRADECIMENTOS

À esta Instituição que me deu a oportunidade de estudo e condições suficientes para que nós tivéssemos um curso de pós graduação digno e por tantas outras oportunidades oferecida à nós enquanto estudantes.

Ao meu orientador, professor Felipe Moraes Júnior, por estes dois anos de orientação e por confiar a mim a realização desse trabalho.

À Cátia Pereira pela oportunidade maravilhosa que me ofereceu ao me receber na sua rotina de trabalho e dividir comigo sua experiência profissional e os momentos com sua família ao longo de seis meses.

À UEMA e a FAPEMA pela concessão da bolsa de Mestrado e de Estágio Internacional, respectivamente.

À toda minha família por me apoiar em todas minhas decisões e fazer o possível para me ajudar sem medir esforços em qualquer circunstância.

Por último e não menos importante, agradeço inteiramente à DEUS mais essa etapa vencida em minha vida, por ser sempre a minha mão sustentadora nos momentos longes de casa e da família e em todos os momentos quando o fardo parecia mais pesado do que eu pudesse carregar. Toda honra e toda glória, hoje e sempre, ao Senhor meu Deus.

RESUMO

Na equinocultura a transferência de embriões (TE) é a biotecnologia da reprodução mais difundida na espécie, onde a disponibilidade de receptoras aptas para esta técnica durante a estação reprodutiva representa um dos principais desafios aos centros reprodutivos. O objetivo do presente estudo foi promover o aproveitamento de receptoras de embrião em anestro através da sincronização com a administração de cipionato de estradiol seguido por altrenogest injetável, propondo assim um novo protocolo de sincronização. Considerou em anestro (acíclicas) as receptoras com folículos de até 15 mm ou ausência destes, assim como ausência de edema uterino e corpo lúteo, e cíclicas aquelas que demonstraram presença de folículo pré-ovulatório e/ou CL. As receptoras em anestro receberam 2mL de Cipionato de Estradiol (5 mg/mL) no primeiro dia e mais 1 mL no dia seguinte por via intramuscular, no terceiro dia após observado edema uterino escala 3 foi realizado a administração de 3mL de altrenogest (75mg/mL) também por via intramuscular, neste grupo a TE foi realizada cinco, seis ou sete dias (D5, D6 ou D7) após o recebimento do altrenogest injetável. Nas receptoras cíclicas a sincronização com as doadoras foi realizada através da indução de ovulação com HCG nas éguas com folículos de diâmetro ≥ 40 mm e edema satisfatório (escala 3). Realizou-se a transferência de embriões grau 1, 2 e 3 com seis, sete ou oito dias de desenvolvimento. O diagnóstico de gestação foi realizado aos quinze dias de idade do embrião e feito acompanhamento até trinta dias de gestação. A avaliação estatística foi realizada por meio do teste de Fischer com probabilidade de 5%. Não houve diferença significativa entre as taxas de gestação das éguas tratadas e não tratadas aos quinze e trinta dias de gestação. Ao comparar o dia da realização da TE após o tratamento com altrenogest, também não se observou diferença nos dias cinco, seis e sete. Ao avaliar o dia da coleta dos embriões, aos 15 dias de gestação obteve-se 80% e 92,3 %, para o grupo tratado e não tratado respectivamente, diferindo estatisticamente entre si. As receptoras cíclicas apresentaram taxa de prenhez superior ao grupo tratado ($p < 0,05\%$) ao receberem embriões grau 1 nas transferências. Conclui-se que a prenhez foi semelhante entre as receptoras cíclicas e acíclica, porém o protocolo proposto com duas administrações de cipionato de estradiol associado a uma única dose de altrenogest pode ser uma alternativa para o aproveitamento de éguas receptoras de embrião em anestro.

Palavras-chave: Altrenogest. Cipionato de estradiol. Receptoras. Anestro. Transferência de embrião

ABSTRACT

The equinoculture embryo transfer (ET) is the most widespread reproductive biotechnology in the species, where the availability of receptors suitable for this technique during the breeding season represents one of the main challenges for reproductive centers. The aim of the present study was to promote the utilization of anestrus embryo recipients by synchronization with the administration of estradiol cypionate followed by injectable altrenogest, thus proposing a new synchronization protocol. It considered in anestrus (acyclic) the recipients with follicles up to 15 mm or absence of these, as well as absence of uterine edema and corpus luteum, and cyclic those that showed presence of preovulatory follicle and / or CL. Anestrus recipients received 2mL Estradiol Cypionate (5 mg / mL) on the first day and an additional 1 mL intramuscularly on the following day. On the third day after uterine edema scale 3, 3mL altrenogest (75mg / mL) was administered. mL) also intramuscularly, in this group the ET was performed five, six or seven days (D5, D6 or D7) after receiving the injectable altrenogest. In cyclic recipients, synchronization with donors was performed by induction of ovulation with HCG in mares with follicles ≥ 40 mm in diameter and satisfactory edema (scale 3). Grade 1, 2 and 3 embryos were transferred at six, seven or eight days of development. The pregnancy diagnosis was made at fifteen days of the embryo and followed up until thirty days of gestation. Statistical evaluation was performed using the Fischer test with a probability of 5%. There was no significant difference between the gestation rates of treated and untreated mares at 15 and 30 days of gestation. When comparing the day of ET after treatment with altrenogest, no difference was also observed on days five, six and seven. When evaluating the day of embryo collection, at 15 days of gestation, 80% and 92.3% were obtained for the treated and untreated groups, respectively, differing statistically from each other. Cyclic recipients had a higher pregnancy rate than the treated group ($p < 0.05\%$) when receiving grade 1 embryos on transfer. It was concluded that pregnancy was similar between cyclic and acyclic recipients, but the proposed protocol with two administrations of estradiol cypionate associated with a single dose of altrenogest can be an alternative for the use of anestrus embryo receptor mares.

Keywords: Altrenogest. Estradiol cypionate. Recipient mares. Anestrus. Embryo transfer.

LISTA DE ABREVIATURAS

TE	Transferência de embrião
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
FSH	Hormônio folículo estimulante
mm	Milímetros
E₂	Estradiol
LH	Hormônio Luteinizante
CL	Corpo lúteo
F2α	Prostaglandina F2 α
PGF	Prostaglandinas
hCG	Gonadotrofina Coriônica Humana
PGF2-α	Prostaglandina F2 α
D0	Dia da ovulação
D-1	Ovulação da receptora um dia antes da doadora
D+3	Ovulação da receptora um três dias depois da doadora
P4	Progesterona
mg	Miligramas
%	Por cento
MHz	Megahertz
mL	Mililitros
D4	Quatro dias após ovulação
D5	Cinco dias após ovulação
D6	Seis dias após ovulação
D7	Sete dias após ovulação
D8	Oito dias após ovulação
D11	Onze dias após ovulação

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 -** Esquema representativo do protocolo instituído com duas administrações de cipionato de estradiol seguidas pela administração de altrenogest e realizado a transferência de embrião no dia cinco, seis ou sete após uso do altrenogest. Aos onze, quinze e trinta dias de idade do embrião, realiza-se o diagnóstico de gestação, acompanhamento com quinze e trinta dias, respectivamente.....20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Taxa de prenhez e perda embrionária com 15 e 30 dias de gestação das receptoras tratadas e não tratadas.....	23
Tabela 2 -	Taxa de prenhez (%) com 15 e 30 dias de gestação para receptoras com cinco, seis, e sete dias após administração do altrenogest nas receptoras tratadas e com quatro, cinco, seis, sete e oito dias após ovulação para receptoras não tratadas.....	24
Tabela 3 -	Comparação entre as taxas de prenhez (%) aos trinta dias das transferências realizadas cinco, seis e sete dias após administração de altrenogest nas receptoras tratadas e não tratadas.....	25
Tabela 4 -	Taxa de prenhez (%) com 15 e 30 dias de gestação para embriões coletados seis, sete ou oito dias após a ovulação da doadora entre o grupo tratado e não tratado.....	26
Tabela 5 -	Taxa de prenhez (%) com 15 e 30 dias de gestação para o grau de qualidade do embrião (grau 1, grau 2 e grau 3) entre o grupo tratado e não tratado.....	26

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Ciclo reprodutivo e sazonalidade da égua.....	15
2.2 Seleção e manejo de receptoras cíclicas e acíclicas.....	15
2.3 Sincronização entre doadoras e receptoras de embriões.....	15
2.4 Estrógenos e progestágenos em receptoras de embrião acíclicas.....	16
2.5 Diferentes protocolos de sincronização para receptoras acíclicas.....	17
3. OBJETIVOS	19
3.1 Geral.....	19
3.2 Específicos.....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1 Animais.....	20
4.2 Grupos Experimentais.....	20
4.2 Transferência dos embriões.....	21
4.3 Avaliações ultrassonográficas e diagnóstico de gestação.....	22
4.5 Análise Estatística.....	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
6. CONCLUSÃO.....	28
REFERÊNCIAS.....	29

1 INTRODUÇÃO

Na equinocultura a transferência de embriões (TE) é a biotecnologia da reprodução mais difundida na espécie, chegando a superar o uso exclusivo da técnica de inseminação artificial (HARTMAN, 2011). Segundo IETS (2018), o Brasil ocupa um lugar de destaque no cenário mundial quando se trata de transferências de embriões, reportando 31.650 colheitas e 19.560 transferências realizadas no ano de 2017.

Sabe-se que o ciclo reprodutivo das fêmeas da espécie equina é fortemente influenciado pelo fotoperíodo. As éguas são consideradas poliéstricas estacionais e apresentam quatro fases de atividade ovariana: fase de transição de primavera, fase ovulatória, fase de transição de outono e fase de anestro (GINTHER et al., 2004).

No hemisfério norte, entre os meses de Abril e Setembro tem-se a primavera e o verão, já no hemisfério sul, estas estações ocorrem entre os meses de Outubro e Março. A ocorrência de dias mais longos (mais horas-luz por dia) são durante a primavera e verão, neste período o estímulo luminoso maior faz com que as éguas iniciem a atividade ovariana (MCKINNON & VOSS, 1993).

Na fase de transição de primavera, que é o período que antecede a estação reprodutiva, as éguas apresentamaios prolongados e anovulatórios. Na fase ovulatória, tem-se a atividade ovariana promovendo não só crescimento folicular como também a ovulação. Enquanto que a fase de transição de outono, que ocorre logo após a estação reprodutiva, osaios também vão tornando-se prolongados e anovulatórios devido a diminuição do estímulo luminoso e logo em seguida elas entram em um período de anestro que se dá nos meses mais frios do ano (OLIVEIRA & SOUZA, 2003).

Considerando estas peculiaridades das fêmeas da espécie equina, a TE surge como uma importante ferramenta para otimizar a eficiência reprodutiva viabilizando a obtenção de mais de um embrião de uma mesma doadora em uma única estação de monta (ARRUDA et al., 2001). Por esta razão, a qualidade das receptoras é de suma importância para o sucesso da técnica, o que representa limitação, devido à disponibilidade destas e pela dificuldade na sincronização das doadoras com as receptoras (LANGNEAUX & PALMER, 1993) e, também, pelo fato de que muitas delas encontram-se em anestro estacional ou anestro profundo no início da estação reprodutiva.

Por estas razões, o aproveitamento de receptoras acíclicas através da administração de progestágenos exógenos no estabelecimento e manutenção da gestação, é uma importante ferramenta para otimização da técnica de TE tornando-a mais produtiva ao longo do ano

(HINRICHS et al., 1987). Diversos estudos demonstram a eficácia de protocolos de sincronização com estrógeno e progestágenos no preparo e manutenção da gestação de éguas acíclicas como receptoras de embriões nos programas de TE aumentando as taxas de prenhez ao longo do ano (SILVA et al., 2014).

Portanto, é de grande valia o desenvolvimento de protocolos de sincronização para receptoras acíclicas que apresentem boa aplicabilidade nos centros de reprodução, que possua custo razoável e resultados satisfatórios. Desta forma, este trabalho buscou aplicar um novo protocolo de sincronização para receptoras acíclicas através da associação de cipionato de estradiol e altrenogest injetável, com menos aplicações e com concentrações diferentes das já reportadas na literatura.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ciclo reprodutivo e sazonalidade da égua

As fêmeas equinas apresentam atividade reprodutiva em momentos pré-estabelecidos durante o ano, classificando-as assim como animais poliéstricos estacionais (GINTHER, 1992). Esta característica de sazonalidade é fortemente determinada pelo fotoperíodo crescente e aumento da temperatura, estes fatores quando favoráveis, culminam para que as coberturas e o nascimento dos potros aconteçam durante a primavera e o verão (ARRUDA et al., 2001; HAFEZ & HAFEZ, 2004).

O período reprodutivo é regulado pelo eixo pineal-hipotalâmico-hipofisário-gonadal, onde o estímulo visual luminoso promove a inibição da secreção de melatonina pela glândula pineal, ou seja, em dias longos onde há maior incidência luminosa tem-se menor secreção de melatonina. Durante o inverno, quando há redução das horas de luz/dia e da temperatura, restabelece o estímulo da produção de melatonina, comprometendo assim a liberação de GnRH pelo hipotálamo e consequentemente dos hormônios hipofisários e gonadais (GINTHER, 1992; MCKINNON & VOSS, 1993).

A sazonalidade reprodutiva é dividida em anestro, fase de transição de primavera, ovulatória e de transição de outono. Então tem-se nenhuma ou pouca ovulação durante o inverno (fase de anestro), aumento da dinâmica folicular durante a primavera (fase de transição de primavera), atingindo o máximo durante o verão (fase ovulatória) e diminuindo progressivamente no outono (fase de transição de outono) (GINTHER et al., 2005).

O FSH promove o surgimento de uma onda folicular ovariana, que nas éguas ocorre através do recrutamento de folículos com diâmetro de aproximadamente 13 mm. Aproximadamente com quatro a cinco dias após a concentração plasmática de FSH ter atingido o seu valor máximo, os maiores folículos alcançam o diâmetro médio de 19 e 22 mm, iniciando a divergência folicular, caracterizada pela seleção e crescimento contínuo do maior folículo, que será considerado como dominante, e redução do crescimento dos folículos remanescentes, considerados como folículos subordinados devido à produção de E_2 e inibina pelo folículo dominante (GASTAL et al., 1999; GINTHER et al., 2003).

Nas espécies monovulatórias, que é o caso das éguas, normalmente, o folículo dominante secreta elevada quantidade de estrógeno e é sensível ao estímulo ovulatório desempenhado pelo padrão de liberação do LH, sendo estes dois hormônios responsáveis pela manifestação dos sinais do estro e pela ovulação, respectivamente (DRIANCOURT, 2001; GURGEL et al., 2008).

O aproveitamento de receptoras na fase de anestro ou transição de primavera tornou-se extremamente desejável para algumas associações de criadores de equinos (ROCHA FILHO et al., 2004), devido à pressão econômica para que os potros nasçam o mais próximo possível do início do ano hípico (1° de janeiro no hemisfério norte e 1° de julho no hemisfério sul).

Este fato tem incentivado pesquisadores a desenvolverem métodos que antecipem a ciclicidade das éguas por meio de programas com luz artificial (NAGY et al., 2000) ou que permitam a utilização de receptoras acíclicas suplementadas com estrógenos e progestágenos nos programas de TE (CARNEVALE et al., 2000; ROCHA FILHO et al., 2004).

2.2 Seleção e manejo de receptoras cíclicas e acíclicas

Considerando que a qualidade da receptora é a chave para o sucesso do programa de TE, é imprescindível que estas sejam livres de anormalidades uterinas e ovarianas e apresentem fertilidade, escore corporal e desenvolvimento mamário satisfatórios. Deve-se fazer escolhas por receptoras com idade entre quatro e 10 anos, preferencialmente (VANDERWALL, 2011; SQUIRES et al, 1999).

Deve-se examinar diariamente as receptoras através da ultrassonografia durante o cio para monitoramento do crescimento folicular e consequentemente, da ovulação. Recomenda-se que pelo menos duas receptoras estejam sincronizadas para cada doadora, permitindo assim escolher antes da inovulação aquela que apresenta melhor condição uterina para receber o embrião (CARNEVALE, 2000).

Pode-se considerar acíclica, aquelas receptoras que apresentarem pouca ou nenhuma atividade folicular, ovários pequenos com ausência de corpo lúteo e útero sem influência de estrógeno. É possível observar éguas em anestro profundo enquanto outras encontram-se em anestro de transição. Em anestro são aquelas que apresentam folículos com diâmetro medindo até 15 mm e ausência de CL, enquanto que em transição são aquelas que apresentam folículos entre 15 a 25 mm e ausência de CL, indicando a não ocorrência da primeira ovulação durante aquela estação (SHARP, 1980). Ambas podem ser selecionadas para os programas de TE através do emprego de protocolos de sincronização para receptoras acíclicas.

2.3 Sincronização entre doadoras e receptoras de embriões

É imprescindível a sincronização entre doadora e receptora para a efetivar as gestações nos programas de TE. Quando não sincronizadas tem-se mortalidade embrionária precoce logo na primeira semana do desenvolvimento da vesícula no ambiente uterino. Além disso, melhores taxas de prenhez foram observadas em TE realizadas em receptoras cíclicas 5 ou 6 dias após a

ovulação quando comparada aquelas que ovularam há 7 a 9 dias (BARNES, 2000).

A progesterona produzida pelo CL em éguas cíclicas promove alterações no ambiente uterino que possibilitam o desenvolvimento embrionário. Uma vez que um embrião é transferido a um útero não sincronizado, este pode estar sujeito a níveis hormonais e fatores de crescimento não correspondentes à fase na qual ele se encontra. (EVANGELISTA, 2012).

A administração intramuscular de prostaglandina (PGF₂-α) ou análogo na égua doadora anterior a mesma aplicação na receptora quando ambas estão há pelo menos cinco dias no diestro, pode possibilitar a sincronização do crescimento da onda folicular e consequentemente da ovulação na doadora/receptora (ALLEN, 2000).

A utilização de várias combinações de esteroides reprodutivos (progestágenos e estrógenos), prostaglandina F_{2α} (PGF e análogos), hCG, GnRH e análogos, têm sido usados no controle do desenvolvimento folicular e indução de ovulação em éguas, visando a melhor sincronização em éguas (MCKINNON; VOSS, 1992).

A janela de sincronização entre doadoras e receptoras permite que a receptora ovule num no intervalo de um dia antes (D-1) até 3 dias depois (D+3) da ovulação da doadora (D0), com coleta de embrião no sétimo dia (MCKINNON & SQUIRES, 2007). Jacob et al. (2012) afirma que essa janela de sincronização pode ser mais flexível, uma vez que receptoras ovuladas de um dia antes (D-1) até cinco dias (D+5) após a doadora podem ser utilizadas sem afetar as taxas de prenhez.

2.4 Estrógenos e progestágenos em receptoras de embrião acíclicas

São denominados “progestágenos” todo esteróide natural ou sintético que apresente efeito similar ao efeito da progesterona (PINTO, 2011). Nos equinos, a progesterona (P₄) e o estradiol (E₂) são os principais hormônios esteroides de origem ovariana (GINTHER, 1992). Os progestágenos são amplamente empregados em programas de transferência de embriões para promover e manter a gestação em receptoras acíclicas (HINRICHS et al. 1985; GRECO et al., 2012).

Hinrichs et al. (1986) foram pioneiros na administração de P₄ e altrenogest no preparo de éguas receptoras ovariectomizadas. Neste estudo, os autores, obtiveram 75% de taxa de gestação ao administrar de 300 mg diários de P₄ por cinco dias antes da TE, demonstrando que éguas ovariectomizadas tratadas com progestágenos (altrenogest e P₄) foram capazes de manter a gestação após a transferência do embrião.

Durante o estro, o estrógeno promove o aumento dos receptores uterinos de P₄ e o embrião equino secreta estrógeno na fase inicial da gestação. No diestro ocorre diminuição

destes receptores devido ação da progesterona (ZAVY et al., 1979; SILVA et al., 2014; AUPPERLE et al., 2000). Ao administrar estrógeno é possível simular a condição hormonal do estro e estimular assim a expressão de receptores para progesterona. Após a verificação do edema uterino provocado pelo estrógeno, administra-se então os progestágenos para promover as mudanças endometriais similares às que ocorrem nas éguas naturalmente gestantes (PINTO, 2011).

Diferentes protocolos com a utilização de benzoato de estradiol foram descritos em éguas receptoras acíclicas, como 2,5 mg em dose única (SILVA et al., 2014), 5 mg em três doses decrescentes (GRECO et al., 2012) e 10 mg em doses decrescentes (BOTELHO, 2015), todos com o objetivo de promover edema uterino.

Ao testar diferentes progestágenos disponíveis comercialmente, como a medroxiprogesterona, hidroxiprogesterona, altrenogest, norgestomet e megestrol, Mckinnon et al. (2000) observaram que apenas o altrenogest apresentou eficácia na manutenção da gestação.

Após uso de estrógeno Botelho et al. (2015) associaram 1500 mg de progesterona de longa ação, de três a oito dias, antes de realizar a transferência de embrião e Silva et al. (2014) usaram altrenogest oral por um período de quatro a seis dias antes da transferência, ambos protocolos ao utilizar diferentes progestágenos as taxas de gestação foram semelhantes e superior a 70%.

2.5 Diferentes protocolos de sincronização para receptoras acíclicas

Três diferentes protocolos de sincronização aplicados antes da TE foram propostos por Hinrichis et al. (1986) em outro estudo com éguas ovariectomizadas. Ao utilizar 22 mg de altrenogest via oral uma vez ao dia durante cinco dias; 66 mg de altrenogest via oral uma vez ao dia durante seis dias; 300mg de P4 injetável uma vez ao dia durante cinco dias, obteve taxa de prenhez de 1/6, 2/6, 2/5 e 13/19, respectivamente, demonstrando que éguas ovariectomizadas tratadas com altrenogest ou P4 podem ser inseridas nos programas de transferência de embrião e de manter a gestação.

McKinnon et al. (1988) realizaram três diferentes protocolos em éguas ovariectomizadas: no primeiro protocolo, administrou-se de três a cinco dias de 17β -estradiol (E_2) seguido da administração de 300 mg de progesterona diários após a ovulação da doadora; no segundo protocolo estendeu-se a administração de E_2 além da aplicação da progesterona; e no terceiro protocolo substituiu-se a progesterona por 0,044mg/kg de altrenogest diários. Obteve-se 70% e 80% de taxa de gestação respectivamente entre os protocolos propostos,

sugerindo que a concentração adequada de progestágeno é fundamental para manutenção da gestação (MCKINNON et al., 1988).

Carnevale et al. (2000) ao administrar altrenogest diariamente às receptoras acíclicas, 5 a 7 dias antes da TE, até os 120 dias, encontraram taxas de gestação semelhantes entre as éguas em anestro de transição e cíclicas aos 16 dias de gestação.

A progesterona de longa ação foi utilizada por Bringel et al. (2003) em éguas sem o corpo lúteo primário e obteve concentrações de progesterona compatíveis com a fase luteal de éguas cíclicas, após a administração de 1500 mg a cada sete dias.

Receptoras cíclicas tratadas com progesterona de longa ação, apresentaram taxas de gestação e mortalidade embrionária semelhantes às receptoras cíclicas. O intervalo entre o início do tratamento e a TE não afetou as taxas de prenhez de 57,6% e 44,5% respectivamente assim como as taxas de mortalidade embrionária de 11,51% nas acíclicas e 9,72% nas cíclicas (GRECO et al., 2012).

Rocha Filho et al. (2004) propuseram que protocolos com progesterona de longa ação e de curta ação são eficazes para a preparação de receptoras acíclicas, e não apresentam diferenças nas taxas de prenhez. Pinna et al (2007), ao utilizarem éguas cíclicas e éguas acíclicas tratadas com cipionato de estradiol e progesterona de longa ação tiveram melhor índice de prenhez para o grupo tratado, 49% e 54,6% respectivamente.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Promover o aproveitamento de receptoras de embrião em anestro através da sincronização com a administração de cipionato de estradiol seguido por altrenogest injetável, propondo assim um novo protocolo de sincronização.

3.2 Objetivos Específicos

- Comparar a taxa de prenhez com 15 e 30 dias de gestação entre o grupo tratado e não tratado;
- Determinar através da taxa de prenhez o melhor dia para realização da TE após a administração do altrenogest;
- Analisar se o dia de coleta do embrião interfere na taxa de prenhez das receptoras tratadas;
- Verificar se o grau de qualidade embrionária interfere na taxa de prenhez das receptoras tratadas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Este experimento obteve aprovação do Comitê de Ética da Universidade Estadual do Maranhão sob nº 43/2019.

Foram realizadas 189 transferências em receptoras de embriões equinos, mestiças e da raça Quarto de Milha, com idade entre 4 e 16 anos, score corporal satisfatório pesando 350 a 500kg e em bom estado de saúde. Os animais receberam concentrado, feno de *Coast Cross* (*Cynodon dactylon*) e foram mantidos em pasto também de *Coast Cross* (*Cynodon dactylon*) com água *ad libitum*.

Todas as fêmeas foram examinadas previamente através da palpação retal e avaliação ultrassonográfica para certificação da integridade do sistema reprodutivo, não apresentando alterações patológicas em ambas avaliações.

4.2 Grupos Experimentais

Diariamente as receptoras eram avaliadas por ultrassonografia transretal para identificação da fase reprodutiva em que se encontravam. Através desta avaliação, para as receptoras em anestro (acíclicas) observou-se folículos de até 15 mm ou ausência destes, assim como ausência de edema uterino e corpo lúteo, classificando-as assim em anestro. Já nas éguas cíclicas observou-se precisamente a presença de folículo pré-ovulatório e/ou CL.

Todas as receptoras classificadas em anestro foram submetidas ao protocolo proposto (Figura 1) através da administração de 2mL e 1mL de Cipionato de Estradiol (5 mg/mL) por via intramuscular por dois dias consecutivos.

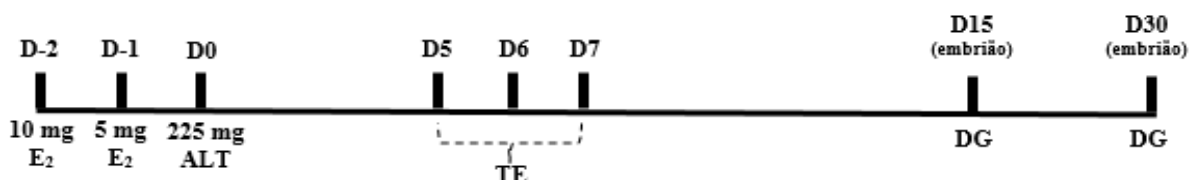


Figura 1: Esquema representativo do protocolo instituído com duas administrações de cipionato de estradiol seguidas pela administração de altrenogest e realizado a transferência de embrião no dia cinco, seis ou sete após uso do altrenogest. Aos onze, quinze e trinta dias de idade do embrião, realiza-se o diagnóstico de gestação, acompanhamento com quinze e trinta dias, respectivamente

No terceiro dia durante a avaliação ultrassonográfica ao constatar-se a presença de edema uterino (escala 3) realizou-se a administração de 3mL de Altrenogest (75mg/mL) por via intramuscular, sendo este o dia considerado da ovulação (D0). Estas receptoras eram ainda avaliadas por ultrassonografia nos dias subsequentes para observação da redução do edema

uterino até o dia da TE realizada entre os dias D5, D6 ou D7 após o recebimento do altrenogest injetável.

Considerou-se as receptoras que demonstram cio natural e pelo menos uma ovulação espontânea (cíclicas) como o grupo controle. Nestas, a sincronização com as doadoras foi realizada através da indução de ovulação nas éguas com folículos de diâmetro ≥ 40 mm e edema satisfatório (escala 3). Realizou-se a indução através da administração intravenosa de 3 mL de hCG (1000 UI/mL). Buscou-se sincronizar estas receptoras (grupo controle) para que tivessem ovulação um dia antes até três dias depois da ovulação das respectivas doadoras (-1 a +3).

Após realizada a TE, de forma padronizada, todas as receptoras (acíclicas e cíclicas) receberam 15mL de altrenogest oral (Regu-mate® 2,2mg/mL), até o dia do diagnóstico de gestação (D15) para que neste intervalo entre a TE até o dia do DG as receptoras acíclicas não ficassem desprovidas de uma fonte exógena de progesterona.

4.3 Transferência dos embriões

Antes de iniciar a transferência as receptoras eram novamente avaliadas por ultrassonografia para observação de corpo lúteo nas receptoras cíclicas e condição uterina (ausência de edema).

As coletas dos embriões foram realizadas com seis, sete ou oito dias após a ovulação e as transferências foram realizadas pelo método transcervical não cirúrgico com o auxílio de um inovulador, conforme citado por Squires et al. (2003). Os embriões foram depositados preferencialmente no corno uterino direito, realizados por um único técnico.

Antes da transferência os embriões eram avaliados sob o microscópio estereoscópio AmScope quanto ao grau conforme citado por McKinnon & Squires (1988):

Grau 1: Excelente, embrião ideal, esférico, com tamanho das células, cor e textura uniformes.

Grau 2: Bom, pequenas imperfeições com poucos blastômeros extrusos, forma irregular ou separação do trofoblasto.

Grau 3: Razoável, com lesões não muito severas, com presença de blastômeros extrusos, células degeneradas ou blastocele colapsada.

Grau 4: Pobre, com lesões sérias como blastocele colapsada, vários blastômeros extrusos e células degeneradas, mas com aparência viável da massa embrionária.

Grau 5: Não Fertilizado ou Morto, oócito não fertilizado ou embrião totalmente degenerado.

4.4 Avaliações ultrassonográficas e diagnóstico de gestação

Utilizou-se o aparelho ultrassonográfico Aloka SSD-500 em frequência de 5 MHz. Ambos ovários foram avaliados quanto a presença de folículos e corpos lúteos e suas respectivas dimensões. Na avaliação uterina analisou-se a textura, presença de edema uterino e presença de cistos e líquidos.

O edema uterino foi classificado em uma escala de 0 a 3, onde 0 representa a ausência de edema e 3 edema bem evidente. E quanto ao tônus uterino classificou-se em uma escala de 1 a 3, sendo 1 para consistência flácida e 3 consistência máxima de tensão.

O diagnóstico de gestação foi realizado a partir de 11 até 15 dias (D11-D15 do embrião) mediante observação da vesícula embrionária no lúmen uterino. As receptoras cíclicas com diagnóstico de gestação positivo foram suplementadas com 8mL de progesterona de longa ação (200mg/mL) por via intramuscular a cada cinco dias assim como o acompanhamento ultrassonográfico até trinta dias de gestação. Já as receptoras acíclicas com diagnóstico de gestação positivo foram suplementadas com 3mL de altrenogest via intramuscular a cada sete dias até 120 dias de gestação.

4.5 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa As análises foram executadas através do programa *Statistical Analysis System* (SAS Institute Inc, 2002). Para as variáveis qualitativas como o dia de ovulação da receptora, dia da coleta do embrião e grau de qualidade do embrião, utilizou-se o Teste de Fischer para comparação das taxas de prenhez entre os tratamentos com probabilidade de 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizadas 189 transferências embrionárias, destes, 26 embriões foram transferidos para o grupo de receptoras acíclicas e 163 em receptoras cíclicas. Os dados obtidos para taxas de prenhez entre o grupo tratado e não tratado estão descritos na Tabela 1. Nas receptoras acíclicas obteve-se 61,5% de éguas prenhez e 38,4% de perdas embrionárias aos trinta dias de prenhez enquanto no grupo controle obteve-se 78,5% e 21,4%, respectivamente.

Tabela 1 - Taxa de prenhez (%) e perda embrionária com 15 e 30 dias de gestação das receptoras tratadas e não tratadas

Tratamentos	N	Prenhez		Perda Embrionária	
		15d	30d	15d	30d
Acíclicas	26	73,0 (19/26) ^a	61,5 (16/26) ^a	26,9 (7/26) ^a	38,4 (10/26) ^a
Cíclicas	163	87,1 (142/163) ^a	78,5 (128/163) ^a	12,8 (21/163) ^a	21,4 (35/163) ^a

^aLetras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($p>0,05$).

Estudo realizado por Pinna et al. (2007) utilizando cipionato de estradiol antes da administração de progesterona de longa ação demonstrou taxas de prenhez e perda embrionária de 54,5% e 14,8%, respectivamente, em 100 dias de gestação.

Carnevale et al. (2000) ao comparar as taxas de prenhez de receptoras acíclicas em transição tratadas com altrenogest oral até sete dias antes da transferência de embrião apontaram taxas de prenhez semelhantes entre éguas cíclicas e acíclicas, corroborando com os dados encontrados no presente estudo.

O protocolo com administração de cipionato de estradiol (10 mg/dia, por dois dias), seguido de P4 de curta (200 a 400 mg/dia a cada dois dias) ou longa ação (1500 mg a cada sete dias) proposto por Rocha Filho et al. (2004) com o objetivo de comparar as taxas de gestação em éguas cíclicas e acíclicas observaram taxas similares entre os diferentes tratamentos, em torno de 75%.

Ao testar diferentes progestágenos disponíveis comercialmente, como a medroxiprogesterona, hidroxiprogesterona, altrenogest, norgestomet e megestrol, Mckinnon et al. (2000) observaram que apenas o altrenogest apresentou eficácia na manutenção da gestação.

Se tratando de ciclo artificial, a literatura reporta taxas de gestação e perda embrionária semelhantes entre receptoras acíclicas tratadas seja com altrenogest (ora/injetável), seja com

progesterona de longa ação, evidenciando assim que o aproveitamento destes animais se dá de forma eficiente nos programas de transferência de embrião (McKinnon et al., 1998; Silva et al., 2014; Botelho et al., 2015) e ambos fármacos podem ser utilizados no preparo de receptoras acíclicas. Não há na literatura estudos que reportem taxas de prenhez em éguas acíclicas tratadas com cipionato de estradiol seguido por altrenogest.

Na Tabela 2 tem-se os dados obtidos ao comparar as taxas de gestação para as receptoras que foram submetidas a TE com cinco, seis ou sete dias após o tratamento com altrenogest em comparação às receptoras do grupo controle (que apresentaram ovulação natural). Vale ressaltar que nas receptoras tratadas considera-se o dia corresponde à ovulação o dia da aplicação do altrenogest, conforme descrito no item 4.2.

O dia da TE não afetou as taxas de gravidez em éguas receptoras acíclicas quando comparada com o grupo controle ($p>0,05$), portanto as receptoras em anestro que são submetidas à TE cinco, seis ou sete dias após aplicação do altrenogest apresentam índices de prenhez satisfatórios tanto quanto àquelas receptoras de ciclo normal que são submetidas à TE nesses mesmos dias.

Tabela 2 - Taxa de prenhez (%) com 15 e 30 dias de gestação para receptoras com cinco, seis, e sete dias após administração do altrenogest nas receptoras tratadas e com quatro, cinco, seis, sete e oito dias após ovulação para receptoras não tratadas

Tratamentos	N	D4		D5		D6		D7		D8	
		15	30	15	30	15	30	15	30	15	30
Acíclicas	26	0	0	71,4 ^a (5/7)	71,4 ^a (5/7)	75 ^a (12/16)	56,2 ^a (9/16)	66,6 ^a (2/3)	66,6 ^a (2/3)	0	0
Cíclicas	163	100 ^a (5/5)	60 ^a (3/5)	93,3 ^a (28/30)	90 ^a (27/30)	83,3 ^a (35/42)	76,1 ^a (32/42)	83,3 ^a (35/42)	80,9 ^a (34/42)	88,6 ^a (39/44)	72,7 ^a (32/44)

^aLetras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($p>0,05$).

No presente estudo, a maior taxa prenhez para o grupo tratado ocorreu para as transferências realizadas cinco dias após aplicação do altrenogest (Tabela 3), corroborando com os dados obtidos por Greco et al. (2012) ao utilizar progesterona de longa ação cinco dias anteriores à TE. A administração de 300 mg diários de progesterona, durante cinco dias antes da TE, resultou em 75% de gestação em éguas ovariectomizadas (HINRICHS et al., 1985).

Segundo Hinrichs & Kenney, (1987) as taxas de gestação são superiores (6/8) quando o início do tratamento hormonal com progesterona se dá dois dias após a ovulação da doadora quando comparado com as éguas em que o início do tratamento hormonal ocorreu pelo menos

quatro dias antes da ovulação da doadora (1/12), demonstrando assim a necessidade de sincronia, entre a administração de progesterona na receptora com a ovulação da doadora.

Zavy et al. (1979) demonstraram que o estrógeno estimula o aumento dos receptores de progesterona. Contudo, McKinnon et al. (1988) sugerem que independente do período de administração do estradiol, o requisito primário para o preparo e a manutenção da gestação é uma concentração adequada de progesterona ou altrenogest antes e após a realização da TE após obter taxas de 70 e 80% nos protocolos testados.

Tabela 3 – Comparação entre as taxas de prenhez (%) aos trinta dias das transferências realizadas cinco, seis e sete dias após administração de altrenogest nas receptoras tratadas e não tratadas

Tratamentos	N	D5	D6	D7
		30	30	30
Acíclicas	26	71,4 ^a (5/7)	56,2 ^a (9/16)	66,6 ^a (2/3)
Cíclicas	114	90 ^a (27/30)	76,1 ^a (32/42)	80,9 ^a (32/42)

^aLetras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si ($p>0,05$).

O procedimento não cirúrgico de coleta do embrião do lúmen uterino é relativamente simples e pode ser realizado a partir do 6º dia após a ovulação da doadora respeitando o mecanismo de migração do embrião no ambiente uterino que inicia com entre cinco e seis dias de idade do embrião (OGURI, 1972).

Neste estudo, utilizou-se embriões com seis e sete dias de idade (D6 e D7) para transferências realizadas para o grupo tratado e embriões de seis a oito dias (D6, D7 e D8) para o grupo controle, esta diferença se deu devido a disponibilidade de doadoras/receptoras que estivessem aptas para coleta de embriões aos oito dias.

As melhores taxas de prenhez aos 15 dias de gestação ocorreram nas transferências realizadas com embriões coletados aos sete dias após ovulação da doadora (D7) para o grupo tratado (80%) e para o grupo não tratado obteve-se 92,3 % de prenhez para embriões coletados com seis dias, diferindo estatisticamente ($p<0,05$) do grupo tratado que apresentou 60% de prenhez neste mesmo dia, conforme a Tabela 4.

Já durante o acompanhamento aos 30 dias de gestação o grupo não tratado apresentou melhor taxa de prenhez para embriões maiores, coletados aos oito dias de idade contrapondo-se a taxa de gestação do grupo tratado que permaneceu sendo no D7 (70%). Contudo, aos 30 dias não houve diferença significativa entre os grupos avaliados.

Segundo Squires & Seidel (1995) o período ideal para coleta de embriões se dá entre os dias 7 ou 8 após a fertilização do oócito, onde tem-se melhores taxas de prenhez. O mesmo não é observado em embriões coletados aos nove dias.

Tabela 4 - Taxa de prenhez (%) com 15 e 30 dias de gestação para embriões coletados seis, sete ou oito dias após a ovulação da doadora entre o grupo tratado e não tratado

Tratamentos	N	D6		D7		D8	
		15	30	15	30	15	30
Acíclicas	26	60 ^b (3/5)	40 ^a (2/5)	80 ^a (16/20)	70 ^a (14/20)	0 (0/1)	0 (0/1)
Cíclicas	163	92,3 ^a (24/26)	76,9 ^a (20/26)	86,6 ^a (110/127)	78,4 ^a (100/127)	80 ^a (8/10)	80 ^a (8/10)

^{ab}Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si (p>0,05).

O presente estudo considerou embriões com grau de qualidade 1, 2 e 3 aptos para serem transferidos, contudo 165 embriões das 189 transferências realizadas eram embriões grau 1, havendo predominância destes.

Ao analisar os embriões de melhor qualidade (grau 1), o grupo não tratado apresentou taxas de prenhez aos 15 e 30 dias (88,6% e 80,8%, respectivamente) superiores ao grupo não tratado (p<0,05). Não se obteve diferença significativa entre os grupos para embriões transferidos grau 2 e 3, logo a qualidade do embrião não afetou a taxa de gravidez, conforme a Tabela 5.

Tabela 5 - Taxa de prenhez (%) com 15 e 30 dias de gestação para o grau de qualidade do embrião (grau 1, grau 2 e grau 3) entre o grupo tratado e não tratado

Tratamentos	N	GRAU 1		GRAU 2		GRAU 3	
		15	30	15	30	15	30
Acíclicas	26	70,8 ^b (17/24)	62,5 ^b (15/24)	100 ^a (1/1)	0 (0/1)	100 ^a (1/1)	100 ^a (1/1)
Cíclicas	163	88,6 ^a (125/141)	80,8 ^a (114/141)	75 ^a (12/16)	68,7 ^a (11/16)	83,3 ^a (5/6)	50 ^a (3/6)

^{ab}Letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si (p>0,05).

Botelho et al (2015) transferiram embriões grau 1, 2 e 3 e não observaram diferença (p>0,05) nas taxas de prenhez com 13, 30 e 60 dias de gestação. Enquanto Greco et al (2012), utilizaram somente embriões grau 1 para as transferências realizadas em seus estudos e

obtiveram 54,4% de prenhez em receptoras acíclicas.

É reportado na literatura que a perda embrionária é maior em transferências cujo embriões possuem qualidade 2 e 3 do que os embriões de grau 1 (Carnevale et al., 2000). Logo, para as transferências de embrião seja em receptoras cíclicas ou acíclicas deve-se permanecer priorizando embriões que apresentem melhor grau de qualidade (grau 1) por serem mais viáveis para estabelecer e manter a gestação.

6 CONCLUSÃO

Desta forma, conclui-se que a prenhez foi semelhante entre as receptoras cíclicas e acíclica, porém o protocolo proposto com duas administrações de cipionato de estradiol associado a uma única dose de altrenogest pode ser uma alternativa para o aproveitamento de éguas receptoras de embrião em anestro.

REFERÊNCIAS

- ALLEN, W. R. The physiology of early pregnancy in the mare. In: **Proceedings American Association of Equine Practitioners**. p. 338-354. 2000.
- ARRUDA, R.P.; VISINTIN, J.A.; FLEURY, J.J.; GARCIA, A.R.; MADUREIRA, E.H.; CELEGHINI, E.C.C.; NEVES NETO, J.R. Existem relações entre tamanho e morfoecogenicidade do corpo lúteo detectados pelo ultra-som e os teores de progesterona plasmática em receptoras de embrião eqüinos? **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** 38:233-239, 2001.
- AUPPERLE, O.S. et al. Cyclical endometrial steroid hormone receptor expression and proliferation intensity in the mare. **Equine Vet J.**;32(3):228-32, 2000. <http://dx.doi.org/10.2746/042516400776563554>
- BARNES, F. L. The effects of the early uterine environment on the subsequent development of embryo and fetus. **Theriogenology**, v. 53, n. 2, p. 649-658, 2000.
- BRINGEL, B. A.; JACON, J. C. F.; ZIMMERMAN, M.; ALVARENGA, M. A.; DOUGLAS, R. H. Biorelease progesterone LA 150 and its application to overcome effects of premature luteolysis on progesterone levels in mares. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. V. 27, p. 498-500, 2003.
- BOTELHO, J.H.V.; PESSOA, G.O.; ROCHA, L.G.P.; YESTE, M. Hormone supplementation protocol using estradiol benzoate and long-acting progesterone is efficient in maintaining pregnancy of anovulatory recipient mares during autumn transitional phase. **Animal Reprod.** 2015;153:39-43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.12.014>
- CARNEVALE, E.M.; RAMIREZ, R.J.; SQUIRES, E.L.; ALVARENGA, M.A.; VANDERWALL, D.K.; MC CUE, P.M. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. **Theriogenology**. 2000;54(6):965-79. [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00405-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00405-2)
- DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals: implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v.55, p.1211- 1239, 2001.
- EVANGELISTA, R. M. **A transferência de embriões em equinos e a importância da égua receptora**. Trabalho de conclusão do curso – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Veterinária. Curso de Medicina Veterinária, 2012.
- GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; WILTBANK, M. C.; GINTHER, O. J. Follicle deviation and intrafollicular and systemic estradiol concentrations in mares. **Biology of Reproduction**, v. 61, n. 1, p. 31-39, 1999.
- GINTHER, O.J. Reproductive Biology of the Mare, Basic and Applied Aspects. 2th ed. **Equiservices Publishing**, Cross Plains. 642p, 1992.
- GINTHER, O. J.; WOODS, B. G.; MEIRA, C.; BEG, M. A.; BERGFELT, D. R. Hormonal mechanism of follicle deviation as indicated by major versus minor follicular waves during the transition into the anovulatory season in mares. **Anim Reprod Sci**, v.126, p.653-660, 2003.
- GINTHER, O.J.; BEG, M.A.; GASTAL, E.L. Follicle dynamics and selection in mares. **Anim**

Reprod Sci, v.1, p.45-63, 2004.

GINTHER, O.J; GASTAL, E. L.; GASTAL, M.O.; BEG, M. A. Regulation of circulating gonadotropins by the negative effects of ovarian hormones in mares. **Biology of Reproduction**, v.73, p.315-323, 2005.

GRECO, G.M.; BURLAMAQUI, F.L.G.; PINNA, A.E.; DE QUEIROZ, F.J.R.; CUNHA, M.P.S; BRANDÃO, F.Z. Use of long-acting progesterone to acyclic embryo recipient mares. **R Bras Zootec**. 2012;41(3):607-11. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982012000300019>

GURGEL, J. R. C.; VIANA, C. H. C; PEREZ, E. G.A; NICHI, M. Dinâmica folicular em éguas: aspectos intrafoliculares. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 2, p. 122-132, 2008.

HAFEZ, E.S.E; HAFEZ, B. Reprodução Animal. 7.ed. **Barueri: Manole**, 513p, 2004.

HARTMAN, D.L. Embryo Transfer. In: Mckinnon AO, Squires EL, Waala WE, Varner DD. (2nd Ed.). **Equine Reproduction**. Oxford: Wiley-Blackwell. p.2871-2879, 2011.

HINRICHS, K.; SERTICH, P.L.; CUMMINGS, M.R.; KENNEY, M.R. Pregnancy in ovariectomized mares achieved by embryo transfer. **Equine Veterinary Journal**, Supplement 3, p. 74-75, 1985.

HINRICHS, K.; SERTICH, P.L.; KENNEY, R.M. Use of altrenogest to prepare ovariectomized mares as embryo transfer recipients. **Theriogenology**, v. 26, n.4, p.455-460, 1986.

HINRICHS, K.; KENNEY, R.M. Effect of timing of progesterone administration on pregnancy rate and embryo transfer in ovariectomized mares. **J Reprod Fertil Suppl**, n.35, p.439-443, 1987.

INTERNACIONAL EMBRYOS TECHNOLOGY SOCIETY, 2018: 2017 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. **Embryo Technology Newsletter**. Vol. 36, No. 4, Dec, 2018. https://www.iets.org/pdf/Newsletter/Dec18_IETS_Newsletter.pdf

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

LAGNEAUX, D.; PALMER, E. Embryo transfer in anoestrous recipient mares: attempts to reduce altrenogest administration period by treatment with pituitary extract. **Equine Veterinary Journal**, v. 25, n. S15, p. 107-110, 1993.

MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; CARNEVALE, E.M.; HERMENET, M.J. Ovariectomized steroid-treated mares as embryo transfer recipient and as a model to study the role of progestins in pregnancy maintenance. **Theriogenology**. 1988;29(5):1055-63. [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(88\)80029-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(88)80029-3).

MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. Equine reproduction, **Philadelphia: Lea & Febiger**; 1993, p. 121-132.

MCKINNON, A.O.M.C.; LESCUN, T.B.; WALKER, J.H.; VASEY, J.R.; ALLEN, W.R. The inability of some synthetic progestagens to maintain pregnancy in the mare. **Equine veterinary journal**, v.32, n. 1, p. 83-85, 2000.

MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L. Embryo Transfer and Related Technologies. In: NAGY, P.; GUILLAUME, D.; DAELS, P. Seasonality in mares. **Anim Reprod.** 60-61:245-62, 2000. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00133-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00133-0).

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

PINNA, A.L.; DE QUEIROZ, F.J.R.; BURLAMAQUI, F.L.G.; GRECO, G.M.; PINHO, T.G.; BRANDÃO, F.Z. Taxa de gestação e incidência de morte embrionária em eguas recepc aciclicas e ciclicas tratadas com P4 LA. Universidade Rural. **Série Ciencias da vida.** 2007;27(Suplemento):137-9.

PINTO, C.R.F. Progestagens and Progesterone. In: MC KINNON, A.O.; SQUIRES, E.L.; VAALA, W.E.; VARNER, D.D. Equine Reproduction. 2º Ed. **Blackwell Publishing**, 2011. vol.2, chap.189, pg.1811-1817.

ROCHA-FILHO, N. A.; PESSOA, M. A.; GIOSO, M. M.; ALVARENGA, M. A. Transfer of equine embryos into anovulatory recipients supplemented with short or long acting progesterone. **Animal Reproduction**, v. 1, n.1, p 91-95, 2004.

VANDERWALL, D.K. Progesterone. In: Equine Reproduction. 2nd ed. New Jersey (USA): **Blackweel Publishing**; p. 1637-41. 2011.

SILVA, E.S.M. et al. Supplementary corpora lutea monitoring allows progestin treatment interruption on day 70 of pregnancy in non-cyclic recipient mares. **Anim Reprod.** 2014;144(3-4):122-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.12.004>

SQUIRES, E. L. Cooled and frozen stallion semen, fort collins: animal reproduction biotechnology laboratory. **Colorado State University, Bulletin n. 9**, 1999.

SQUIRES, E.L., SEIDEL, G.E. Jr., Superovulation. In: Colletion and transfer of equine embryos. **Anim. Reprod. And Biotechnology Lab., Bulletin n.8**, Fort Collins, Colorado, 1995. P. 32-38.

SQUIRES, E.L.; MCCUE, P.M.; VANDERWALL, D. The current status of equine embryo transfer. **Theriogenology.** 1999;51(1):91-104. [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00234-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00234-9)

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

SHARP, D.C. Environmental influences on reproduction in horses. **Vet Clin North Am Large Anim Pract.** 1980;2(2):207-23.

ZAVY, J.T.; MAYER, R.; VERNON, M.W.; BAZER, F.W.; SHARP, D.C. An investigation of the uterine luminal environment of non-pregnant and pregnant pony mares. **J Reprod Fertil Suppl.;**(27):403-11, 1979.

