

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

RODRIGO ALVIM SOUZA

**AVALIAÇÃO DE FATORES RELATIVOS AO EMBRIÃO E PREPARO DA
RECEPTORA QUE PODEM INTERFERIR NAS TAXAS DE GESTAÇÃO EM
PROGRAMAS DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM EQUINOS**

**UBERLÂNDIA
2023**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

RODRIGO ALVIM SOUZA

**AVALIAÇÃO DE FATORES RELATIVOS AO EMBRIÃO E PREPARO DA
RECEPTORA QUE PODEM INTERFERIR NAS TAXAS DE GESTAÇÃO EM
PROGRAMAS DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM EQUINOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária – FAMEV da Universidade Federal de Uberlândia – UFU, como requisito parcial à aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso.

Orientadora: Profa. Dra. Elisa Sant’Anna Monteiro da Silva

**UBERLÂNDIA
2023**

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”. (Isaac Newton)

RESUMO

A transferência de embriões (TE) oferece diversas vantagens, como a obtenção de potros de éguas em competição, a produção de múltiplos potros em um único ano, a reprodução de éguas com problemas de saúde e o auxílio a éguas com dificuldades reprodutivas. A sincronização do ciclo estral entre a égua doadora e a égua receptora é crucial para o sucesso da TE, assim, diferentes protocolos têm sido estudados para alcançar essa sincronização e melhorar as taxas de gestação. Além disso, a qualidade, idade e tamanho dos embriões também podem afetar as taxas de prenhez e perda embrionária. O presente estudo analisou dados de TE em éguas, abordando a influência de diferentes variáveis nas taxas de confirmação de prenhez nas receptoras. Neste estudo retrospectivo, foram analisados dados de 346 transferências de embriões em éguas receptoras cíclicas e acíclicas de diferentes haras, sendo estas submetidas a diferentes tratamentos hormonais. Os embriões foram classificados de acordo com sua qualidade e tamanho, e a confirmação da prenhez foi avaliada por ultrassonografia transretal aos 14 dias. Os resultados indicaram que a qualidade do embrião teve um impacto significativo nas taxas de confirmação de prenhez nas receptoras. Enquanto, outras variáveis analisadas não demonstraram significância. Recomenda-se que pesquisas futuras explorem outras variáveis e incluam uma amostra maior de receptoras para confirmar e ampliar esses achados. Além disso, estudos adicionais podem investigar a relação entre a qualidade do embrião e outros desfechos reprodutivos, visando aprimorar as estratégias de seleção de embriões e o sucesso dos programas de reprodução assistida.

Palavras-chave: égua; embrião; transferência de embrião; protocolos.

ABSTRACT

Embryo transfer (ET) offers various advantages, such as obtaining foals from competitive mares, producing multiple foals in a single year, reproducing mares with health issues, and aiding mares with reproductive difficulties. Synchronizing the estrous cycle between the donor mare and the recipient mare is crucial for the success of ET. Different protocols have been studied to achieve this synchronization and improve pregnancy rates. Furthermore, the quality, age, and size of embryos can also affect pregnancy and embryo loss rates. This study analyzed ET data in mares, addressing the influence of various variables on pregnancy confirmation rates in recipients. In this retrospective study, data from 346 embryo transfers in cyclic and acyclic recipient mares from different breeding farms were analyzed, with these mares undergoing various hormonal treatments. The embryos were categorized based on their quality and size, and pregnancy confirmation was assessed via transrectal ultrasonography at 14 days. The results indicated that the embryo quality had a significant impact on pregnancy confirmation rates in recipients, while other analyzed variables did not show significance. Future research is recommended to explore other variables and include a larger sample of recipients to confirm and expand upon these findings. Furthermore, additional studies can investigate the relationship between embryo quality and other reproductive outcomes, with the aim of enhancing embryo selection strategies and the success of assisted reproduction programs..

Keywords: mare; embryo; embryo transfer; protocols.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 7 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 8 |
| 3. HIPÓTESE | 8 |
| 4. OBJETIVO | 8 |
| 5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 9 |
| 5.1 Transferência de embrião (TE) | 9 |
| 5.2 Fatores que afetam a transferência de embrião em éguas | 10 |
| 5.2.1 Sincronização do ciclo estral entre as éguas doadora e receptora | 10 |
| 5.2.2 Idade do embrião | 11 |
| 5.3 Qualidade do embrião | 11 |
| 5.4 Protocolos hormonais na transferência de embrião em éguas cíclicas e acíclicas | 12 |
| 5.4.1 Éguas cíclicas | 12 |
| 5.4.2 Éguas acíclicas | 12 |
| 5.4.3 Protocolos hormonais em éguas acíclicas | 13 |
| 5.5 Relação entre a duração do edema uterino e a fertilidade em éguas | 14 |
| 6. METODOLOGIA | 15 |
| 6.1 Receptoras | 15 |
| 6.2 Embriões | 16 |
| 6.3 Análise estatística | 17 |
| 7. RESULTADOS | 17 |
| 8. DISCUSSÃO | 19 |
| 9. CONCLUSÃO | 21 |
| 10. REFERÊNCIAS | 22 |

1. INTRODUÇÃO

As fêmeas equinas são classificadas como poliéstricas sazonais. Durante os dias mais longos do ano (primavera e verão), elas entram na fase cíclica. Durante a fase não-cíclica (anestro ou transição), as éguas não podem emprenhar. A fase cíclica, caracterizada pelo estro e diestro, os hormônios estrógeno e progesterona são os principais atuantes, respectivamente. No estro, ocorre um pico de estradiol circulante dois dias antes da ovulação, acompanhado por um aumento do edema uterino. As altas concentrações de estrógeno inibem o hormônio folículo estimulante (FSH), levando à atresia dos folículos menores. O diestro começa com a ovulação do folículo dominante, e os níveis de progesterona aumentam rapidamente devido à formação do corpo lúteo, impedindo que outros folículos ovulem, mesmo que tenham tamanho similar ao do folículo pré-ovulatório (GINTHER, 1992; MCKINNON, 2011; AURICH, 2011).

A transferência de embriões foi inicialmente desenvolvida nos anos 1980 como uma abordagem inovadora para produzir potros a partir de éguas mais velhas e não produtivas, essa técnica evoluiu e se tornou um procedimento aplicável a grande parte das éguas em idade reprodutiva. A TE oferece a oportunidade de produzir potros de éguas em competição e múltiplos potros de uma mesma égua em um único ano, viabilizar a reprodução de éguas com problemas de saúde não relacionados à fertilidade ou ao sistema musculoesquelético, e ajudar éguas com dificuldades reprodutivas a terem potros saudáveis (MCKINNON, 2011).

A sincronização do ciclo estral entre a égua doadora e a égua receptora é fundamental para o sucesso da TE em éguas. O uso de diferentes protocolos tem sido estudado para alcançar a sincronização e melhorar as taxas de gestação. Estudos têm sido conduzidos para avaliar a eficácia de diferentes protocolos e dispositivos de sincronização tanto em éguas acíclicas quanto cíclicas. Por exemplo, o uso de diferentes tipos de progesterona e estrógeno (ROCHA FILHO, 2004; SILVA, 2017; SEGABINAZZI et al., 2021; LINO et al., 2022). A utilização de estradiol nos protocolos vem se mostrando eficaz quando se trata do aumento das taxas de prenhez. Éguas expostas por um maior período ao estradiol, demonstraram maior persistência do edema uterino o que elevou as taxas de prenhez quando comparadas àquelas expostas a um menor tempo e curta durabilidade do edema (CUERVO-ARANGO et al., 2018).

De acordo com Panzani (2016), deve-se levar em consideração a idade, tamanho e qualidade dos embriões a serem transferidos, os quais podem afetar as taxas de prenhez e de perda embrionária. Outro fator que pode influenciar a TE é a seleção adequada e manejo das éguas receptoras, pois é nestas éguas que o reconhecimento materno-fetal irá acontecer e elas que

fornecerão as condições necessárias para o desenvolvimento do embrião (VANDERWALL e WOODS, 2007; MCKINNON e SQUIRES, 2007; FLEURY et al., 2007).

2. JUSTIFICATIVA

Diante o exposto, várias características relacionadas a receptora, embrião e os hormônios, progesterona e estrógeno, utilizados em protocolos de sincronização entre doadora e receptora, podem influenciar na taxa de confirmação de prenhez na receptora equina. Por ser uma técnica amplamente utilizada, a análise de dados colhidos a campo, relativos às características citadas acima, são de importância para a identificação dos fatores que possam estar influenciando as taxas de gestação.

3. HIPÓTESE

Hipotetizamos que, de acordo com os resultados de outros estudos previamente realizados, a qualidade dos embriões vai interferir nas taxas de prenhez (CARNEVALE et al. 2000; CAMARGO et al. 2013; PANZANI et al., 2016). Além disso, acredita-se que, a utilização de receptoras cíclicas ou acíclicas, independentemente de serem ovuladas, no caso das cíclicas, ou recebendo progesterona exógena, seja ela injetável (P4 LA) ou por dispositivo intravaginal (CIDR) (MCKINNON et al., 1988; CARNEVALE et al., 2000; ROCHA FILHO et al., 2004; DOS REIS et al., 2020) e que o dia do diestro no intervalo de D3 a D8, em que as receptoras se encontram quando utilizadas na transferência de embrião, não interferem nas taxas de prenhez (SQUIRES et al., 1982; ALLEN, 2018; JACOB et al. 2019). Ademais, a maior persistência do edema uterino vai influenciar em maiores taxas de gestação (CUERVO-ARANGO et al., 2018; SILVA et al., 2019; OQUENDO et al., 2022).

4. OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi fazer uma análise retrospectiva de dados coletados durante as estações de monta 2020/2021, 2021/2022 e 2022/2023 de São Paulo, utilizando éguas de diferentes haras que passaram por TE, relacionando: qualidade, idade e fase embrionária; dia da receptora em diestro; diferentes fontes de progesterona e tratamentos com diferentes doses de 17 β -estradiol; com as taxas de diagnóstico gestacional (12 dias).

5. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

5.1 Transferência de embrião (TE)

O nascimento do primeiro potro através da técnica de transferência de embrião ocorreu em 1974. Nos 30 anos seguintes, a utilização dessa técnica foi limitada devido a restrições impostas pelas associações de raças. Muitos registros de raças proibiam completamente a transferência de embrião ou estabeleciam um limite para o número de potros que poderiam ser registrados por uma única égua em um ano. No entanto, em 2003, nos Estados Unidos, houve um aumento significativo no uso da transferência de embrião, quando a Associação Americana de Quarto de Milha (AQHA) eliminou a restrição que limitava o número de potros registrados por uma égua em um único ano (MCCUE e SQUIRES, 2015).

A TE é uma biotecnologia que se caracteriza por retirar o embrião de uma égua doadora e transferi-lo a outra égua, receptora, a qual vai manter essa gestação até o nascimento do concepto (HANNAN et al., 2020). Antes da transferência existe a coleta de embriões na qual ocorre comumente no 7º ou 8º dia após a ovulação, sendo que os embriões mais jovens podem ser submetidos à criopreservação. A criopreservação aprimora a preservação dos embriões para posterior implantação em éguas receptoras, além de facilitar o transporte de embriões em âmbito internacional (SCHERZER, 2011).

Na TE, o procedimento chamado lavagem uterina é utilizado para extrair os embriões do lúmen uterino da égua doadora no dia correto após a ovulação. Esses embriões frescos são então transferidos transcervicalmente para o útero das éguas receptoras logo após a coleta com o auxílio de um enovulador (SCHERZER, 2011; DERBALA, 2017). A maioria das éguas doadoras de embriões tem a capacidade de ovular apenas um óvulo, e a maioria dos embriões resultantes dessas éguas são transferidos sem passar pelo processo de congelamento. A taxa média de recuperação de embriões por colheita em éguas normais é de aproximadamente 70%, e essa taxa tem se mantido constante ao longo das décadas. Para aumentar essa taxa, é necessário que a égua tenha uma ocorrência espontânea de dupla ovulação, contudo, atualmente, não há disponibilidade comercial de hormônio folículo-estimulante equino (FSH) para induzir múltiplas ovulações em éguas. No entanto, há relatos de sucesso na melhoria das taxas de recuperação de embriões em éguas que receberam extrato pituitário equino rico em FSH ou FSH recombinante (MCCUE et al. 2007; SQUIRES e MCCUE, 2007; MCCUE e SQUIRES, 2015; SQUIRES, 2020).

5.2 Fatores que afetam a transferência de embrião em éguas

5.2.1 Sincronização do ciclo estral entre as éguas doadora e receptora

Um dos principais desafios em um programa de transferência de embriões (TE), de acordo com Lino et al. (2022), é o sucesso na seleção das receptoras. A eficácia da transferência está diretamente ligada à qualidade das características reprodutivas das receptoras e à sincronização adequada entre as doadoras e as receptoras. Várias pesquisas foram conduzidas para explorar a utilização de éguas não cíclicas como receptoras de embriões, permitindo sua incorporação em programas de TE por meio de protocolos hormonais que imitam o ciclo estral natural.

É recomendável ter pelo menos duas receptoras para cada doadora (McKinnon e Squires, 2007). No entanto, devido aos altos custos de manutenção dessas fêmeas, especialmente no final da estação, nem sempre é viável alcançar esse número. Para otimizar a utilização das receptoras, uma abordagem é sincronizar o ciclo estral entre as doadoras e as receptoras, buscando atingir uma proporção de uma receptora para uma doadora (Lopes, 2015).

A sincronização do ciclo estral entre as éguas doadora e receptora antes da transferência é um aspecto crucial na TE. No caso de éguas cíclicas, utiliza-se basicamente prostaglandina F2 α para lizar o corpo lúteo e indutores de ovulação como a Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG) e o Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH) quando um folículo pré-ovulatório (35 mm) for avaliado através da ultrassonografia (TEIXEIRA, 2020; SPENCER et al., 2022). Em éguas acíclicas, são empregados protocolos hormonais. A administração de progestágenos, seja isoladamente ou em conjunto com o estradiol, é uma abordagem comumente utilizada nesse processo (LINO et al., 2022).

Cuervo-Arango (2019) realizou estudos experimentais que comprovaram que os embriões in vivo provenientes do Dia 8 apresentam uma ampla faixa de tolerância em relação à sincronia uterina da égua receptora (Dias 4-9 após a ovulação). No entanto, houve um leve retardo no crescimento embrionário quando esses embriões foram transferidos para as receptoras do Dia 4. Por outro lado, os embriões produzidos in vitro demonstraram uma tolerância limitada em relação à sincronia uterina, sendo que o Dia 4 após a ovulação foi o mais favorável em comparação aos outros dias. Além disso, observou-se que os embriões in vivo apresentaram melhores taxas de sobrevivência quando transferidos para receptoras que passaram por um período de estro relativamente longo, caracterizado por mais de 5 dias de edema endometrial.

5.2.2 Idade do embrião

Normalmente, a coleta de embriões é realizada entre o 7º (D7) e o 8º (D8) dia após a ovulação (D0), a menos que se deseje congelar o embrião. Nesse caso específico, a coleta de embriões deve ocorrer no 6º dia (D6) após a ovulação, no entanto, isso pode resultar em uma redução de 10% a 15% na taxa de recuperação embrionária. O D8 é considerado o momento ideal para a coleta, mas sugere-se o D6 ou D7 para doadoras com infecção uterina e o D9 para éguas mais velhas (SQUIRES et al, 1999; GOMES E GOMES, 2023).

Em um experimento realizado por Jacob et al. (2012), as taxas de obtenção de embriões não diferiram para as lavagens efetuadas entre o sétimo e o décimo dia pós-ovulação (63%).

Em outro estudo, realizado por Derbala e Abdou (2017), foram coletados embriões no momento em que estes eram visualizados no exame ultrassonográfico, D10 e D11. Para a transferência desses embriões de idade mais avançada foi utilizado um cateter com um diâmetro maior. Neste estudo a taxa de sucesso após a transferência foi de 73,5%, apesar do embrião ter um tamanho maior. Os resultados revelaram elevado grau de sucesso na recuperação de embriões (94,4%) e taxa de gestação de 73,5%.

5.3 Qualidade do embrião

Panzani et al. (2014), realizaram um experimento no qual avaliou-se a qualidade de 338 embriões recuperados entre o D7 e D10 de 937 ovulações de éguas com diferentes idades. No total, foi observado que 326 de 338 embriões recuperados (equivalente a 96,4%) estavam em estágio de blastocisto expandido, enquanto 11 embriões (3,2%) estavam em estágio inicial de blastocisto e apenas 1 embrião (0,02%) estava em estágio de mórula. Em relação à qualidade dos embriões, foi constatado que 307 embriões (90,8%) foram classificados como grau I, 18 embriões (5,3%) como grau II, 11 embriões (3,2%) como grau III e 2 embriões (0,6%) como grau IV. Não foram encontradas diferenças significativas entre as categorias em relação à qualidade dos embriões.

A classificação do embrião foi subjetiva, no entanto, foi possível compará-la com outros experimentos a fim de buscar uma padronização ou aproximação com a classificação de outro profissional. A taxa de 96% de embriões grau I e II, está comparável a estudos anteriores realizados por McKinnon e Squires (1988) e Squires et al. (2003) - grau I: embrião ideal, esférico, com células de tamanho, cor e textura uniformes; grau II: imperfeições menores, como algumas partes do blastômero extrusadas, formato irregular ou separação trofoblástica; III: problemas definidos, mas não graves como presença de blastômeros extrusados, células degeneradas ou

blastocle colapsada; IV: problemas graves a muito graves, blastocle colapsada, numerosos blastômeros extrusados, células degeneradas, mas com uma massa embrionária aparentemente viável; V: oócitos não fertilizados ou embriões degenerados total ou parcialmente mortos.

5.4 Protocolos hormonais na transferência de embrião em éguas cíclicas e acíclicas

5.4.1 Éguas cíclicas

Um dos procedimentos mais comuns em éguas em fase cíclica é a administração intramuscular de prostaglandina F2 α (PGF2 α) na doadora, seguida de sua aplicação nas éguas receptoras um ou dois dias depois, com o intuito de promover a luteólise e sincronizar o estro. Para isso, é necessário que as éguas estejam entre o 5º e 14º dia do diestro e que o exame ultrassonográfico não revele a presença de um folículo pré-ovulatório com diâmetro médio de 35mm nos ovários (ALLEN, 2001). Em seguida, o crescimento folicular das éguas é monitorado por meio de ultrassonografia, e a ovulação da receptora é induzida aproximadamente 48 horas após a indução da doadora, utilizando-se análogos de deslorelina ou gonadotrofina coriônica equina (hCG), aumentando assim as chances de sincronização entre ambas, sendo que o ideal é a doadora e a receptora estarem no D7-D8 e D4-D9 pós-ovulação, respectivamente (DUCHAMP et al., 1987; CUERVO-ARANGO et al., 2019).

5.4.2 Éguas acíclicas

A administração de hormônios em éguas que estão em anestro sazonal desempenha um papel fundamental na otimização dos programas de TE, pois viabiliza a transferência mesmo fora do período de reprodução regular. Isso se torna uma abordagem indispensável para aumentar a eficácia desses programas (OQUENDO et al., 2022). Os hormônios utilizados são uma fonte de estrógeno seguido de uma fonte de progesterona, para simular as alterações hormonais que acontecem durante o ciclo estral.

As ações do hormônio estrogênio são mediadas por meio das formas α e β de seus receptores, os quais são codificados por diferentes genes (OKUMU et al., 2010), ambos os tipos de receptores foram identificados no útero de éguas (HONNENS et al., 2011; SILVA et al., 2014).

Durante o período de estro, éguas apresentam um aumento na expressão dos receptores de estrógeno e progesterona no endométrio, sendo detectados no epitélio luminal, glandular e estroma. Com isso, experimentos com diferentes protocolos de estrógeno como benzoato de estradiol,

cipionato de estradiol ou 17 β -estradiol, foram desenvolvidos com foco no edema uterino (HARTT et al., 2005; GRECO et al., 2012; SILVA et al., 2014; BOTELHO et al., 2015).

A progesterona tem como função a preparação e manutenção do trato reprodutivo para garantir uma gestação bem sucedida. Os níveis desse hormônio estão relacionados à formação, manutenção e luteólise do corpo lúteo. Trata-se de um hormônio pró-gestacional de alta importância para uma gestação (NISWENDER et al., 2002; VANDERWALL, 2011; GINTHER e BEG, 2012). Esse hormônio desencadeia alterações no útero, como a estimulação das secreções glandulares, acompanhada pelo acúmulo de vacúolos basais no epitélio glandular (MASLAR et al., 1986). Entre todos os efeitos da progesterona nos eventos reprodutivos em éguas, talvez o mais importante seja a regulação da secreção das glândulas uterinas, que proporciona o ambiente adequado para o desenvolvimento do produto. É importante ressaltar que o embrião equino depende inteiramente das secreções uterinas durante os estágios iniciais de seu desenvolvimento para suporte nutricional e metabólico (VANDERWALL, 2011). Assim, a utilização da progesterona sendo ela de longa ou curta ação, injetáveis ou por dispositivo intravaginal, é amplamente estudada em éguas acíclicas (ROCHA FILHO et al., 2004; DOS REIS et al., 2020; OQUENDO et al., 2022).

5.4.3 Protocolos hormonais em éguas acíclicas

Durante o período de transição de primavera, é comum observar que as doadoras têm ciclos estrais mais precoce em comparação às receptoras, devido principalmente às diferenças no manejo e na disponibilidade de alimentos. Diante dessa situação, uma alternativa viável é utilizar receptoras que estejam em anestro ou em fase de transição (acíclicas), por meio de ciclos artificiais. Os protocolos utilizados em éguas acíclicas, tem como base a administração de estrógeno seguido de progesterona com variações na apresentação e dose desses fármacos de acordo com o protocolo de escolha (GRECO et al., 2012; SILVA et al., 2016; SILVA et al., 2017; LINO et al., 2020; OQUENDO et al. 2022).

Para comparar a ação da progesterona (P4) de curta e longa ação, um estudo feito por Rocha Filho et al. (2004), utilizou éguas cíclicas (doadoras) e acíclicas (receptoras). As receptoras receberam dois tipos de tratamentos: 10 mg de cipionato de estradiol, intramuscular, durante dois dias, seguido da aplicação de progesterona de curta (P4CA) ou longa ação (P4LA) por 5 a 8 dias antes da transferência. O estudo comprovou que éguas em anestro que receberam P4 de curta ou longa ação por 5 a 8 dias antes da transferência, podem ser usadas como receptoras de embrião

obtendo taxa de prenhez (D12): P4 CA 200 mg - 75,9%; P4 CA 400 mg - 76,9%; P4 LA a cada 6 dias - 73,3%; P4 LA a cada 7 dias - 76,6%.

Outro protocolo utilizado, agora em um estudo mais recente, Oquendo et al. (2022), utilizou apenas éguas acíclicas como receptoras. O protocolo utilizado foi dividido em 3 grupos: estro longo - animais tratados com benzoato de estradiol durante 5 dias, aumentando as doses, após 72h foi administrada a P4 LA; estro curto - animais receberam benzoato de estradiol em dose única e em seguida (48h) foi administrado P4 LA; sem estro - animais receberam apenas uma dose de P4 LA. Com os resultados obtidos pode-se concluir que a duração do estro influenciou a sobrevivência do embrião, 87,7% no grupo de estro longo.

Comparando as ações do cipionato de estradiol e o benzoato de estradiol em estudo realizado por Greco et al. (2012), utilizou o cipionato de estradiol em seguida da P4 LA em éguas acíclicas. Esses animais foram tratados durante três dias consecutivos com doses de cipionato de estradiol seguidas de P4 LA. Concluiu que receptoras acíclicas protocoladas com cipionato de estradiol e P4 LA, podem ser utilizadas como receptoras de embriões obtendo taxa de prenhez: receptoras D3 - 51,28%; D4 - 58,93%; D5 - 60,53%; D6 - 58,57%.

Outro estudo, agora utilizando benzoato de estradiol, realizado por Silva et al. (2017), tratou éguas acíclicas com uma dose intramuscular de benzoato de estradiol seguido por P4 LA depois de 48h. Esse estudo comprovou que o protocolo utilizado e seus resultados foram comparáveis a éguas cíclicas tanto em condições de expressão gênica, edema uterino e concentrações de estrógeno (SILVA et al., 2017; LINO et al., 2022).

5.5 Relação entre a duração do edema uterino e a fertilidade em éguas

Como citado anteriormente, o embrião equino depende inteiramente das secreções uterinas durante os estágios iniciais de seu desenvolvimento para suporte nutricional e metabólico (VANDERWALL, 2011; AUGUSTA, 2013). Sabe-se também que durante o estro, o estrógeno desencadeia importantes alterações fisiológicas no útero sendo essas mudanças principalmente relacionadas ao aumento da perfusão vascular e ao extravasamento de líquido para o interstício uterino, o que resulta na formação do edema endometrial (GINTHER, 1992).

Assim, um estudo já citado anteriormente, comprovou que a presença e o período de tratamento com estradiol antes da administração de progesterona têm um efeito positivo na sobrevivência do embrião em éguas em anestro, dois dias após a transferência (OQUENDO et al., 2022).

Um estudo mais aprofundado, avaliou, molecularmente, a expressão dos genes responsáveis pela aceitação do embrião no útero. Foram analisados 17 genes relacionados aos estrogênios e à formação do endométrio receptivo ao embrião, onde apenas três apresentaram diferenças significativas em sua expressão: uterocalina (P19), fator 2 de crescimento ligado ao fibroblasto (FGF-2) e fator 1 de crescimento ligado à insulina (IGF-1). Além disso, observou-se que apenas dois desses genes (P19 e FGF-2) mostraram uma associação clara com a duração do tratamento com estrogênio antes da P4. Os autores citam que embora comprovado que um período de estro mais longo possa tornar o endométrio mais receptivo por meio do aumento na síntese de P19, é importante considerar que outros genes e vias também podem contribuir para os efeitos positivos observados com a exposição aos estrogênios (SILVA et al., 2019).

A evidência direta de que períodos mais longos de edema uterino têm um impacto positivo nas taxas de prenhez foi confirmada por Cuervo-Arango et al. (2018) em um experimento com éguas cíclicas. Nesse estudo, a taxa de sucesso na obtenção de gestação em éguas receptoras que apresentaram um período de edema no estro anterior à TE de 3 dias ou mais foi consideravelmente maior (83,1%; 157/189) em comparação com aquelas receptoras que tiveram um período de edema inferior a 3 dias (63,6%; 77/121).

6. METODOLOGIA

Este estudo foi realizado com base em dados retrospectivos coletados por um médico veterinário experiente em reprodução equina durante as estações de monta 2020/2021, 2021/2022 e 2022/2023 em diferentes haras da região do estado de São Paulo, Brasil.

6.1 Receptoras

Foram avaliados dados de 346 transferências de embriões, realizadas em diferentes receptoras com idade de 4 a 15 anos. Utilizou-se receptoras cíclicas (117/346 - 34%) e acíclicas (229/346 - 66%) submetidas ou não a protocolos hormonais utilizando P4 LA e/ou dispositivo intravaginal de progesterona (CIDR). As receptoras cíclicas foram utilizadas entre D2 e D8, sendo que as em D2 (3/117 - 2,5%) foram suplementadas com P4 LA. Excluindo as D2, 28% (33/117) das receptoras cíclicas D3 a D8 foram suplementadas com P4 LA ou CIDR e 69% (81/117) não foram suplementadas. As receptoras acíclicas foram utilizadas entre D3 e D8 e 100% submetidas a tratamento com P4 LA e/ou CIDR, sendo que dessas 229 éguas, em 62 (27%) foi administrada

apenas P4 LA, em 162 (70,8%) utilizou-se apenas CIDR e em 5 (2,2%) associou-se P4 LA e CIDR.

Em éguas cíclicas sem suplementação, o protocolo utilizado foi o convencional, utilizando basicamente PGF2 α quando havia presença de corpo lúteo e avaliação ultrassonográfica até a presença de um folículo pré-ovulatório maior ou igual a 35 mm, acompanhado de edema uterino, quando ocorreu a indução da ovulação com fármacos análogos ao hCG e GnRH. Nas receptoras acíclicas, os protocolos diferiram com relação as doses de estrógeno variando entre 0 e 50 mg por 0 a 10 dias intercalados entre 1 a 3 aplicações de 17 β -estradiol. Assim, dentre as 229 éguas acíclicas, 53% (121/229) ficaram sob efeito do estradiol exógeno por 2 dias, 12% (28/229) por 3 dias, 20% (46/229) por 4 dias, 8% (18/229) por 5 dias, 2,6% (6/229) por 6 dias, 0,9% (2/229) por 7 dias, 0,9% (2/229) por 10 dias e, em apenas, 2,6% (6/229) não foi administrado 17 β -estradiol. Duas diferentes fontes de progesterona (P4 LA de 1500 mg e CIDR de 1,9 g - dispositivo intravaginal) foram utilizadas para mimetizar o diestro.

6.2 Embriões

Os embriões foram coletados e transferidos no mesmo dia pela técnica transcervical convencional (MCCUE e SQUIRES, 2015) e apresentavam idade entre D6 e D10 sendo D6: 6 embriões; D7: 91 embriões; D8: 140 embriões; D9: 107 embriões; D10: 2 embriões.

A qualidade e a fase embrionária foram avaliados após as coletas e classificados de acordo com McCue et al. (2009) como grau I (317) - nenhuma anormalidade observada, esférico em forma, células de tamanho, cor e textura uniformes. tamanho e estágio de desenvolvimento adequados para a idade pós-ovulação; grau II (21) - pequenas imperfeições, como alguns blastômeros extrudados, ligeiras irregularidades em forma, tamanho, cor ou textura, separação limitada entre a camada de trofoblasto e a zona pelúcida ou cápsula; grau III (3) - nível moderado de imperfeições, como uma maior porcentagem de blastômeros extrudados ou degenerados, colapso parcial da blastocele ou encolhimento moderado do trofoblasto em relação à zona pelúcida ou cápsula; embriões ICSI (5) - embriões advindos da produção *in vitro*. Em relação a fase embrionária, foram classificados em mórula (Mo = 17) - presença da zona pelúcida, célula pequena, células do complexo cumulus oócito (CCO) muito compactadas; blastocisto inicial (Bi = 35) - presença da zona pelúcida e blastocele não formada completamente; blastocisto (Bo = 70) - trofoblasto e blastocele formada; blastocisto expandido (Bx = 193) - trofoblasto e blastocele expandidos; blastocisto muito expandido (Bxx = 26) - trofoblasto e blastocele muito expandidos; embriões ICSI (5) - embriões advindos da produção *in vitro*.

O diagnóstico de gestação, após a transferência do embrião para a receptora, foi realizado através de ultrassonografia transretal no D14 do embrião.

6.3 Análise estatística

Foi realizada regressão logística para calcular a probabilidade do diagnóstico gestacional na receptora em 14 dias de gestação dar positivo quando utilizados as diferentes variáveis: qualidade do embrião (GRADE); dia do embrião (D-EMBR); fase embrionária (EMB-SIZE); dia da receptora (D-RECEPT); receptora de ciclo normal, ovulada, ou artificial com a utilização de CIDR ou P4 (CIDR/P4/OV); dias que a receptora ficou sob efeito de estrógeno exógeno (DIAS-E2); número de doses de estrógeno administrado (1DOSE-E2, 2DOSE-E2 e 3DOSE-E2).

Para dados que apresentaram diferenças $<0,05$ no p-valor, os testes de Chi-Quadrado de Pearson, comparações de proporções e coeficiente de contingência foram utilizados.

7. RESULTADOS

Os resultados encontrados quando realizada a regressão logística utilizando as variáveis qualidade do embrião (GRADE); dia do embrião (D-EMB); fase embrionária (EMB-SIZE); dia da receptora (D-RECEPT); receptora de ciclo normal, ovulada, ou artificial com a utilização de CIDR ou P4 (CIDR/P4/OV); dias que a receptora ficou sob efeito de estrógeno exógeno (DIAS-E2); número de doses de estrógeno administrado (1DOSE-E2, 2DOSE-E2 e 3DOSE-E2); e comparamos com os resultados positivos de diagnóstico gestacional (RESULTADO DG) nas receptoras após 14 dias de vida do embrião, apenas a qualidade do embrião influenciou nas taxas de confirmação de prenhez na receptora (p-valor $< 0,05$) com um odds ratio de 0,445, o que significa que as chances de dar DG positivo caem em 56% quando passamos a utilização de embriões grau I para grau II ou grau II para grau III ou grau III para embriões ICSI (Tabela 1). O teste de Chi-Quadrado de Pearson provou que existe relação entre o resultado DG e a qualidade do embrião por apresentar significância igual a 0,001 ($<0,05$).

Tabela 1 - Regressão logística das variáveis qualidade do embrião (GRADE), dia do embrião (D-EMB), fase embrionária (EMB-SIZE), dia da receptora (D-RECEPT), CIDR/P4/OV, DIAS-E2, 1DOSE-E2, 2DOSE-E2 e 3DOSE-E2 em função do RESULTADO DG.

| Variáveis | p-Valor | Odds Ratio |
|------------|---------|------------|
| GRADE | 0,002* | 0,445 |
| D-EMB | 0,292** | |
| EMB-SIZE | 0,297** | |
| D-RECEPT | 0,721** | |
| CIDR/P4/OV | 0,568** | |
| DIAS-E2 | 0,337** | |
| 1DOSE-E2 | 0,574** | |
| 2DOSE-E2 | 0,235** | |
| 3DOSE-E2 | 0,877** | |

*teve diferença estatística pois p-valor<0,05. **Como p-Valor >0,05, não foi calculado Odds Ratio.

No teste de comparações de proporções, observou-se que não podemos diferenciar, embriões grau I de grau II, nem grau II de grau III e embriões ICSI, nem grau III de embriões ICSI, porém podemos dizer que embriões grau I se diferem de embriões grau III e de ICSI (Tabela 2).

Tabela 2 - Teste de comparações de proporções entre os diferentes graus de embrião (GRADE) que influenciaram na RESPOSTA DG (RESPDG).

| | | | GRADE | | | | Total |
|--------|----------|---|-------|--------|-------|-------|-------|
| | | | 1 | 2 | 3 | ICSI | |
| RESPDG | negativo | n | 29a | 4a, b | 2b | 2b | 37 |
| | | % | 9,1% | 19,0% | 66,7% | 40,0% | 10,7% |
| | positivo | n | 288a | 17a, b | 1b | 3b | 309 |
| | | % | 90,9% | 81,0% | 33,3% | 60,0% | 89,3% |
| Total | | | 317 | 21 | 3 | 5 | 346 |

a e b - os números acompanhados das mesmas letras não se diferem estatisticamente em relação ao resultado da RESPOSTA DG.

Os protocolos utilizando diferentes doses de 17 β -estradiol nas receptoras acíclicas não influenciaram nas taxas de prenhez (Tabela 1). Desse modo, as diferentes durações da administração de estradiol (53% (121/229) por 2 dias, 12% (28/229) por 3 dias, 20% (46/229) por 4 dias, 8% (18/229) por 5 dias, 2,6% (6/229) por 6 dias, 0,9% (2/229) por 7 dias, 0,9% (2/229) por 10 dias) não apresentaram importância estatística em relação às taxas de gestações.

8. DISCUSSÃO

Nesta avaliação retrospectiva de dados, foi possível comprovar as hipóteses de que a qualidade do embrião influencia na taxa de gestação; de que a utilização de receptoras cíclicas ovuladas ou acíclicas submetidas a protocolos utilizando progesterona injetável (P4 LA) ou dispositivo intravaginal (CIDR) não influencia na taxa de gestação. Além disso, foi demonstrado que o dia do diestro em que a receptora se encontra quando utilizada na transferência de embrião não influencia na taxa de prenhez. Entretanto, a hipótese, de que a maior persistência de edema uterino vai influenciar em maiores taxas de gestação, não foi observada.

A influência da qualidade do embrião quando relacionado a taxa de prenhez na receptora aos 14 dias, está de acordo com diversos estudos como o de Panzani et al (2016), Carnevale et al. (2000) e Camargo et al. (2013). Contudo, o baixo número de embriões grau III utilizados neste estudo (3 embriões) e sua proporção de 66,7% dos resultados serem negativos, pode dificultar a confiabilidade dos resultados obtidos, visto que embriões grau III apresentam problemas definidos, como blastômeros extrudados, células degeneradas ou blastocele colapsada. Então espera-se que quanto maior o número de embriões grau III, maior será essa confiabilidade no resultado.

É amplamente descrita na literatura que a utilização de receptoras cíclicas ou acíclicas não interferem nas taxas de gestação em 14 dias (MCKINNON et al., 1988; CARNEVALE et al., 2000; ROCHA FILHO et al., 2004; DOS REIS et al., 2020). O resultado desta análise retrospectiva comparável a outros estudos pode ser devido a utilização dos protocolos baseado nesses estudos anteriores onde a utilização de P4 LA e de dispositivo intravaginal, mimetizam o diestro de éguas cíclicas nas éguas acíclicas trazendo todas as características como expressão de receptores de progesterona no endométrio, tônus uterino e cervical, imagem uterina mais homogênea, deixando o ambiente uterino viável para o desenvolvimento do embrião. A ampla utilização do CIDR no presente estudo, sustenta-se quando observamos o estudo de Segabinazzi et al. (2021) onde um dos experimentos comprovou que a utilização de implante intravaginal de progesterona no protocolo de sincronização foi igualmente eficaz na obtenção de taxas satisfatórias de prenhez em éguas receptoras acíclicas. Ademais, esse protocolo não resultou em maiores perdas gestacionais quando comparado a éguas cíclicas ou aquelas que foram sincronizadas com P4 LA e apresentou grande vantagem quando se trata do tempo de reutilização da receptora: caso não dê positivo o diagnóstico gestacional, assim que retirado o dispositivo, as concentrações de progesterona abaixam e essa égua poderá ser usada novamente em sete dias, levando vantagem em

relação a P4 LA que quando utilizada predispõe o animal a um maior período de espera para uma nova utilização na TE.

A falta de relação entre o dia pós-ovulação que a receptora se encontra na TE e o resultado de prenhez aos 14 dias de gestação, concordou com o hipotetizado. Pode-se conferir em experimentos anteriores (SQUIRES et al., 1982; ALLEN, 2018; JACOB et al. 2019) que receptoras com grau de assincronia doadora-receptora de -6 dias, inovuladas no D2 pós-ovulação, e aquelas que ovularam mais de 1 dia antes da doadora, inovuladas no D9+ da ovulação, obtiveram taxas de prenhez menores que os demais dias (D3, D4, D5, D6, D7 e D8). Entretanto as receptoras D2 utilizadas neste estudo foram suplementadas com P4 LA, impossibilitando a comparação entre os estudos de Jacob et al. (2019), Allen (2018) e Squires et al. (1982). Ademais, já é de conhecimento que TEs realizadas em receptoras entre D3 e D8, não influenciam nas taxas de prenhez (WILSHER et al., 2010; NETO et al., 2018; JACOB et al., 2019).

Uma hipótese que não foi comprovada pela análise de dados do presente estudo, foi a de que dias mais longos de edema uterino iriam influenciar em maiores taxas de gestação não apenas em éguas cíclicas mas, também, em acíclicas. Essa hipótese foi criada baseada em um estudo realizado por Cuervo-Arango et al. (2018) onde éguas cíclicas expostas ao estradiol por 3 dias ou mais resultaram em maiores taxas de prenhez (83,1%) que as expostas por menos de 3 dias (63,6%). Outros estudos que ajudaram a formular esse raciocínio foram aqueles que demonstraram a importância de um período mais longo de edema relacionado com a receptividade do útero com a sobrevivência do embrião (SILVA et al., 2019; OQUENDO et al., 2022). Alguns resultados deste estudo podem não ter ido de acordo com as hipóteses devido a inconstância na duração do tempo em que a receptora ficou sob efeito do estradiol que variou de 0 a 10 dias. Assim, talvez em caso de embriões frescos, é possível que seja necessário manter por um maior período as receptoras sob efeito do estradiol visto que a maioria das tratadas (121/229 - 53%) ficaram expostas por apenas 2 dias, seguidas das expostas por 4 dias (46/229 - 20%), 3 dias (28/229 - 12%), 5 dias (18/229 - 8%), 6 dias (6/229 - 2,6%), 7 dias (2/229 - 0,9%) e 10 dias (2/229 - 0,9%). Dessa forma, são necessários mais estudos com um número maior de receptoras expostas ao estradiol.

Recomenda-se que pesquisas futuras explorem outras variáveis e considerem uma amostra maior de receptoras para confirmar e ampliar esses achados. Além disso, estudos adicionais podem investigar a relação entre a qualidade do embrião e outros desfechos reprodutivos, como a taxa de perda embrionária e, por fim, a estimulação de mais estudos relacionando o edema uterino com a taxa de prenhez em éguas acíclicas visando melhorar as estratégias de seleção de embriões e o sucesso dos programas de reprodução assistida.

9. CONCLUSÃO

Conclui-se que a qualidade do embrião influenciou nas taxas de confirmação de prenhez das receptoras. Entretanto, não foi observado efeito das demais variáveis quando relacionadas à taxa de prenhez.

10. REFERÊNCIAS

- ALLEN, W. R. Embryo transfer in the horse. In: **Mammalian egg transfer**. CRC Press, 2018. p. 135-154.
- ALLEN, W. R. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. **Reproduction**, v. 121, n. 4, p. 513-527, 2001.
- ALONSO, MA. **Efeito da aplicação da hCG em diferentes dias do ciclo estral sobre a concentração sérica de progesterona e fluxo sanguíneo uterino e ovariano em éguas**. 2013. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. <https://doi.org/10.11606/T.10.2013.tde-05062013-141143>
- AURICH, C. Reproductive cycles of horses. **Animal reproduction science**, v. 124, n. 3-4, p. 220-228, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.02.005>
- BOTELHO, J. H. et al. Hormone supplementation protocol using estradiol benzoate and long-acting progesterone is efficient in maintaining pregnancy of anovulatory recipient mares during autumn transitional phase. **Animal reproduction science**, v. 153, p. 39-43, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.12.014>
- CAMARGO, C. E. et al. Some factors affecting the rate of pregnancy after embryo transfer derived from the Brazilian Jumper horse breed. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 11, p. 924-929, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2013.01.008>
- CARNEVALE, E. M. et al. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. **The riogenology**, v. 54, n. 6, p. 965-979, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00405-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00405-2)
- CUERVO-ARANGO, J. ; CLAES, Anthony N.; STOUT, Tom AE. In vitro-produced horse embryos exhibit a very narrow window of acceptable recipient mare uterine synchrony compared with in vivo-derived embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 31, n. 12, p. 1904-1911, 2019. <https://doi.org/10.1071/RD19294>
- CUERVO-ARANGO, J. et al. Likelihood of pregnancy after embryo transfer is reduced in recipient mares with a short preceding oestrus. **Equine veterinary journal**, v. 50, n. 3, p. 386-390, 2018. <https://doi.org/10.1111/evj.12739>
- DERBALA, M. K.; ABDON, M. S. S. Transfer of Large Equine Embryos in Arabian Mares. **ARC Journal of Animal and Veterinary Sciences**, v. 3, n. 4, 2017. DOI:10.29011/AVST-135/100035
- DUCHAMP, G. et al. Alternative solutions to hCG induction of ovulation in the mare. **Journal of Reproduction and fertility. Supplement**, v. 35, p. 221-228, 1987.
- GINTHER, O. J. Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects. 1992.
- GINTHER, O.J.; BEG, M.A. Dynamics of circulating progesterone concentrations before and during luteolysis: a comparison between cattle and horses. **Biology of Reproduction**, v.86, n.6, p.1-12, 2012. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.099820>
- GOMES, G. M. ; DE MACEDO GOMES, L. P. Pontos críticos na produção de embriões equinos com enfoque na doadora. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 47, n. 2, p. 154-158, 2023. DOI: 10.21451/1809-3000.RBRA2023.022

GOMES, G. M.; DE MACEDO GOMES, L. P. Processos que afetam a taxa de gestação pós-inovulação do embrião equino. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 47, n. 2, p. 159-163, 2023. DOI: 10.21451/1809-3000.RBRA2023.023

GRECO, G. M. et al. Use of long-acting progesterone to acyclic embryo recipient mares. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, p. 607-611, 2012. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982012000300019>

HANNAN, M. A. et al. Birth of first foals through embryo transfer after artificial insemination using frozen semen in Japan. **Journal of Reproduction and Development**, v. 66, n. 2, p. 193-197, 2020. <https://doi.org/10.1262/jrd.2019-117>

HARTT, L. S. et al. Temporal and spatial associations of oestrogen receptor alpha and progesterone receptor in the endometrium of cyclic and early pregnant mares. **Reproduction**, v. 130, n. 2, p. 241-250, 2005. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00596>

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. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.10.022>

LINO, D. C.; DA SILVA, ESAM; DE OLIVEIRA, R. A. Uso de éguas receptoras acíclicas em programas de transferência de embrião Anovulatory recipient mares in embryo transfer programs. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 46, n. 3, p. 298-307, 2022. DOI: 10.21451/1809-3000.RBRA2022.022

LOPES, Edilson de Paula. Transferência de embriões equinos: maximizando resultados com a escolha de receptoras. **R. bras. Reprod. Anim.**, p. 223-229, 2015.

MASLAR, I. A.; POWERS-CRADDOCK, P.; ANSBACHER, R. Decidual prolactin production by organ cultures of human endometrium: effects of continuous and intermittent progesterone treatment. **Biology of reproduction**, v. 34, n. 4, p. 741-750, 1986. <https://doi.org/10.1095/biolreprod34.4.741>

McCue PM, LeBlanc MM, Squires EL. eFSH in clinical equine practice. *Theriogenology* 2007;68:429e33. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.027>

McCue PM, Squires EL. Equine embryo transfer. Jackson, WY: Teton New Media; 2015. [https://doi.org/10.1016/S0749-0739\(17\)30643-0](https://doi.org/10.1016/S0749-0739(17)30643-0)

MCCUE, Patrick M. et al. How to evaluate equine embryos. In: **Proceedings of the... annual convention**. 2009.

MCCUE, Patrick M.; SQUIRES, Edward L. Equine embryo transfer. CRC Press, 2015.

McKinnon AO, Squires EL. Embryo transfer and related technologies. **Current therapy in equine reproduction**. WB Saunders, p. 319-334, 2007.

MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L. Equine embryo transfer. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 4, n. 2, p. 305-333, 1988. [https://doi.org/10.1016/S0749-0739\(17\)30643-0](https://doi.org/10.1016/S0749-0739(17)30643-0)

NETO, I. V. O. et al. Synchronization of cyclic and acyclic embryo recipient mares with donor mares. **Animal reproduction science**, v. 190, p. 1-9, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.12.016>

NISWENDER, G. D. Molecular control of luteal secretion of progesterone. **reproduction**, v. 123, n. 3, p. 333-339, 2002. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1230333>

OKUMU, L. A. et al. The effect of elevated progesterone and pregnancy status on mRNA expression

and localisation of progesterone and oestrogen receptors in the bovine uterus. **Reproduction**, v. 140, n. 1, p. 143-153, 2010. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0113>

OQUENDO, P. S. et al. The effect of priming and duration of oestradiol benzoate treatment before progesterone administration on embryo development and survival in anestrus recipient mares. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 57, n. 11, p. 1474-1477, 2022. <https://doi.org/10.1111/rda.14220>

PANZANI, D. et al. Factors affecting recipients' pregnancy, pregnancy loss, and foaling rates in a commercial equine embryo transfer program. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 37, p. 17-23, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2015.10.011>

PANZANI, D. et al. Retrospective study of factors affecting multiple ovulations, embryo recovery, quality, and diameter in a commercial equine embryo transfer program. **The riogenology**, v. 82, n. 6, p. 807-814, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.06.020>

ROCHA FILHO, A. N. et al. Transfer of equine embryos into anovulatory recipients supplemented with short or long acting progesterone. **Animal Reproduction (AR)**, v. 1, n. 1, p. 91-95, 2018.

SCHERZER, J. Artificial insemination and embryo transfer in mares. **Compendium (Yardley, PA)**, v. 33, n. 7, p. E1-5; quiz E5, 2011.

SEGABINAZZI, L. GTM et al. Use of intravaginal progesterone-releasing device results in similar pregnancy rates and losses to long-acting progesterone to synchronize acyclic embryo recipient mares. **Veterinary Sciences**, v. 8, n. 9, p. 190, 2021. <https://doi.org/10.3390/vetsci8090190>

SILVA, E. S. M. et al. Administration of 2.5 mg of estradiol followed by 1,500 mg of progesterone to anovulatory mares promote similar uterine morphology, hormone concentrations and molecular dynamics to those observed in cyclic mares. **The riogenology**, v. 97, p. 159-169, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.04.031>

SILVA, E. S. M. et al. Comparison of different regimens of estradiol benzoate treatments followed by long-acting progesterone to prepare noncycling mares as embryo recipients. **The riogenology**, v. 86, n. 7, p. 1749-1756, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.05.041>

SILVA, E. S. M. et al. Expression of receptors for ovarian steroids and prostaglandin E2 in the endometrium and myometrium of mares during estrus, diestrus and early pregnancy. **Animal reproduction science**, v. 151, n. 3-4, p. 169-181, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.11.001>

SILVA, E. S. M. et al. Effect of the duration of estradiol priming prior to progesterone administration on endometrial gene expression in anestrus mares. **The riogenology**, v. 131, p. 96-105, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.03.025>

SPENCER, K. M. et al. Ovulatory response to GnRH agonist during early and late fall in mares. **The riogenology**, v. 185, p. 140-148, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.03.003>

Squires EL, McCue PM. Superovulation in mares. *Anim Reprod Sci* 2007;99: 1e8.

SQUIRES, E. L. et al. Embryo technologies in the horse. **The riogenology**, v. 59, n. 1, p. 151-170, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01268-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01268-2)

SQUIRES, E. L. et al. Factors affecting reproductive efficiency in an equine embryo transfer programme. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 32, p. 409-414, 1982.

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

TEIXEIRA, A. C. B. et al. Effects of equine chorionic gonadotropin on ovulatory and luteal characteristics of mares submitted to an P4-Based Protocol of Ovulation Induction With hCG. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 94, p. 103233, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2020.103233>

WHITWELL, K. E. et al. Abortions and stillbirths: A pathologists overview. **Equine Reproduction**, v. 2, p. 2339-2349, 2011.

WILSHER, S. et al. Successful transfer of day 10 horse embryos: influence of donor-recipient asynchrony on embryo development. **Reproduction**, v. 139, n. 3, p. 575, 2010.