

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE VETERINÁRIA

**A IMPORTÂNCIA DA ÉGUA RECEPTORA NOS PROGRAMAS DE
TRASNFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM EQUINOS**

EDUARDO MACHADO PINHEIRO

PORTO ALEGRE

2015/2

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE VETERINÁRIA

**A IMPORTÂNCIA DA ÉGUA RECEPTORA NOS PROGRAMAS DE
TRASNFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM EQUINOS**

Autor: Eduardo Machado Pinheiro

Trabalho apresentado à Faculdade de Veterinária como requisito parcial para obtenção da graduação em Medicina Veterinária

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Costa Mattos

Co-Orientador: Med. Vet. Msc. Frederico Lança Schmitt

PORTO ALEGRE

2015/2

AGRADECIMENTOS

A minha família, pela capacidade de sempre acreditar e investir em mim. Mãe, seu amor, carinho, cuidados e ensinamentos foi o que me deu, em todos os momentos da minha vida, suporte para que eu pudesse seguir em frente em busca dos meus sonhos. Pai, sua presença, amor e carinho me trouxeram a certeza de que não estou sozinho nessa caminhada. Mana, pelo amor e companheirismo de sempre, conversas e palavras de apoio. Amo vocês mais que tudo.

Ao meu amor, Eliana Mertins, por ser minha metade, companheira e por sempre estar ao meu lado em todas as horas. Nosso amor será eterno e realizaremos todos nossos sonhos juntos. Te amo infinitamente.

A minha amada vó, Amélia Serafini, pelo infinito amor e carinho e por nunca ter medido esforços para me ver feliz e chegar até aqui. Te amo.

Aos meus tios, Fernando, Madalena, Rubens, Eunice, Ludemir e Maria de Lourdes, pelo amor, carinho e apoio de todo o tipo, durante a minha vida. Vocês são como pais.

Aos meus primos Fernando, Lucas, Lúcio, Gustavo, Thiago, Diego, Cássio e Fernanda, os quais considero irmãos, pela parceria e união de sempre.

A todos os amigos que a Medicina Veterinária me deu, em especial Gilberto, Vanessa, Mica, Mari, Comiotto e Guela, pelo companheirismo e parceria de todas as horas. Vocês são para sempre.

Aos meus amigos de Santiago, Jé, Mari, Gabi, Ana, Nathalie, Juliano e Plínio, pela parceria de sempre e momentos de alegria que vivemos juntos.

Aos meus professores, do colégio a faculdade, por serem heróis e disseminarem o conhecimento mesmo em situações precárias e com baixos salários.

Aos exemplos de profissionais que tive a oportunidade de acompanhar e aprender sobre a profissão de Médico Veterinário, Frederico Schmitt, Fernando Gonzales, Rodrigo Mattos e Elisabeth Soares.

Aos colegas do Reprolab e Hospital Veterinário Jockey, pelos momentos de alegria, estudos, discussões e assados.

“Después de Dios, debemos la victoria a los caballos”.

Hernán Cortés

RESUMO

A transferência de embriões em equinos (TE) é uma técnica que vem sendo utilizada comercialmente desde a década de 80 e que vem crescendo ano após ano no cenário da equinocultura mundial. A TE é uma ferramenta de avanço tecnológico que traz muitas vantagens para a criação de equinos, pois com ela conseguimos reproduzir com maior eficiência e em maior número os animais de maior potencial genético e valor comercial, beneficiando o aprimoramento das raças e seus cruzamentos. Para buscar melhores índices de sucesso com essa biotécnica os médicos veterinários devem atentar para os pontos críticos e que podem prejudicar os resultados positivos em um programa de TE, sendo a seleção e manejo da égua receptora o principal deles. Essa revisão bibliográfica tem como objetivo analisar e comentar a técnica de TE em equinos com foco na importância da égua receptora.

Palavras chave: equinos, transferência de embrião, éguas receptoras, seleção, manejo.

ABSTRACT

Embryo transfer in horses (TE) is a technique that has been used commercially since the 1980s and has been growing year after year in the scenario of global Equine. The TE is a technological breakthrough tool that brings many advantages to the creation of equine, because with it we can play more efficiently and more animals of greater genetic potential and commercial value , benefiting the improvement of breeds and their crosses . To seek better success rates with this biotech veterinarians should look for hot spots, which can harm the positive results in an TE program , and the selection and management of recipient mare chief among them. This literature review aims to analyze and comment on the TE technique in horses with a focus on the importance of the recipient mare.

Keywords: *equine, embryo transfer, mares receiving, selection, management.*

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	Albumina do Sérica Bovina
CL	Corpo Lúteo
D0	Dia zero
D2	Dia dois
D5	Dia cinco
E2	Estradiol
EPE	Extrato de Pituitária Equina
IA	Inseminação Artificial
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
Fshe	Hormônio Folículo Estimulante Equino Purificado
LH	Hormônio Luteinizante
P4	Progesterona
PGF2 α	Prostaglandina F2 α
TE	Tranferência de Embrião
α	Alfa
ml	Militlitros
mm	Milímetros
%	Por cento
R\$	Reais

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	8
2	SAZONALIDADE E CICLO ESTRAL NA ÉGUA.....	10
3	SINCRONIZAÇÃO DOADORA x RECEPTORA.....	12
4	SUPEROVULAÇÃO EM ÉGUAS.....	14
5	TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM EQUINOS.....	16
5.1	Coleta de Embrião.....	16
5.2	Técnicas de Transferência de Embrião.....	17
6	MANEJO DAS RECEPTORAS.....	18
7	SELEÇÃO DAS RECEPTORAS.....	19
7.1	Exame Clínico Externo do Aparelho Reprodutor.....	19
7.2	Palpação Transretal.....	20
7.3	Ultrassonografia Transretal.....	20
7.4	Citologia Endometrial.....	20
7.5	Biópsia e Histologia Endometrial.....	21
7.6	Cultura Endometrial.....	22
8	CONCLUSÃO.....	24
	REFERÊNCIAS.....	25

1 INTRODUÇÃO

A técnica de transferência de embriões (TE) em equinos, após seu desenvolvimento e posterior popularização, vem sendo utilizada em larga escala em programas comerciais no Brasil nos últimos anos, e assim ajuda a desenvolver a equinocultura nacional (ALVARENGA, 2010). Esta biotécnica se resume em coletar um embrião de uma égua geneticamente superior, denominada doadora, e a transferência deste para outra égua que leve a gestação a termo, denominada receptora (McKINNON et al, 2007; ALVARENGA, 2010). Sendo assim, as características e a constituição genética do potro não terão nada a ver com as da égua receptora, e sim, serão provenientes da égua que produziu o óvulo e do garanhão cujo sêmen foi utilizado para fecunda-lo (DAVIES MOREL, 2003).

A criação de equinos do nosso país revela números animadores. Segundo o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) o Brasil tem o maior rebanho da América Latina e o terceiro em âmbito mundial, atingindo a marca de 8 milhões de cabeças, o que faz girar economicamente cerca de R\$7,3 bilhões e gera 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos nesse ramo do agronegócio. Segundo dados da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões, o Brasil recuperou em torno de 12000 embriões no período 2008 a 2009 e o mercado de TE vem aumentando numa taxa média de 20% ao ano, nos últimos 5 anos no país. Após a liberação da utilização da TE por algumas associações de raças o Brasil lidera a produção de embriões no mundo, juntamente com Estados Unidos e Argentina (ALVARENGA, 2010).

Sendo assim, a TE se tornou uma ferramenta de suma importância em programas de melhoramento genético de equinos no mundo todo. Permite a produção de vários potros de éguas de alto potencial genético que estejam em carreira atlética, de éguas incapacitadas de levar uma gestação a termo, de potras muito novas para conceber, permite que potros filhos de éguas idosas tenham melhores condições de desenvolvimento pré e pós parto e poupa essas éguas de idade avançada das dificuldades de levar uma gestação a termo bem como de amamentar (LEY, 2006). A TE em equinos é uma técnica de boa aplicação prática devido ao fato de o embrião, nessa espécie, permanecer com mobilidade total no útero da fêmea nos primeiros 15-17 dias de gestação. O conceito nessa fase migra de um corno uterino ao outro e não forma nenhum tipo de anexo embrionário ao endométrio da mãe, sendo possível transferi-lo de uma égua para outra (GINTHER, 1983).

Há inúmeros fatores que afetam o sucesso da TE em equinos, desde a qualidade do sêmen do garanhão utilizado, a idade da égua doadora, o dia da coleta ou até o método

escolhido de transferência. Entretanto, o fator que é considerado como o principal é, sem dúvidas, a escolha da égua receptora. Uma seleção adequada, baseada em aspectos como idade, tamanho, status sanitário e reprodutivo, docilidade, aptidão materna e condição corporal, aliados a um correto manejo são requisitos indispensáveis para obtenção do sucesso desejado com a utilização da TE, levando a elevadas taxas de prenhez e reduzindo a perda embrionária (VANDERWALL e WOODS, 2007; ALONSO, 2008).

2 SAZONALIDADE E CICLO ESTRAL NA ÉGUA

A fêmea equina é classificada reprodutivamente como poliéstrica sazonal, tem atividade sexual regulada principalmente pelo fotoperíodo, tendo a fase cíclica em épocas do ano com dias maiores e de maior fotoperíodo (primavera e verão) e um período acíclico fisiológico nos meses com dias mais curtos e com menor fotoperíodo (outono e inverno). A maturidade sexual na potra se dá em média com um ano e meio de idade, variando de acordo com a raça, desenvolvimento, escore de condição corporal e época do ano (McKINNON; VOSS, 1993; EILTS, 2011). Além disso, a espécie é classificada como monovulatória, ou seja, apenas um folículo dominante recrutado por onda folicular. Ocorrem, entretanto, casos de múltiplas ovulações em taxas que variam de 4% a 43%, isso está relacionado a diversos fatores inerentes ao animal e a estação do ano (GINTHER, 1992).

Ao longo do ano as éguas passam ainda por duas fases chamadas de transicionais. A primeira ocorre após o anestro de inverno, passando a ciclar na primavera e verão, durante esse período a égua apresentará episódios variáveis de sinais comportamentais de estro, sem desenvolvimento efetivo de estruturas foliculares significantes ou que culminem em uma ovulação. A segunda fase transicional é no início do outono, quando a égua retornará do período reprodutivo cíclico novamente ao anestro no inverno (LEY, 2006).

A duração do dia (natural ou artificial) é um fator determinante para o estímulo da sazonalidade nas regiões temperadas do mundo. No ambiente, estímulos luminosos durante 15 a 16 horas por dia são suficientes para atuar no eixo pineal-hipotalâmico-hipofisário-gonadal, levando à diminuição da produção de melatonina, que produzida pela glândula pineal, inibe a produção de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) pelo hipotálamo, o que afeta diretamente a produção e liberação dos hormônios folículo-estimulante (FSH) e luteinizante (LH) pela hipófise. FSH e LH, agem em receptores ovarianos promovendo o recrutamento, seleção, dominância e maturação folicular (McKINNON; VOSS, 1993; LEY, 2006).

O padrão regular do ciclo estral se baseia numa íntima e organizada relação dos hormônios produzidos e liberados pela glândula pineal, hipotálamo, hipófise, ovários e endométrio. Assim, programas de fotoperíodo artificial podem antecipar, se bem manejados, as atividades regulares do ciclo estral nas éguas em até 60 a 90 dias. Grupos numerosos de éguas podem ser satisfatoriamente manejados nesses programas de iluminação artificial, usando holofotes ou lâmpadas que garantam que todos os animais tratados recebem uma quantidade mínima de luz nos períodos estipulados (LEY, 2006).

O intervalo entre uma ovulação e outra é definido como ciclo estral, durando em média 19 a 21 dias, sendo dividido em estro (fase folicular ou estrogênica) e diestro (fase luteal ou progesterônica). O estro tem duração média de 4 a 7 dias e compreende a fase de receptividade ao garanhão, onde todo trato reprodutivo da égua está preparado para cópula e ocorre a ovulação (considerado o dia 0 do ciclo). Tem como característica a presença de um ou mais folículos com diâmetro superior a 25mm e o aumento dos níveis de estrógeno, levando a formação edema uterino. Durante o estro a concentração de progesterona (P4) é menor que 1ng/ml, no sangue periférico. Em média na espécie há uma variação do diâmetro folicular no momento da ovulação, ocorrendo esta em torno de 30 a 70mm (geralmente na faixa dos 45mm) (LEY, 2006; BRINSKO, 2011).

A fase de diestro (luteínica) tem duração de 15 dias em média, sendo caracterizada pela presença de corpo lúteo (CL), pelo aumento dos níveis séricos de progesterona e por sinais comportamentais indicando ausência de receptividade ao garanhão. Além disso, nessa fase o ambiente uterino está nas condições adequadas para o desenvolvimento embrionário. O CL é o resultado da luteinização das células das camadas foliculares da teca e da granulosa e é o responsável pela produção de P4, em quantidades crescentes do 2º ao 10º dia pós-ovulação e mantendo este padrão equilibrado até o 12º dia, momento em que as concentrações de P4 plasmáticas sofrem uma queda acentuada. Em seguida, por volta do 14º ao 16º dia ocorre a chamada luteólise, devido a produção e liberação de prostaglandina (PGF2 α) pelo endométrio uterino, fato que ocorre na ausência do reconhecimento materno da gestação, marcando desse modo o fim do diestro (GINTHER, 1992; DAELS; HUGHES, 1993).

No entanto, quando ocorre a fertilização, o embrião que chegará ao útero ao redor do 5º dia após a ovulação. O embrião equino produz e secreta estrógeno (E2) que auxilia sua movimentação e suprime a liberação de PGF2 endometrial, nessa fase há movimentação do concepto por toda extensão do útero, processo importante para o reconhecimento materno (LEY, 2006). Então ao redor do 17º ocorre a fixação do embrião ao endométrio da égua cessando a fase de mobilidade (GINTHER, 1983).

O diâmetro do maior folículo presente na fase de luteólise afetará diretamente no tamanho do intervalo entre o início do estro e a próxima ovulação. Geralmente, a presença de folículos grandes nessa etapa representa um encurtamento do período de estro, pois a ovulação ocorrerá mais cedo. Tendo em vista que no início da estação de reprodução o estro pode ter uma maior duração, isso se deve talvez a menores concentrações de LH durante essa transição de primavera (BRINSKO, 2011).

3 SINCRONIZAÇÃO DOADORA x RECEPTORA

No que diz respeito à sincronização entre doadoras e receptoras de embrião, a espécie equina é classificada como uma das mais fáceis de se trabalhar, em relação às outras espécies domésticas como os ruminantes e os suínos, na obtenção de altas taxas de prenhez (ALLEN, 2005). Essa sincronização do ciclo estral entre as éguas é uma ferramenta que otimiza a mão de obra e o acompanhamento da fase do ciclo e da ovulação nesses animais (COSTA, 2003). Algumas dificuldades podem aparecer nessa espécie devido a sua prolongada fase folicular, que faz com que a ovulação possa ocorrer num grande e variado espaço de tempo. A importância de se manter uma janela ideal de sincronia entre as doadoras e receptoras é o fato de que a ação da progesterona realiza modificações no ambiente uterino que são indispensáveis para o reconhecimento materno e manutenção da gestação. Assim, se o útero não está em sincronia com a idade do embrião, pode deixar de oferecer as condições adequadas para a sobrevivência do conceito (CAMARGO, 2008).

A sincronização das éguas é uma das etapas que consome mais tempo e dedicação dentro de um programa de TE. As éguas devem seguir uma rotina de exames com palpação transretal e ultrassonografia do trato reprodutivo, as doadoras devem ser examinadas no mínimo uma vez ao dia depois que um folículo dominante é identificado, isso é de suma importância para a tomada de decisão sobre o momento ideal da inseminação artificial (IA) ou monta natural e avaliar o dia correto da ovulação, considerado o dia zero (D0) (HARTMAN, 2011). Normalmente o intervalo de sincronização aceito e utilizado é aquele no qual receptoras se encontram entre o 4º e 8º dia de ovulação (contados relacionados com o dia de ovulação da doadora D0), sendo a coleta do embrião realizada no 7º dia, a receptora poderia ovular um dia antes (+1) ou até 3 dias depois (-3), estando apta a receber o embrião nesse período (McKINNON; SQUIRES, 2007).

Vários estudos comprovaram que esta “janela” de sincronização pode ser mais flexível do que se imaginava. Lopes (2004), relatou ter alcançado índices de 63% de prenhez após TE não cirúrgica, com receptoras que ovularam até 48 horas após a doadora, contra 0% de prenhez em receptoras que ovularam 48 horas antes da doadora. Um trabalho mostrou ainda que não obteve diferença com receptoras que ovularam um dia antes ou até 5 dias depois da doadora, chegando 76% e 61% de taxas de prenhez, com as receptoras ovuladas 4 e 5 dias após a doadora respectivamente (JACOB et al, 2012). Já Carnevale *et al.* (2000) demonstraram que o principal fator no momento da escolha da receptora era o tempo de ovulação, intimamente relacionado com o tônus uterino, e não a “janela” de sincronização em si.

Éguas em anestro ou fase transicional também podem ser utilizadas como receptoras em programas de TE, desde que tratadas para esse fim, aplicando-se tratamento hormonal que mimetizam um cio, para esse fim se utiliza estrógeno e progesterona (P4) provocando um cio artificial (ALONSO, 2007). Entretanto, essas éguas devem ser suplementadas com progesterona até, em média, os 100 – 120 dias de gestação, momento em que a placenta assume a produção de desse hormônio (SQUIRES, 2003). No Brasil, o uso de progesterona nessas éguas é muito frequente e funcional, esse protocolo é indicado, pois é sabido que doadoras começam a ciclar mais cedo na temporada reprodutiva e entram em anestro fisiológico mais tarde também (LOSINO; ALVARENGA, 2006). Um estudo verificou que o tratamento diário com progesterona oleosa aplicado nas receptoras, iniciado no dia da ovulação da receptora (D0) até o 5º dia pós ovulação (D5), permite a utilização dessas receptoras já no D2, com uma taxa de prenhez de 72% (CAIADO, 2005).

4 SUPEROVULAÇÃO EM ÉGUAS

A grande maioria das éguas doadoras tem ovulações espontâneas simples. Taxas consideradas aceitáveis de recuperação embrionária, em éguas com simples ovulação, giram em torno de 50%, sendo que se consegue obter 75% de prenhez pós-transferência, o que nos resulta em 35% de chance de se obter uma prenhez proveniente de uma única ovulação (MCCUE; SQUIRES, 2015). A espécie equina, apesar de ser considerada monovulatória, apresenta dentre suas raças diferentes taxas de múltiplas ovulações espontâneas. Puro Sangue Inglês, Polo Argentino, Quarto de Milha e Apaloosa apresentam, respectivamente, taxas de múltiplas ovulações espontâneas de 15% a 30%, 38%, 9% e 8%. Outros fatores além da raça estão relacionados com esse evento, tais como genética, estado nutricional e idade da égua (GINTHER, 1992).

A incidência de múltiplas ovulações unilaterais ou bilaterais é motivo de estudos, pois está relacionado a ocorrência de gestações gemelares e a obtenção de mais de um embrião por lavado uterino. Quanto mais perto uma ovulação ocorrer da outra, maiores são as chances de fertilização e recuperação de vários embriões de uma única vez, normalmente as ovulações múltiplas ocorrem sincronicamente sendo que 75% nas primeiras 24 horas, 15% nas primeiras 48 horas e 10% após as 48 horas (HUGHES et al, 1972).

É considerada uma tarefa bem difícil superovular éguas, devido a inconsistência de éguas que respondem e/ou continuam respondendo ao tratamento de superovulação, falta de drogas superovulatórias disponíveis no mercado, custo do tratamento e a possível baixa viabilidade dos embriões obtidos com a técnica. Alguns autores consideram impossível superovular éguas devido à conformação anatômica do ovário dessa espécie, que contém o epitélio germinativo restrito a uma pequena parcela do órgão, denominada fossa de ovulação. Outros ainda relatam que a recuperação embrionária e as taxas de prenhez em éguas superovuladas são menores, e atribuem isso à menor fertilidade desses embriões (McCUE; SQUIRES, 2015).

Outra dificuldade encontrada é a refratariedade das éguas aos preparados hormonais a base de FSH suíno, usado para outras espécies, sendo necessário o uso de FSH homólogo para se obter uma resposta ovariana satisfatória. Sendo assim, o extrato de pituitária equina (EPE) e o FSH equino purificado (FSHe) são indicados para se conseguir superovulações na fêmea equina (ALVARENGA, 2010).

Com o uso da técnica de superovulação conseguimos uma maior eficiência reprodutiva e econômica nos programas de TE em equinos, pois aumentando o número de

ovulações e conseqüentemente o número de ovócitos para fertilização, multiplicamos as chances de recuperar mais de um embrião de éguas doadoras por lavado. A média de ovulações utilizando-se FSH foi de 3,4 a 5,2 por ciclo, já com o uso do EPE a média aumenta para 4 a 7 ovulações por ciclo. Entretanto a média de recuperação embrionária por ovulação ainda é considerada baixa, sendo de 35% a 40% (ALVARENGA et al, 2001). Alguns autores defendem que a partir de 2 ovulações a liberação e o transporte de ovócitos ficam prejudicados devido à formação de um grande coágulo de sangue na fossa de ovulação, sendo mais frequente em éguas com múltiplas ovulações unilaterais (CARMO, 2003).

5 TRANFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM EQUINOS

Na espécie equina a técnica de TE vem sendo amplamente utilizada para uma maior obtenção de potros por matriz/ano (CAIADO, 2007). As principais razões que levam a utilização da TE em programas comerciais são o fato de conseguirmos obter mais de um potro por ano filhos de animais geneticamente superiores, de éguas em treinamento ou doma, de éguas jovens (potrancas) ou de éguas com problemas de saúde (como laminite crônica ou fratura de pelve) (LEY, 2006). A primeira TE em equinos que cursou com sucesso, ocorreu no Japão no ano de 1972 e foi realizada por Oguri e Tsutsumi e começou a ser utilizada comercialmente na década de 80 (McKINNON et al, 2007). Em 1986, foram descritos as primeiras tentativas com resultados positivos no Brasil, em São Paulo na raça Mangalarga (FLEURY, 1998).

5.1 Coleta de Embrião

A data da ovulação da égua doadora é dada como dia 0 (D0) e a coleta propriamente dita é normalmente realizada entre o 7º e 8º dia após a fertilização. Em éguas, o embrião migra para o útero entre os dias 5 e 6 pós-ovulação começando sua mobilidade, que dura até aproximadamente o 16º dia de gestação, através de todos os segmentos do útero, o que é essencial para o reconhecimento materno da prenhez (MEIRA et al; 2012). A égua é contida em brete apropriado e é realizada uma higienização da genitália externa e períneo, para evitar carreamento de sujidades no momento de introdução do cateter. A coleta dos embriões é realizada predominantemente pelo procedimento não cirúrgico utilizando um cateter de 3 vias que é introduzido pelo canal vaginal passando a cérvix aproximadamente 5cm no corpo do útero. Este possui um balão preenchido com 60ml de solução fisiológica ou ar e é inflado no corpo do útero, fixando o cateter e impedindo o refluxo de líquido infundido, permitindo assim que os dois cornos e o corpo uterino sejam lavados simultaneamente (McKINNON et al, 2007).

O próximo passo é a infusão contínua intrauterina de solução tamponada (salina ou Ringer com lactato de sódio) no volume aproximado de 1 a 2 litros de uma única vez, lavando, literalmente, toda luz do útero. O líquido é recuperado através da ação da gravidade e uma sonda/cateter acoplado ao sistema a um recipiente precedido por um micro filtro, onde o embrião ficará retido em caso de lavado positivo (SQUIRES et al, 2003). Esse processo é normalmente repetido 3 vezes. O conteúdo obtido no filtro do recipiente é analisado em

microscópio estereoscópio (lupa) no aumento de 10 a 40 vezes, para visualização e avaliação de maneira subjetiva do embrião recuperado (McKINNON et al, 2007).

Depois de localizado e avaliado, o embrião é inserido a um meio de manutenção próprio para embriões que contém diversos ingredientes sendo a albumina do soro bovino (BSA) um exemplo, pode conter também antibióticos, dependendo da escolha do médico veterinário que realizará a técnica. Então o embrião é “passado” em algumas gotas (em torno de 10) desse meio e posteriormente envasado para ser transferido. Essa “lavagem” do embrião é feita para retirar dele sujidades que podem estar aderidas a zona pelúcida (HARTMAN, 2011).

5.2 Técnicas de Transferência de Embrião

A técnica de TE equina pode ser realizada de maneira cirúrgica que pode ser feita através de laparotomia na linha média do abdômen, com o animal sob anestesia geral, ou pelo flanco com animal em pé sob sedação leve e anestesia local. Usando-se esse método obtém-se índices de gestação entre 75% e 80%, apesar se ser mais oneroso, invasivo e necessitar de instalações adequadas ao procedimento, como um bloco cirúrgico (LEY, 2006). Também pode se realizar da forma não cirúrgica por via transcervical, sendo esse o método mais utilizado (SILVA, 2003). A técnica transcervical é considerada mais fácil e menos invasiva, e seus índices de gestação que eram mais baixos, girando em torno de 60% a 70%, já ultrapassaram os índices do método cirúrgico nos últimos anos (HARTMAN, 2011).

O método não cirúrgico pode ser feito com pipeta padrão de inseminação artificial (IA), pistola de inseminação ou inovulador descartável ou de aço reutilizável com bainha de proteção estéril, e uma pipeta ou palheta contendo o embrião, em porções alternadas de ar e meio de manutenção. O procedimento consiste apenas em depositar o embrião, com auxílio desse instrumental, no útero da égua doadora (LEY, 2006). Preferencialmente se faz uso de uma camisa sanitária plástica estéril cobrindo o conjunto de instrumentos, para evitar contaminação do material. Então, a receptora é higienizada da mesma maneira que a doadora para realização da coleta do embrião e pode-se fazer uso de sedação leve se necessário no momento da transferência. Com a mão e braço enluvados com luvas de IA estéreis o veterinário introduz a mão, que segura os instrumentos contendo o embrião, via canal vaginal até a cérvix. A camisa sanitária deve ser tracionada e rompida antes de se passar a cérvix. O embrião é desse modo depositado no lúmen uterino com a compressão do material inovulador (HARTMAN, 2011).

6 MANEJO DAS RECEPTORAS

O manejo para éguas designadas a receptoras em um programa de TE é trabalhoso e exige dedicação dos profissionais envolvidos na atividade. Esta tarefa começa no outono anterior a estação de monta, nesse período é importante adquirir o número de éguas necessário para a realização da técnica, baseado no número de doadoras e/ou de embriões que se pretende produzir. Segundo McCue e Squires (2015) para cada doadora se faz necessário no mínimo 2 ou 3 éguas receptoras, para a obtenção de maiores índices de sucesso no programa. A formação de um adequado plantel de receptoras representa uma das partes mais difíceis e dispendiosas em um programa de TE, visto que a cada ano se torna mais raro e caro devido a demanda por animais para tal função (ALVARENGA *et al*, 2009). Novas éguas que podem introduzir doenças contagiosas na manada não devem ser selecionadas e todas devem possuir um meio de identificação individual permanente, para evitar confusões em relação qual égua está prenhe de qual potro (BRINSKO, 2011).

Sabe-se que o manejo nutricional é um ponto chave e afeta diretamente as taxas de prenhez após a transferência. As éguas devem estar ganhando peso durante a estação de monta, as receptoras que receberem embrião devem ser colocadas em pastagens e/ou receberem concentrado de melhor qualidade. Os índices de prenhez e perda embrionária podem ser radicalmente afetados se a égua estiver perdendo peso durante a estação reprodutiva. No manejo devemos preconizar que esses animais sofram o mínimo de estresse, principalmente dos animais transferidos ou prenhes. Os piquetes devem ter lotação adequada, de preferência baixa, fácil acesso a água, boas pastagens e sombra. As trocas de grupos devem ser feitas individualmente para evitar confrontos hierárquicos e os animais devem ser manejados por pessoal experiente e que entenda do comportamento da espécie e, sobre tudo, com calma (ALONSO, 2008).

7 SELEÇÃO DAS RECEPTORAS

Um dos pontos de maior importância em um programa de TE equina é a escolha da receptora, a seleção deve ser criteriosa e responsável, primeiramente visando a eficiência do programa de TE com baixos custos (ALONSO, 2008). Deve basear inicialmente em um exame físico do estado geral do animal. Exame do sistema musculoesquelético, saúde oral e dentária, comportamento, escore corporal, avaliação oftálmica e glândula mamária. Essa primeira etapa indicará se o animal tem as mínimas condições de se locomover, se alimentar e manter-se nutrido e saudável, além de indicar docilidade, facilidade de ser manejado e aptidão materna, principalmente para o período de aleitamento do potro. Nessa fase é importante gerenciar o status sanitário de todos os animais, colocando em dia as vacinas e fazendo controle de endoparasitas e ectoparasitas de toda manada. Testes e vacinação para arterite viral equina devem ser abordados em regiões geográficas em que são indicados (BRINSKO,2011).

Em um plano geral, receptoras são selecionadas baseadas na idade, histórico reprodutivo e conformação perineal, além de um criterioso exame do trato reprodutor (HARTMAN, 2011). Esse exame deve conter palpação transretal, ultrassonografia, citologia, cultura e biópsia endometriais. Devem ser escolhidas fêmeas que tenham histórico de parição anterior, de tamanho adequado, entre 3 e 10 anos de idade e que sejam mansas para cabrestear (SQUIRES et al, 1999).

7.1 Exame Clínico Externo do Aparelho Reprodutor

Através de um exame da genitália externa da égua podemos verificar a conformação e angulação vulvar, coaptação dos lábios vulvares. Em éguas, defeitos nesses parâmetros podem levar a ocorrência de pneumovagina e entrada de contaminantes para o trato reprodutivo, acarretando em problemas de fertilidade como as endometrites bacterianas e fúngicas (TROEDSSON, 1997).

Animais que tem cicatriz ou evidência de cirurgia de correção de defeitos de conformação vulvar (vulvoplastias) anteriores não devem ser selecionados para um plantel de receptoras de embrião (McCUE; SQUIRES, 2015).

7.2 Palpação Transretal

No exame de palpação transretal, segundo Hayes e Ginther (1986) através da compressão digital, podemos avaliar o tônus uterino e cervical, além de dimensionar tamanho de ovários e folículos assim como sua consistência e também a presença de outras estruturas de características anormais, patológicas ou que causem sensibilidade ao animal. A avaliação de tônus uterino varia numa escala de 1 a 4, sendo considerado 1 o útero de tônus flácido e 4 o útero de tônus firme.

7.3 Ultrassonografia Transretal

A utilização do aparelho de ultrassom possibilitou grandes avanços na reprodução assistida de equinos e deve ser rotina no controle reprodutivo das éguas. Com uso dessa ferramenta, temos informações valiosas sobre forma e função do trato reprodutor, podemos avaliar a morfoecogenicidade do útero, folículos, corpo lúteo, além de anormalidades ou patologias que podem estar presentes em qualquer estrutura do trato reprodutivo da égua (CARNEVALE et al, 2011). Esse exame nos permite uma avaliação mais precisa de tônus uterino, presença ou ausência de líquido ou ar intrauterinos, cistos endometriais, morfologia e tônus da cérvix. Todos esses são aspectos de grande importância no momento de decisão sobre qual égua receptora será usada, pois nos revelam indícios de possíveis patologias ou problemas reprodutivos do animal que irão afetar os índices de sucesso da técnica (McCUE; SQUIRES, 2015).

7.4 Citologia Endometrial

Esse exame complementar tornou-se rotina para diagnóstico desde os anos 1960 quando foi descrito pela primeira vez. Na fase de seleção e formação do plantel de éguas receptoras para um programa de TE deve ser realizado, pois nos revela informações sobre possíveis processos inflamatórios no útero (McCUE; SQUIRES, 2015). Quando aplicada em conjunto com um completo exame reprodutivo da égua, a citologia endometrial pode nos indicar rapidamente éguas com processo ativo de endometrite. Assim, podemos tomar decisões sobre a gestão reprodutiva desses animais antes mesmo de se ter resultados de culturas uterinas (LE BLANC, 2011).

Existem várias técnicas de coleta e coloração das células, assim como de avaliação das lâminas em um exame citológico endometrial. Esse exame se baseia em coletar, com auxílio de um suabe, escova citológica ou alíquota de fluido proveniente de lavagens uterinas, uma pequena amostra do conteúdo celular no lúmen do endométrio e posteriormente fixar essa amostra em uma lâmina e corá-la, para posterior avaliação. Independente do método escolhido, o objetivo é coletar um número suficiente de células do endométrio, sem contaminar a amostra com fluidos vaginais e principalmente não causar nenhuma contaminação de origem iatrogênica, carregando sujidades e microrganismos patogênicos para o útero da égua (LE BLANC, 2011).

O tamanho, forma e população celular do epitélio luminal uterino variam bastante de um estágio do ciclo para outro, indo de cuboidal no anestro a colunar alto no estro, e isso deve ser levado em consideração na avaliação da citologia. As células epiteliais do endométrio são as mais comumente encontradas nos exames citológicos, entretanto o que procuramos, em uma possível contaminação e/ou inflamação são as células inflamatórias, representadas principalmente pelos neutrófilos (polimorfonucleares). Os neutrófilos são as células inflamatórias mais encontradas em exames citológicos éguas com endometrite, sendo rara a sua presença em animais reprodutivamente saudáveis. Entretanto, podemos encontrar neutrófilos em algumas ocasiões consideradas fisiológicas, como no primeiro estro após o inverno, no pós parto, 2 a 3 dias pós cobertura e 16 dias após lavagem uterina. Em casos de processos inflamatórios uterinos podemos encontrar diversos outros tipos celulares, como eosinófilos, linfócitos, macrófagos, além de células de descamação do epitélio cervical, hemácias, etc (LE BLANC, 2011). Nesses casos devemos ficar em alerta já que essa égua, no momento, não está apta a ser selecionada para receptora em um programa de TE, e devemos tomar decisões sobre a conduta reprodutiva a ser tomada com esse animal.

A interpretação na leitura das lâminas de citologia endometrial varia conforme diversos autores. No geral, conta-se ao microscópio, 10 campos diferentes na lâmina e se estipula uma porcentagem entre 0,5% e 5% como indicador positivo de inflamação (ALLEN, 2005; LE BLANC, 2011).

7.5 Biópsia e Histologia Endometrial

O exame histológico do endométrio tem que se tornar uma rotina presente nas avaliações reprodutivas de éguas, principalmente no momento de escolha de uma futura receptora de embriões. Esse é o único método que nos propicia uma avaliação da saúde e

integridade do endométrio em relação a infiltrados inflamatórios, alterações de origem fibrótica, diâmetro de vasos sanguíneos e linfáticos e densidade e qualidade glandular, além de mudanças cíclicas e sazonais do endométrio normal (DAEVIS MOREL, 2003).

Para a realização da coleta da amostra de biópsia endometrial se faz necessário o auxílio de material adequado, uma pinça do tipo “boca de jacaré” de tamanho apropriado e com compartimento para alojar o fragmento retirado do endométrio é o instrumento mais utilizado. Esse instrumento é colocado manualmente, fechado, com ajuda de um espécuro vaginal ou não, através de vulva, vestibulo e cérvix, até o corpo uterino. Quando está no interior do órgão deve pressioná-lo contra a parede do endométrio e, nesse momento, faz-se um movimento de abre-fecha com a pinça e outro movimento de “arrancamento” concomitante, para se conseguir coletar um fragmento. Ocorre um mínimo sangramento após a remoção da amostra, que pode ser observado até alguns dias depois da coleta. A amostra deve ter um tamanho adequado para passar pelo processo de preparação histológica e posterior avaliação. Depois da aquisição da amostra, a solução fixadora de escolha é o meio de *Bouin*, na qual o fragmento permanece entre 12 e 24 horas até ser colocado em etanol 70%, evitando o endurecimento demasiado da amostra tecidual. Então, as lâminas histológicas devem ser preparadas por técnico capacitado e experiente, para serem avaliadas (LOVE, 2011).

Achados no exame de histologia endometrial podem trazer informações sobre o estágio do ciclo estral do animal e, juntamente com um exame ginecológico completo, a interação e sincronia da função ovariana e uterina. Normalmente o epitélio do endométrio no anestro é cúbico e baixo com escassa densidade glandular, no estro o epitélio chega a colunar alto com a densidade glandular diminuída devido ao edema uterino e no diestro pode ser parecido com o de estro, porém, a densidade glandular fica aumentada sem a presença do edema. O exame histológico do endométrio é uma ferramenta que mostra ao veterinário o estado de fertilidade potencial da égua, em contraste com citologia e cultura endometrial, que avaliam possíveis contaminações e processos inflamatórios superficiais, a biópsia nos revela patologias mais profundas nessa camada uterina, a nível glandular (LOVE, 2011).

7.6 Cultura Endometrial

O exame bacteriológico uterino, se executado de maneira correta, revela relações entre problemas de fertilidade e contaminações por microrganismos patogênicos que podem acometer fêmeas equinas. Essa técnica deve ser realizada com material adequado,

normalmente se utiliza um suabe, protegido por uma bainha com utilização ou não de espéculo ginecológico e/ou com a técnica da mão enluvada. Todo o material utilizado deve ser primeiramente esterilizado e deve-se tomar muito cuidado para que não ocorra contaminação acidental do instrumental ou da amostra colhida, para se evitar resultados falso-positivos. Como em qualquer exame ginecológico, o animal deve estar previamente contido, de preferência em brete adequado a espécie, que traga certo grau de segurança para os manipuladores, médicos veterinários e para as próprias éguas. Deve se ligar a cauda com uma atadura limpa e suspende-la, posteriormente faz-se uma higienização prévia do períneo com água e sabão, desinfetantes não são necessários pois, se usados com frequência podem levar a colonização da genitália externa da égua por microrganismos patogênicos, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* (RICKETTS, 2011).

As amostras, depois de colhidas devem ser levadas ao laboratório o mais rápido possível, o ideal é que em menos de 48 horas já estejam sendo processadas para posterior avaliação. Os suabes devem ser transportados em embalagens estéreis, protegidas da luz solar e calor e pode-se fazer uso de meios nutritivos de transporte de microrganismos, como o meio de Stuart. No laboratório os meios de cultivo mais comumente utilizados para patógenos aeróbios de equinos são o ágar sangue, Sabouraud e MacConkey. As bactérias mais associadas a contaminações do trato reprodutivo de éguas são *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Streptococcus zooepidemicus*. Já os fungos mais isolados nessa espécie são *Candida spp.* e *Aspergillus spp.* Após análise e antibiograma da cultura obtida, o técnico pode tomar decisões sobre o manejo e tratamento da égua acometida (RICKETTS, 2011) e, juntamente com os outros exames reprodutivos fazer a opção de usá-la ou não como receptora.

8 CONCLUSÃO

A cada ano a TE ganha mais espaço na equinocultura mundial e principalmente nacional. Dessa forma os médicos veterinários devem atentar para realizar a técnica de maneira cada vez mais efetiva e buscando melhorar os índices de sucesso com ela alcançados, analisando os pontos críticos e falhas que podem ocorrer. Tomando a escolha da égua receptora como o principal gargalo no assunto, os técnicos devem dar uma maior importância a sua seleção e manejo nos programas comerciais de TE em equinos, para que as taxas de prenhez sejam cada vez maiores com a utilização dessa biotecnologia.

REFERÊNCIAS

- ALONSO, M. A. **Efeito das características uterinas e dia do ciclo na taxa de prenhez e níveis séricos de progesterona em éguas candidatas a receptoras de embrião.** 2007. 72p. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, 2007.
- ALONSO, M. A. Seleção, manejo e fatores que influenciam as taxas de prenhez em éguas receptoras de embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.36, p. s207-s214, 2008. Suplemento 2.
- ALLEN, W. R; The development na apliccation of the modern reproductive technologies to horse breeding; **Reproduction in Domestic Animals**. Berlin, v. 40, n. 4, p. 310-329. 2005.
- ALVARENGA, M. A. *et al.* Improvement of ovarian super stimulatory. Response and embryo production in mares treated with equine pituitary extract twice daily. *Theriogenology*. Los Angeles, v. 56, p. 879-887, 2001.
- ALVARENGA, M. A. Problems and solutions in equine embryo transfer programs in Brazil. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 38, p. s319- s333, 2010. Suplemento 1.
- ALVARENGA, M.A; CARMO, M. T; OLIVEIRA, J. V. Principais fatores que interferem em programas de transferência de embriões equinos. *In: Transferência de embriões na espécie equina*, Botucatu, 2009, p.33.
- BRINSKO, S. P. *et al.* Embryo Transfer. *In: Manual of Equine Reproduction*; 3^{ed}; Missouri MOSBY Elsevier; 2011; Cap.17, p.276-287.
- CAIADO, J. R. C. *et al.* Tratamento de éguas da raça Mangalarga Marchador com progesterona (P4) ou altrenogest visando sua utilização como receptoras de embriões no segundo dia após ovulação. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33, p. 180, 2005, suplemento 1.
- CAIADO, J. R. C. *et al*; Tratamento de éguas receptoras de embrião visando sua utilização no segundo dia pós ovulação. **Revista Brasileira. Zootecnia**; Viçosa, v.36, n.2, p.360-368, 2007.
- CAMARGO, C. E. **Fatores reprodutivos que interferem em um programa comercial de transferência de embriões em éguas de hipismo.** 2008. 76p. Dissertação (mestrado)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- CARNEVALE, E. M. *et al.* Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. **Theriogenology**. Stonehan, v. 54, n. 6, p. 965-979; 2000.
- CARNEVALE, E. M; OLSEN, L. M; Seson (g): Diagnostic ultrasonography- Normal anatomy. *In: MCKNNON, O. A; et al; Equine reproduction*; 2^a ed; Oxford: Wiley-Blackwell, 2011. v.2; Cap 12; p2003-2008.

- COSTA, W. P. *et al.* Sincronização, indução ao estro e a ovulação em éguas Quarto de Milha atletas no nordeste brasileiro; **Revista Brasileira de Reprodução Animal**; Belo Horizonte, vol. 27, n.3, p.502-504, 2003.
- DAELS, P. F; HUGHES, J. P; The normal estrous cycle. *In*: McKINNON, A. O; VOSS, J. L; **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 121-132.
- DAEVIS MOREL, K. M. C. G. Selection of the mare and stallion for breeding. *In*:__. **Equine reproductive physiology, breeding and stud management**. Wallingford, CAB International, 2003. Cap.12, p.105-130.
- EILTS, B. E; Puberty; *In*: MCKINNON, A.O; SQUIRES, E. L; VAALA, W. E; VARNER, D. D. **Equine Reproduction**; 2ªed; Oxford: Wiley-Blackwell, 2011. v.2, cap 176, p.1689-1695.
- FLEURY, J. J. Transporte de embriões eqüinos e sua aplicação no Brasil. **Arquivo da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v.26, n.1, p.264, 1998.
- GINTHER, O. J. Mobility of the early equine conceptus. **Theriogenology**, Stoneham, v.19. n.4, p. 603-611, Apr. 1893.
- GINTHER, O. J. **Reproductive biology of mare**. 2ªed. Ann Arbor: McNaughton and Gunn, 1992.
- HARTMAN, D. L. Embryo transfer. *In*: McKINNON, A. O. *et al.* **Equine reproduction**. 2ª ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2011. v.2, cap. 303, p. 2871-2879.
- HAYES, K. E; GINTHER, O. J. Role of progesterone and estrogen in development of uterine tone in mares. **Theriogenology**, v.25, p.581-590, 1986.
- HUGHES, J. P. *et al.* **Clinical and endocrine aspects of the estrous cycle of the mare. In: Proceeding annual convencion of american practitioners**. 1972. San Francisco. P. 119-148.
- JACOB, J, C. F. *et al.* Effecty of embryo and recipiente asynchrony on pregnancy rates in a comercial equine embryo transfer program. **Theriogenology**, Stoneham, v.77, n. 6, p. 1159-1166, 2012.
- LE BLANC, M. M; Uterine Cytology; *In*: McKINNON, A. O. *et al.* **Equine reproduction**. 2ª ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2011. v.2, cap. 204, p. 1922-1927.
- LEY, W. B; Tranferência de embriões; **Reprodução em Éguas: para veterinários de equinos**; 1ªed; São Paulo; Roca; 2006; p. 184-190.
- LOPES, E. P. **Parâmetros reprodutivos de éguas Mangalarga Marchador em projeto comercial de transferência de embriões**. 2004.47p. Tese (pós graduação) – Universidade Federal de Viçosa, Faculdade de Medicina Veterinária, Viçosa-MG, 2004.
- LOVE, C. C; Endometrial Biopsy; *In*: McKINNON, A. O. *et al.* **Equine reproduction**. 2ª ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2011. V.2, Cap. 205, p. 1929-1939.

McCUE, P. M; SQUIRES, E. L. Management of recipients. In: **Equine Embryo Transfer**; 1ª ed; Jackson, Teton Newmedia; 2015; Cap 12. P 98-101.

McCUE, P. M; SQUIRES, E. L. Superovulation. In: **Equine Embryo Transfer**; 1ª ed; Jackson, Teton Newmedia; 2015; Cap 5. P 36-38.

McKINNON, A. O; ESQUIRES, E. L. **Embryo Transfer and Relatedie Technologies**. In: SAMPER, J. C; PYCOCK, J. F; McKINNON, A. O. (Ed). Current Therapy in equine reproduction. Philadelphia: W. B Saunders, 2007. cap 51, p. 319-334.

MEIRA, C.; FERREIRA, J. C.; SILVA, E. S. M.; IGNÁCIO, F. S. Developmental aspects of early pregnancy in mares. **Animal Reproduction**. v.9, n.3, p.166-172, 2012.

SILVA, L. A. Técnica ultrassonográfica de injeção intrauterina para transferência de embriões em equinos. 2003. 145f. Tese de Pós-graduação - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Zootecnia, 2003.

RICKETTS, S. W. Uterine and clitoral cultures; In: McKINNON, A. O. *et al.* **Equine reproduction**. 2ª ed. Oxford: Wiley-Blackwell, 2011. v.2; Cap. 208, p. 1963-1978.

SQUIRES, E. L. *et al.* Embryo Technologies in the horse; **Theriogenology**; Fort Collins; 59; p. 151-170; 2003.

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

TROEDSSON, M. H. T. Diseases of the uterus. In: Robinson, N.E. (Ed.), **Current Therapy in Equine Medicine**, 4. WB Saunders Co; p. 517–524, 1997.

VANDERWALL, D. K; WOODS, G. L. Embryo transfer and newer assisted reproductive thecniques for horses. In: Youngquist RS, Threlfall WR (Ed.). In: **Current therapynem large animal theriogenology**. Philadelphia; Saunders, 2007. p. 211-219.