



CONGRESSO
REPROLAB
DE REPRODUÇÃO EQUINA



2018



ANAIS



**ANAIS DO CONGRESSO REPROLAB DE REPRODUÇÃO
EQUINA**

1ª Edição

Editores:

Rodrigo Costa Mattos

Henrique Boll de Araujo Bastos

Gabriel de Oliveira Santos

Porto Alegre

UFRGS

2018

C749a Congresso Reprolab de Reprodução Equina (2018 : Porto Alegre).
Anais do Congresso Reprolab de Reprodução Equina / Editores:
Rodrigo Costa Mattos, Henrique Boll de Araujo Bastos, Gabriel de Oliveira
Santos. – Porto Alegre : Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2018.
83 p. : il.

ISBN 978-85-66094-38-1

1. Reprodução animal : equinos I. Mattos, Rodrigo Costa II. Bastos,
Henrique Boll de Araujo III. Santos, Gabriel de Oliveira IV. Título

CDD 591.16

Catálogo na fonte: Ana Vera Finardi Rodrigues – CRB-10/884

EDITORES

Rodrigo Costa Mattos

Faculdade de Veterinária – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Av. Bento Gonçalves, 9090. Porto Alegre – RS. 91540-000

rcmattos@ufrgs.br

Henrique Boll de Araujo Bastos

Faculdade de Veterinária – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Av. Bento Gonçalves, 9090. Porto Alegre – RS. 91540-000

henriquebastosvet@gmail.com

Gabriel de Oliveira Santos

Faculdade de Veterinária – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Av. Bento Gonçalves, 9090. Porto Alegre – RS. 91540-000

gabrieldoliveira@hotmail.com

COMISSÃO ORGANIZADORA DO CONGRESSO REPROLAB DE REPRODUÇÃO EQUINA

Prof. Rodrigo Costa Mattos

Cesar Augusto Camacho Rozo

Frederico Lança Schmitt

Gabriel de Oliveira Santos

Giovani Casanova Camozzato

Gustavo Rupp Larentis

Henrique Boll de Araujo Bastos

Luiz Augusto Machado Centeno

Natan da Cruz de Carvalho

Verônica La Cruz Bueno

COMISSÃO CIENTÍFICA DO CONGRESSO REPROLAB DE REPRODUÇÃO EQUINA

Adriana Pires Neves

Eduardo Malschistky

Mara Iolanda Batistella Rubin

Nelson Alexandre Ketzmann Filho

Ricardo Macedo Gregory

Rodrigo Costa Mattos

Sandra Mara da Encarnação Fiala Rechsteiner

Nicolás Cazales

Maria José Estradé

**O CONGRESSO REPROLAB DE REPRODUÇÃO EQUINA
AGREDECE PELO APOIO RECEBIDO:**

INSTITUIÇÃO GOVERNAMENTAL,

CAPES - Coordenadoria de Desenvolvimento de Pessoal de Nível Superior

EMPRESAS PATROCINADORAS DO CONGRESSO

ABCCC - Associação Brasileira de Criadores de Cavalo Crioulo

DOMED – Dominion Medical Ltda

Laboratório Hípica Ltda

MINITUB do Brasil Ltda

BIODUX Laboratório Ltda

WTA - Watanabe Tecnologia Aplicada Ltda

EMPRESAS APOIADORAS DO CONGRESSO

ABRAVEQ - Associação Brasileira dos Médicos Veterinários de Equídeos

BOTUPHARMA Biotecnologia Animal Ltda

MED-MENDEZ Assistência Técnica Bio-médica Ltda

SUPRA Alisul Alimentos S.A.

VENCO Laboratórios Vencofarma do Brasil Ltda

SUMÁRIO

Aspectos práticos na avaliação do corpo lúteo	10
Juan Cuervo-Arango	
Foliculogênese na égua.....	19
Gustavo Ferrer Carneiro	
Folículo anovulatório hemorrágico.....	28
Juan Cuervo-Arango	
Reprodução em zebras.....	31
Gustavo Ferrer Carneiro, Lawrence de Oliveira Barros, Melba O Gastal, Eduardo L Gastal	
Bioteχνologias Avançadas Aplicadas à Reprodução.....	40
Marcelo Bertolini	
Seleção da doadora na eficiência reprodutiva.....	45
Eduardo Malschitzky	
Avaliação de receptoras de embrião.....	53
Gustavo Ferrer Carneiro	
Aspiração folicular em éguas.....	65
Juan Cuervo-Arango	
Resumos (trabalhos científicos):	
Imunomarcagem de leptina e seu receptor no endométrio de éguas durante o ciclo estral.....	70
Millie de Oliveira Marchiori, Luis Augusto Cruz, Luis Otávio Centeno, Bruna dos Santos Suñe Moraes, Sandra FialaRechsteiner	
Dinâmica folicular nas raças pônei brasileiro e brasileiro de hipismo: existem diferenças?.....	72
Fabíola Freire Albrecht, Estela Rose Araújo, Viviane Flores Penteado, Guilherme	

de Oliveira Oliveira, Rodrigo Costa Mattos, Ricardo Macedo Gregory, Adriana Pires Neves

Doses terapêuticas de fenilbutazona afetam o processo ovulatório de éguas 74

Gustavo Rupp Larentis, Henrique Boll de Araujo Bastos, Giovani Casanova Camozzato, Gabriel de Oliveira Santos, Rodrigo Costa Mattos

Fatores relacionados a determinação do sexo dos potros da raça psc..... 75

Jonas Gomes Flores, Alinne Machado Petrarca Léo, Sandra Fiala Rechsteiner

Associação entre a qualidade do colostro e a transferência de imunidade passiva em neonatos equinos..... 76

Luísa Lemos Silveira, Adriana Kroef Tarouco, Adriana Pires Neves

Tumor maligno de células da granulosa em ovário cístico: relato de caso..... 77

Murilo Farias Rodrigues, Luciane Veronezi, Guilherme Valente de Souza, Adriana Pires Neves, Diego Mazetto

Produção endometrial de histotrofo durante o início do desenvolvimento embrionário em éguas..... 79

Giovani Casanova Camozzato, Maria Noel Martinez, Henrique Boll de Araujo Bastos, Sandra Fiala-Rechsteiner, Ricardo Macedo Gregory, Maria Inês Mascaranhas Jobim, Ana Meikle, Rodrigo Costa Mattos

Uso da sulpirida para antecipação da primeira ovulação do ano em éguas.... 81

Lucas A. N. Medina, Reno Roldi de Araújo, Eduardo Malschitzky

APRESENTAÇÃO

A presente publicação reúne as palestras e resumos de trabalhos científicos apresentados durante o Congresso REPROLAB de Reprodução Equina, organizado pelo Laboratório de Reprodução Animal (REPROLAB) – Faculdade de Veterinária – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com o objetivo de contribuir para a aprendizagem e aperfeiçoamento de estudantes, pesquisadores e profissionais da área de Medicina Veterinária.

Os editores

Porto Alegre, março de 2018.

ASPECTOS PRÁTICOS NA AVALIAÇÃO DO CORPO LÚTEO

Juan Cuervo-Arango

Department of Equine Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University,
The Netherlands.

1 INTRODUÇÃO

Em muitos casos a identificação correta do corpo lúteo (CL) na égua, a estimativa aproximada de sua idade (em relação ao dia da ovulação) e o grau de funcionalidade (CL ativo ou não funcional) é uma ferramenta muito útil para o clínico veterinário no momento do diagnóstico da fase de estro do ciclo da égua. Assim como para decidir se é necessário administrar PGF2a ou suplementar com progesterona quando a égua está prenhe. Para isso, focaremos na morfologia e ecogenicidade do CL, seu tamanho, o grau de vascularização (com o modo Doppler) e, claro, as características uterinas (grau de edema endometrial, tônus e forma do endométrio).

2 MORFOLOGIA E FUNCIONALIDADE DO CORPO LÚTEO NORMAL

O CL da égua pode adotar diferentes morfologias, depois da ovulação, mantendo uma funcionalidade totalmente normal (produção de progesterona), independentemente da sua morfologia (CL sólido vs. cavitário). Esta, em alguns casos, pode causar uma confusão sobre o tipo de estruturas que observamos: um CL (proveniente de uma ovulação normal) ou um folículo hemorrágico. Este fato se deve, pois, aproximadamente metade dos corpos lúteos das éguas sofrem uma hemorragia interna no interior da glândula luteal, entre 20 a 72 horas após a ovulação, formando uma cavidade central (corpo hemorrágico ou CH). Algumas dessas cavidades podem se tornar muito grandes, reduzindo o tecido luteal a uma simples borda delgada na periferia do CL, que pode ser muito semelhante à morfologia de um folículo hemorrágico em fase coagulada (fig. 1a e 1b), podendo ser confuso se a égua não é revisada com frequência. A principal diferença entre a cavidade central do CL e a do antro de um folículo hemorrágico (HAF), é que o sangue da cavidade do CL normal se coagula muito rápido (12 – 20 h) apresentando

trabéculas de fibrina, enquanto que no HAF o antro folicular mantém um estado de sangue líquido (sem coagular) durante pelo menos 48 h, devido a presença de substâncias similares à heparina no líquido folicular. Além disso, o tamanho do HAFs geralmente é maior do que o folículo pré-ovulatório original.

A cavidade central do CH é visualizada durante vários dias, inclusive durante todo o diestro (14 dias), embora cada vez menor (encolhendo com os dias). O outro tipo de CL, o corpo lúteo sólido, é mais fácil de identificar, já que não tem cavidade central (fig. 2).

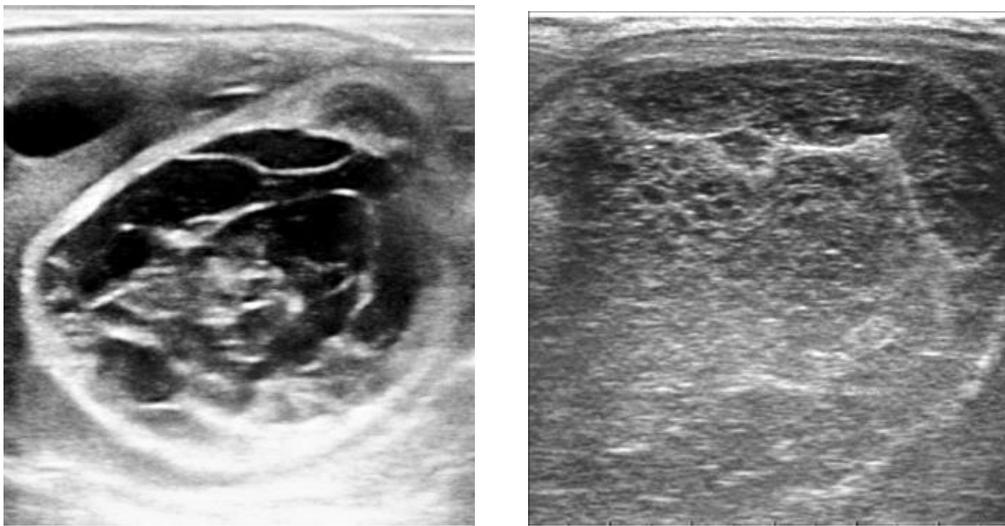


Fig. 1a (esquerda): CL normal de 72 h de idade com uma extensa cavidade central (hemorragia pós-ovulação) e Fig. 1b (direita): folículo hemorrágico patológico (nunca ovulado) 72 h após o início da hemorragia folicular (antro folicular pontilhado).



Fig. 2. Corpo lúteo sólido (sem cavidade central) 10 dias de idade.

Uma vez que o corpo lúteo é lisado, seja pela ação endógena da $\text{PGF}_{2\alpha}$ endometrial ou pela administração exógena de dinoprost, cloprostenol, luprostirol ou qualquer outra PGF sintética, diminui de tamanho e muda sua ecogenicidade (as bordas tornam-se menos ecogênicas e o centro mais ecogênico), no entanto, pode permanecer visíveis durante 3 - 5 dias após o tratamento com PGF. Esta estrutura é chamada de corpo albicans (CA), comumente denominado como CL velho. O tamanho desses CAs geralmente é igual ou inferior a 15 mm de diâmetro e não produz sinais Doppler (Fig. 3a) ao contrário de um CL ativo (Fig. 3b). Quando houver folículos estrogenicamente ativos (mesmo que pequenos) e um CA, haverá presença de edema endometrial, uma vez que a progesterona é basal ($< 1 \text{ ng / mL}$).

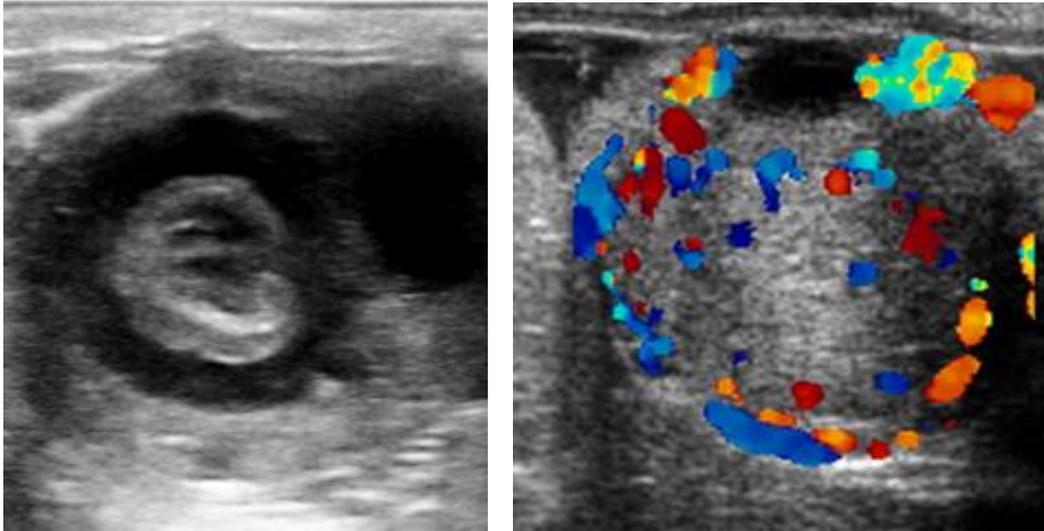


Fig. 3 (esquerda): corpo lúteo não funcional (CA) sem sinal Doppler, 3 dias após o tratamento com PGF e Fig. 3b (direita) CL normal funcional com sinais Doppler sobre toda a superfície do CL.

Tenha em mente que, em alguns casos, especialmente quando aplicamos PGF a uma égua no início do diestro (3-5 dias após a ovulação), o CL pode regredir e até não ser visível pela imagem ultrassonográfica, mas produzir suficiente progesterona para manter a égua em diestro. Esse fenômeno é chamado de luteólise parcial e caracteriza-se por uma queda na concentração de progesterona seguida de ressurgência à níveis de 2-3 ng / mL. O CL regride, e um folículo começa a crescer até tamanhos pré-ovulatórios e pode mesmo ovular. No entanto, o útero mantém tônus alto, morfologia tubular, sem edema endometrial e com a cérvix fechada. Se inseminarmos essas éguas, a fertilidade será muito baixa. Um segundo tratamento com PGF é suficiente para lisar completamente CL em casos de luteólises parciais e atingir edema endometrial satisfatório e que a égua entre no estro.

Em éguas em que a prenhez é mantida com progesterona ou altrenogest exógenos, o tamanho do CL e do sinal Doppler pode ser usado para avaliar o seu grau de funcionalidade e assim ser capaz de interromper o tratamento com progesterona. Esse procedimento é comum quando usamos éguas receptoras em transição. Uma vez diagnosticada a prenhez, as éguas são capazes de produzir ovulações e corpos lúteos primários e secundários. Um CL ativo que produz progesterona terá um diâmetro maior que 20 mm e um sinal Doppler ativo.

3 ESTIMATIVA DA IDADE CL

Há momentos em que é útil saber com certa precisão o dia da ovulação (idade CL). Primeiro, quando lidamos com um grande rebanho de receptores, muitas vezes não é possível revisá-las todos os dias, por razões óbvias de tempo e logística. Embora os embriões frescos permitam uma assincronia flexível (-1 a +4 dias), quando o número de embriões e receptores é semelhante ou quando usamos embriões produzidos *in vitro* (eles precisam de uma sincronia maior), é uma vantagem então conhecer o dia exato da ovulação. Em segundo lugar, quando trabalhamos com monta natural (Puro Sangue Inglês) tendo em vista que o sêmen dura na égua cerca de 3 - 4 dias, não é necessário verificar as éguas todos os dias, mas é útil conhecer o dia da ovulação para estabelecer o momento ideal do diagnóstico de prenhez, especialmente quando há dupla ovulação. Por último, quando avaliamos uma égua pela primeira e a encontramos em diestro com um CL, é importante estimar o momento da ovulação e assim a idade do CL, especialmente para evitar administrar a PGF com CL menores do que 5 dias, já que não responderão e pior, ocorrerá uma luteólise parcial. Ou se acreditamos tratar de uma ovulação recente, pois ainda temos tempo de inseminar a égua, já que o oócito se mantém viável durante 12 – 15 horas após a ovulação.

Existem três métodos para estimar a idade de um CL: 1) avaliação da morfologia e por palpação da área pós-ovulatória e CL inicial; 2) avaliação da ecogenicidade na área pós-ovulatória e CL inicial, e finalmente; 3) a avaliação da morfologia e tônus uterino. Com a combinação destes três métodos geralmente é possível estimar a idade do CL com um erro de 12 – 24 h entre o dia 0 e 3 após a ovulação (erro igual ao que temos quando revisamos as éguas a cada 24 h). Não é possível estimar a idade do CL em éguas que ovularam entre 5 e 12 dias, pois o CL tem um aspecto muito similar.

3.1 Avaliação da morfologia e palpação da área pós-ovulação e CL inicial:

Uma vez que o folículo colapsa (ovulação normal), a maior parte do líquido folicular é evacuado (>90%) em poucos minutos. A área pós-ovulatória permanecerá sem fluido (sangue) por pelo menos 12 h. A área pós-ovulatória permanece sem bordas ou limites diferenciados durante 20 h aproximadamente. Ou seja, é difícil

diferenciar aonde termina a área da ovulação e aonde começa o resto do estroma ovariano, em outras palavras não há um CL com bordas bem definidas, simplesmente denominamos de área pós-ovulatória. Na palpação, é possível sentir uma depressão na área da ovulação ligeiramente dolorosa ao toque. Neste momento você ainda pode inseminar a égua. Entre 20 e 24 horas começamos a observar as bordas do que será o futuro CL. Também a partir das 20 h podemos começar a observar pela primeira vez uma cavidade com sangue (no caso de se formar um CH). Entre as 24 e 36 horas é quando se forma o CL, o qual tem as bordas bem definidas. Em caso de observarmos uma cavidade coagulada, o CL geralmente terá menos de 48 h. Conforme o CL se torna mais velho, a palpação do mesmo fica mais evidente.

3.2 Avaliação da ecogenicidade da área pós-ovulatória e CL inicial:

A área pós-ovulatória permanece homogênea e hipoecoica (similar ao resto do estroma ovariano) durante 12 – 16 h. A partir das 16 – 20 h a ecogenicidade da área pós-ovulatória e CL inicial começa a se intensificar (mais ecogênica) até alcançar o pico máximo às 48 – 60 h. A partir deste momento a ecogenicidade começa a diminuir até alcançar a densidade típica de um CL maduro (Fig. 2) por volta do dia 3 – 4 após a ovulação.

3.3 Avaliação da morfologia e do tônus uterino:

Durante as primeiras 24-36 horas após a ovulação, o útero mantém uma ecogenicidade de estro, com um ligeiro edema endometrial e morfologia achatada e tônus flácido. Por sua vez, a cérvix continuará aberta. Entre 36 e 48 h, o edema desaparece completamente, embora a ecogenicidade heterogênea seja mantida e o útero comece a adquirir uma morfologia mais tubular, mas o tônus do útero permanece baixo. A partir de 72 h é quando a morfologia uterina é tubular e o tônus uterino aumenta, semelhante ao de uma égua no meio do diestro.

4 RESUMO DA ESTIMATIVA DO DIA DA OVULAÇÃO E IDADE DO CL

4.1 Dia 0 (idade de 0 a 24 h):

Área pós-ovulatória hipoecóica, sem bordas definidas (Fig. 4a). Ausência de um CL bem definido. Morfologia uterina de cio (Fig. 4b). Se a área pós-ovulatória é ecogênica e/ou tem uma cavidade de sangue líquido, mas ainda não existe um CL bem definido, encontra-se ao final do dia 0 (20 – 24 h pós ovulação).

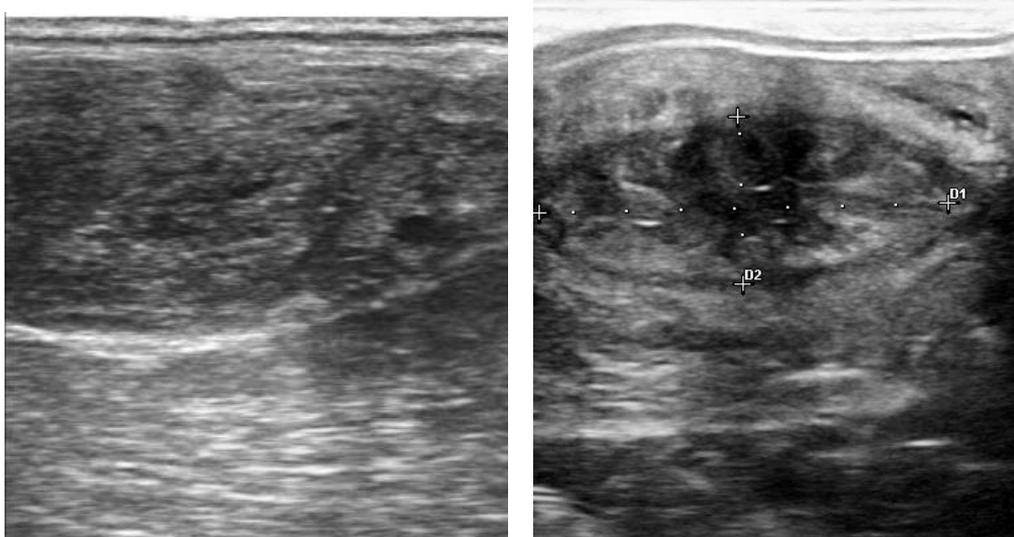


Fig. 4 (esquerda) área pós-ovulatória < 12 h de idade (Dia 0). 4b (direita): útero achatado com leve edema imagem, feita na mesma hora da ovulação.

4.2 Dia 1 (idade de 24 a 48 h):

Há um CL com bordas parcialmente bem delimitadas (Fig. 5a), uma ecogenicidade maior (claramente diferente do estroma ovariano), mas ainda não máxima. O útero, no entanto, está flácido e achatado, algum edema endometrial é visível e a cérvix permanece aberta. Se uma cavidade no CL for visualizada está será de sangue não coagulado (Fig 5b).

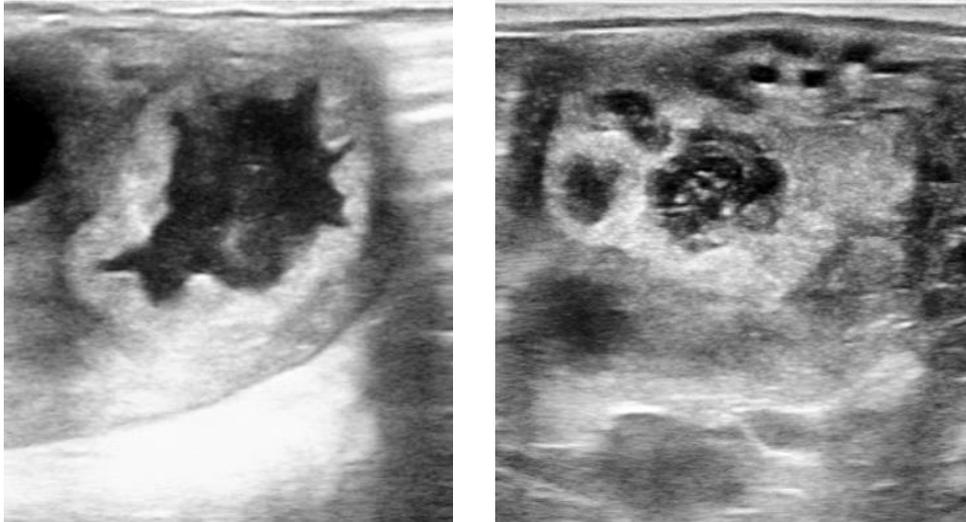


Fig. 5a (Esquerda): um CL de 28 h (Dia 1). Observe as bordas parcialmente delimitadas e o aumento da ecogenicidade (claramente mais ecogênico do que o estroma ovariano). 5b (direita): CL de 30 h de idade com uma cavidade central com sangue líquido (sem coagulação).

4.3 Dia 2 (48 a 72 horas):

Um CL muito ecogênico, com bordas muito bem delimitadas (Fig. 6a). Se houver uma cavidade, pode ser líquido ou coagulado. O útero possui um tônus intermediário, com morfologia tubular e ecogenicidade intermediária entre o estro e o diestro (Fig. 6b). A cérvix começa a fechar, com tônus baixo-intermediário.

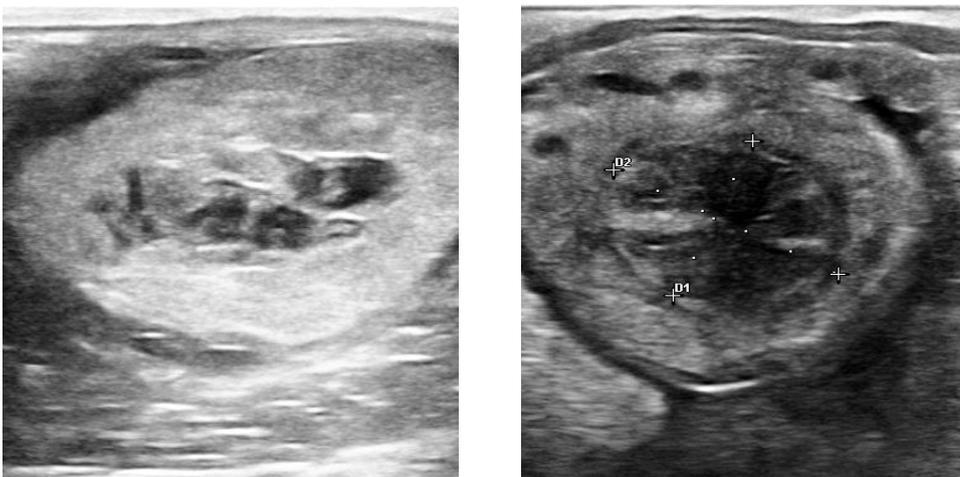


Fig. 6a (esquerda): CL de 60 h de idade (Dia 2). Observe as bordas, diferenciando claramente a superfície do CL do resto do estroma ovariano. Igualmente, a ecogenicidade é máxima (muito branca). 6b (direita): útero com morfologia tubular e ecogenicidade intermediária.

4.4 Dia 3 (72 a 96 horas):

CL muito bem delimitado, com menor ecogenicidade, ligeiramente superior ao estroma ovariano (Fig. 7a e 7b). Se houver uma cavidade no CL, ela estará completamente coagulada (Fig. 7b). A morfologia e o tônus do útero são de diestro (bom tônus, sem edema e morfologia tubular). A cervice estará fechada, com tônus médio-alto.

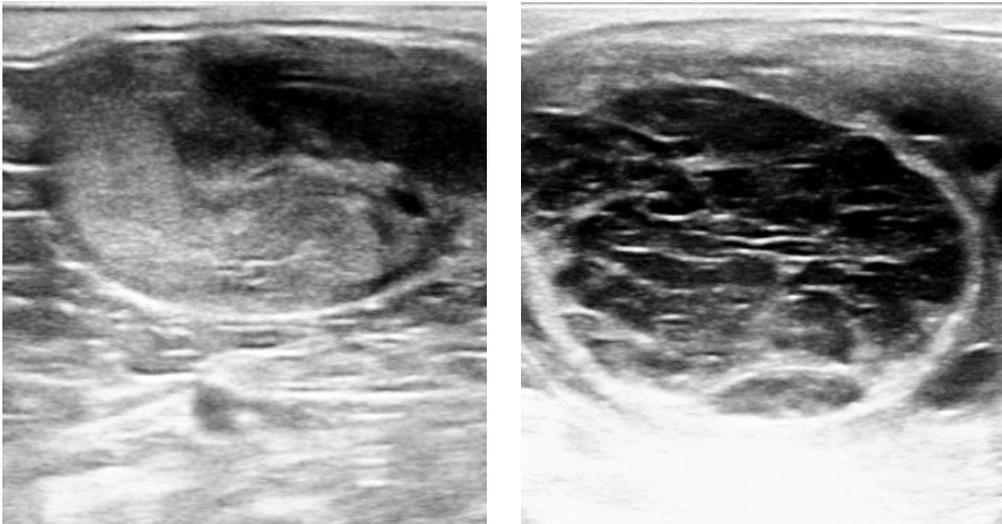


Fig. 7a (esquerda): CL sólido de 84 h de idade (Dia 3). Observe a diminuição da ecogenicidade do CL. 7b (direita): CL 90 h (Dia 3) com uma cavidade central coagulada, com bordas bem definidas e ecogenicidade ligeiramente superior a do estroma ovariano.

FOLICULOGÊNESE NA ÉGUA

Gustavo Ferrer Carneiro

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade acadêmica de
Garanhuns, Laboratório de Reprodução Animal – LABRAPE,
Garanhuns, PE, Brasil

1. CONTEXTUALIZAÇÃO DE OOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE

1.1 Formação de Oócitos

A formação dos oócitos passa por vários processos, dentre eles estão: formação das células germinativas primordiais (CGPs); migração das CGPs para as futuras gônadas; colonização das gônadas pelas CGPs; proliferação das CGPs; e diferenciação mitótica das CGPs em oogônia (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Segundo Curcio et al., (2006) em equinos a multiplicação das oogônias inicia-se no 50º dia de gestação e se conclui aproximadamente no 150º-160º dia de gestação.

De acordo com Araujo et al., (2014), as CGPs provêm do mesoderma extraembrionário, no entanto, seu desenvolvimento inicial depende de sinais oriundos do ectoderma extraembrionário e do endoderma visceral. Entretanto, os processos de migração e proliferação das CGPs ocorrem a partir do endoderma do saco vitelínico. Van den hurk; Zhao, (2005), relatam que os membros da família do fator de crescimento transformante β (TGF β), ossos morfogenéticos a proteína-4 (BMP-4), BMP-8b e BMP-2 foram identificados como reguladores da CGP geração do epiblasto, em que BMP-2 é proveniente do endoderma e BMP-4 e -8b são oriundos do ectoderma extra-embriônico.

A formação dos oócitos primários ocorre por ação meiótica, através da diferenciação das oogônias, e sabe-se que essas células permanecem na fase de diplóteno da Prófase I até que se inicie a puberdade (ADONA et al., 2013). Sánchez; Smitz, (2012) relatam que neste período são essenciais para o crescimento e maturação do oócitos, bem como para o desenvolvimento de um embrião viável após a fertilização, a síntese e acumulação de RNAs e proteínas. Os oócitos primários são rodeados pelas células da granulosa, e ainda segundo estes autores, é fundamental a comunicação entre estas células, tanto para o desenvolvimento dos oócitos como para a diferenciação de células da granulosa.

A retomada das divisões meióticas ocorrem no período da puberdade, durante a ovulação, através do estímulo do hormônio luteinizante (LH) ocorrendo a maturação nuclear do oócito, que progride até o estágio de metáfase da segunda divisão meiótica (oócito secundário) momentos antes da ovulação (CURCIO et al., 2006).

Na espécie equina durante o crescimento oocitário, a zona pelúcida (ZP), que possui função protetora em torno do oócito, sofre uma importante mudança estrutural e se torna rígida, sendo formada por três glicoproteínas essenciais nos processos de oogênese e folículogênese ZP1, ZP2 e ZP3 (SOYAL; AMLEH; DEAN, 2000).

1.2 Formação de Folículos

Ao processo de formação, crescimento e maturação dos folículos ovarianos dá-se o nome de folículogênese. Este processo inicia-se ainda na vida pré-natal, na maioria das espécies, com a formação do folículo primordial e culmina com o estágio de folículo pré-ovulatório (VAN DEN HURK E ZHAO, 2005).

O folículo é considerado a unidade morfofuncional do ovário, proporcionando um ambiente ideal para o crescimento e maturação do oócito, além de produzir hormônios e peptídeos (CELESTINO et al., 2009). O folículo é composto por um oócito circundado por células somáticas (granulosa e tecais) e, durante a folículogênese, sua morfologia é alterada uma vez que o oócito cresce e as células da granulosa circundantes se diferenciam (FIGUEIREDO et al., 2008).

A formação dos folículos inicia-se no processo de transição da mitose para meiose, onde as oogônias transformam-se em oócitos e folículos primordiais, com uma camada de 4 a 8 células somáticas, denominadas pré-granulosas e uma lâmina basal formando a primeira categoria de folículo (ADONA et al., 2013).

Até pouco antes da puberdade as células foliculares primordiais permanecem em repouso; em seguida os ovários sofrem influência do hormônio gonadotrófico (SOYAL; AMLEH; DEAN, 2000).

Segundo Costa et al., (2012) a formação de folículos é controlada por uma variedade de gonadotrofinas e de fatores de crescimento locais, que agem em conjunto para regular a formação e o desenvolvimento dos folículos ovarianos.

O processo de desenvolvimento folicular ovariano associado à maturação dos oócitos está sob controle dos princípios endócrinos convencionais tais como as gonadotrofinas pituitárias e os hormônios esteroides produzidos pelo ovário; entretanto alguns autores sugerem que as gonadotrofinas são apenas parte de um complexo sistema de agentes autócrinos e parácrinos, incluindo os fatores de crescimento (TONETTA & DIZEREGA, 1989).

O sistema formado pelos fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGF) e às proteínas de ligação de IGF (IGFBP) exercem importantes funções no controle do desenvolvimento folicular e atresia em animais domésticos (MONGET et al., 2002). O IGF aumenta a proliferação de células da granulosa, a esteroidogênese e o crescimento do oócito (SILVA et al., 2008; LUZ et al., 2015). O sistema IGF é composto por diferentes elementos, ou seja, IGF-1 e IGF-2, dois tipos de receptores (IGFR-1 e IGFR-2) e seis IGFBP (IGFBP-1, -2, -3, -4, -5 e -6). Ambos receptores de IGF estão presentes em células da granulosa de folículos primários, secundários e antrais (LEITÃO et al. 2009; MAGALHÃES et al., 2012).

Após a ovulação, o sistema IGF pode estar envolvido na manutenção e na regressão do corpo lúteo (HASTIE; HARESIGN, 2006).

De acordo com Gurgel et al., (2008) a dinâmica folicular, que é o processo de crescimento e regressão dos folículos nos ovários das éguas, é diretamente influenciada por fatores extrínsecos como nutrição, temperatura, estresse e fotoperíodo.

Os folículos ovarianos são classificados, geralmente, em pré-antrais e antrais (ADONA et al., 2013). A formação do folículo pré-antral divide-se em três etapas: ativação de folículos primordiais, transição do folículo primário para secundário e desenvolvimento de folículos secundários para o estágio pré-antral. Na transição do estágio primordial para o primário observa-se folículos com algumas células da granulosa achatadas e cuboidais, o estágio secundário inicia-se com o desenvolvimento de uma segunda camada de células da granulosa, prossegue com adição de até sete camadas e conclui-se com o desenvolvimento gradual de uma cavidade antral com um diâmetro folicular de cerca de 250 μm (FORTUNE, 2003).

A fase antral, se caracteriza pela formação do antro, bem como pela diferenciação das células da granulosa em cumulus e compartimentos de células murais que permite ao oócito a retomada do processo meiótico (SÁNCHEZ; SMITZ, 2012).

O processo de diferenciação das células da pré-granulosa e granulosa, durante o desenvolvimento folicular, ainda é desconhecido, entretanto sabe-se que moléculas como o kit ligante e seu receptor c-kit, fator de diferenciação de crescimento 9 (GDF-9) e a BMP-15 fazem parte deste mecanismo (FORTUNE, 2003; MONIRUZZAMAN; MIYANO, 2010; ROSALES-TORRES; SÁNCHEZ; AGUILAR, 2012).

1.3 Maturação Oocitária

Segundo Blanco et al., (2011), em mamíferos a maturação oocitária define-se como a sequência de eventos que ocorrem desde o estágio de vesícula germinativa até o término da segunda divisão meiótica, com formação do segundo corpúsculo polar. Uma série de transformações no núcleo e citoplasma do oócito em seu desenvolvimento até o estágio de metáfase da segunda fase da meiose caracteriza a sua maturação (SÁNCHEZ; SMITZ, 2012; VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

No processo de maturação nuclear na fase de transição entre prófase I e metáfase II ocorrem várias fosforilações e desfosforilações, envolvendo proteínas que participam do reinício e da regulação da meiose na maturação do oócito. Entre as proteínas que mais se destacam no período da maturação, estão as do fator promotor da maturação (MPF) e as proteínas cinase, ativadas por mitógenos (MAPK) (ADONA et al., 2013). Segundo Curcio et al., (2006), é fundamental a ativação da MAPK nas células do *cumulus* para induzir a retomada da meiose por ação de gonadotrofinas, porém a ativação da MAPK não é necessária nos casos de retomada espontânea da meiose.

A maturação citoplasmática está ligada à competência de desenvolvimento, referindo-se à capacidade do oócito ser fertilizado bem como produzir um embrião viável, capaz de se desenvolver e culminando com o nascimento de um indivíduo (ARAUJO et al., 2014).

Durante os sucessivos ciclos estrais em mamíferos, se torna necessário o pico de liberação de LH, para retomada da meiose nos oócitos. Entretanto, a maturação oocitária em equinos difere dos demais animais domésticos, tendo em vista que ocorre um aumento gradativo do LH durante os dias de estro e não um pico de liberação (CURCIO et al., 2006).

Apesar de haver outros atores envolvidos nos diferentes processos de desenvolvimento folicular *in vivo*, tais como condição corpórea, idade e sazonalidade, foi possível se comprovar a influência direta dos hormônios de crescimento IGF-I e IGFBP-3 através da identificação de receptores nas células do *cumulus* e da granulosa em oócitos equinos. Além disso, verificou-se um mecanismo intrínseco com detecção de níveis de transcrição de IGF-I por PCR tempo real e a diminuição das concentrações de IGF-I em diferentes tamanhos de folículos e aumento da IGFBP-3 nos folículos pré-ovulatórios quando comparados com as concentrações de IGF-I. Esse estudo sugeriu a presença de fatores de transcrição, estabilidade e tradução do RNAm comprovando o papel primordial desses fatores de crescimento na maturação dos oócitos equinos (CARNEIRO et al, 2002).

2. BIOTÉCNICAS DA REPRODUÇÃO NA EQUIDECULTURA

A implantação de biotécnicas da reprodução tem como principal objetivo melhorar os índices reprodutivos, favorecendo a produção de animais geneticamente superiores, maximizando assim a utilização reprodutiva de fêmeas e machos que apresentem características hereditárias desejáveis e permitir que animais portadores de alterações adquiridas não compatíveis com a reprodução natural, não interrompam a atividade (RODRIGUES, 2006).

Apesar da maturação e fertilização *in vitro* (FIV) serem biotécnicas utilizadas rotineiramente na espécie humana e em diversas outras espécies domésticas, os avanços são limitados na espécie equina. Baseado em diversos estudos, oócitos equinos imaturos são capazes de completar meiose, porém fertilização e desenvolvimento embrionário dos mesmos tem sido limitado (ZHANG et al., 1989; WILLIS et al., 1991; SHABPAREH et al., 1993; SQUIRES, 1996; GOUDET et al., 2000). Em um experimento de maturação *in vitro*, observamos um efeito positivo da adição de IGF-I no meio de maturação nos efeitos da maturação citoplasmática de oócitos equinos medidos através de partenogênese (CARNEIRO et al, 2001)

Realizando estudos sobre a dinâmica folicular em éguas Gurgel et al., (2008) relatou que para manipular o ciclo estral e conseqüentemente aplicar biotecnologias da reprodução, é fundamental esclarecer os mecanismos de desenvolvimento folicular, assim como seleção do folículo dominante.

Gastal; Gastal, (2011), realizaram estudos sobre a utilização de ultrassonografia em modo B e Doppler colorido durante o período pré-ovulatório com intuito de estudar mudanças morfológicas bem como de fluxo e perfusão sanguíneos do folículo pré-ovulatório em equinos. No entanto, Rodrigues, (2006), utilizou a técnica de aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom em éguas com objetivo de avaliar a taxa de recuperação de oócitos de folículos pré-ovulatórios.

Devido ao insucesso adquirido com a FIV na espécie equina, técnicas de reprodução assistida como transferência de oócitos (TO) transferência intrafalopiana de gametas (GIFT) e microinjeção intracitoplasmática de espermatozoide ICSI têm sido utilizadas como alternativas.

A vitrificação de oócitos, segundo Polenz, (2016) pode ser de grande importância na manutenção genética após a morte assim como na pesquisa científica preservando oócitos em diferentes estágios de maturação. Carnevale; Frank-Guest; Stokes, (2010) e Ribeiro et al., (2008) relatam que produtos advindos de fêmeas de elevado padrão genético, por meio da conservação dos ovários, tornaram-se possíveis, determinando a continuidade do material genético em técnicas de Maturação *in vitro* (MIV) e Transferência de Oócitos (TO).

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Portanto, compreender os processos morfofisiológicos da oogênese e folículogênese é de suma importância para o aprimoramento de biotecnologias da reprodução. A Produção *in vivo* de embriões equinos a partir da técnica de TE passou a ser rotina na Reprodução Equina. Com relação à produção *in vitro*, apesar do grande avanço adquirido nos últimos anos, vários aspectos ainda necessitam de esclarecimento. Algumas questões estão associadas à avaliação da competência biológica dos gametas e ao próprio sistema de cultivo. Estudos abordando os diversos mecanismos envolvidos estão sendo conduzidos em diversos laboratórios no mundo inteiro. As técnicas de reprodução assistida como ICSI, TO e GIFT servem como alternativas e passam a ser utilizadas com o objetivo de transpor parte desses obstáculos auxiliando em uma maior compreensão dos diversos aspectos envolvidos na MIV de oócitos equinos.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADONA, P. R. et al. Ovogênese e Foliculogênese em Mamíferos. UNOPAR Científica. **Ciências biológicas e da saúde**, v. 15, n. 3, p. 245–250, 2013.

ARAUJO, M. S. et al. Principais mecanismos envolvidos na maturação oocitária em bovinos: da oogênese à maturação in vitro. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, v. 10, n. 18, p. 2373, 2014.

BLANCO, M. R. et al. Developmental competence of in vivo and in vitro matured oocytes: A review. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v. 6, n. 7, p. 155–165, 2011.

CARNEIRO, G.F.; LORENZO, P.; PIMENTEL, C.; PEGORARO, L.; BERTOLINI, M.; BALL, B.; ANDERSON, G.; LIU, I. Influence of insulin-like growth factor-I and its interaction with gonadotropins, estradiol, and fetal calf serum on in vitro maturation and parthenogenic development in equine oocytes. **Biology of Reproduction**, 2001, Sep.65 (3): p.899-905

CARNEIRO, G.F.; MUNRO, C.J.; LEUTENEGGER, C.M.; LORENZO, P.L.; BALL, B.A.; LIU, I.K.M. Potential relevance of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) on in vivo maturation of equine oocytes during follicular growth. **Theriogenology**, v. 58, p. 685-688, 2002.

CARNEVALE, E. M.; FRANK-GUEST, B. L.; STOKES, J. E. Effect of equine oocyte donor age on success of oocyte transfer and intracytoplasmic sperm injection. **Animal Reproduction Science**, v. 121, n. 1–2, p. 258–259, 2010.

CELESTINO, J. J. H.; BRUNO, J. B.; LIMA-VERDE I. B.; MATOS, M. H. T.; SARAIVA, M. V. A.; CHAVES, R. N.; MARTINS, F. S.; LIMA, L. F.; NAME, K. P. O.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R.V.; BÃO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Recombinant Epidermal Growth Factor Maintains Follicular Ultrastructure and Promotes the Transition to Primary Follicles in Caprine Ovarian Tissue Cultured In vitro. **Reproductive Science**, v. 16, p. 239-246, 2009.

COSTA, J. J. N. et al. Proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e seu papel na regulação da oogênese e da foliculogênese ovariana em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n. 4, p. 225–238, 2012.

CURCIO, B. D. R. et al. Eqüinos: oogênese, foliculogênese e maturação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 30, n. 12, p. 28–35, 2006.

FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; SILVA, J.R.V. Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Editora Roca, 2008. p.303-327.

FORTUNE, J. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3–4, p. 135–163, out. 2003.

GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O. Equine preovulatory follicle: blood flow changes, prediction of ovulation and fertility Folículo pré-ovulatório equino: mudanças circulatórias, predição de ovulação e fertilidade. **Animal Reproduction**, v. 35, n. 2, p. 239–252, 2011.

GOUDET, G., et al. Influence of epidermal growth factor on in vitro maturation of equine oocytes. **J Reprod Fertil Suppl**, n.56, p.483-92. 2000

GURGEL, J. R. C. et al. Dinâmica folicular em éguas: aspectos intrafoliculares. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 2, p. 122–132, 2008.

Hastie PM, Haresign W. Expression of mRNAs encoding insulin-like growth factor (IGF) ligands, IGF receptors and IGF binding proteins during follicular growth and atresia in the ovine ovary throughout the oestrous cycle. **Animal Reproduction Science**, v. 92, p. 284–299, 2006.

LEITÃO, C.C.F.; BRITO, I.R.; FROTA, I.M.A.; SILVA J.R.V. Importância dos fatores de crescimento locais na regulação da foliculogênese ovariana em mamíferos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.37, n.2, p. 215-224. 2009.

Luz, V.B.; Chaves, R.N.; Alves, A.M.C.V.; Pinheiro, A.S.; Figueiredo, J.R.. Papel do Fator de Crescimento semelhante à Insulina-I (IGF-I) e Kit Ligand (KL) na função ovariana. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.43, p. 1300, 2015.

MAGALHÃES, D.M.; DUARTE, A.B.G.; ARAÚJO, V.R.; BRITO, I.R.; SOARES, T.G.; LIMA, I.M.T.; LOPES, C.A.P.; CAMPELLO, C.C.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. In vitro production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone, **Theriogenology**, 2011.

MONGET, P.; FABRE, S.; MULSANT, P.; LECERF, F.; ELSEN, J.M.; MAZERBOURG, S.; PISSELET, C.; MONNIAUX, D. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v.23, p.139-154, 2002.

MONIRUZZAMAN, M.; MIYANO, T. Growth of primordial oocytes in neonatal and adult mammals. **The Journal of reproduction and development**, v. 56, n. 6, p. 559–66, 2010.

POLENZ, M. F. **Expressão gênica de complexo cúmulus-ovócito equino antes e após a vitrificação**. Dissertação de mestrado - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, 2016.

RIBEIRO, B. I. et al. Transport of equine ovaries for assisted reproduction. **Animal Reproduction Science**, v. 108, n. 1–2, p. 171–179, 2008.

- RODRIGUES, R. **Aspiração folicular por via transvaginal guiada por ultra- som em eqüinos**. Dissertação de Mestrado - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL, 2006.
- ROSALES-TORRES, A. M.; SÁNCHEZ, A. G.; AGUILAR, C. G. Follicular development in domestic ruminants. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 15, n. 1, p. 147–160, 2012.
- SÁNCHEZ, F.; SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1822, p. 1896–1912, 2012.
- SHABPAREH, V., et al. Methods for collecting and maturing equine oocytes in vitro. **Theriogenology**, v.40, n.6, p.1161-1175. 1993.
- SILVA, J.R.V.; BRITO, I.R.; LEITÃO, C.C.F.; SILVA, A.W.B.; PASSOS, M.J.; VASCONCELOS, G.L.; SARAIVA, M.V.A.; ALMEIDA, A.P.; FIGUEIREDO J.R. 2008. Quantificação da proteína e do RNA mensageiro para o fator de crescimento semelhante à insulina- 1 (IGF-1) em folículos ovarianos caprinos. In: Resumos da XXII Reunião Anual da SBTE (Guarujá, SP, Brasil). p.466
- SOYAL, S. M.; AMLEH, A.; DEAN, J. FIG α , a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. **Development**, v. 127, p. 4645–6454, 2000.
- SQUIRES, E. L. Maturation and fertilization of equine oocytes. **Vet Clin North Am Equine Pract**, v.12, n.1, p.31-45. 1996
- TONETTA, S.A.; DIZEREGA, G.S. Intraovarian regulation of follicular maturation. **Endocrinology Review**, 125: p. 912, 1989.
- VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, p. 1717–1751, 2005.
- WILLIS, P., et al. Equine oocyte in vitro maturation: influences of sera, time, and hormones. **Mol Reprod Dev**, v.30, n.4, p.360-8. 1991.
- ZHANG, J. J., et al. Recent studies on in vivo fertilisation of in vitro matured horse oocytes. **Equine Veterinary Journal**, v.21, n.S8, p.101-104. 1989.

FOLÍCULO ANOVULATÓRIO HEMORRÁGICO NA ÉGUA

Juan Cuervo-Arango

Department of Equine Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University,
The Netherlands.

A síndrome do folículo hemorrágico anovulatório (HAF, do inglês para *hemorrhagic anovulatory follicles*) também denominado folículo anovulatório luteinizado (LUF, do o inglês para *luteinized unruptured follicle*) é a patologia anovulatória mais frequente na égua cíclica durante a temporada reprodutiva. De etiologia desconhecida, provavelmente de origem multifatorial. Caracteriza-se por apresentar um padrão de crescimento folicular normal assim como o padrão de edema endometrial que produzem é similar ao dos folículos ovulatórios. Mas ao contrário destes, os HAFs sofrem uma hemorragia em seu antro e luteinizam sem chegar a romper-se, portanto o oócito não pode ser liberado. Em vez de ovular, o HAF segue crescendo devido à constante hemorragia intrafolicular, chegando a atingir diâmetros de até 100 mm em 48 a 60 horas após o início da hemorragia (visualizado como pontos ecogênicos no interior do folículo). Finalmente o conteúdo do folículo hemorrágico coagula, assemelhando-se em alguns casos a um corpo lúteo cavitário (corpo hemorrágico), o que pode confundir o clínico se a égua não é revisada frequentemente.

Nos casos em que a égua só apresentou um folículo pré-ovulatório nesse ciclo, que formou um HAF, a fertilização não é possível, portanto, a égua não deve ser inseminada. Se já foi inseminada, pode-se informar ao proprietário que deverá ser repetida no próximo ciclo. A incidência está em torno de 5% de todos os ciclos estrais em uma população normal de éguas. No entanto, uma pequena porcentagem de éguas (chamadas coloquialmente “repetidoras”) podem desenvolver HAFs em 40 – 50% de todos os seus ciclos, o que representa um grave problema de infertilidade. Não existe um tratamento específico desta patologia, uma vez que ao se diagnosticar é tarde demais para fazer qualquer coisa, tendo em vista que o oócito já se encontra degenerado. A maioria das éguas entrará em cio aos 14 – 15 dias após a formação do HAF, devido à sensibilidade destes à liberação endógena de PGF2 α (como um CL normal), tendo uma ovulação no próximo cio. Não se recomenda induzir o estro com PGF2 α ou seus análogos sintéticos, uma vez que se viu que a

probabilidade de uma nova formação de HAF aumenta após o uso destes hormônios. Em éguas pré-dispostas a desenvolver HAF (repetidoras) de alto valor, um programa de aspiração de oócitos poderia ser realizado para a subsequente produção de embriões *in vitro*, uma vez que aqueles são férteis se forem aspirados antes do início da hemorragia. Também se recomenda a interrupção de qualquer tratamento com anti-inflamatórios não esteroides (AINEs), uma vez que estes podem interferir no processo ovulatório fisiológico e podem induzir a formação de HAF (em doses elevadas ou tratamentos prolongados com fenilbutazona ou flunixin - meglumine).

O clínico deveria treinar para diferenciar um folículo hemorrágico anovulatório que é patológico, de outros folículos anovulatórios (fisiológicos) que podem alcançar tamanhos pré-ovulatórios sem chegar a ovular, como nos casos dos folículos transicionais e alguns folículos de diestro. Ao contrário dos HAFs estes não se luteinizam e a quantidade de pontos ecogênicos no antro é muito menor. Estes folículos ocorrem geralmente na transição primaveril entre o inverno e a primeira ovulação do ano. Eles também podem ocorrer como resultado de ondas foliculares de diestro. Neste último caso, a égua apresenta um corpo lúteo e não terá edema endometrial.

Um tratamento (ainda em fase experimental) foi desenvolvido para este tipo de éguas repetidoras de HAFs que consiste na administração intrafolicular, com um auxílio de uma sonda transvaginal guiada por ultrassom, de PGE₂ (500 µg) e PGF_{2α} (125 µg) em um volume de 0,5 ml. A administração deve ser feita 30 – 32 h após a administração de hCG ou deslorelina, quando a égua tiver um folículo pré-ovulatório > 32 mm de diâmetro e edema endometrial. A ovulação ocorre nas 12 horas seguintes, evitando-se a formação do HAF e permitindo uma correta liberação do oócito.

O veterinário clínico também tem que conhecer e saber diferenciar um HAF de um corpo lúteo com uma hemorragia central (corpo hemorrágico) que é formado depois de uma ovulação normal, tendo em vista que em algumas ocasiões eles podem apresentar um aspecto muito semelhante. Em éguas que revisamos frequentemente (a cada 12 h) não há problema, uma vez que para diagnosticar uma ovulação normal deve haver evidência do colapso completo do folículo pré-ovulatório com evacuação total ou pelo menos de 90% do líquido folicular. Na imensa maioria

das éguas este processo é rápido e está completo em menos de 4 minutos, contado desde o começo da evacuação folicular, geralmente indicado pela deformação do folículo apontando ao seu próprio ápice e em alguns casos pela presença de partículas ecoicas em seu antro folicular.

Em éguas que verificamos com menos frequência (>24 h), em 30 – 40% das éguas formarão um corpo hemorrágico que é preenchido rapidamente com sangue e em alguns casos pode parecer um HAF. Um corpo hemorrágico, ao contrário do HAF, apresenta bordas irregulares e tamanho igual ou menor ao do folículo pré-ovulatório.

Outra apresentação semelhante de ovários com folículos hemorrágicos é a que ocorre em éguas gestantes entre 40 e 120 dias de gestação. Neste caso podemos observar luteinização e hemorragia em folículos de tamanhos muito menores do que o de HAFs em éguas cíclicas (entre 20 e 30 mm normalmente) e até ovulações (com colapso completo do folículo) devido ao constante efeito, da gonadotrofina coriônica equina (eCG) produzida pelos cálices endometriais, sobre os folículos antrais. O clínico deve estar ciente do possível efeito do eCG nos ovários, pois em éguas que abortaram entre 40 e 120 dias de gestação, é comum ver esse efeito sobre a ciclicidade, produzindo infertilidade transitória devido à irregularidade dos ciclos e à efeito negativo do eCG sobre a qualidade do oócito. Menos frequente, mas também possível, o eCG pode ser encontrada nas éguas pós-parto (após a gestação a termo) devido a retenção patológica dos cálices endometriais. Em éguas que abortaram antes de 120 dias, o melhor manejo é esperar o efeito do eCG passar (geralmente até os 120-150 dias). Por outro lado, éguas positivas para eCG podem ser utilizadas como receptoras de embriões, desde que tenham por pelo menos dois ou três dias edema endometrial claro. Em casos de retenção de cálices endometriais após gestações a termo, usualmente é necessário a excisão histeroscópica.

REPRODUÇÃO EM ZEBRAS

¹Gustavo Ferrer Carneiro, ²Lawrence de Oliveira Barros, ³Melba O Gastal,
³Eduardo L Gastal

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade acadêmica de
Garanhuns, Laboratório de Reprodução Animal – LABRAPE, Garanhuns, PE,
Brasil; ²University of Veterinary Medicine, Hannover - Germany;
³Southern Illinois University, Carbondale, IL, USA

1. INTRODUÇÃO

O comportamento reprodutivo e ciclo estral das espécies de zebras baseiam-se na observação de animais livres na natureza e mantidos em zoológicos, associado a dados coletados de peças anatômicas de animais sacrificados, porém o conhecimento sobre o ciclo estral, atividade ovariana, e a dinâmica folicular, ainda permaneciam desconhecidas. Além disso, pesquisas ligadas a jardins zoológicos têm determinado alguns detalhes sobre ciclo biológico das fêmeas assim como início da puberdade e da vida reprodutiva através de estudos de comportamento (NUÑEZ et al., 2011).

A presença, população e diâmetros foliculares, presença de corpo lúteo, assim como as dosagens hormonais documentadas foram frutos de observações a partir de peças coletadas de animais abatidos da espécie zebra da Montanha (*Equus zebra hartmannae*) evidenciando a presença de folículos de diâmetros variados, entre 20 – 40 mm no proestro e presença de corpo lúteo e corpos albicans em fêmeas gestantes (LILIAN et al., 1988). Em experimentos de punção folicular (OPU) para coleta de oócitos para produção in vitro de embriões (IVF) em animais abatidos e criados em cativeiro onde folículos a partir de 25 mm foram puncionados, produzindo oócitos de excelente qualidade em zebras da Planície (*Equus burchelli*) e de Zebra da Montanha (*Equus zebra hartmannae*) (MEINTJES et al., 1997).

A Transferência de Embriões (TE) entre as espécies de zebras tendo éguas como receptoras, já se mostrou eficiente na produção de indivíduos normais e sãos, e trata-se de uma alternativa para preservação de genes puros (BENNET et al., 1985; SUMMERS et al., 1987), pois há 04 subespécies de zebras, que diferem entre si cromossomicamente (CORDINGLEY et al., 2009a) tal variedade genética põe em risco espécies ameaçadas de extinção como a zebra da Montanha (*Equus*

zebra hartmannae) e a zebra de Grevy's (*Equus grevyi*) por conta da hibridização pelo acasalamento com a zebra da Planície (*Equus Burchelli*) que produzem indivíduos viáveis, mas estéreis, além de gerar uma diluição nos genes das espécies ameaçadas, reduzindo drasticamente a quantidade de diferentes genes na mesma espécie e levando a um risco de extinção (CORDINGLEY et al., 2009). No entanto, todos os programas que resultaram em nascimento de produtos vivos, foram realizados sem o devido conhecimento da atividade ovariana, controle folicular e de ovulação, sendo considerado apenas a data de início e término do cio, como data para coleta de embriões (ALLEN et al., 1997).

2. BANCO DE RECURSOS GENÔMICOS

A pouca disponibilidade de material biológico é um fator limitante para o estudo da fisiologia da reprodução nas espécies selvagens. Dados são escassos e as oportunidades de pesquisa tornam-se limitadas. Além disso, as normas de importação de sêmen ou embriões para espécie selvagens ainda não estão devidamente definidas (SCHIEWE et al, 1991).

O Banco de Recurso Genômico (BRG) se refere a todos os procedimentos de coleta, processamento, armazenamento de material genético e uso de gametas, embriões e outros materiais biológicos (HOLT, 2000). O BRG associado às técnicas de reprodução assistida pode ser uma alternativa viável para manutenção de espécies em extinção. Hoje é muito mais utilizada para raças raras de espécies domesticadas (bovino, caprino, ovino, porcino), até pela menor dificuldade da coleta do material biológico (HOLT & PICKARD, 1999).

Em nossas pesquisas, a dificuldade encontrada ocorreu primeiramente pelo baixo número dos animais envolvidos com a presença de um único reprodutor não condicionado a coletas de sêmen e a dificuldade de importação de material genético de machos da espécie zebra da Planície (*Equus burchelli*). Essa dificuldade se caracterizou não só pela dificuldade ou ausência de comercialização de sêmen, mas também do desconhecimento das autoridades sanitárias no que se referia a importação desse material genético. Uma alternativa foi condicionar primeiramente um potro de zebra da Planície (Fig. 1) que havia na propriedade para seu uso futuro como reprodutor. Para utilização como reprodutor não só nas fêmeas do zoológico particular, mas também para experimentos com éguas realizando os híbridos.



Fig. 1: Potro em domesticação da espécie Zebra da Planície (*Equus burchelli*).
Fonte: autor.

3. CRUZAMENTOS INTERESPECÍFICOS

Allen & Short (1997) documentaram a habilidade que equídeos tem de se reproduzirem livremente com indivíduos fenotipicamente semelhantes, entretanto com cariótipos distintos produzindo animais viáveis, mas inférteis ou híbridos.

Curiosamente nos cruzamentos interespecíficos, o número de cromossomos das espécies envolvidas aparentemente apresenta um papel primordial, visto que em todos os cruzamentos onde o reprodutor apresenta um número inferior de cromossomos diploides, as taxas de concepção são extremamente reduzidas. Ou seja, no caso de Cavalos domésticos (*E caballus* $2n = 64$) reproduzindo com uma fêmea de Zebra da Planície (*E. burchelli* $2n = 44$) os resultados documentados são muito baixos, enquanto que o inverso (Reprodutor *E. burchelli* x *E. caballus*) ocorre naturalmente (Fig. 2).



Fig.2: F1 híbrido interespecífico produzido a partir de um macho Zebra da Montanha (*Equus burchelli*, $2n = 44$) em égua doméstica (*Equus caballus*, $2n = 64$). Fonte: autor.

4. CRUZAMENTO EXTRAESPECÍFICO

O estudo da transferência de embriões extraespecífica com o intuito da obtenção de uma gestação xenogênia foi fruto de intensas pesquisas, questionando-se a interação entre o genótipo fetal e o ambiente uterino materno associado ao desenvolvimento e implantação placentária (ALLEN, 1982).

Summers et al. (1987) reportaram transferência de embriões de zebra da planície (*E. burchelli*) para égua doméstica (*E. caballus*) no zoológico de Londres. A fêmea foi induzida com PGF 2α e observada no piquete para monta natural e presumiu-se a data de ovulação. As coletas dos embriões foram realizadas com as fêmeas sedadas e a transferência através de técnica cirúrgica. Catorze embriões de zebra foram obtidos de 25 tentativas (56%) de duas doadoras. Desses 14 embriões, 5 foram transferidos cirurgicamente para receptoras de éguas resultando em 3 prenhez (60%). Uma perdeu a gestação entre os dias 59 e 66 e a outra o potro foi retirado sem vida por cesariana aos 350 dias de gestação. O terceiro potro nasceu robusto e com saúde aos 367 dias de gestação. Os outros 8 embriões foram transferidos para receptoras asinina gerando 2 prenhez (25%). Uma receptora perdeu a gestação entre os dias 53 e 64, e o outro nasceu prematuramente aos 292 dias de gestação sobrevivendo só por 3 horas. De um total de 13 embriões transferidos (5 para receptoras éguas e 8 para jumentas) apenas um produto desenvolveu viável. As receptoras (1 égua e 1 jumenta) que tiveram parto prematuro

apresentaram sinais de toxemia em torno de 5 dias e 3 semanas antes da perda gestacional.

A nível endocrinológico, concentrações mínimas de eCG (0,5 a 1,5 UI/ml) foram detectadas entre os dias 40-56 de gestação nas 3 éguas levando os embriões de zebra e apenas uma égua levou a gestação a termo. Em contraste as 2 receptoras jumentas tiveram picos elevados de eCG durante a gestação (7,0 a 22,0 UI/ml) e ambas perderam a gestação.

Como conclusão desses experimentos, há evidências de uma rejeição celular visto que foi detectada alta presença de linfócitos em contato com o alantocóron degenerado ou mesmo no epitélio endometrial. Até que ponto essas mudanças imunológicas são a causa da morte fetal ou do aborto ainda carece de maiores estudos visto que foi possível uma gestação ser levada a termo sem apresentar as mesmas características acima.

5. DINÂMICA FOLICULAR:

Barros et al. (2014) demonstraram alguns aspectos da dinâmica folicular em zebras de planície objetivando o controle ultrassonográfico da atividade ovariana, dinâmica e crescimento folicular, controle do edema uterino e ovulação, durante ciclo estral natural, assim como em ciclo estral induzido. O experimento foi realizado em um zoológico privado, localizado no município de Santa Luzia do Tide, MA, Brasil (latitude 03°57'48" sul e longitude 45°39'30" oeste). Para tal, 4 fêmeas de Zebras da Planície (*Equus burchelli*) com idade variando de 5 a 8 anos e pesando em média 370 kg, foram examinadas diariamente por palpação retal e ultrassonografia (Pie Medical modelo Scanner 480) com transdutor linear de 5 Mhz, e os animais contidos em tronco de palpação durante o período de 1 ano. (Fig. 3).



Fig. 3: Zebra da planície (*Equus burchelli*) devidamente contida em tronco de palpação. Fonte: autor.

O experimento foi dividido em duas etapas: 1ª etapa – animais foram examinados diariamente para determinação do intervalo entre as ovulações ou intervalo intraovulatório (IIO) sem indução de cio ou ovulação, onde a atividade ovariana era avaliada e a data de ovulação considerada o D0 para início do IIO até a ovulação subsequente. E a 2ª etapa – animais foram examinados diariamente, sendo que o início do controle folicular foi aleatório e quando era observado corpo lúteo, o agente luteolítico era aplicado, até o folículo atingir um diâmetro de > 30 mm e edema uterino máximo, para aplicação do agente indutor de ovulação.

No experimento 1, 5 intervalos intraovulatórios e 4 períodos pré-ovulatórios foram avaliados. No Experimento 2, 10 períodos pré-ovulatórios foram avaliados após a aplicação de 0.5 ml Dinoprost Tromethamine (Lutalyse®; PG) IM em dia aleatório após a presença de CL. Quando o maior folículo atingiu o tamanho ≥ 30 mm na presença de edema uterino, 1500 UI de hCG (Vetecor®) era administrada.

O ciclo estral natural foi caracterizado por:

- a) Longo IIO (37.0 ± 1.7 dias);
- b) Reduzido número de folículos antrais (≥ 3 mm) por dia durante o IIO (media de, 2.6 ± 0.4 to 3.4 ± 0.2 folículos);
- c) Ausência de ondas foliculares aparentes;
- d) Diâmetro folicular de 36.2 ± 0.3 mm um dia antes da ovulação
- e) 44% (4/9) de ovulações duplas.

No Segundo experimento com a indução do ciclo, observou-se:

- a) Intervalo desde a aplicação da prostaglandina até a ovulação foi em média de 5.2 ± 0.3 dias;
- b) Intervalo desde a aplicação do indutor de ovulação (hCG) até a ovulação foi em média de 2.0 ± 0.1 dias;
- c) Diâmetro do folículo em média de 31.6 ± 1.7 mm um dia antes da ovulação.

Observamos que o controle ultrassonográfico do ciclo estral das zebras é possível de ser realizado, desde que os animais estejam devidamente condicionados adaptados e aceitem a rotina de exames e palpação retal e ultrassonografia (Fig. 4).



Fig. 4: Zebra da planície devidamente adaptada e condicionada a lida no brete de palpação.

Nesse estudo podemos demonstrar que a dinâmica folicular das Zebras da Planície tem algumas diferenças quando comparadas com éguas e jumentas;

Todos os animais tratados responderam adequadamente a luteólise e a indução de ovulação, contribuindo assim para o conhecimento da fisiologia reprodutiva dessa espécie.

6. REFERÊNCIAS:

ALLEN, W.R. The influence of fetal genotype upon endometrial cup development and PMSG and progesterone production in equids. **Journal of Reproduction and Fertility Suppl** (1975)

ALLEN, W.R.; SHORT, R.V. Interspecific and Extraspecific pregnancies in equids: anything goes. **Journal of Heredity**, (1997) 88, p.384-392.

BARROS, L.O.; CARNEIRO, G.F.; GASTAL, M.O.; GASTAL, E.L. Follicular dynamics in Plains zebra (*Equus burchelli*): preliminary results. **Journal of Equine Veterinary Science** January (2014), Volume 34, Issue 1, Page 149.

BENNET, S.D.; FOSTER, W.R. Successful transfer of a zebra embryo to a domestic horse. **Equine Vet. Journal** (1985) 17, P. 78-79

CORDINGLEY, J.E., SUNDARESAN, S.R., FISCHHOFF, I.R.; SHAPIRO, B.; RUSKEY, J.; RUBENSTEIN, D.I. Is the endangered Grevy's zebra threatened by hybridization? **Anim. Conservation** (2009) 12, p.505-513

CORDINGLEY, J.E.; SUNDARESAN, S.R.; LARISON, B.J.; SHAPIRO, B.; RUBENSTEIN, D.I. Grevy's zebra conservation: overcoming threats of isolation, genetic hybridization and demographic instability. **Anim. Conserv.** (2009) 12 (6): P.520-521.

HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. **Theriogenology**, 53 (2000): p. 47-58.

HOLT, W.V.; PICKARD, A.R. Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. **Rev Reprod**, 4 (1999): p. 143-150.

WESTLIN-VAN AARD, L.M., VAN AARD, R.J.; SKINNER, J.D. Reproduction in female Hartmann's zebra, *Equus zebra hartmannae*. **J Reprod Fertil** 84(2):505-11 . December

MEINTJES, M.; BEZUIDENHOUT, C.; BARTELS, P.; VISSER, D.S.; MEINTJES, J.; LOSKUTOFF, N.M. In vitro maturation and fertilization of oocytes recovered from free-ranging Burchell's zebra (*Equus zebra hartmannae*). **J. Zoo Wildl. Med.** 28 (1997), 251-259.

NUÑEZ, C.M.V; ASA, C.S.; RUBENSTEIN, D.I. Zebra Reproduction. **In: Equine Reproduction**. 2nd Edition 2011, 2, 2851-2865

SCHIEWE, M.C.; HOLLIFIELD, V.M.; KASBOHM, L.A.; SCHMIDT, P.M. Embryo importation and cryobanking strategies for laboratory animals and wildlife species. **Theriogenology**, 43, (1995): p. 97-104.

SUMMERS, P.M.; SHEPHARD, A.M.; HODGES, J.K.; KYDD, J.; BOYLE, M.S.;

ALLEN, W.R. Successful transfer of the embryos of Przewalski's horses (*Equus przewalskii*) and Grant's zebra (*E. burchelli*) to domestic mares (*E. caballus*). **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 80, n. 1, p. 13-20, May, 1987.

BIOTECNOLOGIAS AVANÇADAS APLICADAS À REPRODUÇÃO

Marcelo Bertolini

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,
Porto Alegre - RS, Brasil

A curiosidade científica, a necessidade técnica do controle dos processos reprodutivos em animais, aliados à demanda econômica, impulsionou um ganho significativo de conhecimento na área da reprodução no último século, desencadeando o desenvolvimento gradual de quatro gerações de biotecnologias da reprodução em humanos e animais. O uso destas biotécnicas da reprodução tem sido de grande importância na produção animal. Em termos gerais, as três primeiras gerações de biotécnicas, que incluem (1) a inseminação artificial (IA) e a criopreservação de gametas e embriões, (2) a produção in vivo de embriões e transferência de embriões e (3) a produção in vitro (PIV) de embriões pela fecundação in vitro (FIV) amadureceram para se tornarem aplicações comerciais de sucesso em bovinos, por exemplo, facilitando o aumento da produção animal por meio da aplicação mais proeminente da seleção genética, reduzindo intervalos entre gerações, auxiliando no controle de doenças e na redução de custos de produção. A quarta geração de biotécnicas da reprodução engloba processos de menor eficiência e mais experimentais, das quais lideram a clonagem animal por transferência nuclear (TN) tanto com células embrionárias quanto somáticas, a engenharia genética e a biologia das células-tronco, que têm trazido avanços e perspectivas científicas de grande relevância. Tais tecnologias estão intimamente entrelaçadas entre si, e com a associação a ferramentas moleculares atualmente disponíveis, pode-se incrementar ainda mais os avanços zootécnicos, preservacionistas e técnico-científicos, de acordo com a espécie animal de interesse. Obviamente, o sucesso na aplicação das biotecnologias avançadas da reprodução dependem de vários componentes técnicos, que além das variáveis biológicas pertinentes a cada espécie, também incluem a habilidade clínica e a experiência laboratorial de cada equipe. Em adição, a aplicação de tais tecnologias como atividades lucrativas e de sucesso também permanecerá questionável se não estiver associada a outros componentes básicos da produção animal, tais como a sanidade animal, a nutrição,

práticas adequadas de manejo e produção animal, e o uso adequado da genética e seleção animal.

Quando comparado a outros animais domésticos, o uso de biotécnicas avançadas da reprodução em equinos é mais recente, tendo passado por um crescimento rápido nos últimos 20 anos. Tais tecnologias têm sido extensivamente utilizadas em bovinos, muito em função das particularidades permissivas da espécie, com enfoque na fertilidade e seleção animal, havendo também uma maior bagagem de conhecimento em aspectos da biologia dos gametas, da foliculogênese e do desenvolvimento embrionário, e de fatores econômicos que sustentam a cadeia produtiva. Em equinos, as biotécnicas avançadas possuem particularidades que as aproximam dos objetivos da aplicação em humanos, por envolver aspectos relacionados à infertilidade ou sub-fertilidade. Como os equinos são freqüentemente selecionados para reprodução com base em atributos de desempenho em oposição à fertilidade, o sucesso das biotécnicas pode ser impactado negativamente. Neste contexto, certas tecnologias se tornam eficazes em abordar exatamente questões de fertilidade, permitindo uma maior produção de genética desejada, não limitada às capacidades de reprodução natural de éguas e garanhões, permitindo também à reprodução de animais inférteis, sub-férteis, mortos ou mesmo geograficamente distantes. Um aspecto com caráter de extrema relevância se refere às diferenças fisiológicas e anatômicas dos equinos, que podem tornar os procedimentos técnicos mais complexos, e os resultados finais mais limitados, quando comparados a outras espécies, como a bovina.

Os objetivos associados ao uso de biotécnicas avançadas da reprodução em equinos estão em sua maioria associados a fins recreativos, havendo resistência de algumas associações de raças em aceitar a aplicação das biotecnologias como parte de seus programas. Por outro lado, a aceitabilidade por algumas das associações tem permitido o desenvolvimento científico, técnico e de aplicação de inovação na espécie. Interessantemente, e por tais razões, muitas tecnologias alcançaram uma adesão e uso mais rápido em equinos do que em outras espécies, com exceção de alguns procedimentos que ainda encontram barreiras por serem transpostas, como a superovulação, a PIV pela FIV e a crioconservação de embriões. Apesar da coleta de embriões por lavagem uterina seguida da transferência de embriões ser uma técnica bem sucedida e amplamente utilizada em equinos, com mais de 25 mil transferências registradas ao redor do mundo

anualmente, ainda não foram desenvolvidos procedimentos repetíveis de superestimulação ovariana que permitam uma ovulação de mais de três folículos, com a respectiva recuperação fidedigna de estruturas viáveis após a coleta. Já as biotécnicas avançadas da reprodução animal são aquelas contidas nas duas últimas gerações, que para embriões, envolvem a PIV pela FIV, a injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) e a clonagem por TN. Mesmo em espécies às quais estas biotécnicas avançadas da reprodução estão mais desenvolvidas, ainda há desafios biológicos e técnicos que limitam sua eficiência e aplicações para o desempenho máximo nas atividades produtivas, por vezes afetando a produtividade e a lucratividade. Enquanto não são melhor compreendidos e resolvidos, os desafios biológicos e reprodutivos impedem a aplicação plena da gama disponível de biotecnologias em certas espécies, como a equina, gerando oportunidades para inovações e alternativas técnicas, por vezes temporárias, para a multiplicação de indivíduos de exceção. Desta forma, o desenvolvimento de procedimentos mais refinados visam a adequação das atividades conforme as particularidades e/ou barreiras celulares, fisiológicas ou anatômicas que caracterizam cada espécie animal. Por exemplo, a PIV de embriões equinos pela FIV ainda não encontra sucesso, presumivelmente por questões associadas a procedimentos inadequados de capacitação in vitro do espermatozoide equino e/ou aspectos relacionados à zona pelúcida de oócitos maduros, como a zona hardening. Esta barreira na espécie equina estimulou na década de 1990 o desenvolvimento de processos que a sobrepassem, enquanto não se alcança o conhecimento e resultados devidos pela FIV, como a transferência intrafolicular de oócitos (IFOT), a transferência intra-tubárica de oócitos (OT), gametas (GIFT) ou zigotos (ZIFT), a injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI), ou mesmo a clonagem por TN. Para tanto, há a necessidade da obtenção de oócitos competentes que dêem suporte ao desenvolvimento embrionário e que cheguem a termo para a geração de uma cria saudável, o que nem sempre é possível, dependendo da espécie em questão. Neste enfoque, a estrutura folicular dos equinos difere dos ruminantes, com a presença de complexos cumulus-oócito (CCO) mais intimamente aderidos à parede folicular por meio das células do cumulus e da granulosa. Podem-se recuperar oócitos imaturos, de folículos antrais terciários de mais de 1 mm de diâmetro, ou maturados in vivo, de folículos pré-ovulatórios, 24 h após uso de indutor de ovulação, de folículo de pelo menos 35 mm em diâmetro e edema uterino. Cada

tipo de CCO tem suas vantagens, sendo mais eficiente a recuperação de oócitos maduros de folículos pré-ovulatórios pela OPU, os quais também são limitados em número e mais sensíveis à temperatura e outras influências ambientais, com o transporte e a manipulação podendo comprometer a viabilidade. Por outro lado, a recuperação de CCO imaturos de folículos antrais terciários pela OPU ou postmortem possui menor eficiência, porém as estruturas são menos frágeis e podem ser mantidos em estagnação meiótica à temperatura ambiente por até 24 h antes de estimular-se o início da maturação in vitro (MIV), pela uso de meio com hormônios e incubação em temperatura adequada. Dos oócitos imaturos, De fato, o conhecimento de aspectos relacionados à maturação e competência oocitária, em adição a exigências no desenvolvimento inicial de embriões equinos, propiciaram a evolução e uso de condições específicas que permitem hoje taxas de maturação, clivagem e desenvolvimento embrionário após cultivo in vitro que cada vez mais se aproximam dos resultados observados na espécie bovina. Em adição, o uso da micromanipulação para assistir no processo de criopreservação, por exemplo, pela aspiração blastocélica, além de propiciar a aplicação desta tecnologia em embriões outrora mais sensíveis ao processo ($> 300 \mu\text{m}$), também permite a associação a métodos de diagnóstico molecular (diagnóstico genético pré-implantação, PGD) para características genóticas de interesse, como por exemplo, a sexagem embrionária ou a identificação de características genéticas desejáveis ou mesmo deletérias.

Uma das técnicas de crescimento mais rápido neste século é a ICSI em combinação com a aspiração folicular transvaginal in vivo, ou ovum pick up (OPU), ou com a obtenção de oócitos postmortem, o que suplantou a transferência de oócitos (OT) e técnicas correlatas. A OPU é um procedimento que pode ser repetido a cada duas semanas sem interferir com a atividade normal da doadora, mesmo que o animal esteja envolvido em atividade esportiva. A coleta pode ser feita em qualquer período do ano, incluindo o período fora da estação reprodutiva. A OPU-ICSI também pode ser aplicada com sucesso quando o sêmen está disponível em quantidade limitada ou apresenta baixa fertilidade, também sendo indicada para fêmeas com problemas reprodutivos ou em idade avançada, com histórico de abortos recorrentes ou em competição, em qualquer época do ano, incluindo fora da estação reprodutiva, entre outras possibilidades.

A clonagem por transferência nuclear de células somáticas (TNCS) tem sido utilizada com sucesso por diferentes grupos na Argentina, Brasil, Canadá, Colômbia,

Coréia, Itália e Estados Unidos, utilizando procedimentos variáveis, com uma eficiência geral semelhante ou ligeiramente superior ao observado em bovinos ou caprinos, por exemplo. Atualmente, a clonagem em equinos encontra suporte principalmente na América do Sul, liderada pela Argentina e Brasil, e mais recentemente na Colômbia, onde os ovários de abatedouro são disponíveis, com os custos de manutenção de rebanhos de receptoras sendo mais baixos, em comparação com países da América do Norte ou da Europa, onde não há por vezes a disponibilidade de abatedouros (EUA), com os oócitos sendo predominantemente obtidos por OPU de folículos antrais terciários. Não obstante, aspectos relacionados a falhas de reprogramação epigenética, que por sua vez dependem da competência oocitária e do tipo de célula doadora de núcleo, e uma maior refratariedade à ativação embrionária após a clonagem ainda tornam o processo difícil de ser estabelecido com repetibilidade e eficiência, em equinos e em outras espécies.

A aplicação de biotécnicas avançadas da reprodução em equinos pode ser dispendiosa e onerosa, com taxas de sucesso limitadas, não havendo garantias de geração de descendentes vivos. Existem considerações éticas com estes procedimentos, havendo também certos questionamentos sob o ponto de vista genético e de bem estar animal. Porém, a aplicação de tecnologias como a OPU, a ICSI ou mesmo a clonagem por TNCS em equinos não tem sido associadas a anormalidades clínicas e de desenvolvimento de forma significativa, a exemplo dos relatos e incidências observadas em outras espécies animais. Finalmente, a maioria destas técnicas avançadas ainda requer suporte e supervisão veterinária para a obtenção de resultados bem sucedidos.

SELEÇÃO DA DOADORA NA EFICIÊNCIA REPRODUTIVA

Eduardo Malschitzky

Professor Adjunto, Curso de Veterinária ULBRA

O Brasil é um dos países do mundo que mais utilizam a transferência de embriões (TE). Além de permitir a obtenção de um número maior de descendentes de reprodutoras de alto valor zootécnico, a TE permite a obtenção de progênie sem interferir na campanha esportiva e possibilita a transferência de embriões de éguas em idade avançada e com alterações uterinas para receptoras mais jovens e reprodutivamente saudáveis. Doadoras de embriões são geralmente selecionadas por sua morfologia, pedigree e desempenho funcional, sem levar em consideração sua aptidão reprodutiva. A necessidade de apresentar desempenho funcional, ou ter uma progênie provada do ponto de vista funcional de mercado, implica em que frequentemente será necessário trabalhar com doadoras de idade avançada. Quando ainda jovens, por outro lado, muitas vezes é necessário conciliar o manejo reprodutivo das doadoras de embrião à escala de treinamento.

Considerando as características de seleção, a espécie equina está muito mais próxima da espécie humana, do que dos demais animais de produção no que se refere à utilização das biotécnicas reprodutivas. Como seleção das doadoras em si geralmente não é definida por veterinários, é no manejo reprodutivo desta doadora que podemos trabalhar com mais ênfase. É importante conhecermos as limitações e particularidades, a fim de evitar alto grau de frustração e prejuízo financeiro, tanto para proprietários quanto para os veterinários.

A importância do ambiente uterino para o desenvolvimento fetal foi demonstrada há muitos anos, através do cruzamento de animais de raça de tração com pôneis (FLOOD, 1993; FLOOD, 1996). Esse experimento demonstrou que diferenças no desenvolvimento fetal, devido ao tamanho uterino eram ainda observadas após os três anos de vida. Experimentos mais recentes, utilizando a transferência inter-racial de embriões, demonstraram que o efeito do ambiente uterino, além de duradouro, não se restringe a características morfológicas (ALLEN et al., 2004; ALLEN et al., 2002; TISCHNER, 1987). Uma série de alterações metabólicas, tais como: maior pressão arterial, níveis aumentados de insulina, bem como maior sensibilidade a este hormônio e aumento da reação ao estresse foram observados nos potros resultantes de embriões de pôneis gestados em éguas Puro

Sangue de Corrida (PSC) (ALLEN, 2002). Por outro lado, embriões PSC gestados em éguas pôneis apresentaram menor peso ao nascer e, ainda aos 36 meses, menor circunferência de canela e menor comprimento de canela, rádio e ulna⁴. O retardo de crescimento intrauterino está relacionado à maior incidência de síndrome metabólica, diabetes, Síndrome de Cushing, osteocondrose, asma e hemorragia induzida pelo exercício (ROSSDALE; OUSEY, 2003; SATTERFIELD; COVERDALE, 2010).

A “programação fetal” está bem estudada em humanos, animais de laboratório e uma série de animais domésticos, sendo atribuída a mecanismos epigenéticos que podem determinar, além do aparecimento de distúrbios metabólicos, características de comportamento, capacidade de aprendizado e habilidade materna, seja ela através da capacidade uterina, ou comportamental (BRUNTON, 2013; DESAI; HALES, 1997).

Considerando o longo período gestacional e o tipo e placenta da espécie equina, esses resultados tendem a ser atribuídos à insuficiência placentária (ALLEN; WILSHER, 2009) e seriam, portanto, relacionados à receptora do embrião e não à doadora. No entanto, estudos em animais de laboratório e humanos demonstram que efeitos epigenéticos sobre a progênie, podem ter origem mesmo em situações prévias à concepção, tanto da mãe quanto do pai (BRUNTON, 2013). Além disso, o embrião equino somente está acessível à coleta através de técnicas de rotina, a partir dos seis dias após a ovulação, permanecendo por um período relativamente longo no oviduto da doadora (BETTERIDGE, 2011).

Uma característica particular da espécie equina é o transporte seletivo do embrião, que deve estar com o desenvolvimento adequado, para secretar a Prostaglandina E₂ (PgE₂) e promover a abertura da junção útero-tubárica, permitindo, assim, sua chegada ao útero. Porém, durante o período em que permanece no oviduto, o embrião equino é mantido por secreções do órgão e secreta outras moléculas, como o early pregnancy fator (EPF) (STOUT, 2016), influenciando, portanto o ambiente em que se encontra. O ambiente tubárico é fundamental para o desenvolvimento embrionário, conforme foi demonstrado em estudos comparando embriões produzidos *in vitro* com embriões *in vivo*, ou transferidos para o oviduto de receptoras (CARNEVALE, 2008).

Embora a fertilidade apresente uma queda com o avanço da idade da égua, em especial a partir dos 15 anos, as taxas de fecundação na égua, independente da

idade, são altas, superando os 90% (BALL et al., 1986). Porém, quando embriões foram coletados do oviduto aos quatro dias, uma alta taxa de perdas gestacionais foi demonstrada em éguas mais velhas (>15 anos) e com histórico de problemas uterinos, comparado às de éguas jovens e nulíparas. A transferência dos embriões de éguas velhas, para receptoras jovens, não foi capaz de reduzir as perdas, uma vez mais demonstrando que as condições prévias a vida uterina têm grande influência no desenvolvimento da gestação (BALL, 1993).

A progesterona (P4) é o hormônio predominante no período em que o embrião se encontra na tuba uterina e assim segue ao longo da gestação, ainda que as fontes de progestágenos variem, com o avanço da prenhez (GINTHER, 1992). As curvas de progesterona de éguas gestantes e éguas em diestro são muito semelhantes até o 14º dia após a ovulação, momento em que a luteólise leva a uma queda da P4 nas éguas não gestantes (ALLEN, 2001). Somado as altas taxas de prenhez que podem ser obtidas em programas de TE, mesmo com éguas em anestro suplementadas, nesta fase, apenas por P4, essa característica sugere pouco efeito de outros hormônios no estabelecimento e manutenção da prenhez. Através da administração de Prostaglandina F2 α (PgF2 α) visando impedir a formação do corpo lúteo e, portanto, mantendo baixos os níveis de P4, foi observado um atraso no desenvolvimento, uma redução de tamanho e uma menor proporção de embriões de qualidade ótima, comparado aos animais do grupo controle (LEISINGER et al., 2018). Processos inflamatórios induzidos por Iodo Povidine levaram também a uma concentração menor de P4, bem como a uma menor expressão de receptores para P4 no endométrio (KALPOKAS et al., 2010). É possível supor, com base nesses resultados, que éguas com endometrite persistente pós-cobertura apresentem uma probabilidade menor de recuperação embrionária, ou uma queda na qualidade do embrião resgatado, não apenas pelos efeitos nocivos do ambiente uterino. A antecipação do dia da coleta, para reduzir ao máximo o contato do embrião com um ambiente uterino inadequado tem sido utilizada para melhorar os resultados (HARTMAN, 2011). O controle do processo inflamatório deve visar também a manutenção dos níveis hormonais, de forma a dar condições melhores ao embrião no período de vida intratubárico. A busca por um ambiente uterino saudável para receber o embrião antes da coleta não deve gerar uma produção excessiva de PgF2 α , a qual sabidamente é produzida em resposta à manipulação do colo uterino e em resposta à tratamentos intrauterinos,

especialmente aqueles realizados nos primeiros dias após a ovulação, quando a queda da progesterona parece ser maior devido à inflamação (LÖF, 2015).

Por outro lado, a secreção do oviduto é controlada pelos esteroides sexuais, tanto quantitativa, quanto qualitativamente (AGUILAR; REYLEY, 2005). O estrógeno, por exemplo, é responsável pela expressão de receptores para progesterona e pelo controle do volume da secreção do oviduto, sendo incluído nos protocolos de receptoras de embrião em anestro, ou ovariectomizadas.

Além disso, através de microscopia eletrônica, foram demonstradas diferenças marcadas no endométrio de éguas das quais se coletou embrião no 7º dia após a ovulação, em comparação ao das éguas das quais não se obteve embrião (MATTOS et al., 2015), sugerindo que essa preparação do endométrio não é regulada apenas pela progesterona, podendo haver a participação de hormônios e fatores de crescimento, que podem ter origem ovariana, embrionária e de leucócitos presentes no trato reprodutivo. Esse mesmo efeito, embora provável, não foi estudado no oviduto. Os esteroides sexuais, estrógeno e PgE2 de origem embrionária colaboram para o estabelecimento de um estado de tolerância imunológica em relação ao embrião e a placenta invasiva, que é considerado um aloenxerto, conforme demonstrado em estudos com suínos, animais de laboratório e humanos (BOIS et al., 2007; ROBERTSON et al., 2009; TYROWSDALE; BETZ, 2006).

Com o envelhecimento, alterações endócrinas, especialmente nos níveis de FSH resultam modificações do intervalo entre ovulações, inicialmente encurtando e como passar dos anos, alongando o ciclo. A partir dos 20 anos, foram observados, além de níveis elevados de gonadotrofinas, menos folículos em crescimento na fase transicional e, na fase cíclica, menor número de folículo a cada onda folicular, atraso na emergência do folículo dominante e retardo na taxa de crescimento folicular. Estudos da composição do líquido, quanto a fatores relacionados à resposta folicular ao LH e maturação de oócitos sugerem uma dissociação entre essa maturação e a ovulação em éguas com idade superior aos 20 anos. A transferência de oócitos de éguas com mais de 20 anos para o oviduto de receptoras jovens, que então foram inseminadas, resultou igualmente em taxas de prenhez inferiores, quando comparadas às taxas de oócitos coletados de éguas jovens (CARNEVALE, 2008). Protocolos hormonais visando não apenas a indução da ovulação por questões práticas, mas com o intuito de compensar desvios endócrinos podem ser uma

alternativa para buscar melhorar os índices de prenhez nas TE's realizadas com embriões de éguas mais velhas.

Devido ao alto valor zootécnico, doadoras de embrião geralmente são mantidas em condições ótimas de alojamento e com fartura de alimento. A frequência de obesidade e síndrome metabólica em equinos tem aumentado em escala semelhante ao que se observa na espécie humana (SESSIONS-BRESNAHAN et al., 2016). Ambas as condições estão associadas à alterações no ciclo estral e no desenvolvimento de folículos não ovulatórios. A composição do fluido folicular de éguas com síndrome metabólica pode apresentar alterações em vários hormônios e citocinas, que podem afetar a viabilidade do oócito, a ovulação e a programação fetal, que, como citado, inicia antes da vida intrauterina. A obesidade também afeta o ambiente folicular, o conteúdo lipídico do oócito, e a expressão gênica de células da granulosa e do *cúmulos* (SOUT, 2016).

Em condições de clima como a brasileira, o exercício leva a uma redução dos níveis de LH e a intervalos interovulatórios mais longos, que parecem aumentar progressivamente, a cada novo ciclo em que a égua é mantida em treinamento. Comparado ao grupo mantido sem exercício, a taxa de recuperação embrionária pode ser menor e a proporção de embriões de qualidade ótima significativamente reduzida, mesmo quando os animais são mantidos sem trabalho entre o dia da ovulação (D0) e a coleta do embrião (D7) (KELLEY et al., 2011). O exercício leva, ainda, a níveis mais altos de cortisol, o que poderia explicar a redução dos níveis de LH, potencialmente prejudicando a qualidade dos oócitos e também dificultando a sincronização entre doadora e receptoras. Além disso, através do Ultrassom Doppler, uma menor perfusão sanguínea foi observada na parede do folículo no dia anterior à ovulação, um aspecto correlacionado à taxa de recuperação embrionária (GASTAL; GASTAL, 2011).

Na medida do possível, ajustar horários de treinamento para horários de temperaturas mais amenas e época do ano de temperaturas menos extremas poderia auxiliar a melhorar os índices de coleta, quando um período de repouso não é possível.

Embora na maioria das vezes questões econômicas determinem a seleção de doadoras, o manejo reprodutivo, que é um fator determinante da eficiência reprodutiva, geralmente é controlado pelo veterinário. O resultado final esperado é um cavalo adulto com aptidão para a realização da função para a qual foi realizada a

seleção da doadora. Visando dar a melhor condição para a expressão das características selecionadas e uma menor incidência de doenças metabólicas e ligadas ao desenvolvimento devem ser considerados não apenas o ambiente uterino da receptora, mas o ambiente uterino da doadora, assim como o ambiente tubárico no qual o embrião inicia seu desenvolvimento e o do líquido folicular no qual está o oócito. É importante considerar a influência hormonal e a constante comunicação e interferência entre oócito/embrião sobre esses ambientes.

REFERÊNCIAS

- 1 -AGUILAR J. REYLEY M. The uterine tubal fluid: secretion, composition and biological effects. **Anim. Reprod.**, v.2, n.2, p.91-105, April/June, 2005
- 2 - ALLEN W.R. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. **Reproduction**, v.121, p.513-527, 2001.
- 3 - ALLEN W.R, WILSHER S. A review of implantation and early placentation in the mare. **Placenta**, v.30, p.1005-1015, 2009.
- 4 - ALLEN W.R, WILSHER S, TIPLADY C, BUTTERFIELD R.M. The influence of maternal size on pre- and postnatal growth in the horse: III Postnatal growth. **Reproduction**, v.127, p.67-77, 2004.
- 5 - ALLEN W.R, WILSHER S, TURNBULL C, STEWART F, OUSEY J, ROSSDALE P.D., FOWDEN A.L. Influence of maternal size on placental, fetal and postnatal growth in the horse. I. **Development in utero. Reproduction**, v.123, p.445-453, 2002.
- 6 - BALL B.A. Embryonic Death in mares. In McKinnon AO, Voss JL. **Equine Reproduction**. Philadelphia, EUA: Lea & Febiger, 1993. p. 532-536.
- 7 - BALL B.A., LITTLE T.V., HILLMAN R.B., WOODS G.L. Pregnancy rates at days 2 and 14 and estimated embryonic loss rates prior to day in normal and subfertile mares, **Theriogenology**, v.26, p.612-619, 1986.
- 8 - BETTERIDGE K.J. Embryo morphology, growth and development. In: Mckinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD. **Equine reproduction**. 2.ed. Oxford, UK: Blackwell, 2011. p.2167-2186.
- 9 - BOIS S.M., KAMMERER U., SOTO C.A., TOETTEN M.C., SHAIKLY V., BARRIENTOS G., JURD R., RUKAVINA D., THOMSON A.W., KLAPP B.F., FERNÁNDEZ N., ARCK P.C. Dendritic Cells: Key to Fetal Tolerance. **Biology of Reproduction**, v.77, p.590-598, 2007
- 10 - BRUNTON P.J. Effects of maternal exposure to social stress during pregnancy: consequences for mother and offspring. **Reproduction**, v.146, p.175-189, 2013.

- 11 - CARNEVALE E.M. The mare model for follicular maturation and reproductive aging in the woman. **Theriogenology**, v.69, p.23–30, 2008.
- 12 - DESAI M., HALES C.N. Role of fetal and infant growth in programming metabolism in later life. **Biol Rev Camb Philos Soc**, v.72, p.329-348, 1997.
- 13 - FLOOD P.F. Fertilization, early development, and the establishment of the placenta. In: McKinnon AO, Voss JL. **Equine Reproduction**. Philadelphia, EUA: Lea & Febiger, 1993. P.473-485.
- 14 - FLOOD P.F. Ever since daisy: today's endometrium and tomorrow's placenta. **Equine Vet J**, v.28, p.170-172, 1996
- 15 - GASTAL E., GASTAL M.O. Equine preovulatory follicle: blood flow changes, prediction of ovulation and fertility. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v.35, n.2, p.239-252, abr./jun. 2011.
- 16 - GINTHER O.J. **Reproductive biology of the mare**, basic and applied aspects. 2.ed. Cross Plains, WI: Equiservices, 1992, 642p.
- 17 - HARTMAN D. Embryo transfer. In: McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD. **Equine reproduction**. 2.ed. Oxford, UK: Blackwell, 2011. p.2871-2879.
- 18 - KALPOKAS I., PERDIGÓN F., RIVERO R., TALMON M., SARTORE I., VIÑOLES C. Effect of a povidone-iodine intrauterine infusion on progesterone levels and endometrial steroid receptor expression in mares. **Acta Vet Scand**, v.52, p.66, 2010.
- 19 - KELLEY, D.E., GIBBONS, J.R., SMITH R., VERNON K.L., PRATT-PHILLIP S.E., MORTENSEN C.J. Exercise affects both ovarian follicular dynamics and hormone concentrations in mares. **Theriogenology** v.76, p.615– 622, 2011.
- 20 - LEISINGER C.A., MEDINA V., MARKLE M.L., PACCAMONTI D.L., PINTO C.R.F. Morphological evaluation of Day 8 embryos developed during induced aluteal cycles in the mare. **Theriogenology**, v. 105, p.178-183, 2018
- 21 - LÖF, H. K. **A INFLAMAÇÃO UTERINA INTERFERE NA LUTEOGÊNESE DA ÉGUA?** 2015. 61f. Tese (Doutorado em Medicina Animal). Faculdade de Veterinária UFRGS, Porto Alegre, 2015.
- 22 - MATTOS R.C., FIALA-RECHSTEINER S.M., MARTINEZ M.N., CAMOZZATO G.C., SOUZA A.M., WINTER G.H.Z. O endométrio no transporte espermático e durante a gestação precoce. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.39, n.1, p.111-116, jan./mar., 2015
- 23 - ROBERTSON S.A., GUERIN L.R., MOLDENHAUER L.M., HAYBALL J.D. Activating T regulatory cells for tolerance in early pregnancy – the contribution of seminal fluid. **Journal of Reproduction Immunology**. v.83, p.109-116, 2009.

- 24 - ROSSDALE P.D., OUSEY J.C. Fetal programming for athletic performance in the horse: potential effects of IUGR. **Equine Vet Educ**, v.15, p.24-37, 2003
- 25 - SATTERFIELD M.C., COVERDALE J.A., WU G. Review of fetal programming: implications to horse health. **Proc Am Assoc Equine Pract**, v.56, p.207-214, 2010.
- 26 - SESSIONS-BRESNAHAN D.R., SCHAUER K.L., HEUBERGER A.L., CARNEVALE E M. Effect of Obesity on the Preovulatory Follicle and Lipid Fingerprint of Equine Oocytes. **Biology Of Reproduction** v.94, n.1, p.1–12, 2016.
- 27 - STOUT T.A.E. Embryo–maternal communication during the first 4 weeks of equine pregnancy. **Theriogenology**, v. 86, p.349–354, 2016.
- 28 - TISCHNER M. Development of Polish pony foals born after transfer to large mares. **J Reprod Fertil Suppl**, n.35, p.705-709, 1987.
- 29 - TROEDSSON M.H.T. Diseases of the uterus. In: Robinson NE. **Current therapy in equine medicine**. 4. Philadelphia, PA: Saunders, 1997. p.517-524.
- 30 - TYROWSDALE J., BETZ A.G. Mother's little helpers: mechanisms of maternal-fetal tolerance. **Nature Immunology**, v.7., p.241-246, 2006.

AValiação de Receptoras de Embrião Equino

Gustavo Ferrer Carneiro

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade acadêmica de Garanhuns,
Laboratório de Reprodução Animal – LABRAPE, Garanhuns, PE, Brasil

1. INTRODUÇÃO

A transferência de embriões (TE) consiste na coleta de um embrião de uma fêmea doadora, geneticamente superior, e a transferência deste para uma fêmea receptora, encarregada de levar a gestação a termo (MCKINNON; SQUIRES, 2007). A técnica de TE não-cirúrgica em éguas foi relatada pela primeira vez por Oguri e Tsutsumi (1972). A partir da década de 1980, essa técnica passou a ser utilizada comercialmente em diversos países, sendo uma das principais biotécnicas da reprodução assistida de equinos (FERREIRA, 2011).

No Brasil, a transferência de embriões de equino enfrentou crescente interesse desde os primeiros estudos nacionais publicados (FLEURY et al., 1987; HENRY et al., 1987).

A TE tem sido usada para aumentar a produção de potros por égua/ano, obter potros de éguas que estejam competindo (salto, adestramento, polo, shows, etc.) e obter potros de potrancas e de éguas subférteis (SQUIRES, 2007), e para facilitar a produção de filhotes de equídeos exóticos, como a zebra (SUMMERS et al., 1987).

Na equideocultura, o aumento da eficiência reprodutiva é necessário para um maior e melhor aproveitamento, além da intensificação do ritmo de melhoramento genético dos animais (FARIA D.R.; GRADELA A., 2013). A TE é uma importante ferramenta que visa acelerar o melhoramento genético, conferindo maior precisão e rapidez no processo de seleção animal (COSTA, 2010).

Sabe-se que as taxas de sucesso após um procedimento de transferência de embriões são afetadas por muitos fatores, como aqueles relacionados a doadoras e receptoras, sêmen usado, qualidade do embrião, manipulação e armazenamento, e condições climáticas (SQUIRES et al., 1999; CARNEVALE et al., 2000).

A seleção e o manejo da égua receptora são, provavelmente, os fatores mais importantes para o sucesso de um programa de TE (VANDERWALL & WOODS, 2007; SQUIRES, 2007). Estes fatores determinarão, em grande parte, o êxito da

técnica. Logo, a seleção da receptora deve ser criteriosa, responsável e, sobretudo, deve visar à eficiência do programa de TE com o menor custo (ALONSO, 2008).

Alguns critérios básicos para seleção das receptoras incluem: temperamento, idade, habilidade materna, ciclo estral normal e ausência de problemas reprodutivos (CARNEVALE et al., 2000; SQUIRES, 2003).

2. TEMPERAMENTO

O primeiro critério de seleção é a possibilidade de manejo do animal. Equinos são gregários e sempre criam hierarquia entre componentes de um mesmo grupo, por isso a introdução de um animal em um grupo fechado provoca uma reorganização que pode ser mais ou menos estressante. Sempre que possível deve-se evitar a introdução de novas receptoras no plantel durante a estação de monta (LOPES, 2015).

Uma receptora agitada, não manejável representa um risco para os profissionais e para o embrião que receberá. Além disso, há o risco de liberação de prostaglandina durante o procedimento podendo comprometer as taxas de prenhez (MCKINNON & SQUIRES, 2007). Animais cabresteados e possíveis de serem manejados devem ser escolhidos, permitindo a realização de controles ultrassonográficos e não dificultando o manejo dos profissionais com o potro (LOSINNO & ALVARENGA, 2006).

3. IDADE DA RECEPTORA

Por se tratar de um importante fator predisponente para a degeneração endometrial, que pode comprometer a habilidade de manter a gestação (RICKETTS & ALONSO, 1991; MORRIS & ALLEN, 2002), à idade considerada ideal, para éguas a serem utilizadas como receptoras compreende o intervalo entre 3 a 10 anos (SQUIRES & SEIDEL, 1995; SQUIRES et al, 1999).

Receptoras com mais de 10 anos aparentemente tem maior risco de sofrer perda embrionária (CARNEVALE et al., 2000). Ricketts e Alonso (1991) observaram que há um aumento na incidência de alteração endometrial em éguas mais velhas, incluindo aquelas que nunca foram cobertas.

Carnevale e Ginther (1992) descrevem que a fertilidade das éguas tende a diminuir conforme a idade aumenta, acentuando-se a partir dos 15 anos de idade. Alterações degenerativas do endométrio como endometrites, endometroses e alterações vasculares podem atrapalhar a atividade de hormônios circulantes, modificar o aporte celular da luz uterina e comprometer a drenagem linfática (SCHOON et al., 1997).

Ball et al., (1989) relatam que devido ao ambiente útero-tubárico de éguas senis a sobrevivência de embriões nessas éguas é significativamente menor que os embriões de éguas jovens. Em éguas senis, o útero é projetado para a cavidade abdominal e aloja-se em um nível mais baixo e com uma angulação maior quando comparado a éguas jovens. Esse posicionamento inadequado do útero dificulta uma drenagem eficiente do líquido uterino (LEBLANC et al., 1998), possibilitando que essas éguas em sua maioria também apresentem deficiência na coaptação da vulva (TROEDSSON, 1997).

Losinno e Alvarenga (2006) ressaltam que, quanto mais jovem o animal adquirido, mais tempo ele permanecerá no plantel, e seu custo será diluído pelos anos, o que é reforçado por Mckinnon e Squires (2007), que afirmam que, éguas virgens ou jovens que tenham parido um ou dois potros são preferidas como receptoras.

4. ASPECTOS REPRODUTIVOS

A aquisição de éguas, destinadas à gestação de embriões, deve ser precedida por um exame reprodutivo completo, incluindo palpação retal e ultrassonografia, exame citológico, exame de biópsia endometrial, integridade dos genitais externos e exame de competência cervical. Contudo, comumente o exame não é feito de uma forma completa, havendo elevada proporção de éguas, introduzidas em propriedades, inaptas reprodutivamente (LOSINNO; ALVARENGA, 2006).

Diversos tipos de receptoras podem ser utilizados: éguas cíclicas, éguas ovariectomizadas, éguas na fase transicional ou éguas em anestro. Geralmente, há preferência por éguas cíclicas, porém, no início da temporada, estas são escassas, utilizando-se como alternativa éguas em anestro ou na fase transicional. Ao escolher

uma égua receptora cíclica, está deve apresentar ciclos estrais regulares (SQUIRES et al., 1999).

As receptoras devem apresentar uma cérvix íntegra e não muito torta (STOUT, 2006), com tamanho e tônus adequados (RIERA, 2009). Também devem ser livres de anormalidades ovarianas e uterinas, como fluido uterino, cistos uterinos, presença de ar ou debris no útero, tumores ovarianos ou outra característica ovariana anormal.

A biópsia endometrial associada ao exame histopatológico disponibiliza informações importantes sobre as condições do endométrio, permitindo uma correlação entre os achados histopatológicos e a futura perspectiva do desempenho reprodutivo da égua (QUEIROZ, 1991).

Éguas receptoras deveriam apresentar biópsias uterinas classificadas como categorias I ou IIA, conforme classificação histopatológica de Kenney (1978).

Losinno et al. (2005), encontraram, em estudo avaliando classificação endometrial de éguas receptoras, 27% de categoria IIB e 5% de categoria III em éguas de 2-10 anos, sugerindo que na população estudada 32% das éguas com menos de 10 anos estavam comprometidas para levar uma gestação a termo, mesmo tendo sido classificadas como clinicamente aptas como receptoras.

A escolha da égua através da avaliação ginecológica realizada no momento da inovulação é de extrema importância, tendo influência direta sobre a taxa de prenhez (FLEURY et al., 2006).

Squires (2006) recomenda que as éguas candidatas a receptoras sejam submetidas a um exame reprodutivo no D5 pós ovulação. Na palpação retal, as éguas devem apresentar cérvix firme e fechada, e um útero arredondado e tubular. Na ultrassonografia, não deve ser detectada presença de dobras endometriais ou fluido uterino. O corpo lúteo deve ser identificado e mensurado. As receptoras com um corpo lúteo visível e grande, um útero firme, cérvix fechada são consideradas aprovadas e estão disponíveis como receptoras pelos próximos dias.

Carnevale et al., (2000) sugerem que um tônus uterino reduzido pode indicar um ambiente uterino não completamente compatível com o desenvolvimento e crescimento embrionário. Esses autores associam o tônus reduzido a pior qualidade da receptora, com menores taxas de prenhez e maiores taxas de perda embrionária. Ainda observaram que as taxas de prenhez das receptoras avaliadas no D5 foram superiores para as éguas que apresentaram tônus excelente ou bom (70,6%), com

diferença estatística em relação aquelas que tiveram tónus classificado como ruim ou pobre (63,6%).

5. ULTRASSONOGRAFIA DOPPLER NA REPRODUÇÃO EQUINA

A avaliação ovariana e uterina de éguas com a US modo Doppler auxilia na seleção de animais que irão participar de programas de TE, em que pode ser correlacionada a vascularização luteal com os níveis séricos de progesterona (P4) (FERREIRA; MEIRA, 2011). A ultrassonografia doppler é uma tecnologia emergente com o potencial de aumentar o diagnóstico, monitoramento e estudo da fisiopatologia reprodutiva equina (GINTHER; 2004). Nos últimos anos, a US Doppler vem sendo utilizado na reprodução equina para avaliar o fluxo sanguíneo das artérias uterina e ovariana (BOLLWEIN et al., 2002), folículos (FL) e de corpo lúteo (CL) (GASTAL et al. 2007; GINTHER et al. 2007a; GINTHER et al. 2007).

6. AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA MODO DOPPLER DE FOLÍCULOS DOMINANTES E SUBORDINADOS

O aumento do suprimento sanguíneo nos folículos dominantes pode estar relacionado com a existência de fatores angiogênicos produzidos por estes folículos. Estas substâncias desencadeiam o crescimento de novos vasos, aumentando o fluxo sanguíneo e fazendo com que o folículo possua hormônios e substâncias metabólicas necessárias para a sua maturação final (SENGER, 2003).

Este aumento na vascularização da parede folicular foi detectado através de avaliações ultrassonográficas Doppler durante os seis dias que antecedem a ovulação com um ritmo mais lento durante a primeira ovulação quando comparada com ovulações subsequentes da estação de monta (GASTAL et al., 2007).

A US Doppler na fase de transição da primavera é eficiente para diferenciar folículos dominantes que se tornariam ovulatórios daqueles que se tornariam anovulatórios. Com realização de avaliações diárias, é possível observar que folículos que não ovularam apresentaram uma menor taxa de irrigação da parede folicular a partir da divergência folicular (25 mm de diâmetro) quando comparados com folículos ovulatórios que possuem irrigação folicular mais alta (ACOSTA et al., 2004).

Por meio da perfusão vascular (PV) é possível detectar precocemente diferenças vasculares entre o folículo que se tornará dominante, daqueles que se tornarão subordinados durante a estação de monta (GINTHER et al., 2007).

7. AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA MODO DOPPLER DO STATUS FUNCIONAL DO CORPO LÚTEO

Segundo GINTHER (1995), diversos estudos utilizando a US modo-B obtiveram resultados divergentes quanto à relação existente entre a morfoecogenicidade luteal e a concentração sistêmica de P4 em éguas. Levando em consideração que o desenvolvimento, regressão e funcionalidade do CL estão especificamente relacionados com o rápido desenvolvimento e regressão de um longo sistema vascular local. Dessa forma, o uso da US Doppler é de grande importância para a avaliação do status funcional do CL, pois existe uma grande relação entre a perfusão sanguínea com o desenvolvimento estrutural e funcional do CL (GINTHER et al., 2007).

Levando em consideração a íntima relação entre a perfusão vascular do CL e a concentração sérica de P4, o uso da US Doppler pode ser empregado no momento da inovulação do embrião com o intuito de avaliar a funcionalidade do CL e com isso, selecionar a receptora com perfil progesterônico mais adequado e/ou para definir se é preciso fazer suplementação com P4 exógena (FERREIRA, 2008).

8. AVALIAÇÃO ULTRASSONOGRÁFICA MODO DOPPLER DO STATUS FUNCIONAL UTERINO

Distúrbios vasculares agem como potenciais causadores de alterações degenerativas do endométrio, e essas alterações, por sua vez, estão intimamente relacionados com casos de subfertilidade em éguas (FERREIRA et al., 2008). A US Doppler é fundamental para o estudo da viabilidade endometrial, assim como para a interação conceito-maternal (FERREIRA, 2011).

De acordo com Ferreira et al. (2008) a US Doppler é efetiva na avaliação da perfusão sanguínea do útero de éguas que apresentam ou não cistos uterinos. Em que, neste estudo, foi observado que regiões císticas possuem menor perfusão

sanguínea do que regiões adjacentes não císticas, indicando que distúrbios vasculares estão relacionados com a formação de cistos uterinos.

9. ESCOLHA DA RECEPTORA

A escolha da receptora no dia da TE tem influência direta sobre a taxa de gestação. Alguns aspectos precisam ser levados em consideração neste momento, sendo os mais importantes o dia pós-ovulação e as características uterinas da receptora ao exame de palpação e ultrassonografia. A sincronia entre embrião e ambiente uterino é fundamental para o estabelecimento da gestação (BEZERRA, 2011).

O ambiente uterino altera-se marcadamente sob a influência da progesterona, onde que um embrião em um útero assincrônico pode estar sujeito a níveis hormonais e fatores de crescimento não correspondentes à fase na qual ele se encontra, dessa forma, afetando o estabelecimento da gestação (WILSHER et al., 2006). Estudos anteriores indicavam que receptoras que ovularam um dia antes (-1) até 3 depois (+3) em relação a doadora teriam a mesma chance de se tornarem prenhes (SQUIRES; SEIDEL, 1995 *apud* BEZERRA, 2011). Outros estudos concluíram que não se deve apenas avaliar o dia da ovulação da receptora, visto que receptoras d3 e d8 (após ovulação) não mostraram diferença significativa nas taxas de gestação, a ecogenicidade e o tônus uterino no momento da TE, também devem ser levados em consideração para escolha da melhor receptora para o momento da inovulação (FLEURY et al., 2006; ALONSO, 2007).

A escolha da Receptora através da avaliação ginecológica realizada no momento da transferência de embrião é de suma importância, no entanto, esta escolha é, muitas vezes, realizada de maneira subjetiva, sendo que cada veterinário possui um método próprio de avaliação (BEZERRA, 2011). Um método mais objetivo de seleção auxiliaria em uma escolha mais adequada com melhores resultados (FLEURY et al., 2006). Dessa forma, o uso da US Doppler no dia da TE seria mais um método de avaliação, visto que, a perfusão vascular do CL possui uma estreita relação com a concentração de P4, com isso possibilita selecionar a receptora com perfil progesterônico mais adequado (FERREIRA, 2011).

As receptoras com edema endometrial no quinto dia pós ovulação não devem ser utilizadas neste ciclo (SQUIRES et al., 1999; SQUIRES et al., 2003). O tônus uterino da égua receptora deve ser avaliado, visto que afeta a taxa de gestação. Carnevale et al. (2000) sugeriram que um tônus uterino reduzido pode indicar um ambiente uterino pouco compatível com o crescimento e desenvolvimento embrionário. A morfoecogenicidade uterina e o aspecto de tubularidade e homogeneidade à palpação retal e ultrassonografia (BEZERRA, 2011).

A avaliação das receptoras, antes da transferência, é de grande importância. Devendo-se selecionar a égua mais adequada para receber o embrião. Dessa forma, por palpação deve-se observar a cérvix firme e fechada, aumento de tônus uterino (cilíndrico e tubular). Além disso, não deve haver nenhuma evidência de dobras endometriais ou secreção uterina no exame ultrassonográfico (CARNEVALE et al., 2000).

Viana et al (2017) realizou um interessante trabalho de avaliação de receptoras por US modo Doppler em programa comercial de transferência de embriões, através de palpação retal, avaliação cervical e ultrassonografia modo B, comparando com as taxas de prenhez nas receptoras avaliadas com US Modo Doppler. Neste estudo, foram realizadas 42 colheitas de embriões, com recuperação de 29 (69%) embriões, resultando em 20 prenhezes (68,9%). Destes 29 embriões implantados, 14 receptoras foram avaliadas por US Modo B onde 7 (50%) resultaram em prenhez positiva e 15 receptoras foram avaliadas por US Modo Doppler e dessas, 13 (86,6%) resultaram em prenhez positiva ($p < 0,05$). Dessa maneira, foi possível observar que aqueles animais avaliados com US Modo Doppler tiveram uma taxa gestacional estatisticamente superior quando comparadas com as receptoras que foram avaliadas apenas com US Modo B.

Portanto, a Ultrassonografia Doppler apresenta um amplo potencial de uso podendo servir como mais um método auxiliar visando otimizar a seleção de receptoras que irão receber embriões em programas de TE.

10. REFERENCIAS

ACOSTA, T.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Differential blood flow changes between the future dominant and subordinate follicles precede diameter changes during follicle selection in mares. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 502-642, 2004.

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.

BALL, B. A.; DAELS, P. F. Early pregnancy loss in mares: applications for progestin therapy. 1988. In: ROBINSON, N. E. **Current Therapy in Equine Medicine**. 4.ed. W.B. Saunders, Philadelphia, 1997, p.531-534.

BEZERRA, L.L. Eficiência reprodutiva de éguas assintomáticas portadoras de Theileria equi submetidas a um programa de transferência de embrião. 2011. 72 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Concentração em Nutrição e Produção de Monogástricos, Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2011.

BOLLWEIN, H.; MAYER, R.; WEBER, F.; STOLLA, R. Luteal blood flow during the estrous cycle in mares. **Theriogenology**, v. 57, n. 8, p. 43-51, 2002.

CARNEVALE E.M. et al. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. **Theriogenology**, v.54. p.965-979, 2000.

CARNEVALE, E.M.; GINTHER, O.J. Relationships of age to uterine function and reproductive efficiency in mares. **Theriogenology**, v.37, p. 1101-1115, 1992.

COSTA, A.L.A. Controle Reprodutivo e Transferência de Embriões em Equinos. Relatório Final de Estágio. Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, 2010.

FARIA D.R., GRADELA A. Hormonioterapia aplicada à ginecologia equina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v.34, n.2, p.114-122, abr./jun. 2010.

FERREIRA, C.J.; MEIRA, C. Aplicação da ultrassonografia colorida doppler em programas de transferência de embriões equinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.41, n.6, p.1063-1069, jun, 2011.

FLEURY, P.D.C.; ALONSO, M.A.;BALIEIRO, J.C.C. Avaliação da receptora: efeito de características uterinas e tempo de ovulação. In: XVIII REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIOES, Araxá. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34 (supl. 1), p.502, 2006.

FLEURY, J.J.; ALVARENGA, M.A.; FIGUEIREDO COSTA, J.B. Transferência de embriões em eqüinos - Nota prévia. CONGRESSO BRASILEIRO DE

REPRODUÇÃO ANIMAL , 7, 1987. Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1987. p.40.

GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; DONADEU, F.X.; ACOSTA, T.J.; BEG, M.A.; GINTHER, O.J. Temporal relationships among LH, estradiol, and follicle vascularization preceding the first compared with later ovulations during the year in mares. **Animal Reproduction Science**, v.102, p.314–321, 2007.

GINTHER, O.J. Reproductive biology of mare. Cross Plains: Equiservices, 1992. p. 503-509.

GINTHER, O.J. Follicles. Ultrasonic imaging and animal reproduction: horses. Cross Plains: Equiservices, 1995.

GINTHER, O.J. et al. Luteal blood flow and progesterone production in mares. **Animal Reproduction Science**, v.99, p.213-220, 2007.

GINTHER, O. J.; GASTAL, E. L.; GASTAL, M. O.; UTT, M. D.; BEG, M. A. Luteal blood flow and progesterone production in mares. **Animal reproduction Science** , v. 99, p. 213-220, 2007a.

GINTHER, O.J.; GASTAL, E.L.; GASTAL, M.O.; SIDDIQUI, M.A.R.; BEG, M.A. Relationships of Follicle Versus Oocyte Maturity to Ultrasound Morphology, Blood Flow, and Hormone Concentrations of the Preovulatory Follicle in Mares. **Biology of Reproduction**, v.77, p.202–208, 2007b.

GINTHER, O.J., 2007. Ultrasonic imaging and animal reproduction: Color-Doppler ultrasonography. Cross Plains: Equiservices, p.258.

GINTHER, O.J; BEG, M. A.; GASTAL, M. O.; GASTAL, E. L. Follicle dynamics and selection in mares. **Animal Reproduction**, v.1, n.1, p.45-63, 2004.

HENRY, M .; MEIRA, C .; OLIVEIRA, M.M.F. Transferência não cirúrgica de embriões em eqüídeos. Em: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 7., 1987, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1987. p.74.

KENNEY, R.M. Cyclic and pathologic changes of the mare endometrium as detected by biopsy, with a note on early embryonic death. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 01 Feb 1978, 172(3):241-262.

LEBLANC, M.M. et al. Differences in uterine position of reproductively normal mares and those with delayed uterine clearance detected by scintigraphy. **Theriogenology**, v.50,p.49-54, 1998.

Lopes, E.P. Transferência de embriões equinos: maximizando resultados com a escolha de Receptoras. Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v.39, n.1, p.223-229, jan./mar. 2015. Disponível em www.cbra.org.br

LOSINNO, L.; ALVARENGA, M.A. Fatores críticos em programas de transferência de embriões em equinos no Brasil e Argentina. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 18., 2006, Araxá. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 34, p. 39-49, 2006.

LOSINNO, L.; ALONSO, C.; CASTANEIRA, C. Escore na biópsia endometrial e aptidão reprodutiva em éguas receptoras de embrião - resultados parciais. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, Angra dos Reis. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33; n. 1, p. 201, 2005.

MORRIS, L.H.; ALLEN, W.R. Reproductive efficiency of intensively managed Thoroughbred mares in Newmarket. **Equine Vet J**, 2002; v.34; p.51-60.

MCKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L. Embryo Transfer and Related 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.

OGURI, N.; TSUTSUMI, Y. Nonsurgical recovery of equine eggs, and an attempt at nonsurgical egg transfer in horses. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 31, p.187-195, 1972.

QUEIROZ, F.J.R. Biópsia endometrial como método auxiliar de diagnóstico da subfertilidade e da infertilidade na égua (*Equus caballus*, L. 1728). 1991. 75f. Dissertação (Mestrado em Reprodução), Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ.

RIERA, F.L. Equine embryo transfer. In: SAMPER, J. C. (Ed.). Equine breeding management and artificial insemination, Philadelphia: Saunders Elsevier, 2009. p. 185-199.

RICKETTS, S.W.; ALONSO, S. The effect of age and parity on the development of equine chronic endometrial disease. **Equine Vet J**, 1991;v.23; p.189-92.

SCHOON, H.A.; SCHOON, D.; KLUG, E. Vascular lesions in the equine endometrium. **Pferdeheilkunde**, v.13, p.546, 1997.

SENGER, P.L. Pathways to pregnancy and parturition. 2 ed. Pullman, WA, 2003, p.272.

SQUIRES, E.L.; MCCUE, P.M. Superovulation in mares. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 99, n. 1-2, p. 1-8, May, 2007.

SQUIRES, E.L. Factors affecting embryo recovery and pregnancy rates after embryo transfer. Società Italiana Veterinari per Equini- SIVE- XII Congresso Multisala, Bologna, Italy, 2006.

SQUIRES, E.L. Management of the embryo donor and recipient mare. In: Robinson NE (Ed.). **Current therapy in equine medicine**. 5.ed. Philadelphia, PA: Saunders, 2003. p.277-279.

SQUIRES, E.L.; CARNEVALE, E.M.; MCCUE, P.M. et al. Embryo technologies in the horse. **Theriogenology**, v.59, p.151-170, 2003.

SQUIRES, E.L.; MCCUE, P.M.; VANDERWALL, D. The current status of equine embryo transfer. **Theriogenology**, Stoneham, v. 51, n. 1, p. 91-104, Jan. 1999.

SQUIRES, E.L.; SEIDEL, G. E. Collection and transfer of equine embryos. Fort Collins: Colorado State University. **Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory**, n.8, 1995, n.08, p.24-31.

STOUT, T.A. E. Equine embryo transfer: review of developing potential. **Equine Veterinary Journal**, London, v. 38, n. 5, p. 467-78, Sept. 2006.

SUMMERS, P.M.; SHEPHARD, A.M.; HODGES, J.K.; KYDD, J.; BOYLE, M.S.; ALLEN, W.R. Successful transfer of the embryos of Przewalski's horses (*Equus przewalskii*) and Grant's zebra (*E. burchelli*) to domestic mares (*E. caballus*). **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 80, n. 1, p. 13-20, May, 1987.

TROEDSSON, M. H. T. Therapeutic consideration for mating-induced endometritis. **Pferdeheilkunde**, v.13, p.516-520, 1997.

VANDERWALL, D. K.; WOODS, G. L. Embryo transfer and newer assisted reproductive techniques for horses, p 211-219. In: YOUNGQUIST, R. S.; THRELFALL, W. R. (Ed.). **Current therapy in large animal theriogenology**. Philadelphia: Saunders, 2007, p. 211-219.

VIANA, A.R.; FERNANDES FILHO, G.T.; GOMES NETO, O.C.; OLIVEIRA, E.R.G.; SOBRAL, G.G.; CARNEIRO, G.F. Use of Doppler Ultrasonography in embryo transfer programs in the equine species. **Animal Reproduction**, v.14, (3):900.

WILSHER, S.; KOLLING, M.; ALLEN, W. R. Meclofenamic acid extends donor-recipient asynchrony in equine embryo transfer. **Equine Veterinary Journal**, v. 38; n. 5; p. 428-432, 2006.

ASPIRAÇÃO FOLICULAR EM ÉGUAS

Juan Cuervo-Arango

Department of Equine Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University,
The Netherlands

1. INDICAÇÕES

A técnica de aspiração folicular na égua, OPU (da sigla em inglês para *ovum pick up*), é uma técnica que ganhando popularidade nos últimos anos. As principais indicações desta técnica são as seguintes:

1.1 Éguas inférteis ou subférteis

Aquelas que não respondem adequadamente a outras técnicas de reprodução assistida como inseminação artificial ou transferência de oócitos. Por exemplo éguas com piometra, endometrites crônicas, adesões uterinas, obstruções irreversíveis no oviduto (salpingite, cistos tubáricos), incompetência cervical (lacerações e tumores cervicais). Ou simplesmente em éguas que não dão mais embriões por causas desconhecidas ou em éguas velhas (não há diferença na eficiência no procedimento de OPU-ICSI entre éguas jovens e velhas).

1.2 Éguas em competição

A diferença entre a transferência de embrião e a técnica de OPU, é o tempo necessário para aspirar os folículos, que é ao redor de uma hora. Portanto a égua de competição pode continuar com suas atividades desportivas dois ou três dias após o procedimento. Dependendo se ocorrer ou não complicações.

1.3 Garanhões inférteis ou com reservas limitadas de sêmen

Provavelmente está seja a principal indicação da técnica de OPU-ICSI, pelo menos na Europa onde muitos clientes utilizam sêmen de garanhões muito valiosos, ou de garanhões que o sêmen já não produz prenhez mediante a inseminação (reprodutores subférteis ou com má qualidade do sêmen pós congelamento). Em média necessita-se 1/5 de uma palheta se sêmen congelado para fertilizar todos os oócitos de uma égua (10 – 15 oócitos em média por OPU)

2. TIPOS DE OPU

Existem dois tipos de técnicas de aspiração folicular.

2.1 Aspiração folicular pelo flanco

A vantagem principal é não necessitar de equipamentos especializados (sonda transvaginal), já que a aspiração é realizada pelo flanco da égua com urocânter e uma agulha longa. A principal desvantagem é que somente se pode aspirar folículos pré-ovulatórios, portanto o número de oócitos recuperado geralmente é baixo (entre 0 e 3). Neste caso usualmente se utiliza a maturação do óvulo in vivo, aspirando-se o folículo 30 – 34 horas após a administração de hCG. Os oócitos maduros recuperados podem ser utilizados diretamente em uma transferência cirúrgica de oócitos ou ICSI sempre quando existir um laboratório de ICSI próximo ao local de aspiração.

2.2 Aspiração transvaginal

Está é a técnica mais utilizada mundialmente e a que este artigo se concentrará. Consiste na aspiração de todos os folículos antrais (>5mm, incluindo os pré-ovulatórios) de forma transvaginal. Para tanto a égua é alocada em um tronco de contenção, cateter intravenoso, sedação e pré-medicação com AINEs, antibióticos de amplo espectro e espasmolíticos ou anestesia epidural. Após lavagem e antisepsia da região perineal, vulvar e no vestibulo vaginal é introduzida uma sonda

transvaginal até a parte lateral da cervice. Ao mesmo tempo segura-se o ovário por via transretal e aproxima-se a parte cranial da vagina. A sonda transvaginal tem uma guia onde é introduzida uma agulha de duplo lúmen de 12 -14 G de diâmetro conectada a um sistema de tubos e bomba de aspiração. Cada folículo é lavado (flushing) entre 5 a 10 vezes com um volume entre 1 ml (para folículos de 5-10mm) até 5 ml (para folículos de maior tamanho) com um meio específico para OPU (que contém heparina e antibiótico). O volume total de meio utilizado em um OPU geralmente varia entre 300 a 600 ml, dependendo do número de folículos aspirados e o número de flushing por folículo. A pressão empregada deve ser suficiente para aspirar 20 ml em 45 – 60 segundos. O procedimento completo de aspiração folicular dura entre 20 e 60 minutos, dependendo do número de folículos e da experiência do veterinário. Em nossa clínica utilizamos dois veterinários, um segura o ovário e a sonda transvaginal e o outro maneja a agulha. Em outros sistemas, o mesmo veterinário realiza ambos os procedimentos. A taxa média de recuperação deve ser entorno de 55% (variando entre 20 e 100%). Em nossa clínica a média de folículos aspirados por OPU é de 25 (variando entre 8 e 70), com uma recuperação média de 14 oocitos por égua (variando entre 2 e 52).

3. FREQUÊNCIA DA OPU EM UMA MESMA ÉGUA

A frequência que se pode realizar a aspiração folicular em uma mesma égua depende muito do indivíduo. Ou seja, algumas éguas produzem muitos folículos 10 – 14 dias após a aspiração enquanto outras podem demorar até 1 ou 2 meses. Tudo depende do número mínimo de folículos que consideramos ótimos para a realização da OPU. Em nossa clínica aspiramos sempre que possível a cada 3 a 4 semanas desde que a égua tenha um mínimo de 15 – 20 folículos. Os que geralmente nos proporciona uma recuperação mínima de 8 -12 oocitos por égua. Entretanto, existem éguas que nunca desenvolverão mais de 10 – 12 folículos antrais, especialmente as éguas de idade avançada. Nestes casos também realizamos a OPU e caso a égua seja uma boa doadora, não é incomum obter-se entre 6 -7 oocitos e finalmente 1 -2 embriões após a ICSI.

4. COMPLICAÇÕES DA OPU

Quando as precauções necessárias são tomadas, não deve haver complicações graves, entretanto, pode ocorrer sangramento leve a moderado (na cavidade vaginal ou peritoneal) em algumas ocasiões, que geralmente não necessitam de tratamento. É frequente que a égua apresente febre e dor no dia seguinte a OPU devido a inflamação pela passagem da agulha por diferentes tecidos. Outras complicações mais graves, mas menos frequentes, são as lacerações do reto, pela excessiva pressão na mucosa retal durante a manipulação do ovário ou uma peritonite pela perfuração não percebida da mucosa intestinal com a agulha. Por este motivo é preciso ter muito cuidado ao introduzir a agulha através da vagina, certificando-se que não exista tecido suspeito entre o ovário e a parede vaginal, como o intestino ou ligamento largo.

5. MANEJO DOS OOCITOS

Uma vez que os oocitos são coletados em tubos tipo falcon de 50 ml ou garrafas de vidro de 500 – 1000 ml (dependendo do sistema de aspiração), estes devem ser mantidos entre 25 – 30° C durante a procura. Pode-se utilizar um filtro e uma lupa de transferência de embriões para o procedimento. Recomenda-se utilizar uma capela de fluxo laminar durante a procura. Não devemos utilizar luvas de látex, pois são tóxicas aos oócitos. Podemos pulverizar as mãos e a bancada da capela de fluxo com um produto específico (Oosafe®). Uma vez identificados, os oocitos são colocados em um tubo de 2 ml com o mesmo meio da aspiração utilizado na OPU ou em um meio especial recomendado pelo laboratório que realizará a ICSI.

O transporte dos oocitos pode ser realizado por um máximo de até 24 horas. É muito importante que a temperatura durante o transporte seja mantida entre 20 e 25 ° C, e NUNCA menos de 18 – 19 graus, uma vez que podem sofrer danos irreversíveis. Uma vez que chegam ao laboratório de ICSI, estes são maturados durante 24 a 30 horas. As taxas de maturação normais encontram-se entre 50 e 70%. Se as taxas médias de maturação atingirem menos de 50 – 55% isto indicaria um problema no transporte dos oocitos ou no laboratório.

6. EXPECTATIVAS PARA O CLIENTE (EFICIÊNCIA DO PROGRAMA)

Como em todas as técnicas de reprodução assistidas existe uma grande variação individual em diferentes éguas. A este fator devemos somar o importante papel desempenhado pelo laboratório onde se realiza a ICSI e o cultivo dos embriões e seu posterior congelamento. Por este motivo recomenda-se escolher um bom laboratório e chegar a um acordo antes de iniciar o programa de aspirações de oócitos. Quando se trabalha com um laboratório bem estabelecido e experiente no setor, pode-se esperar alcançar uma média de 0.8 a 1 embrião por sessão de OPU, o que se traduz geralmente em uma taxa média de blastocisto por oócito injetado entre 15 e 20%. Embora a média de embriões produzidos por sessão de OPU está ao redor de 1, aproximadamente uns 40 a 50% das éguas que aspiramos produzirão 0 embriões. Por outro lado, a outra metade produzirá entre 1 e 10 embriões, com uma média de 2 embriões por sessão de OPU com êxito.

Os embriões demoram entre 6 a 9 dias para atingir o estágio de blastocisto quando são viáveis para a transferência transcervical ao útero. Se congelados (vitrificados ou congelamento lento) ou a fresco (as taxas de prenhez não variam muito, uma vez que o congelamento é bem sucedido, quando medem menos de 150 μ m). Em nossa clínica, após ter transferido 400 embriões produzidos por ICSI e congelados, as taxas de prenhez aos 14 dias são de 65% com uma taxa de nascimento de 45%.

IMUNOMARCAÇÃO DE LEPTINA E SEU RECEPTOR NO ENDOMÉTRIO DE ÉGUAS DURANTE O CICLO ESTRAL

Millie de Oliveira Marchiori^{1,2}, Luis Augusto Cruz², Luis Otávio Centeno², Bruna dos Santos Suñe Moraes³, Sandra FialaRechsteiner^{1,2}

¹Programa de Pós-graduação em Medicina Animal:equinos - Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul – Brasil;

²HISTOREP – Departamento de Morfologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal De Pelotas – RS – Brasil

³Faculdade de Veterinária, Universidade Federal De Pelotas – RS – Brasil

A leptina, uma citocina multifuncional produzida principalmente pelos adipócitos, atua regulando o equilíbrio energético corporal e a função reprodutiva, tanto a nível central quanto periférico. Disfunções causadas por distúrbios nutricionais e mudanças nos hábitos comportamentais dos equinos, têm levado esses animais a atingirem um padrão de acúmulo excessivo de gordura, com a manifestação de alterações clínicas e reprodutivas. O objetivo deste estudo foi avaliar a presença de leptina (Ob) e seu receptor (Ob-Rb) no endométrio de éguas, avaliando a influência da obesidade e do ciclo estral nessas citocinas. Foram utilizadas 20 éguas, divididas em 2 grupos: GrN: grupo de éguas com escore corporal (EC) moderado (EC = 6) e GrO grupo de éguas obesas (EC =8/9). Os animais foram selecionados com base na escala de escore corporal e monitorados através do peso (PC) e observações ultrassonográficas da espessura de gordura na base da cauda (EGBC) e na crista do pescoço (ECP). Os animais de ambos os grupos foram submetidos à coleta de sangue, para análise de triglicerídeos e leptina, além da extração de um fragmento uterino no 8º dia após a ovulação e durante o estro, momento em que a égua apresentava um folículo de 35mm e o útero, com características clínicas e ultrassonográficas de estro. As amostras foram encaminhadas para imunohistoquímica (IHQ) com anticorpos policlonais anti-leptina e seu receptor. Na IHQ foi verificado que houve imunomarcação de Ob e Ob-Rb no epitélio luminal (EL), glandular (EG) e no estroma, nos dois momentos avaliados em todos os grupos. Foi verificada uma imunomarcação mais intensa de Ob-Rb no EG durante o diestro, em ambos os grupos (GrN e GrO). A marcação de Ob no epitélio glandular entre estro e diestro, diferiu apenas nas éguas do GrO. Quando o GrN e o GrO foram comparados, foi observada uma maior imunomarcação no GrN, tanto para Ob como Ob-Rb. Igualmente ao observado nas glândulas endometriais, no epitélio luminal, também se verificou uma maior imunomarcação do receptor de leptina durante o diestro, e quando os grupos foram comparados, houve uma marcação mais intensa no GrN, durante a fase lútea. As análises bioquímicas demonstraram que não houve diferença nos níveis séricos de triglicerídeos e leptina nos grupos e períodos avaliados, havendo, no entanto, diferença nos padrões morfométricos de PC, EGBC e ECP entre os grupos. Não foram observadas alterações no período do ciclo estral ou distúrbios clínicos, nos animais examinados. A Correlação de Pearson

demonstrou que à medida que os níveis séricos de leptina aumentam, a intensidade de imunomarcção de Ob-Rb no endométrio diminui. Os resultados confirmam a presença de leptina e seu receptor funcional de cadeia longa no endométrio equino, havendo uma imunomarcção de Ob-Rb mais intensa durante o diestro em éguas de escore corporal moderado.

Palavras-chave: Leptina, endométrio, equinos, obesidade

DINÂMICA FOLICULAR NAS RAÇAS PÔNEI BRASILEIRO E BRASILEIRO DE HIPISMO: EXISTEM DIFERENÇAS?

Fabíola Freire Albrecht¹, Estela Rose Araújo^{2,3}, Viviane Flores Penteadó⁴, Guilherme de Oliveira Oliveira⁴, Rodrigo Costa Mattos¹, Ricardo Macedo Gregory¹, Adriana Pires Neves^{1,4}

¹Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos, UFRGS, Porto Alegre, Brasil; ²Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, USP, Pirassununga, Brasil; ³School of Veterinary Medicine, University of Wisconsin, Madison, USA ⁴Faculdade de Zootecnia, UNIPAMPA, Dom Pedrito, Brazil.

Grandes diferenças de peso e altura podem ser encontradas dentre as mais de quinhentas raças de equinos existentes no mundo (Mason, A World Dictionary of livestock breeds, types and varieties, 1996). Exemplos são minipôneis, medindo no máximo 97 cm e cavalos de salto, cuja altura pode ultrapassar 180 cm. Aspectos fisiológicos do ciclo estral podem ser diferentes nos extremos representados por estas raças (Kim, Biotechnol. Lett. 36, 2014:1187). Este estudo propôs uma comparação contemporânea de um intervalo interovulatório entre éguas Pônei Brasileiro (minipôneis) e Brasileiro de Hipismo (raça de salto), objetivando-se o registro da dinâmica folicular com rastreamento folicular individual. Dez éguas Pônei Brasileiro medindo entre 78 e 93 cm e pesando entre 87 e 97 Kg foram selecionadas para o grupo MP; doze éguas Brasileiro de Hipismo medindo entre 165 e 173 cm e pesando entre 490 e 520 Kg foram selecionadas para o grupo BH. Utilizou-se ultrassonografia transretal em exames diários realizados pelo mesmo operador e folhas de rastreamento folicular individuais para registro das quantidades e dimensões dos folículos e corpos lúteos observados nos exames. O experimento foi conduzido em uma propriedade na fronteira Oeste do RS, durante os meses de outubro a dezembro. Todos os animais foram mantidos no mesmo piquete e submetidos ao mesmo manejo. O teste t para duas amostras foi utilizado. Não houve diferença entre os grupos quanto à duração do ciclo (MP=21.9 dias e BH=20.58 dias), diferença de diâmetro entre o folículo pré-ovulatório (FPO) e segundo maior folículo (SMF) à divergência (MP=7.25mm e BH=6.71mm) e duração do corpo lúteo (CL) (MP=12.4 dias e BH=13.92 dias). Houve diferença entre os grupos quanto ao diâmetro máximo do FPO (MP=36.15mm e BH=46.66mm); diâmetro do FPO à divergência (MP=22.6mm e BH=26.8mm); razão de crescimento do FPO (MP=2.61mm/dia e BH=3.51mm/dia); quantidade de folículos por onda ovulatória (MP=4.8 e BH=9.75) e área média do CL (MP=436.1mm² e BH=720.4mm²). Há diferenças na dinâmica folicular entre raças pequenas e grandes nesse estudo. As éguas minipôneis desenvolveram folículos e CL menores comparativamente às BH; entretanto, a duração de CL foi similar. 4 das 12 éguas BH apresentaram ovulação dupla. Em ovulações duplas, o maior folículo é menor do que em ovulações simples e origina CL menor (Urquieta, Reprod Anim Dom, 2009:44;859). Ovulações duplas na raça BH podem estar relacionadas à forte ascendência PSC nesta raça (Ginther,

Reproductive Biology of Mare, 1992; Dias, Arquivo Bras Med Vet e Zoot, 2000:52;647). As diferenças entre estas duas raças representam um excelente modelo experimental de estudo da dinâmica follicular intra e interespecífica.

Palavras-chave: éguas, comparação, divergência, Brasileiro de Hipismo, Minipônei

DOSES TERAPÊUTICAS DE FENILBUTAZONA AFETAM O PROCESSO OVULATÓRIO DE ÉGUAS

Gustavo Rupp Larentis*, Henrique Boll de Araujo Bastos, Giovani Casanova Camozzato, Gabriel de Oliveira Santos, Rodrigo Costa Mattos

REPROLAB - Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre - RS, Brasil

Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) são os agentes analgésicos mais frequentemente usados em equinos no mundo devido a que as dores mais comuns serem mediadas por inflamação (Sanchez LC. *Equine Vet J*; 46:517-23. 2014). A administração sistêmica de altas doses de flunixin meglumine durante o período periovulatório bloqueia a ovulação e induz a formação de folículos luteinizados anovulatórios (FLA) em 83% das éguas (Cuervo-Arango J. *Theriogenology*; 75:707-14. 2011). O objetivo deste estudo foi determinar se diferentes tratamentos com doses terapêuticas de fenilbutazona (FB) afetam o processo ovulatório de éguas. Foram utilizadas dez éguas saudáveis e cíclicas; sendo a palpação retal e a ultrassonografia avaliadas a cada 24 horas. Quatro grupos foram examinados em ciclos consecutivos. O primeiro ciclo foi o grupo controle. Quando detectado um folículo > 35 mm e grau de edema endometrial 2-3 foi administrado acetato de deslorelina (DES) para induzir a ovulação. O segundo ciclo foi chamado de FB1. Neste grupo as éguas receberam junto com a DES uma dose (4,4 mg/kg) de FB. O terceiro ciclo foi chamado de FB2. Neste grupo foram administradas duas doses de FB, uma no momento da indução com DES e outra dose administrada 24 horas depois. O quarto ciclo foi chamado de FB5. Quando um folículo dominante \leq 30 mm foi detectado, doses diárias de FB foram administradas até um máximo de cinco doses. Ao atingir 35 mm de diâmetro o folículo e o endométrio um grau de edema 2-3 foi induzida a ovulação com DES. Após a indução todas as éguas de todos os grupos foram avaliadas diariamente até a detecção da ovulação, atresia folicular ou formação de FLA, determinando o intervalo em horas da indução até a ovulação. A avaliação estatística foi realizada através de ANOVA e as diferenças foram localizadas através do teste T-Tukey. Dos 40 ciclos avaliados, 97,5% ovularam e apenas 2,5% formaram FLA. Ovulações duplas ocorreram em todos os grupos, totalizando 22,5% dos ciclos. No grupo controle o intervalo entre a administração da DES e a ovulação foi de $38,5 \pm 3,9$ horas, menor ($P < 0,05$) que os grupos FB1 ($53,3 \pm 5,3$), FB2 ($55,2 \pm 5,1$) e FB5 ($57,6 \pm 7,3$). O presente estudo demonstrou que o uso de doses terapêuticas de FB não foi capaz de interromper o processo de ovulação. No entanto, foi observado um atraso de mais de 15 horas na ovulação das éguas que receberam FB. Este resultado sugere que o uso de FB em programas de inseminação em tempo fixo pode prejudicar as taxas de prenhes.

Palavras-chave: foliculogênese, indução de ovulação, folículo anovulatório

FATORES RELACIONADOS A DETERMINAÇÃO DO SEXO DOS POTROS DA RAÇA PSC

Jonas Gomes Flores^{1,2}, Alinne Machado Petrarca Léo^{2*}, Sandra Fiala Rechsteiner^{1,2}

¹Programa de pós-graduação em Medicina Animal: equinos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil

²HISTOREP, Departamento de Morfologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Brasil

As biotécnicas da reprodução na espécie equina avançaram na última década e criadores começaram a questionar as possibilidades de interferência na determinação do sexo dos potros, uma vez que dependendo da finalidade da criação há uma preferência por machos ou fêmeas. A principal hipótese deste estudo é que coberturas realizadas mais próximas do momento da ovulação resultariam em potros machos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência do momento da cobertura em relação ao momento da ovulação no sexo dos potros e fatores como: indutor da ovulação; idade da égua e garanhão; ovário em que ocorreu a ovulação; corno gestante. O estudo foi realizado em Bagé/RS e Aceguá/RS, Brasil, nas estações de monta de 2011 a 2015, utilizando 259 ciclos reprodutivos de 160 éguas e 22 garanhões Puro Sangue de Corrida. Informações como data da cobertura (n = 259); momento da ovulação em relação a cobertura, + 24 horas (n = 69) e - 24 horas (n = 190); agente indutor utilizado Deslorelina (n = 187) ou HCG (n = 72); data da cobertura (n = 259); idade da égua, G1: até 8 anos (n = 123), G2: 9 até 14 anos (n = 110) e G3: >14 anos (n = 26); idade do garanhão, até 14 anos (n = 11) e >15 anos (n = 11); ovário em que a ovulação ocorreu, direito (n = 122) e esquerdo (n = 137); corno gestante, direito (n = 82) e esquerdo (n = 69) foram catalogados e avaliados. A análise estatística consistiu em análise descritiva, teste de Qui-quadrado de Pearson e Regressão Logística simples e múltipla. No total de potros nascidos, 136 foram machos (52,51%) e 123 fêmeas (47,49%). Não houve diferença no sexo dos produtos em nenhuma das variáveis analisadas. O tempo decorrido entre a cobertura e a ovulação não influenciou o sexo dos produtos, nas éguas que ovularam com - 24h após a indução da ovulação: 104 potros (54,74%) eram machos e 86 (45,26%) eram fêmeas, enquanto nas éguas que ovularam com + 24h, 32 potros (46,38%) eram machos e 37 (53,62%) eram fêmeas. A porcentagem de fêmeas nascidas em relação a idade da égua foi de 46,34% (n = 57), 47,27% (n = 52) e 46,15% (n = 12) nos grupos G1, G2 e G3 respectivamente. Garanhões com idade até 15 anos tiveram 44,14% (n = 49) de fêmeas e com mais de 15 anos 49,66% (n = 73) eram fêmeas. Embora a crença popular seja de que coberturas realizadas mais próximas da ovulação geram potros machos, no período de tempo analisado esta afirmativa não se mostrou verdadeira. O presente estudo concluiu que os fatores estudados não alteraram a proporção macho:fêmea dos potros.

Palavras-chave: Macho:Fêmea; Ovulação; Potro.

ASSOCIAÇÃO ENTRE A QUALIDADE DO COLOSTRO E A TRANSFERÊNCIA DE IMUNIDADE PASSIVA EM NEONATOS EQUINOS

Luísa Lemos Silveira¹, Adriana Kroef Tarouco², Adriana Pires Neves³

¹Laboratório de Reprodução Animal – UFRGS, Porto Alegre, Brasil,

²Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), Hulha Negra, RS, Brasil.

³Universidade Federal do Pampa, UNIPAMPA, Dom Pedrito, Brasil

Este estudo teve como objetivo relacionar a qualidade do colostro com a imunidade adquirida em potros neonatos, utilizando os resultados de dois testes: Turvação pelo Sulfato de Zinco (TSZ) e Coagulação pelo Glutaraldeído (CG). O trabalho foi realizado em 2015 em criatórios da raça Puro Sangue de Corrida (PSC), localizados no Rio Grande do Sul, Brasil. Foram utilizadas 46 éguas da raça PSC e seus respectivos neonatos, foram coletadas amostras de colostro das matrizes e de sangue dos neonatos, sendo que estas últimas foram realizadas 12h após a primeira mamada, uma vez que a absorção máxima de imunoglobulinas ocorre durante as primeiras 8 horas pós-parto, diminuindo para quase nada entre 12-24 horas após o nascimento Nogueira, C.E.W.; Lins, L. A. Neonatologia e Pediatria Equina. 1. ed. Pelotas: Ed. Universitária. p.118-126, (2009). A avaliação do colostro foi realizada através do Refratômetro de Brix e classificação utilizada foi de acordo com (Knottenbelt, D.C., Holdstock, N., Madigan J. E. Philadelphia: Saunders, pp.75-94; 155-364 2004), sendo o colostro pobre com <10-15% de brix, o regular 15-20%, o adequado 20-30% e o muito bom >30% de brix. Os testes realizados no estudo foram os testes de TSZ utilizando a classificação descrita por Nogueira et al. (2009) e CG seguindo a classificação descrita por McGowan, C.M.T. et al. Australian Veterinary Journal, v. 75, n. 1, p.56-59, (1997). Os resultados foram submetidos à análise utilizando-se o programa Sistema de Análises Estatísticas (SAS) 9.3 (2013). Foi realizada análise de variância pelo teste de Kruskal-Wallis e adotado o nível de significância a 5%. A relação entre qualidade do colostro e os resultados do TSZ, evidenciou 100% de Falha na Transferência Passiva (FTP) no colostro pobre, 33,33% de FTP e 66,67% aceitáveis no regular e 100% aceitável nos colostros adequados e muito bons. Já no teste CG, resultou em 100% de FTP no colostro pobre; 33,33% de FTP, 50% de Falha parcial e 16,67% de absorção aceitável no regular; 3,7% de Falha parcial e 96,3% de transferência aceitável no adequado e 100% de transferência aceitável no muito bom. Os resultados não verificaram concentrações diretas de IgG e mostraram que os testes evidenciam uma relação significativa ($P < 0,0001$) entre as concentrações de IgG no neonato e no colostro. Concluiu-se que qualidade do colostro tem influência direta na transferência de imunidade passiva. A avaliação da qualidade do colostro através do refratômetro é um método rápido, prático, não invasivo e eficaz.

Palavras-chave: Égua, Glutaraldeído, Imunoglobulina, Potros, Turvação pelo sulfato de zinco.

TUMOR MALÍGNO DE CÉLULAS DA GRANULOSA EM OVÁRIO CÍSTICO: RELATO DE CASO

Murilo Farias Rodrigues^{1,2}, Luciane Veronezi², Guilherme Valente de Souza²,
Adriana Pires Neves^{1,3}, Diego Mazetto²

¹Programa de Pós-graduação em Medicina Animal: Equinos/UFRGS

²Centro Universitário Barriga Verde – UNIBAVE

³Universidade do Federal do Pampa – UNIPAMPA

O tumor de células da granulosa (TCG) é a neoplasia reprodutiva mais frequente na espécie equina, podendo corresponder, na casuística hospitalar em mais de 85% dos casos (McCue PM. *Vet Clin North Am - Equine Pract.*14,505-515, 1998). O tumor é hormonalmente ativo, e usualmente acomete um dos ovários, o que induz a atrofia do seu contralateral. Há relatos do TCG em distintas faixas etárias e, inclusive, em éguas prenhes (McCue PM, et al. *Vet Clin North Am - Equine Pract.*22:799–817, 2006). Na ultrassonografia observam-se multicísticos, ou composto por um massa sólida ou como um único “cisto grande” (Troedsson MHT, et al. *Pferdeheilkunde.*19,577-584, 2003). Em 90% dos casos cursam com altas concentrações de inibina sérica, porém o diagnóstico conclusivo é através do histopatológico (McCue PM, et al. *Vet Clin North Am - Equine Pract.*22:799–817, 2006). A ovariectomia é o preconizado para o restabelecimento cíclico do contralateral. O presente relato é de uma égua da raça crioula de 26 anos de idade, há dois em anestro e de comportamento ninfomaniaco. Em dois meses de acompanhamento ginecológico, a condição reprodutiva permaneceu inalterada, constatando-se a presença de um folículo ovariano com 62mm de diâmetro no ovário esquerdo, com pontos hiperecóticos sedimentados e em suspensão. O ovário contralateral apresentava-se com diâmetro de 25mm. O uso de indutores da ovulação (Deslorelina-1000µG/hCG-1.500UI) foram refratários, além ser constatado que os hormônios tireoidianos, TSH e T4 total-livre séricos, estarem dentro dos limiares. A ovariectomia foi preconizada, constatando-se, macroscopicamente, um ovário com cisto único, com líquido de coloração amarelo-amarronzada. No histopatológico, observou-se um processo neoplásico inicial, com células da granulosa disformes de aspecto maligno, infiltradas na parede cística. O aumento da inibina plasmática associada aos achados ecográficos poderiam confirmar o TCG. Entretanto, é pouco observado este tumor na forma de cisto único (MacLachlan NJ. *Environ Health Perspect.*73,27–33, 1987), além da concentração alta de inibina não ser constante em todos os casos (McCue PM, et al. *Vet Clin North Am - Equine Pract.*22:799–817, 2006; Murase H, et al. *J Equine Vet Sci.*60:6–10, 2018). Além disso, tratava-se de uma fêmea com 26 anos, faixa etária susceptível ao hipotireoidismo, o que também poderia explicar o anestro e a refratariedade dos indutores de ovulação. Contudo, esta hipótese foi descartada, pois os níveis séricos de TSH e T4 total livre estavam normais. No histopatológico a grande infiltração de células da granulosa na parede cística confirmam o

diagnóstico, pois este é o exame conclusivo do TCG (Troedsson MHT, et al. Pferdeheilkunde.19,577-584, 2003). Apesar dos TCG serem retratados como benignos (Troedsson MHT, et al. Pferdeheilkunde.19,577-584, 2003), a predominância de células neoplásicas disformes infiltradas, mesmo no início, o caracteriza como maligno. Os achados ecográficos e, no histopatológico, a predominância de células da granulosa disformes e infiltradas na parede cística confirmam o aspecto maligno do TCG em ovário com cisto único.

Palavras-chave: tumor, maligno, granulosa, égua

PRODUÇÃO ENDOMETRIAL DE HISTOTROFO DURANTE O INÍCIO DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO EM ÉGUAS

Giovani Casanova Camozzato¹, Maria Noel Martinez², Henrique Boll de Araujo Bastos¹, Sandra Fiala-Rechsteiner³, Ricardo Macedo Gregory¹, Maria Inês Mascaranhas Jobim¹, Ana Meikle², Rodrigo Costa Mattos¹

¹REPROLAB – Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre - RS, Brazil.

²Facultad de Veterinária – UDELAR, Montevideo, Uruguai.

³Historep - Instituto de Biologia, UFPEL, Pelotas - RS, Brasil

A gestação inicial da égua é um período fascinante que abrange numerosas e intensas mudanças em seu desenvolvimento, muitas das quais são únicas para a espécie equina (Stout TAE. Equine breeding management and artificial insemination 2nded;223-240,2009). Esse desenvolvimento depende da manutenção da função lútea, do estabelecimento de um ambiente uterino propício (Leisinger CA, Theriogenology;105;178-183,2017) e de uma interação precisa e orquestrada entre o concepto e o ambiente uterino (Klein C. Biol Reprod;84;872–885,2011). O objetivo deste estudo foi verificar as alterações ultraestruturais do endométrio e a produção histotrófica em éguas cíclicas e prenhes nos dias 7, 10 e 13 pós-ovulação. No primeiro ciclo, biópsias endometriais de 30 éguas foram coletadas no dia 7 (n = 10), 10 (n = 10) e 13 (n = 10) constituindo o grupo éguas cíclicas. No segundo ciclo, as mesmas éguas foram cobertas por um garanhão fértil, acompanhadas diariamente até detectar a ovulação, considerada o dia 0. Foram coletadas biopsias endometriais nos dias 7 (n=10), 10 (n=10) and 13 (n=10). Imediatamente após a coleta, o útero foi lavado e as éguas em que foi obtido embrião, foram inseridas no grupo de éguas prenhes. As amostras foram desidratadas com dióxido de carbono e analisadas em um microscópio eletrônico de varredura. Células engurgitadas foram mais abundantes no grupo de éguas prenhes no dia 7. A secreção endometrial foi maior nas éguas prenhes, aumentando sua quantidade do dia 7 ao 13. No sétimo dia pós-ovulação, uma grande perda de células ciliadas foi evidente no grupo de éguas prenhes. O grupo de éguas prenhes tem menos células ciliadas comparado como o grupo cíclico, provavelmente isso ocorre devido a rápida substituição de células ciliadas por células secretórias, que produzirá substâncias para a nutrição do blastocisto. A superfície com mais células com microvilosidades e menos cílios pode providenciar um maior contato entre o endométrio e o embrião, permitindo que o embrião absorva os nutrientes que compõem a secreção uterina, sinalizando sua presença e estabelecendo sua future fixação e implantação. Ainda no sétimo dia de prenhez, as células superficiais do endométrio são mais ingurgitadas e apresentam uma quantidade significativa de material histotrófico, provavelmente resultado de secreções merócrinas das células epiteliais. Antes da implantação, o concepto equino é dependente dos nutrientes provenientes das secreções uterinas que são dependentes da ação da progesterona. Provavelmente a produção de histotrofo nas éguas prenhes pode estar relacionada a estímulos químicos ou físicos do concepto.

O reconhecimento materno de gestação e a comunicação materno embrionária é um processo recíproco. No presente estudo, as modificações que ocorreram no ambiente uterino tiveram o propósito de prover nutrientes para receber e manter o embrião.

Palavras-chave: embrião, microscopia eletrônica, endométrio

USO DA SULPIRIDA PARA ANTECIPAÇÃO DA PRIMEIRA OVULAÇÃO DO ANO EM ÉGUAS

Lucas A. N. Medina¹, Reno Roldi de Araújo², Eduardo Malschitzky³

¹Medicina Veterinária Ulbra-Canoas/RS

²Brasil Reprodução Animal/Haras Figueira-Novo Hamburgo/RS

³Medicina Veterinária Ulbra-Canoas-RS; Reprolab-UFRGS

A égua é considerada poliéstrica estacional, com atividade cíclica no período de maior luminosidade do ano. A luz é o principal modulador da sazonalidade, mas a alimentação, condição corporal, temperatura e comportamento social devem ser considerados. A iluminação artificial, juntamente, ou não, com protocolos hormonais podem ser utilizados para antecipar a primeira ovulação da estação. A dopamina realiza regulação parcial da sazonalidade tendo relação inversa com os níveis circulantes de prolactina. A sulpirida é um antagonista de dopamina utilizado para adiantar a primeira ovulação, tendo baixo custo e boa disponibilidade. O objetivo deste trabalho foi comparar o efeito da sulpirida, da iluminação artificial convencional e da iluminação com máscaras de led-azul na antecipação da ovulação em éguas saindo do anestro invernal. Foram avaliadas 45 éguas doadoras Mangalarga Marchador ($\pm 12,4$ anos; dados de rotina comercial), alimentadas com ração comercial, silagem de milho, suplementação mineral, água, com condição corporal (≥ 3 , escala de 1-5). Os animais foram divididos em quatro grupos: Grupo 1 (SULP; n=05), animais avaliados na primeira quinzena de setembro, em fase transicional com o maior folículo medindo entre 15-20 mm de diâmetro, estimulados com luz natural recebendo 0,5mg/kg/dia/VO de Sulpirida até a detecção da primeira ovulação. No segundo dia, os animais receberam uma dose de 5mg/kg de benzoato de estradiol. Grupo 2 (MASK), n=5, não avaliados previamente ao início do tratamento (24/06/17), soltos em piquetes sendo estimulados com fotoperíodo artificial através de máscaras com lâmpada de LED azul (Equilume®), programada para que o animal fosse exposto a 16h/dia. Grupo 3 (BAIA), n=10, não avaliados previamente para início de tratamento (05/06/17), mantidos em baias, sendo estimulados com luz artificial, com uma lâmpada fluorescente de 85 watts em cada baia, com 16 h/dia. Grupo 4 (CONT), controle com n=22 mantidos em piquetes sob efeito do fotoperíodo natural. Todos os animais foram avaliados na primeira quinzena de agosto. Os animais do grupo SULP levaram em média 19,4 dias para atingirem a ovulação, que ocorreu em 100% das éguas. Os animais (100%) do grupo MASK ovularam, em média, com 65 dias de tratamento que é inferior ao obtido por (MURPHY, B. A. et al. JEVs. 46:601–605, 2013). que observou que após 83 dias com as máscaras, ainda haviam éguas em anestro (12%). No grupo BAIA obteve-se uma média de 74,2 dias para observação da ovulação, 100% ovularam. (NEELY, D.P. In: NEELY, D.P.; LIU, I.K.M.; HILMANN, R.B. Reproduccion Equina. Montevideo: Editorial Hemisfério Sur, 1989). demonstra que com 15-16 horas de exposição à luz/dia, o prazo para a primeira ovulação fica de 60-90 dias

aproximadamente. No grupo controle, 95% éguas apresentaram ovulação até o equinócio de primavera. A Sulpirida é uma alternativa eficiente para acelerar o início da temporada cíclica na égua quando comparada à iluminação artificial em baia e ao uso das máscaras de led-azul.

Palavras-chave: sulpirida, sazonalidade, ovulação

CONGRESSO REPROLAB DE REPRODUÇÃO EQUINA



PATROCÍNIO

Patrocinadores Associados



APOIO

