



Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Departamento de Medicina Veterinária
Graduação em Medicina Veterinária

Ana Carolina Osse Mazaia

Transferência de Embriões em éguas cíclicas e acíclicas

Trabalho de Conclusão de Curso

Botucatu

2021

Ana Carolina Osse Mazaia

Transferência de Embriões em éguas cíclicas e acíclicas

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Graduação de Medicina Veterinária, da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Graduanda em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique de Araújo Machado

Co-orientador: Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa

Botucatu

2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Mazaia, Ana Carolina Osse.

Transferência de embriões em éguas cíclicas e acíclicas
/ Ana Carolina Osse Mazaia. - Botucatu, 2022

Trabalho de conclusão de curso (licenciatura - Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Luiz Henrique de Araújo Machado

Coorientador: Frederico Ozanam Papa

Capes: 50504037

1. Biotecnologia. 2. Éguas. 3. Transferência de embriões.

Palavras-chave: Biotecnologia; Éguas acíclicas; Éguas cíclicas; Transferência de embrião.

Dedicatória...

Dedico este trabalho ao meu avô, pelo exemplo de coragem e simplicidade; a todos os professores da graduação, que foram de fundamental importância no desenvolvimento da minha vida profissional. Ao professor Luiz Henrique de Araújo Machado pelos conselhos e por me orientar durante esse trabalho; e ao professor Frederico Ozanam Papa pelos ensinamentos passados a mim que foram essenciais para o desenvolvimento deste projeto.

Agradecimentos

O desenvolvimento deste trabalho de conclusão de curso contou com a ajuda de diversas pessoas ao longo dos anos, dentre as quais agradeço:

Aos professores Luiz Henrique de Araújo Machado e Frederico Ozanam Papa, que durante 8 meses me orientaram e acompanharam pontualmente, dando todo o auxílio necessário para a elaboração do projeto.

Aos professores do curso de Medicina Veterinária, mas também a todos aqueles que já cruzaram minha vida, pois foi através dos seus ensinamentos que eu pude hoje estar concluindo este trabalho.

Aos meus pais que foram minha base e meus maiores incentivadores durante toda a graduação, sempre me apoiando quando o desânimo e as inseguranças faziam morada em meus pensamentos, não permitindo que eu desistisse.

Aos meus amigos, pela compreensão das ausências e pelo afastamento temporário e ao meu cachorro Bradock que sempre estava por perto quando eu precisava de uma dose de ânimo.

"Nunca se deve deixar prosseguir uma crise para escapar a uma guerra, mesmo porque dela não se foge, mas apenas se adia para desvantagem própria".

(Nicolau Maquiavel)

Resumo

A espécie equina sempre teve incontestável importância, porém sempre houve dificuldades no meio reprodutivo dessa espécie que eram vistos como obstáculos. Ao longo dos anos as dificuldades foram solucionadas com a evolução das biotécnicas reprodutivas. Este trabalho visa descrever uma dessas biotecnologias, a transferência de embriões, a qual pode ser realizada tanto em éguas cíclicas, quanto em éguas consideradas acíclicas.

Palavras chave: “biotecnologia”, “transferência de embriões”, “éguas cíclicas e acíclicas”.

Abstract

The equine species was always indisputably important, however, there were always difficulties in the reproduction of that species that were seen as obstacles. Over the years, those difficulties were solved by the evolution of reproductive biotechnology techniques. This paper intends to describe one of these biotechnologies that is the embryo transfer, which can be performed both in cyclic mares and mares considered acyclic.

Key words: "biotechnology", "embryo transfer", "cyclic and acyclic mares".

Lista de ilustrações

Figura 1 – Representação hormonal do ciclo estral da égua	12
Figura 2 – Colheita não cirúrgica de embriões com cateter de silicone	15

Lista de tabelas

Tabela 1 – Critérios de classificação dos embriões quanto a qualidade morfológica 16

Sumário

1	Introdução	10
2	Revisão da Literatura	11
3	Conclusão	17
4	Referências	18

1. Introdução

Os equinos são indispensáveis para o agronegócio brasileiro, sendo o rebanho nacional constituído por aproximadamente 5.000.000 de cabeças, que desempenham diversas funções, apenas o trabalho nas fazendas de gado pantaneiro e nos pampas gaúcho somam 3.900.000 cabeças. A agroindústria dos equinos gera 3,2 milhões de empregos em todo país, na comercialização dos animais, na produção de arreios, rações e medicamentos, gerando um faturamento bruto de aproximadamente 16 bilhões de reais por ano (IBGE, 2008). O crescimento econômico ocorreu devido ao aumento da atividade equestre em áreas como do trabalho, turismo, provas, festas de rodeio e lazer. Outra atividade importante desempenhada pelos equinos, refere-se a hipoterapia com crianças portadoras de deficiências motoras e psicossociais, como atraso mental, autismo e outras. Os equinos também desempenham papel importante na produção de soros antiofídicos e, atualmente, tem auxiliado na produção de soro anti-Covid, que contribui no tratamento e recuperação de pessoas acometidas pelo vírus da COVID 19.

O aumento da procura e criação desses animais ao longo dos anos favoreceu o investimento em biotecnologias que facilitam e ajudam na reprodução dessa espécie, já que esta sempre foi considerada por muitos como a de menor fertilidade entre as espécies de animais domésticos. Portanto, com o passar dos anos foram aplicadas biotecnologias que visavam melhorar as taxas de prenhez e a reprodução em geral desses animais. Dentre essas biotecnologias a transferência de embriões, cujo primeiro relato de sucesso ocorreu no Japão na década de 70 (Oguri e Tsutsumi, 1972), foi aprimorada, até alcançar os resultados satisfatórios publicados nesta última década, sendo o Brasil um dos países que faz o maior número de transferências de embriões equinos no mundo.

A transferência de embriões é usada como forma de aproveitar melhor o potencial genético da égua, gerando mais embriões e transferindo para outras éguas que exercem o papel de receptoras. Dessa forma a técnica possibilita que a doadora não seja retirada das suas atividades durante o período de gestação, além de aumentar o número de produtos que podem ser obtidos da mesma doadora (Hurtgen, 2008). Existem diversos protocolos de sincronização de estro entre doadoras e receptoras utilizados no meio da reprodução, mas serão abordados neste trabalho apenas os que

são aplicados em casos de fêmeas que estão ciclando e aquelas que não estão ciclando, também chamadas de acíclicas.

A proposta deste estudo é descrever como é realizada a transferência de embriões em éguas que estão ciclando e éguas consideradas anovulatórias. Será abordada a fisiologia reprodutiva das éguas e toda técnica de transferência, desde como são escolhidas as éguas para o procedimento, como é realizada a sincronização do estro e até como é feita a colheita, seleção e processamento dos embriões para serem transferidos.

2. Revisão da Literatura

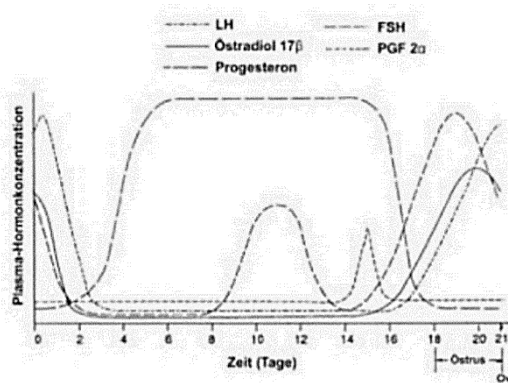
2.1. Fisiologia reprodutiva das éguas

As éguas, em sua maioria, são consideradas poliéstricas sazonais, isso significa que o ciclo estral da égua é orientado pela variação do fotoperíodo, uma vez que essa variação influencia o eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. Esse processo ocorre devido a captação de luz por receptores presentes na retina, que por sua vez estimulam o eixo pineal-hipotalâmico-hipofisário-gonadal reduzindo a produção de melatonina e com essa redução ocorre o aumento da produção e secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) no hipotálamo. O GnRH tem seu sítio de atuação na hipófise anterior, onde induz a produção e liberação do FSH e LH, que por sua vez atuam no ovário determinando o desenvolvimento folicular e a ovulação. A secreção ovulatória de LH é prolongada, ela possui o aumento gradual durante o cio e atinge o pico um dia depois da ovulação (Hafez e Hafez, 2004; Ley, 2006).

Apesar de algumas éguas ciclarem o ano inteiro, elas não emprenham em todos os períodos estrais, pois o cio acompanhado da ovulação só ocorre durante a estação reprodutiva, já os períodos transitórios são caracterizados pelo crescimento dos folículos ovulatórios até um limite e depois estes entram em atresia. Porém, algumas de fato podem ficar prenhes em qualquer época do ano, pois o início da estação reprodutiva também está associado com o manejo da fêmea, um exemplo disso é que as fêmeas que se alimentam a pasto normalmente se reproduzem no verão e apresentam o anestro no inverno, mas aquelas que são bem alimentadas e estabuladas podem ciclar o ano inteiro (Hafez e Hafez, 2004). O ciclo das éguas possui duração muito variável, tanto de éguas para éguas quanto entre os cios da

mesma égua, em média apresentam duração de 21 a 22 dias, sendo 14 dias no diestro, predomínio da progesterona e 7 dias no estro (Hafez e Hafez, 2004).

Figura 1: Representação da variação hormonal no ciclo estral da égua



Fonte: Morel, 2003

2.2 Escolha das éguas

Essa etapa é extremamente importante para que seja entregue um produto de qualidade para o proprietário, pois a qualidade do potro depende da seleção correta tanto da doadora quanto das receptoras. Portanto, deve-se avaliar ambas para verificar se possuem as características necessárias para realizar a transferência.

As doadoras geralmente são éguas de grande valor zootécnico e comercial, a escolha dessas fêmeas se refere ao valor do potro o qual elas podem produzir. Porém, existem outros fatores que influenciam as escolhas das doadoras, como a idade, o histórico reprodutivo e a quantidade de gestações desejadas (Vanderwall et al.; Squires et al., 1999). Essas éguas devem ser constantemente examinadas até a observação do cio, quando este for detectado passam a ser examinadas diariamente, monitorando o crescimento folicular, dessa forma é possível identificar o melhor momento para que ocorra a inseminação dessa égua. O ideal é que para cada doadora tenhamos duas receptoras, para que na hora da inováção possamos escolher a receptora com melhores condições reprodutivas (Carnevale, 2000; Vanderwall e Woods, 2007).

A escolha de uma boa receptora é de suma importância para esse procedimento, o que pode ir contra a realidade que encontramos nas propriedades na prática, pois a receptora é quem será responsável por gestar e manter o embrião valioso da doadora. Dessa forma a receptora deve ter características boas para ser selecionada, além de ser monitorada pela ultrassonografia transretal a fim de avaliar o útero e os ovários buscando possíveis anormalidades (Meira, 2007). Para selecionar uma boa receptora

esta deve apresentar bom histórico reprodutivo, escore de condição corporal adequado, bom desenvolvimento mamário, idade ideal entre 4 e 10 anos, ausência de anormalidades reprodutivas e ter boa índole (Vanderwall, 2000 e Fleury, 2007).

Após selecionar corretamente as éguas desejadas, é possível iniciar a sincronização do ciclo estral entre as éguas, esta etapa é essencial para que todo o processo de transferência ocorra de forma correta.

2.3. Sincronização do Cio em éguas cíclicas

Para que o processo de sincronização seja iniciado de forma adequada ambas as éguas devem estar entre o 6º e 14º dia do diestro, sendo avaliadas através da ultrassonografia diariamente, a fim de acompanhar o crescimento folicular (Allen, 2001; Duchamp et al., 1987). Existem duas formas de realizar a sincronização, inibir a secreção de LH ou encurtar o tempo de vida do corpo lúteo (Hafez & Hafez, 2004).

A ovulação da receptora deve ser induzida dentro de dois dias da inseminação da doadora, com a aplicação de hCG ou GnRH. É uma técnica simples na qual administra-se em dose única com injeção intramuscular de PGF2 α na receptora e em 24h ou 48h realiza-se a mesma aplicação na doadora; ou também é possível realizar outro tratamento de aproximadamente 10 dias tanto nas receptoras quanto nas doadoras. Nesse tratamento utilizamos progesterona injetável em ambas as éguas, mantendo o espaçamento de 1 ou 2 dias citado anteriormente, e no último dia aplica-se uma injeção de prostaglandina com a finalidade de induzir a luteólise, após essa aplicação as éguas apresentarão o cio em 3 dias (Driancourt & Palmer 1982; Bergfelt, 2000).

2.4. Sincronização do Cio em éguas acíclicas

As éguas acíclicas são aquelas que estão no período de anestro ou de transição e a sincronização dos estros dessas éguas deve ser realizada com estrógeno e progesterona. O estrógeno é administrado para simular a condição do estro e estimular a ação dos receptores de progesterona no útero. Após o período de 24h a 48h da aplicação de estrógeno deve-se verificar se houve edema uterino com a ultrassonografia transretal, quando confirmado o edema realiza-se a administração da progesterona, 4 a 8 dias após a última aplicação já pode ser realizada a transferência do embrião (Bringel et al.).

Depois da realização da transferência a progesterona deve ser reaplicada a cada 7 dias durante 120 dias, com a finalidade de manter a gestação e evitar possíveis abortos. Ao realizar este protocolo de aplicação de progesterona de forma correta o resultado da taxa de gestação em éguas cíclicas e acíclicas não se apresenta muito diferente (Bringel et al.).

2.5 Colheita e avaliação dos embriões

Após a sincronização das éguas sejam elas cíclicas ou acíclicas a próxima etapa é a colheita dos embriões e a sua avaliação para verificar a viabilidade. A coleta é realizada com um equipamento próprio que é constituído por uma sonda de silicone com balonete na ponta, o período ideal para realizar o procedimento é entre o dia 7 e 8 após a fertilização da doadora (Squires & Seidel, 1995). A colheita é um procedimento não cirúrgico e pouco invasivo, a técnica para sua realização é relativamente simples.

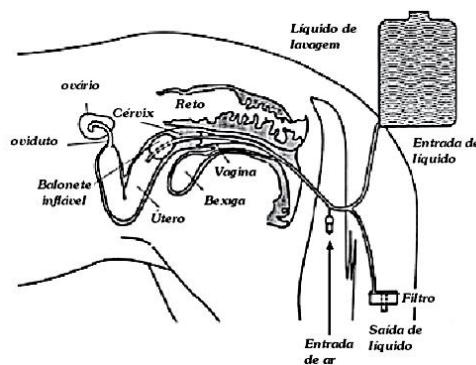
Primeiro realiza-se a palpação vaginal da égua doadora para auxiliar na passagem da sonda de silicone pelo óstio cervical, com a certeza de que a sonda está dentro do útero o balonete é inflado com 40 ml de ar e a mão é retirada da vagina para dar início à segunda etapa do processo. Nesse momento palpa-se a égua por via retal e inicia-se a infusão de ringer lactato, geralmente é infundido 1L, mas dependendo do tamanho da égua podem ser utilizados até 2L. A palpação é necessária para verificar o quão cheio o útero está, após a total infusão do ringer lactato é acoplado o copo coletor com filtro de 0,75 µm na ponta externa da sonda de colheita e inicia-se a drenagem da solução, esse processo pode ser repetido até três vezes. Depois de recuperar a maior parte da solução que foi infundida, desacoplamos o copo coletor, desinflamos o balonete e retiramos a sonda de silicone. A próxima etapa consiste em identificar a presença do embrião e sinais de sua viabilidade (Daels, 2007; Vanderwall, 2000).

Se o embrião foi recuperado em D8 é possível observá-lo a olho nu no copo coletor, porém se esse processo for realizado antes desse período será necessário um Estereomicroscópio, também chamado de lupa, para identificá-lo. Para utilizar esse equipamento colocamos o líquido que estava retido no copo dentro de uma placa de petri, a qual deve estar riscada para facilitar a identificação do quadrante que se encontra o embrião, coloca-se a placa no estereomicroscópio no aumento de 10x e

inicia-se o exame. Após a localização, o embrião deve ser aspirado com uma palheta acoplada a uma seringa de 1ml ou com uma pipeta de 10µl e transferido para uma placa menor que contém um meio específico para a manutenção do embrião. Depois da transferência do embrião para a placa menor deve-se realizar a classificação de estádio de desenvolvimento do embrião com a lupa no aumento de 40x, essa classificação deve seguir as recomendações da International Embryo Transfer Society.

Além de classificar o embrião quanto ao desenvolvimento, também deve-se avaliar sua qualidade morfológica, utilizando uma escala de 1-5 que avalia formato, coloração, simetria, integridade da zona pelúcida e extrusão celular (McKinnon & Squires 1988). A qualidade dos embriões determinada por esta avaliação está diretamente relacionada com a taxa de sucesso da T.E., como citado por Squires e Seidel, embriões com escore menor que três ou que possuem anormalidades apresentam baixa taxa de prenhez. Após a realização da classificação e avaliação, o embrião passa por alguns procedimentos, que serão descritos no próximo item, com a finalidade de estar pronto para a sua transferência de fato.

Figura 2 – Coleta não cirúrgica de embriões com cateter de silicone inserido. A sonda de coleta ligada à solução de lavagem e ao filtro coletor está representada.



Fonte: Vanderwall, 2000

2.6 Manipulação do embrião e sua transferência

Para que o embrião esteja preparado para sua transferência ele passa por uma lavagem cuidadosa, a manipulação deve ser realizada por um veterinário.

A preparação para a lavagem deve ser realizada com a deposição de dez gotas do meio de manutenção numa placa de petri, o embrião é lavado em dez passagens consecutivas no meio, sendo essas lavagens da seguinte forma: o embrião é

mergulhado com a pipeta na primeira gota, depois é aspirado novamente e isso é repetido nas demais gotas. Esse procedimento é realizado com a finalidade de limpar a zona pelúcida de impurezas (Fleury et al., 2001; Camilo et al., 2003; Daels, 2007).

Após a lavagem completa deve ser preparada a palheta de inovulação, montada de forma cautelosa sempre deixando frações alternadas de meio de manutenção e ar, visando reduzir a movimentação do embrião e, facilitar a expulsão no momento da transferência (Silva, 2003).

A transferência já foi um procedimento cirúrgico no seu início, no qual realizavam uma incisão no flanco da égua para depositar o embrião, entretanto com o avanço de novos estudos o procedimento utilizado atualmente é não cirúrgico (Fleury et al., 2007). Essa técnica é rápida, possui alto grau de prenhez e sua complexidade é relativamente baixa, ela consiste em depositar o embrião no corpo do útero com uma pipeta de inseminação que consiga atravessar a cérvix da égua.

Tabela 1: Critérios de classificação de qualidade dos embriões

Classificação	Qualidade
Grau 1: Excelente	Embriões esféricos; com tamanho, textura e cor uniformes.
Grau 2: Bom	Embriões com poucas imperfeições, poucos blastômeros extrusos, algumas células degeneradas ou com a blastocle colapsada.
Grau 3: Razoável	Embriões com problemas não muito severos de blastômeros extrusos, células degeneradas ou blastocle colapsada.
Grau 4: Pobre	Embriões com a blastocle colapsada, muitos blastômeros extrusos e células degeneradas; mas com a massa embrionária com a aparência viável.
Grau 5: Degenerado	Embrião totalmente degenerado ou oócito não fecundado.

Fonte: McKinnon & Squires, 1988

3. Conclusão

Com este trabalho foi possível analisar toda técnica de como realizar uma transferência de embrião, desde a escolha das éguas até a deposição do embrião no útero da receptora, discorrendo a respeito das diferenças entre a preparação hormonal das éguas cíclicas e das acíclicas.

Essa biotecnologia é extremamente importante para a chamada indústria equina, por oferecer um melhor aproveitamento do potencial reprodutivo da égua sem que suas atividades sejam prejudicadas. Com ela podemos potencializar o número de produtos de excelente qualidade, o que é atrativo aos criadores desses animais.

Por mais que atualmente as taxas de sucesso sejam altas ainda há muito o que se discutir a respeito de possíveis melhorias das taxas de prenhez por esse procedimento. A possibilidade de estudar novos protocolos é vasta e o mercado para esses estudos é extremamente promissor, além de que se pode associar essa técnica com a superovulação das éguas.

4. Referências

- Bergefelt D.R. 1999. Estrous synchronization, p.229-246. In: Samper J.C. (Ed) Equine breeding management and artificial insemination. Saunders Comp., Pennsylvania.
- Bringel BA, Jacon JCF, Zimmerman M, Alvarenga MA, Douglas RH. Biorelease progesterone LA 150 and its application to overcome effects of premature luteolysis on progesterone levels in mares. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 2003;27:498-500.
- Carnevale E.M., Ramirez R.J., Squires E.L., Alvarenga M.A., Vanderwall D.K. & McCue P.E. 2000. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine Embryo transfer. *Theriogenology* 54:965-979.
- Daels P. 2007. Embryo transfer tips and tricks. *Proceedings 5th European Veterinary Conference, Voorjaarsdagen, Amsterdam*, p.213-215.
- Driancourt M.A. & Palmer E. 1982. Seasonal and individual effects on ovarian and endocrine responses of mares to a synchronization treatment with progestagen-impregnated vaginal sponges. *J. Reprod. Fertil.* 32:283-291.
- Fleury J.J., Pinto A.J., Marques A., Lima C.G. & Arruda R.P. 2001. Fatores que afetam a recuperação embrionária e os índices de prenhez após transferência transcervical em eqüinos da raça Mangalarga. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 38:29-33.
- Fleury P.D.C., Alonso M.A., Sousa F.A.C., Andrade A.F.C. & Arruda R.P. 2007. Uso da gonadotrofina coriônica humana (hCG) visando melhorar as características reprodutivas e fertilidade de receptoras de embriões eqüinos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 31:27-31.
- Hafez e Hafez, 2004
- Hurtgen J.P. 2008. Management of embryo donor mares with chronic infertility. *Proceedings 54th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, San Diego, California*. P.414-417.
- LEY, M.B.; *Reprodução em Éguas para veterinários de eqüinos*, 1ª Ed. Roca, São Paulo, 2006, p.184-191.
- McKinnon A.O., Squires E.L. & Carnevale E.M. 1988. Ovariectomized steroid-treated mares as embryo transfer recipients and as a model to study the role of progestins in pregnancy maintenance. *Theriogenology* 29:1055-1063.
- Meira, C. *Endocrinologia da Reprodução, Dinâmica Folicular, Superovulação e Transferência de Embriões na Espécie Equina* 2007. (Área da Reprodução) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Botucatu, SP.
- Oguri N. & Tsutsumi Y. 1972. Recuperação não cirúrgica de embriões e tentativa não cirúrgica de transferência de embriões em cavalos. *J. Reprod. Fertil.* 31:187-195.

Squires E.L., McCue P.M. & Vanderwall D.K. 1999. The current status of equine Embryo transfer. *Theriogenology* 51:91-104

Silva L.A. 2003. Técnica ultra-sonográfica de injeção intrauterina para transferência de embriões em eqüinos. Tese (Pósgraduação em Medicina Veterinária), Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa- MG, Brasil, 145 p.

Squires E.L. & Seidel G.E. 1995. Collection and transfer of equine embryos. *Animal Reproduction Biotechnology Laboratory Bulletin*. Colorado State University, Fort Collins. p.397.

Vanderwall D.K. 2000. Current Equine Embryo Transfer Techniques. In: Ball B.A. (Ed.) *Recent Advances in Equine Theriogenology*. International Veterinary Information Service.

Vanderwall D.K. & Woods G.L. 2007. Embryo transfer and newer assisted reproductive techniques for horses, p 211-219. In: Youngquist R.S. & Threlfall W.R. (Eds) *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. Saunders, Missouri.