



Manual técnico

ACOMPANHAMENTO REPRODUTIVO EM ÉGUAS E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES



COLEÇÃO C3I

Nº13

Índice

1. Anatomia reprodutiva da égua.....	3
2. Fisiologia reprodutiva da égua	10
3. Exame reprodutivo na égua	14
3.1. Exame físico reprodutivo.....	14
3.2. Exame ecográfico	23
4. Transferência de embriões.....	31
4.1 Preparação, sincronização e inseminação das éguas.....	33
4.2 Recolha e transferência do embrião	38
Bibliografia.....	49

FICHA TÉCNICA

Título: Manual técnico - Acompanhamento reprodutivo em éguas e transferência de embriões

Autores: Carolina Silva¹, José Ortiz², Rute Santos¹, Miguel Minas¹

1 – Escola Superior Agrária de Elvas, Instituto Politécnico de Portalegre

2 – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade da Extremadura

Edição: Instituto Politécnico de Portalegre, Coleção C3i nº 13

ISBN: 978-989-8806-37-6

Data de edição: 2020

COFINANCIAMENTO:

Projeto ALTBioTech RepGen: ALT20-03-0246-FEDER-000021

Agradecimentos

Aos colegas do Laboratório de Reprodução Equina da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade da Extremadura

Projeto ALTBioTech RepGen – Recursos Genéticos Animais e Biotecnologias: Projeção para o futuro

Neste projeto pretende-se transmitir conhecimentos científicos e tecnológicos nas áreas das biotecnologias, reprodução e genética animal aos diversos agentes do sector agropecuário, melhorando a produtividade e a competitividade das empresas agrícolas. Mais especificamente, pretende-se contribuir para a melhoria da eficiência dos programas de conservação das raças domésticas autóctones e dos programas de melhoramento genético das raças, promovendo igualmente a transferência de conhecimento entre a investigação e o setor agrícola Alentejano.

O presente manual encontra-se focado na espécie equina, procurando fornecer informação prática sobre o acompanhamento reprodutivo na fêmea e a implantação de um programa de transferência de embriões.

Líder do projeto: Instituto Nacional de Investigação Agrária e Veterinária

Parceiros: Instituto Politécnico de Santarém, Instituto Politécnico de Portalegre, Associação de Agricultores do Sul

1. Anatomia reprodutiva da égua

O sistema reprodutor da égua pode ser separado em dois tipos de órgãos: os órgãos, internos e externos, relacionados diretamente com a função reprodutiva; e os órgãos responsáveis pela integração dos estímulos nervosos e controlo endócrino. No presente capítulo procederemos à descrição dos órgãos reprodutores externos e internos. No sentido caudocranial podemos identificar, como principais órgãos do sistema reprodutor da égua:

- **Vulva** – abertura terminal do trato genitourinário, a cerca de 6 cm do ânus. Mede aproximadamente 12-15 cm, desde a comissura dorsal até a comissura ventral (fig. 1).

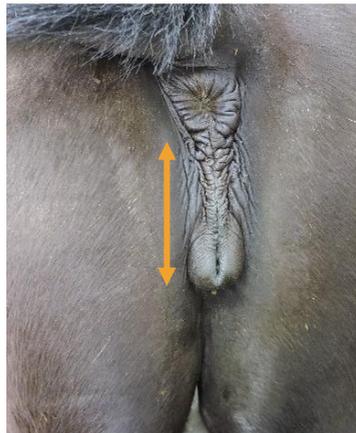


Figura 1. Conformação vulvar adequada em égua, onde se assinala o comprimento total desde a comissura dorsal até à comissura ventral vulvar.

É fundamental o correto encerramento dos lábios vulvares, na medida em que estes constituem a primeira barreira de proteção à entrada de microrganismos e possível desenvolvimento de patologias (fig. 2).



Figura 2. Conformação vulvar inadequada em égua.

Cranialmente à comissura ventral da vulva localiza-se o clitóris, rodeado dorsalmente por três seios clitoridianos e ventralmente pela fossa do clitóris (fig. 3). Os seios e a fossa são locais frequentemente utilizados para a colheita de amostras para análise bacteriana – *Taylorella equigenitalis* (agente da metrite

contagiosa equina – doença de declaração obrigatória)
(Blanchard, et al., 2003);



Figura 3. Exposição de clitóris, seios clitoridianos (1) e fossa do clitóris (2).

Vestíbulo – porção caudal à vagina de cerca de 10-12cm, separada da mesma através da prega transversa, onde se encontra o orifício uretral externo (fig. 4). O vestíbulo é responsável pela produção glandular do trato reprodutivo posterior, e pela formação do anel ou prega vestíbulo-vaginal, que protege a vagina cranial da entrada de microrganismos (Blanchard, et al., 2003);

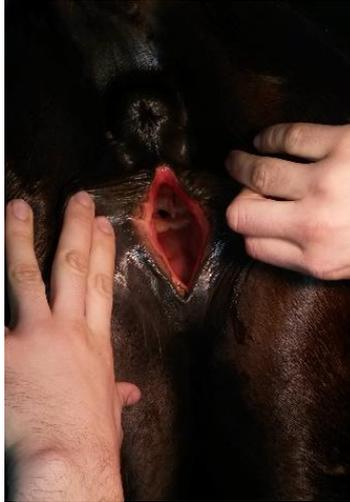


Figura 4. Vestíbulo e prega transversa vestibular

- **Vagina** – cavidade tubular virtual de aproximadamente 15-20cm (fig. 5) que se encontra nas cavidades peritoneal e retroperitoneal. A vagina possui um epitélio escamoso estratificado que protege a mucosa da entrada do pénis. Poderá ser sede de patologias tais como a pneumovagina – preenchimento da cavidade com ar, e a urovagina – preenchimento com urina, que irão alterar a fertilidade da égua (Blanchard, et al., 2003);



Figura 5. Vagina e cérvix visualizados através de espéculo

- **Colo ou cérvix** – esfíncter tubular de aproximadamente 6 cm que se projeta na vagina, rodeado pelo fórnix (fig. 6). Contém glândulas que produzem muco cuja composição varia consoante a fase do ciclo éstrico. O cérvix possui pregas longitudinais contínuas com as pregas uterinas, que se expandem no momento da cópula para permitir a entrada do pénis (Blanchard, et al., 2003);



Figura 6. Cérvix e fórnix visualizados por endoscopia

- **Útero** – em forma de Y, composto pelo corpo uterino, onde ocorre a deposição do sémen de equino, e os cornos uterinos, onde ocorre a implantação do embrião. O útero equino, com cerca de 40cm de comprimento, está suspenso nas cavidades pélvica e abdominal através do ligamento largo uterino – mesométrio, onde se encontram as artérias vaginal, uterina e ovárica, e veias correspondentes. Este órgão é constituído pelas duas camadas musculares do miométrio e pela camada mucosa do endométrio, composta por pregas de glândulas secretórias (Blanchard, et al., 2003);
- **Oviduto ou trompa de Falópio** – composto por união útero-tubária, istmo, ampola e infundíbulo. Local onde ocorre a

movimentação dos espermatozoides, a fecundação e a movimentação do embrião, através do movimento ciliar da sua mucosa. Une-se com o útero na papila ovárica (fig. 7) (Blanchard, et al., 2003);

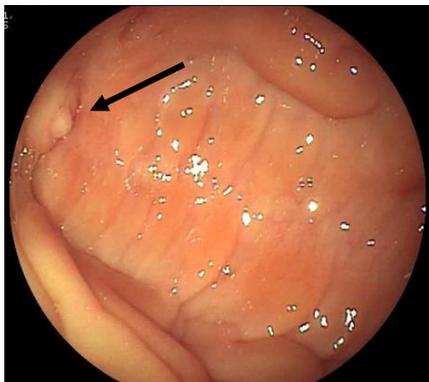


Figura 7. Papila ovárica (seta) visualizada por endoscopia

- **Ovário** – localizado na zona sublombar, caudolateral ao rim, sendo o ovário esquerdo mais caudal que o direito. Encontra-se fixo pelo ligamento suspensório e é responsável pela função exócrina (produção de gâmetas) e endócrina (produção de hormonas). O ovário da égua caracteriza-se pela inversão entre o córtex e a medula, resultando na existência da fossa de ovulação: local específico onde ocorre a rotura do folículo pré-ovulatório (Blanchard, et al., 2003).

2. Fisiologia reprodutiva da égua

Os equinos são uma espécie poliéstrica sazonal de fotoperiodismo positivo e esta sazonalidade é bastante marcada na fêmea. Durante a primavera e verão a égua não gestante repete ciclos éstricos de aproximadamente 21 dias de duração, divididos em fase folicular ou estro (14 dias) e fase luteal ou diestro (7 dias). O estro é caracterizado pelo crescimento folicular e produção de estrogénios, motivando a recetividade ao macho (fig. 8), e termina com a ovulação. Os principais sinais de recetividade sexual na égua consistem na elevação e lateralização da cauda, exposição do clitóris, micção frequente, descida da pélvis e abdução dos membros posteriores.



Figura 8. Égua em estro apresentando sinais de recetividade sexual

O diestro caracteriza-se pela cessação da receptividade sexual (fig. 9) e pela produção ativa de progesterona por parte do corpo lúteo/amarelo, formado após a ovulação. Caso não tenha ocorrido fecundação, a fase luteal termina com a produção de prostaglandina F2 alfa ($\text{PGF}2\alpha$) uterina, que causa a eliminação do corpo lúteo e início de nova fase folicular. Caso a égua se encontre gestante, o útero não produzirá a hormona $\text{PGF}2\alpha$ e, portanto, o corpo lúteo será mantido, mantendo a concentração sérica de progesterona favorável à gestação (Blanchard, et al., 2003).



Figura 9. Égua sexualmente não receptiva a garanhão

Durante os meses de outono e inverno, em que os dias são mais curtos, a égua normalmente deixa de exibir atividade cíclica, entrando em anestro. No início e no final da época reprodutiva, a égua encontra-se em época de transição, em que é frequente o aparecimento de ciclos éstricos irregulares sem ocorrência de ovulação (Blanchard, et al., 2003).

Os órgãos responsáveis pelo controlo endócrino do sistema reprodutor e integração de estímulos nervosos na égua são os seguintes:

- **Glândula pineal** – realiza a produção de melatonina maioritariamente no período noturno, regulando o ritmo circadiano do animal. No caso dos equinos esta hormona é antagonizadora, atuando diretamente sobre o hipotálamo: os níveis elevados de melatonina nos dias de inverno bloqueiam a função reprodutiva, e os níveis mais reduzidos existentes na primavera/verão estimulam o sistema reprodutor;
- **Hipotálamo** – estrutura neuroendócrina responsável pela produção da hormona libertadora de gonadotropinas (GnRH), que atua diretamente sobre a adenohipófise, estimulando a produção das gonadotropinas;

- **Hipófise** – produz as gonadotropinas foliculoestimulante (FSH) e luteinizante (LH), que são libertadas na circulação sistémica e atuam diretamente sobre as gónadas. No ovário, a hormona FSH é responsável pelo recrutamento e crescimento folicular, enquanto que a hormona LH é responsável pela maturação do folículo dominante, ovulação e manutenção do corpo lúteo;
- **Ovários** – responsáveis pela produção de estrogénios, por parte dos folículos, e da progesterona, por parte dos corpos lúteos (Blanchard, et al., 2003).

3. Exame reprodutivo na égua

O exame reprodutivo deve ser executado após a correta realização da anamnese e do exame físico geral, incluindo auscultação do animal e monitorização de constantes fisiológicas. É igualmente fundamental a recolha de dados sobre a condição corporal, a idade, o comportamento habitual em estro, pré e pós-parto, as durações de gestação anteriores, a ocorrência prévia de partos distócicos ou outros fatores relevantes da vida reprodutiva da égua.

3.1. Exame físico reprodutivo

Antes da realização do exame físico ao aparelho reprodutor da égua é necessário que o animal esteja contido de forma adequada, de acordo com o seu caráter e imprevisibilidade. Idealmente deve utilizar-se um tronco de contenção (fig. 10), ainda que existam outras alternativas como peias (fig. 11) ou a utilização de sedativos.



Figura 10. Tronco de contenção para equino



Figura 11. Égua contida com peias

Antes da realização da palpação retal, deve realizar-se um exame reprodutivo externo que inclua a avaliação da conformação vulvar da égua. A importância deste parâmetro reside no fato de a vulva consistir na primeira barreira física à entrada de microrganismos na vagina e posteriormente no útero. Quaisquer alterações vulvares presentes, tais como lacerações ou abscessos, devem ser registadas e tratadas médica ou cirurgicamente. A conformação vulvar é também calculada de acordo com o índice de Caslick, um parâmetro que resulta da multiplicação do comprimento da vulva que se encontra superior ao pavimento isquiático pelo ângulo de inclinação em que a própria vulva se encontra. Um índice de Caslick superior a 150 (fig. 12) significa que a égua necessitará uma vulvoplastia (sutura de Caslick), para prevenir problemas de fertilidade (Blanchard, et al., 2003; McKinnon, Squires, Vaala, & Varner, 2011).



Figura 12. Conformação vulvar correspondente a um índice de Caslick superior a 150

Para a realização da palpação retal, a cauda da égua deve ser fixada verticalmente, de forma a facilitar a entrada do braço do técnico (fig. 13) e é fundamental a utilização de lubrificante e luvas de palpação retal (fig. 14) de forma a limitar o atrito e prevenir qualquer laceração da mucosa retal.



Figura 13. Égua colocada em tronco de contenção com fixação da cauda.



Figura 14. Colocação de lubrificante em luva de palpação retal

O técnico deverá colocar a mão em cone e introduzi-la lentamente através do esfíncter anal, tendo extrema precaução em todas as manipulações que realiza internamente, devido ao risco de perfuração retal. As fezes devem ser removidas do reto e cólon distal, de forma a poder-se palpar posteriormente as estruturas presentes nas cavidades pélvica e abdominal. Para um correto exame do aparelho reprodutor é importante identificar inicialmente as referências anatómicas de localização constante, tais como o assoalho pélvico, e posteriormente ir avançando cranialmente até detetar o cérvix, o corpo e cornos uterinos, e finalmente os ovários (fig. 15).

É possível detetar, através da palpação, alterações na consistência do cérvix, corpo e cornos uterinos, assim como intuir sobre a dimensão e estruturas presentes em cada ovário. A posição de cada órgão poderá variar bastante, consoante a condição corporal, idade, época do ano, estado reprodutivo da égua (gestante ou não), o número de partos anteriores ou o conteúdo vesical e retal (Blanchard, et al., 2003; McKinnon, Squires, Vaala, & Varner, 2011).

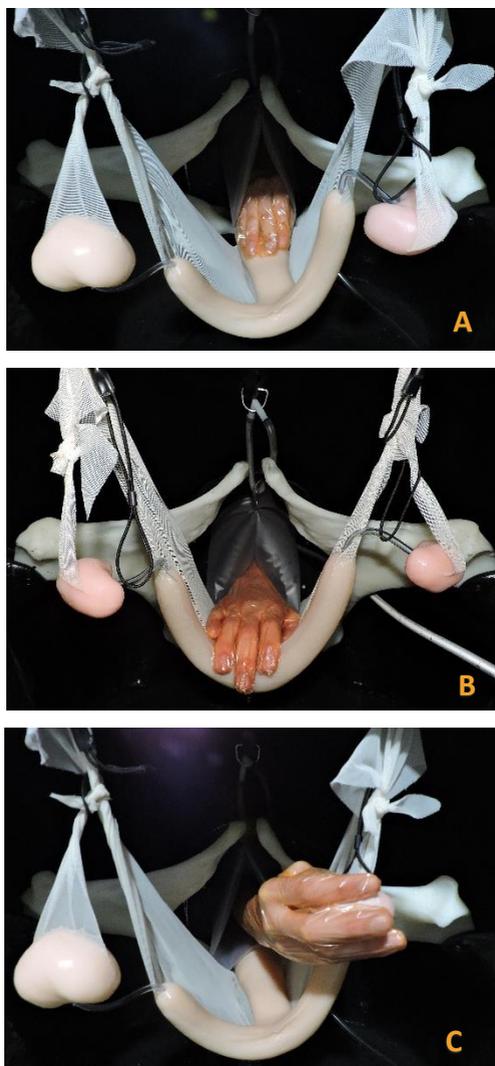


Figura 15. Simulação de palpação retal em modelo anatómico de égua, com palpação de cérvis (A), bifurcação uterina (B) e ovário esquerdo (C).

Como prova complementar à palpação retal é possível realizar uma vaginoscopia, que permite visualizar diretamente a mucosa vaginal, assim como o colo uterino, através da colocação de um espéculo. Esta estrutura altera o seu tónus e diâmetro consoante a fase do ciclo éstrico em que a égua se encontra: durante o estro, o cérvix possui um diâmetro maior e a sua consistência encontra-se diminuída (fig. 16), possibilitando a hipotética entrada do pénis no útero da égua; durante o diestro e anestro o cérvix está encerrado, possuindo uma consistência aumentada e um menor diâmetro (fig. 17) (Blanchard, et al., 2003).



Figura 16. Cérvix em estro visualizado através de espéculo

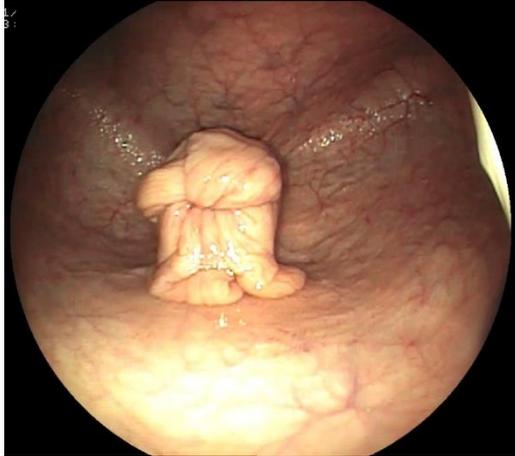


Figura 17. Cérvix em diestro visualizado por endoscopia

Como conselhos interessantes para a realização da palpação retal, enumeram-se os seguintes: poderá ser bastante vantajoso aprender a realizar palpação com ambas mãos, sobretudo quando o volume de animais a palpar é elevado; é fundamental realizar uma boa recolha de história pregressa reprodutiva, de forma a saber que parâmetros são habituais no animal que se está a acompanhar; é imprescindível realizar uma avaliação crítica e objetiva da segurança, para o animal, para o ajudante ou operador responsável pela contenção e para o técnico que se encontra a realizar a palpação retal; é importante compreender que poderão ocorrer alterações transitórias a nível da localização dos diferentes órgãos, pelo que aguardar ou inclusive

passar o animal poderão ser boas opções; a visualização de sangue na luva de palpação é motivo de paragem completa do exame reprodutivo, devido aos riscos associados.

3.2. Exame ecográfico

O exame ecográfico consiste na principal ferramenta de diagnóstico utilizada na clínica reprodutiva de equinos, tendo sido amplamente utilizada desde os anos 80. Tipicamente, é utilizada a ultrassonografia em modo B, que permite obter em tempo real uma imagem bidimensional em escala de cinzentos, dos tecidos moles que são atravessados pelos ultrassons. Para a realização da ecografia transretal em equinos é necessária uma sonda/transdutor transretal conectada ao ecógrafo que habitualmente possui um painel de controlo e um monitor para controlo do procedimento ou, em alternativa, um monitor táctil que permita cumprir ambas funções (fig. 18), assim como luvas de palpação e lubrificante obstétrico. A sonda é responsável pela transmissão e recepção dos ultrassons, que projetam a imagem dos tecidos no monitor do ecógrafo, diferenciando-os através da sua ecogenicidade (capacidade de propagar ou refletir os ultrassons) que é representada na escala de cinzentos. Em reprodução equina são habitualmente usadas sondas lineares de 5 a 6MHz, que

permitem obter imagens adequadas das estruturas do aparelho reprodutor por via transretal (Blanchard, et al., 2003).

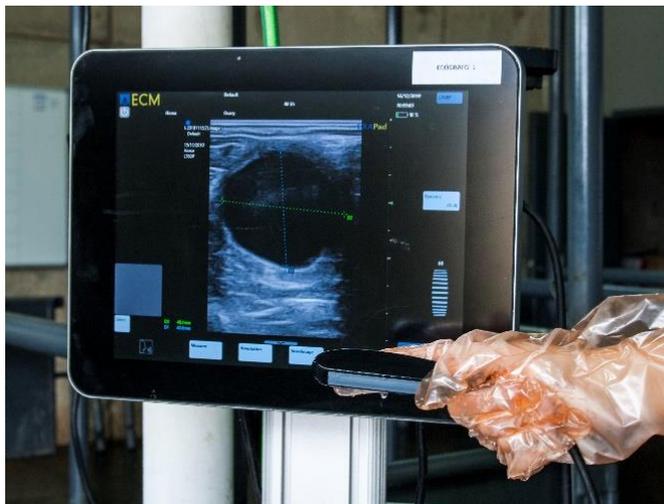


Figura 18. Ecógrafo com monitor tátil e sonda transretal

Este exame, realizado de forma sistemática, permite assim visualizar estruturas tais como os folículos ováricos (fig. 19), quistos endometriais (fig. 20) e fluido livre no lúmen uterino (fig. 21), sendo também fundamental no diagnóstico precoce de gestação (fig. 22), manejo de gestações gemelares e deteção de potenciais patologias ováricas ou uterinas (McCue P. , 2014).

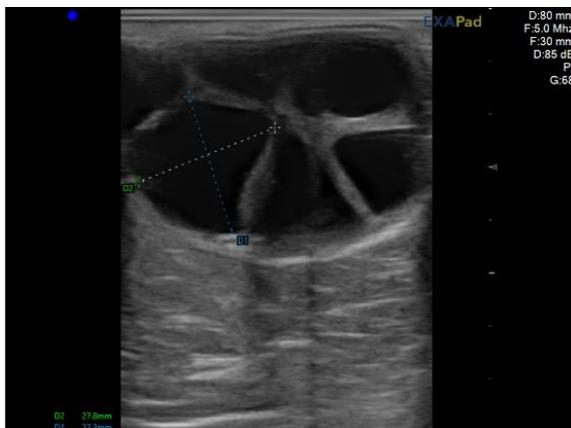


Figura 19. Ovário direito com diversos folículos de tamanho intermédio



Figura 20. Quisto endometrial

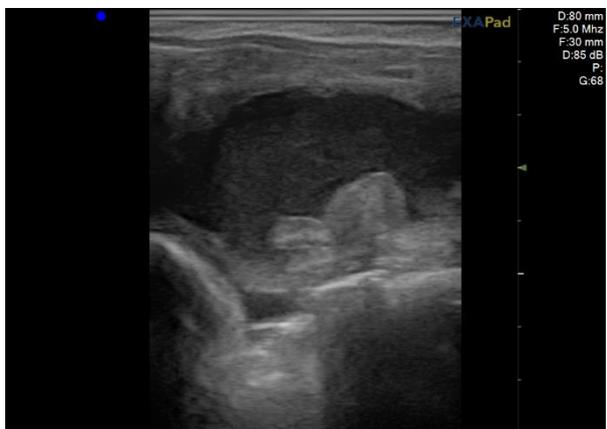


Figura 21. Líquido livre no lúmen uterino



Figura 22. Diagnóstico de gestação positivo com presença de embrião de 13 dias

Para a realização de uma ecografia transretal em equinos, é recomendável seguir alguns passos importantes:

- Realizar inicialmente uma palpação transretal à égua, incluindo a remoção das fezes do reto de forma a que a sonda possa posteriormente funcionar de forma adequada. Esta palpação transretal deve ser realizada de forma sistemática, permitindo ao técnico identificar previamente a localização das estruturas a avaliar;
- Colocar lubrificante obstétrico na sonda e na mão que a introduzirá no reto do animal;
- Realizar um exame sistemático do sistema reprodutor feminino: identificar o corpo do útero e deslizar a sonda lentamente e de forma contínua ao longo de um dos cornos, até alcançar o ovário ipsilateral, angulando a sonda de forma a obter uma imagem completa de todas as estruturas. Repetir o procedimento para o corno e ovário contralaterais, regressar à zona da bifurcação uterina e retirar a sonda (McCue P. , 2014).

Relativamente à interpretação da ultrassonografia reprodutiva em éguas, nos ovários podemos detetar folículos de diferentes tamanhos, corpos hemorrágicos (fig. 23) e corpos lúteos ativos (fig. 24) ou em regressão (corpos albicans) (McCue P. , 2014).

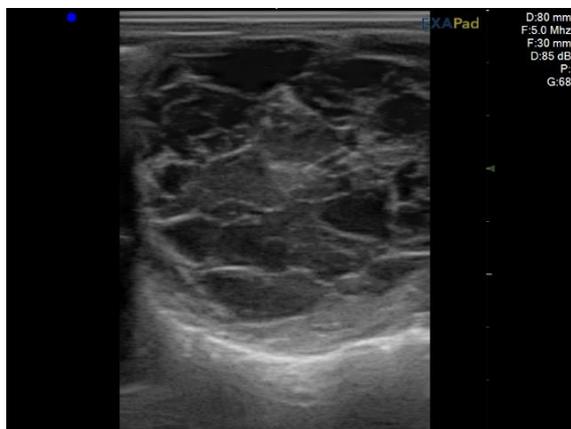


Figura 23. Corpo hemorrágico em ovário esquerdo

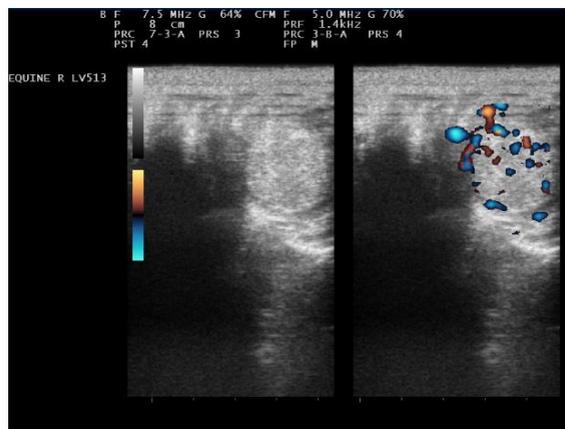


Figura 24. Corpo lúteo ativo em ovário esquerdo

É também possível identificar estruturas anómalas, tais como folículos persistentes anovulatórios, tumores ováricos ou quistos (McCue P. , 2014). Quanto à avaliação ecográfica uterina, é possível reconhecer os diferentes estadios de edema uterino (fig. 25, 26 e 27) resultante dos níveis elevados de estrogénio e reduzidos de progesterona, sendo possível estimar o momento da ovulação (McCue P. , 2014). Como referido anteriormente, é ainda possível detetar a presença de líquido livre no lúmen uterino, estruturas quísticas e embriões.



Figura 25. Edema uterino grau 1

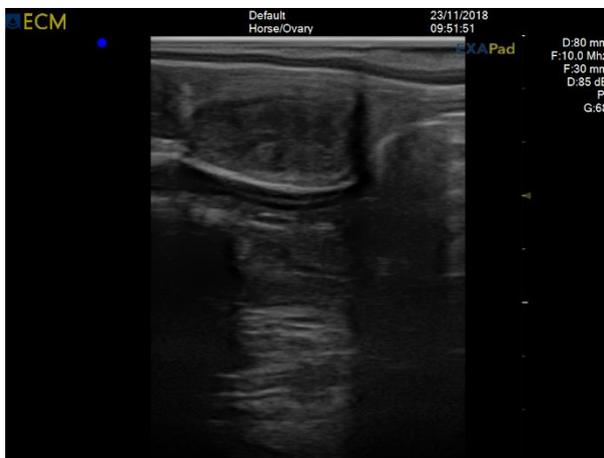


Figura 26. Edema uterino grau 2



Figura 27. Edema uterino grau 3

4. Transferência de embriões

A transferência de embriões (TE) é uma biotecnologia reprodutiva com grande relevância na clínica equina. Esta técnica consiste em recolher um embrião do trato reprodutivo de uma égua que tenha sido coberta por monta natural ou inseminação artificial, e introduzi-lo no útero de uma égua recetora, responsável pela gestação e parto do potro. Desta forma, é possível obter um produto com qualidade genética determinada, criado por uma progenitora não biológica.

A TE na espécie equina foi realizada pela primeira vez com êxito nos anos 70 (Allen & Rowson, 1975; Oguri & Tsumini, 1974), ainda que a comercialização da técnica apenas se tenha iniciado nos anos 80. O procedimento teve grande aceitação nos países da América Latina como a Argentina (Riera & McDonough, 1993), e na Península Ibérica começou a ser prática corrente na clínica reprodutiva equina no início do século XXI.

As principais vantagens da utilização da TE como biotecnologia reprodutiva são as seguintes:

- Obter descendência de uma égua sem interromper a sua carreira desportiva;
- Obter no mesmo ano mais de um produto na mesma égua;

- Éguas jovens de elevado valor genético podem ter descendência sem que isso afete o seu desenvolvimento e crescimento;
- Éguas com historial de reabsorção embrionária ou outros problemas de fertilidade podem gerar embriões que chegarão a término caso sejam transferidos para o útero de outra égua;
- Conseguir descendência de éguas com problemas de saúde não reprodutivos, como por exemplo músculo-esqueléticos, que impeçam a gestação e o parto;
- Evitar o risco associado à gestação e ao parto em éguas de elevado valor económico;
- Um produtor pode possuir poucas éguas de elevada qualidade e muitas éguas recetoras, de forma a obter descendência dos seus melhores exemplares.

Apesar de possuir inúmeras vantagens, a TE na espécie equina apresenta igualmente fatores que limitam a utilização da técnica (McCue & Squires, 2015), entre estes a dificuldade que esta espécie apresenta nos tratamentos de superovulação (McKinnon & Squires, 1988), assim como o custo elevado que o procedimento apresenta em comparação com outras biotecnologias reprodutivas. Adicionalmente, existem outros fatores que condicionam o sucesso da TE, tais como a fertilidade do garanhão, uma vez que a utilização de sémen de má qualidade afetara a recuperação de embriões; a idade e condição

reprodutiva da égua dadora e da recetora; assim como o treino da equipa técnica que realiza o procedimento.

4.1 Preparação, sincronização e inseminação das éguas

Para a realização de um programa de TE é conveniente contar com éguas dadoras de uma idade compreendida entre os 3 e os 14 anos, saudáveis e sem problemas reprodutivos. A taxa de recuperação embrionária nos programas de TE é inferior tanto em éguas jovens sexualmente imaturas (menores de 2 anos), como em éguas idosas (mais de 15 anos) que apresentam uma diminuição na qualidade dos ovócitos e da saúde uterina. Da mesma forma, quando são utilizadas éguas que apresentem stress, condição corporal inferior ao normal ou algum tipo de patologia (claudicação, problemas dentários, má-nutrição, etc.) o êxito da TE é reduzido (McCue & Squires, 2015). Desta forma, as melhores éguas dadoras de embriões são as de meia-idade, que apresentem uma boa condição corporal, sem patologias e que apresentem uma adequada saúde reprodutiva.

Quando se inicia o programa de TE é fundamental avaliar adequadamente a égua dadora de embriões. É importante recolher a história clínica do animal, uma vez que aporta grande quantidade de informação, assim como a idade da égua, se já foi submetida a um

programa de TE e qual a taxa de êxito, se já teve algum parto, se lhe foram diagnosticados quaisquer problemas reprodutivos, vacinas, desparasitações, etc. De seguida deve iniciar-se um exame físico ao animal e um exame específico ao sistema reprodutor (Squires, McCue, & Vanderwall, 1999). É conveniente realizar previamente um seguimento completo de um ciclo éstrico e avaliar todas as características reprodutivas do animal. Como indicado em capítulos anteriores, para avaliar os diferentes componentes do sistema reprodutor pode realizar-se palpação retal, ecografia ou inspeção vaginal com recurso ao vaginoscópio. Deve ainda realizar-se uma citologia do endométrio quando a égua entre em cio para avaliar o estado do seu endométrio, assim como uma cultura microbiana do seu conteúdo, caso seja necessário. Adicionalmente, é possível realizar uma biopsia uterina para avaliar de forma mais aprofundada o estado do endométrio. Caso se detete algum problema reprodutivo como endometrite, urovagina-uroútero ou pneumoútero, este deve ser tratado antes de iniciar o programa de TE.

No caso das éguas recetoras, estas assumem grande importância nos programas de TE, sendo responsáveis pela receção do embrião e manutenção da gestação, e por último pelo parto. Por cada égua dadora devem existir duas a três éguas recetoras, uma vez que no momento da transferência pode dar-se uma redução na efetividade

da sincronização (McCue & Squires, 2015), ou ainda porque no melhor dos casos a dadora pode ovular de dois folículos e possuir dois embriões. É possível utilizar também éguas previamente sujeitas a ovariectomia como recetoras, tratadas com progesterona exógena, permitindo este método contar com recetoras aptas em qualquer momento sem necessidade de sincronização (Hinrichs, Sertich, Palmer, & Kenney, 1987; McKinnon, Squires, Carnevale, & Herment, 1988).

A dimensão corporal da égua recetora é fundamental, devendo ser igual ou superior ao da correspondente égua dadora, uma vez que o abdómen deverá possuir uma dimensão suficiente para manter a gestação e evitar o aparecimento de problemas na gestação e no parto (McCue & Squires, 2015). Existem igualmente estudos que relacionam o crescimento fetal e o tamanho dos potros ao nascimento com o tamanho da progenitora (Allen, Wilsher, Tiplady, & Butterfield, 2004). Outro aspeto importante relativo às recetoras é a idade, que deverá estar compreendida entre os 4 e os 10 anos, período em que a fertilidade é superior, sendo igualmente desejável que tenham tido pelo menos um parto, de forma a conhecer-se a sua capacidade de gestação, facilidade de parto e aptidão maternal. As éguas devem possuir uma condição corporal adequada, devem ser saudáveis e apresentar um carácter dócil e facilidade de maneo, uma vez que num

programa de TE se manipulam os animais diariamente durante um período prolongado. Por último, as éguas recetoras devem estar isentas de problemas reprodutivos. Desta forma, os animais devem ser submetidos a um controlo exaustivo prévio ao início do programa de TE, realizando-se um seguimento completo de um ciclo éstrico, observando a atividade folicular presente nos ovários e a correta formação dos corpos lúteos (CL). Quando as éguas se encontrem em cio devem ser estimuladas pela presença de um garanhão para avaliar a sua recetividade, e devem ser realizadas as provas de diagnóstico convenientes para determinar o seu estado reprodutivo (ecografia, citologias endometriais, culturas microbiológicas, biopsias uterinas, histeroscopias, etc.). As éguas que apresentem qualquer tipo de anomalia que possa interferir com o êxito da TE devem ser descartadas imediatamente do programa.

A sincronização dos ciclos éstricos da égua dadora e das recetoras, associada à avaliação reprodutiva dos animais, são as atividades que mais tempo requerem nos programas de TE. O objetivo da sincronização é que os animais ovulem dentro de determinado intervalo de tempo, para que quando se transfira o embrião da dadora para o útero da recetora o reconhecimento materno da gestação ocorra, permitindo a implantação do embrião e a consequente gestação. Este intervalo de tempo é relativamente amplo, sendo

possível que a recetora ovule desde um dia até três dias após a dadora, sem que a taxa de êxito da TE se veja afetada (Jacob, et al., 2012). Desta forma, no dia em que se realiza a transferência (7 a 8 dias após a ovulação da égua dadora), o CL da égua recetora tem uma vida de 5 a 9 dias, pelo que já consiste num CL funcional com a capacidade de produzir progesterona suficiente para manter a gestação.

A sincronização é realizada através de um acompanhamento ecográfico exaustivo e recorrendo ao uso de diferentes fármacos como a prostaglandina F₂ α (PGF₂ α), para induzir a luteólise e iniciar novo ciclo na égua; a progesterona (P₄) para alargar a fase lútea/diestro e atrasar a entrada em cio, ou indutores da ovulação como a hormona libertadora das gonadotropinas (GnRH) ou a gonadotropina coriónica humana (hCG) (Coffman, et al., 2014).

Uma vez que se induz o cio com a PGF₂ α , a égua ovulará em 6 a 12 dias, dependendo da atividade folicular presente no ovário no momento da administração do fármaco (Samper, 2008). Por esta razão, é conveniente realizar um estudo ecográfico da égua 4 dias após a administração da PGF₂ α e, em função da atividade folicular, determinar a rotina ecográfica. Uma vez detetado um folículo com um diâmetro superior a 35mm e com presença de edema uterino na égua dadora, pode induzir-se a sua ovulação e realizar-se a sua cobertura por

monta natural ou inseminação artificial (McCue & Squires, 2015). Quando se recorre a um programa de TE é mais conveniente realizar uma inseminação artificial, uma vez que através desta técnica se pode determinar a qualidade seminal e estabelecer a probabilidade de êxito da inseminação. No caso das éguas recetoras, deve induzir-se a sua ovulação 12 a 24 horas após a indução da dadora, sempre que exista edema uterino e um folículo dominante superior a 35mm de diâmetro. Após as induções, é fundamental realizar um seguimento ecográfico para determinar o momento da ovulação, sendo considerado o dia 0 do programa o dia em que a dadora ovula. A determinação do momento da ovulação permite conhecer a idade do embrião assim como a sincronia das recetoras relativamente à dadora.

4.2 Recolha e transferência do embrião

Após a ovulação da dadora, dá-se a fecundação do ovócito na ampola do oviduto. O embrião cresce exponencialmente e chega ao útero no dia 5,5 ao dia 6 após a ovulação, em fase de mórula ou blastocisto precoce (Freeman, Weber, Geary, & Woods, 1991). O embrião deve recolher-se do útero entre os dias 7 e 8 após a ovulação, uma vez que com essa idade se encontra em fase de blastocisto com presença de blastocélio, o que reduz o seu peso e facilita o seu transporte no

momento da lavagem uterina, em comparação com a fase de mórula. Em éguas idosas a lavagem uterina pode realizar-se apenas no dia 9, uma vez que apresentam um atraso no crescimento embrionário (McCue & Squires, 2015). Os passos para uma correta recolha e transferência do embrião são os seguintes:

- **Preparação do laboratório** – previamente à recolha do embrião, deve preparar-se o laboratório com todo o material necessário para a realização da TE. É conveniente dispor de uma estufa para aquecer os meios de lavagem para recolha do embrião do útero da dadora, assim como de uma câmara de fluxo laminar equipada com lupa e placa térmica regulável, assim como todo o material necessário para a manipulação do embrião (fig. 28). A temperatura deve manter-se constante (McCue & Squires, 2015).

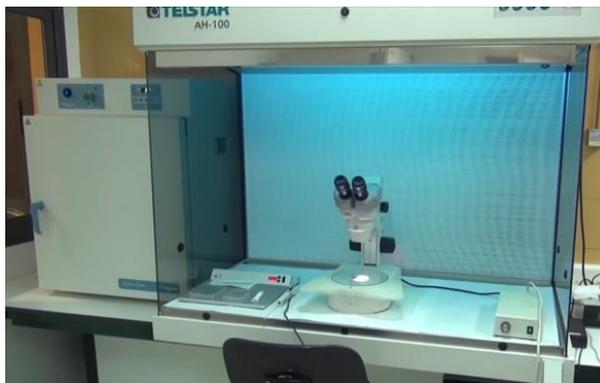


Figura 28. Câmara de fluxo laminar equipada com lupa e placa térmica para apoio à manipulação dos embriões recolhidos.

- **Exame das éguas** – é necessário ter em conta o estado de sincronia em que os animais se encontram, realizando uma avaliação ecográfica do estado uterino e funcionalidade do CL da dadora e das recetoras. Esta avaliação permitirá escolher qual a recetora mais adequada para a transferência do embrião.
- **Preparação da égua dadora** – após avaliação das éguas e escolha da recetora, deve preparar-se a égua dadora, colocando uma ligadura ao redor da base da cauda para reduzir a contaminação e lavando a zona perineal de forma exaustiva com água e sabão de pH neutro (fig. 29). Pode também aplicar-se um antisséptico como a iodopovidona.



Figura 29. Realização de lavagem perineal a égua dadora após colocação de ligadura na cauda.

- **Montagem do circuito de lavagem uterina** – o circuito é composto por um cateter de Foley com um balão na extremidade para se fixar e vedar o cérvix, conectado a um tubo em forma de “Y”, cujos extremos se ligam ao meio de lavagem e ao recipiente com filtro onde se recolhe o embrião (fig. 30). Deve preencher-se todo o circuito com o líquido de lavagem, de forma a eliminar todo o ar existente no interior dos tubos (fig. 31).

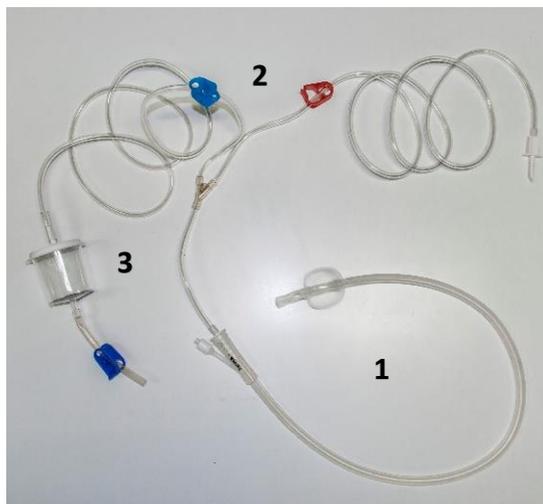


Figura 30. Circuito de lavagem montado, com cateter de Foley (1), tubo em “Y” (2) e filtro para recolha de embrião (3)



Figura 31. Montagem do circuito para realização de lavagem uterina.

- **Lavagem uterina** – por via vaginal, introduzir o cateter de Foley através do cérvix e encher posteriormente o balão com ar para permitir a fixação do cateter. Introduzir 1 a 2L de solução de lavagem, em função do tamanho do útero, realizando posteriormente massagens transretais para criar turbulência. Permitir a saída da solução através do filtro, de forma que o embrião fique depositado no recipiente e assegurando que é recolhida a mesma quantidade de líquido que se introduz (fig. 32). Repetir o procedimento cerca de 2 a 3 vezes, podendo utilizar-se um ecbólico como a oxitocina na última lavagem, de forma a recuperar todo o líquido intrauterino. Esvaziar o balão e retirar o cateter de Foley do útero.



Figura 32. Recolha de solução fisiológica de lavagem uterina em filtro, quantificando o fluido recolhido com uma proveta graduada.

- **Deteção do embrião** – o tamanho de um embrião de equino de 7-8 dias é de 400-800 μ m de diâmetro (McCue & Squires, 2015), pelo que não se aprecia a sua presença no recipiente de recolha. Após finalização da lavagem uterina, o recipiente deve ser desconectado do restante sistema e levado para o laboratório. Deve verter-se o conteúdo em placa de Petri específica para a procura de embriões, e observar de forma minuciosa até detetar o embrião. Este deve ser classificado de acordo com a sua qualidade e morfologia, determinando o estadio em que se encontra (mórula, blastocisto precoce ou blastocisto expandido) (fig. 33).



Figura 33. Embrião em placa de Petri, em estadio de blastocisto expandido.

De seguida, deve realizar-se a lavagem do embrião colocando-o, através do uso de um microaspirador e de uma palheta, em diversos pocilhos com concentrações crescentes de um meio adequado para a sua manutenção (fig. 34).



Figura 34. Microaspirador, meio de lavagem de embriões e placas de Petri necessárias para a manipulação dos embriões

Por último, deve colocar-se o embrião no interior de uma palheta de 0.25 ou de 0.5mL, de acordo com o seu diâmetro (fig. 35).



Figura 35. Embrião colocado em palheta para realização de transferência.

- **Transferência** – uma vez que se encontra o embrião, deve iniciar-se a preparação da égua recetora para que a transferência tenha lugar o mais rapidamente possível. A recetora pode ser submetida a um tratamento com progesterona oral para complementar a funcionalidade do CL, desde o dia 5 pós-ovulação. Adicionalmente, podem administrar-se anti-inflamatórios não esteroides para prevenir os efeitos da prostaglandina, uma vez que a manipulação do cérvix em diestro pode provocar a libertação de prostaglandinas que poderão causar luteólise (McCue & Squires,

2015). Deve preparar-se a égua recetora, colocando uma ligadura ao redor da base da cauda e lavando a zona perineal de forma exaustiva com água e sabão de pH neutro. Uma vez que o embrião está corretamente colocado na palheta, esta deve ser introduzida no cateter de transferência (fig. 36), acoplado à respetiva pistola. O cateter deve ser protegido com revestimento plástico para evitar que ocorra contaminação do útero, no momento da sua introdução. Após inserção do cateter de inseminação, este deve ser avançado até à zona de bifurcação dos cornos uterinos, retraído 1 a 2 cm e por último depositar o conteúdo da palheta no corpo do útero.



Figura 36. Introdução de cateter de transferência, para realização de transferência de embrião.

Após a finalização do processo o diagnóstico de gestação da égua recetora será realizado por ecografia. Em função da perícia do

técnico e da qualidade do equipamento, o diagnóstico de gestação poderá ser realizado entre 2 a 6 dias após a transferência. O diagnóstico definitivo pode ser realizado pela detecção da vesícula embrionária no útero da égua recetora quando o embrião possui 14 dias de idade, ou seja, 7 dias após a realização da TE no caso desta ter sido efetuada no dia 7 após a ovulação da égua dadora (fig. 37) (Simpson, et al., 1982).



Figura 37. Diagnóstico ecográfico de gestação de embrião com 14 dias de idade.

A taxa de sucesso dos programas de TE depende de diversos fatores, sendo diferente o valor da taxa de recuperação embrionária do valor

da taxa de gestação. A taxa de recuperação de embriões depende em grande medida da égua dadora e do garanhão que se utilize para fecundar o ovócito, estando normalmente entre 50% e 80% nos casos mais favoráveis. Por outro lado, a taxa de gestação é também influenciada pela manipulação do embrião e pela égua dadora. A taxa de gestação obtida após realização de TE com éguas dadoras jovens encontra-se entre os 50% e os 60%, enquanto que em éguas de idade mais avançada se obtêm taxas de gestação de apenas 25% a 30%. É importante considerar que os embriões provenientes de éguas mais velhas possuem também uma viabilidade mais reduzida, ocorrendo maior mortalidade embrionária em fases precoces (McCue & Squires, 2015; Squires, Carnevale, McCue, & Bruemmer, 2003). Desta forma, para obter maiores taxas de sucesso devem utilizar-se dadoras e garanhões jovens. Adicionalmente, o pessoal técnico que realiza a TE deve ser experiente e estar formado na realização de procedimentos reprodutivos em equinos. Deve ainda contar-se com uma equipa bem organizada que permita a divisão das diferentes tarefas a realizar no programa de TE, dispondo de um laboratório bem equipado e limpo, prestando especial atenção à sua desinfeção e esterilidade.

Bibliografia

- Allen, W. R., & Rowson, L. E. (Oct de 1975). Surgical and non-surgical egg transfer in horses. *Journal of Reproduction and Fertility, Supplements(23)*, 525-530.
- Allen, W. R., Wilsher, S., Tiplady, C., & Butterfield, R. M. (Jan de 2004). The influence of maternal size on pre- and postnatal growth in the horse: III Postnatal growth. *Reproduction, 127(1)*, 67-77.
- Blanchard, T. L., Varner, D. D., Schumacher, J., Love, C. C., Brinsko, S. P., & Rigby, S. L. (2003). *Manual of Equine Reproduction* (2nd ed.). EUA: Mosby.
- Coffman, E. A., Pinto, C. R., Snyder, H. K., Leisinger, C. A., Cole, K., & Whisnant, C. S. (Dec de 2014). Antiluteogenic effects of serial prostaglandin F₂ α administration in cycling mares. *Theriogenology, 82(9)*, 1241-1245.
- Freeman, D. A., Weber, J. A., Geary, R. T., & Woods, G. L. (Nov de 1991). Time of embryo transport through the mare oviduct. *Theriogenology, 36(5)*, 823-830.
- Hinrichs, K., Sertich, P. L., Palmer, E., & Kenney, R. M. (Jul de 1987). Establishment and maintenance of pregnancy after embryo transfer in ovariectomized mares treated with progesterone. *Journal of Reproduction and Fertility, 80(2)*, 395-401.
- Jacob, J. C., Haag, K. T., Santos, G. O., Oliveira, J. P., Gastal, M. O., & Gastal, E. L. (Apr de 2012). Effect of embryo age and recipient asynchrony on pregnancy rates in a commercial equine embryo transfer program. *Theriogenology, 77(6)*, 1159-1166.

- McCue, P. (2014). Ultrasound Evaluation of the Non-Pregnant Mare. Em J. Dascanio, & P. McCue, *Equine Reproductive Procedures* (pp. 26-31). Iowa, EUA: Wiley Blackwell.
- McCue, P. M., & Squires, E. L. (2015). *Equine Embryo Transfer*. WY: Teton NewMedia.
- McKinnon, A. O., & Squires, E. L. (Aug de 1988). Equine Embryo Transfer. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 4(2), 305-333.
- McKinnon, A. O., Squires, E. L., Carnevale, E. M., & Hermetet, M. J. (Jan de 1988). Ovariectomized steroid-treated mares as embryo transfer recipients and as a model to study the role of progestins in pregnancy maintenance. *Theriogenology*, 29(5), 1055-1063.
- McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., & Varner, D. D. (2011). *Equine Reproduction* (2nd ed.). EUA: Wiley-Blackwell.
- Oguri, N., & Tsumini, Y. (Dec de 1974). Non-surgical egg transfer in mares. *Journal of Reproduction and Fertility*, 41(2), 313-320.
- Riera, F. L., & McDonough, J. (1993). Commercial embryo transfer in polo ponies in Argentina. *Equine Veterinary Journal, Supplements*, 15, 116-119.
- Samper, J. C. (Aug de 2008). Induction of estrus and ovulation: Why some mares respond and others do not. *Theriogenology*, 70(3), 447-447.
- Simpson, D. J., Greenwood, R. E., Ricketts, S. W., Rossdale, P. D., Sanderson, M., & Allen, W. R. (1982). Use of ultrasound echography for early diagnosis of single and twin pregnancy in

the mare. *Journal of Reproduction and Fertility, Supplements*,
32, 431-9.

Squires, E. L., Carnevale, E. M., McCue, P. M., & Bruemmer, J. E. (1 de
Jan de 2003). Embryo technologies in the horse.
Theriogenology, *59(1)*, 151-70.

Squires, E. L., McCue, P. M., & Vanderwall, D. (Jan de 1999). The
current status of equine embryo transfer. *Theriogenology*, *51*,
91-104.


COLEÇÃO C3I
Nº13



UNIÃO EUROPEIA
Fundo Europeu
de Desenvolvimento Regional



Praça do Município, 11 – 7300-110 Portalegre

T +351 245 301 500 F +351 245 330 353

E geral@ipportalegre.pt