

**ASPECTOS DA REPRODUÇÃO EQUINA:
INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL E TRANFERÊNCIA DE EMBRIÃO:
REVISÃO DE LITERATURA**

ASPECTS OF EQUINE REPRODUCTION: ARTIFICIAL INSEMINATION IS
EMBRYO TRANSFER: LITERATURE REVIEW

Diene do Carmo Bortot
Discente do curso de pós-graduação de Reprodução e Clínica de equinos e bovinos
da FAEF-Garça
Rodovia Comandante João Ribeiro de Barros KM 420, Garça-SP, CEP17400-000,
Brasil

carmobortot@bol.com.br

ZAPPA, Vanessa
Médica Veterinária Docente do Curso de Medicina Veterinária e Zootecnia de
Garça- FAEF
Rodovia Comandante João Ribeiro de Barros KM 420, Garça-SP, CEP17400-000,
Brasil

profvanessazappa@yahoo.com.br



RESUMO

A transferência de embrião e a inseminação artificial na espécie equina é uma biotécnica de suma importância para a indústria do cavalo. Uma vez que a versatilidade desta espécie é o principal fator responsável pelo crescimento mundial da equideocultura, Estas biotecnologias possibilita o maior desenvolvimento do setor através do ganho na eficiência reprodutiva e no incremento do melhoramento genético, favorecendo o aprimoramento das raças e seus cruzamentos. Dentro da espécie equina a inseminação artificial vem sendo empregada com bons índices de fertilidade, além de proporcionar menor desgaste do garanhão e possibilitar o progresso genético do plantel existente. A transferência de embriões é uma biotécnica baseada no princípio da multiplicação da progênie de fêmeas consideradas superiores dentro de um rebanho. Fundamenta-se na obtenção de embriões de uma fêmea doadora para em seguida transferí-los para fêmeas receptoras, com a finalidade de completar o período de gestação. Avaliando a importância do melhoramento genético do rebanho esta técnica é a mais acessível e proporciona o melhor aproveitamento de uma doadora, multiplicando seu material genético.

Palavras-chave: Equinos, Inseminação artificial, Transferência de embrião

ABSTRACT

The embryo transfer and artificial insemination in the equine species is a biotech paramount to the horse industry. Once the versatility of this species is the main factor responsible for the growth of the world equine culture, these biotechnology enables the further development of the sector through the gain in reproductive efficiency and boosting breeding, favoring the improvement of breeds and their crosses. Within the equine species artificial insemination has been used with good fertility rates, and provide less wear stallion and enable the genetic progress of the existing squad. Embryo transfer is a biotech based on the principle of multiplying the progeny of females considered top within a herd. It is based on obtaining embryos from one donor female to then transfer them to recipient females, in order to complete the gestation period.



Assessing the importance of the breeding herd this technique is the most accessible and provides the best use of a donor, multiplying their genetic material.

KEYWORDS: Equine, artificial insemination, embryo trans



1. INTRODUÇÃO

A criação de cavalos destinados ao segmento esportivo sofreu um grande aumento nas últimas décadas. O plantel aumentou rapidamente sem que existisse número adequado e proporcional de bons garanhões a disposição nas temporadas reprodutivas. Esse fato, aliado as vantagens econômicas e sanitárias, vem proporcionando crescente aceitação no uso de diferentes biotécnicas ligadas à reprodução (CHALHOUB, 1996).

Entre as diferentes biotecnologias atualmente empregadas, a inseminação artificial e a transferência de embrião são as que demonstram a maior viabilidade econômica e facilidade na implantação entre diferentes espécies domésticas onde seu uso já se tornou consagrado (CHALHOUB, 1996).

Dentro da espécie equina atualmente, nas raças que permitem o uso da inseminação artificial, essa técnica vem sendo empregada com bons índices de fertilidade, além de proporcionar menor desgaste do garanhão e possibilitar o progresso genético do plantel existente (CHALHOUB, 1996).

Segundo a história, consta que a primeira inseminação artificial em equinos foi realizada no Século XIV, por um xeique Árabe, desejando obter um produto do garanhão do xeique inimigo, excitou o animal com algodão embebido com secreções de uma égua em cio, transferiu o sêmen colhido, também em algodão para o interior da vagina de outra égua em cio, assim obtendo um produto (BOCHIO, 2006).

A inseminação artificial em equinos é largamente praticada em todo o mundo, e a maneira mais comumente usada nessa espécie é mediante o resfriamento e transporte de sêmen. Aparentemente, no mundo, os países que mais realizam IA com sêmen resfriado transportado são Estados Unidos, seguido pelo Brasil (LOOMIS, 2006).

O uso da inseminação artificial acelera o melhoramento genético, viabiliza a obtenção de produtos de reprodutores alojados em outros países ou até mesmo que já morreram, evita a transmissão de doenças venéreas, facilita a realização de testes de progênie além de possibilitar que machos subfêrteis produzam filhos. Entretanto, para que se obtenha sucesso em programas de inseminação artificial, são necessários



alguns cuidados como a utilização de machos de boa qualidade, um bom controle sanitário e mão de obra especializada (MIES FILHO, 1987).

A transferência de embriões (TE) é uma importante ferramenta que visa acelerar o melhoramento genético, conferindo maior precisão e rapidez no processo de seleção animal. O primeiro relato envolvendo a TE em equinos foi feito por pesquisadores japoneses, em 1972, embora incremento nas pesquisas só ocorresse uma década depois. No Brasil a TE vem sendo realizada desde a segunda metade dos anos 80, ocupando hoje, lugar de destaque no mundo, junto com os Estados Unidos e Argentina (CARMO, 2003).

Em relação a TE, o Brasil ocupa lugar de destaque na utilização desta técnica ao lado dos Estados Unidos e da Argentina, sendo um dos líderes, realizando em torno de 3.500 transferências por ano, de acordo com levantamento da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões - IETS (CARNEIRO, 2005).

A espécie equina foi considerada por muito tempo como a de menor fertilidade entre as espécies domésticas, o que foi atribuído a características de seleção e problemas relacionados ao manejo reprodutivo contudo, o desenvolvimento de novas técnicas reprodutivas possibilitou o melhor aproveitamento dos animais, tornando possível acelerar o aprimoramento das raças e seus cruzamentos, sendo a transferência de embrião (TE) a ferramenta mais promissora para essa finalidade, tornando-se assim, cada vez mais comum no mundo equino para obtenção de potros (LIRA, 2009).

Esta biotécnica tem sido utilizada como uma gestão de procedimentos para a produção de múltiplos potros por égua durante o ano, o melhor aproveitamento de éguas que possuam alto valor zootécnico e sejam idosas ou que estejam em atividade esportiva, obtenção de embriões de potras de dois anos, já que nesta fase a gestação é contra-indicada e pode prejudicar o desenvolvimento da potra. Ainda, é capaz de gerar potros de éguas subférteis por problemas adquiridos, as quais ficam impedidas de exercer uma gestação a termo devido a uma variedade de razões, tais como idade, infecção uterina crônica, danos cervicais, etc (LIRA, 2009).



Além disso, esta biotécnica favorece o maior controle de doenças quando da transferência de material genético entre estados ou países, bem como a obtenção de divisas através de exportações de embriões congelados (ARRUDA et al., 2001).

Com este trabalho tem-se como objetivo fazer uma revisão de literatura acerca dos principais aspectos relacionados à aplicação da inseminação artificial e transferência de embrião na espécie equina devido ao grande aumento de criação de cavalos destinados ao seguimento esportivo e com isso possa aprimorar meus conhecimentos através do tema.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fisiologia reprodutiva

As éguas são animais classificados como poliétricos estacionais, pois possuem sua estação reprodutiva na primavera e no verão. Três são os fatores básicos, que explicam o caráter estacional dos ciclos estrais nas éguas: nutrição, temperatura e fotoperíodo (ARRUDA, 1990).

Durante a transição do anestro para o poliestro fisiológico, a égua apresentara períodos variáveis de sinais comportamentais de estro sem efetivamente desenvolver estruturas foliculares significantes ou ovular (LEY, 2006).

Em ambiente natural, períodos de 15 a 16 horas de duração do dia (ou de estímulo luminoso) atuam sobre o eixo pineal-hipotalâmico-hipofisário-gonadal para interromper a produção de melatonina. Esta, quando liberada pela glândula pineal, inibe a produção de gonadotrofina (GnRH) no hipotálamo. A modulação da frequência e da amplitude da liberação de GnRH pelo hipotálamo afeta a produção hipofisária e libera os hormônios folículo-estimulante (FSH) e luteinizante (LH). Os receptores ovarianos respondem ao FSH e ao LH induzindo ao recrutamento, à seleção e à dominância folicular (LEY, 2006).

O ciclo estral é tipicamente definido como início com a ovulação (dia 0) e término no dia anterior a próxima ovulação. A média de intervalo entre as ovulações, para a maioria das éguas, é de 12 dias, mas pode oscilar entre 18 e 24



dias. Intervalo muito curto ou muito extenso pode ser considerada uma anormalidade (LEY, 2006).

A fase estral (fase folicular) pode durar de 3 a 7 dias e é dominada por um ou mais folículos pré-ovulatórios grandes > 30mm diâmetro, por estradiol-17 β (estrógeno) e por sinais comportamentais de cio ou receptividade ao garanhão (LEY, 2006).

A progesterona durante o estro é tipicamente menor de 1ng/mL no sangue periférico. O diâmetro folicular, na ovulação varia de 30 a 70 mm, mais comum ao redor de 40 a 45 mm (MEIRA, 2007).

A égua ovula 24 a 48 horas antes dos sinais de comportamento do cio desaparecer. Isso é um evento fisiológico muito importante de se lembrar, muitas éguas são cobertas ou inseminadas após a ovulação simplesmente porque ainda demonstram sinais de cio. Se a inseminação ou cobertura ocorrer depois de 12 a 14 horas da ovulação, o ovulo será muito velho para ser prontamente fertilizado ou se fertilizado, falhará ao desenvolver um embrião viável (LEY, 2006).

Durante o período intermediário de 1 a 4 dias após a ovulação, o estrógeno diminui e antes de o corpo lúteo começar produzir quantidades significantes de progesterona, a égua demonstra sinais equívocos de cio ou receptividade ao garanhão (MEIRA, 2007).

A fase de diestro (fase luteínica) dura 13 a 17 dias e é dominada por um corpo lúteo, pela progesterona e por sinais comportamentais indicando ausência de receptividade à aprovação do garanhão (LEY, 2006).

O corpo lúteo em desenvolvimento, após a ovulação primária, tipicamente tem vida útil de até 85 dias. Se o endométrio não liberar a prostaglandina ele continuará a produção de progesterona e não sofrerá regressão (LEY, 2006).

Acredita-se que o reconhecimento materno da gestação na égua que ovula e é adequadamente coberta ou inseminada resulte de o embrião, com livre movimentação, produzir e secretar estrógeno que suprime a liberação endometrial de prostaglandina. Isso deve ocorrer entre os dias 12 e 14 após a ovulação produtiva (LEY, 2006).



A égua que falha em conceber ou que não foi coberta ou exposta a um garanhão ou que apresentou morte embrionária precoce (antes de 12 a 14 dias), o endométrio secreta prostaglandina que, pela circulação sistêmica, afeta o corpo lúteo e induz à sua regressão (luteólise). A produção de progesterona declina em 4 a 40 horas seguintes e a égua começa a mostrar sinais de receptividade conforme entre em seu próximo ciclo estral (MEIRA, 2007).

2.2 Técnicas de conservação do sêmen

Quando nos referimos à utilização da inseminação artificial, normalmente há uma diferenciação relativa ao tipo de técnica utilizada na conservação do sêmen a ser utilizado e ao tempo decorrido entre a colheita e sua utilização (BOCHIO, 2012).

Inseminação com sêmen fresco – consiste na utilização do sêmen, normalmente acrescido de diluentes apropriados, em um período de até duas horas (BOCHIO, 2012).

Inseminação com sêmen refrigerado – nesta técnica, o sêmen devidamente é diluído com diluentes ricos em açúcares, lipídeos e antibióticos, sendo mantido a uma temperatura de aproximadamente 5°C e podem ser utilizadas por um período de até 48 horas após a colheita sem comprometer sua capacidade fecundante e, conseqüentemente, os resultados obtidos (CARMO, 2002).

Inseminação com sêmen congelado – o sêmen deve passar pelo mesmo processo que na refrigeração, porém faz a utilização de diluente próprio para o congelamento, com isso possa proteger a integridade da membrana tanto no processo de congelamento como no descongelamento, sendo que após o sêmen ter sido congelado com sucesso, pode ser armazenado por anos, ficando conservado em temperatura de – 196°C em tanques de nitrogênio líquido (BOCHIO, 2012).

Estudos sobre técnicas adequadas para preservação e armazenamento de sêmen são de grande relevância em Reprodução Animal, já que possibilitam maximizar o aproveitamento de animais de alto potencial genético, bem como, por permitir a preservação por tempo indeterminado do patrimônio genético de animais que possam vir a falecer (CARMO, 2002).



2.3 Coleta e avaliação do sêmen

A IA pode ser realizada de diferentes formas de processamento do sêmen: in natura; diluído, diluído transportado; diluído resfriado transportado e congelado. Cada um dos tipos de tecnologia de processamento tem suas vantagens, limitações e indicações. Independente da técnica utilizada, o sêmen deve ser colhido, avaliado e processado. Quanto às técnicas de colheita de sêmen, a mais largamente utilizada é a da vagina artificial (VA) fechada, podendo ser modificada, utilizando-se a técnica de VA aberta, cuja principal finalidade é a colheita de sêmen fracionada, sendo apenas indicada em situações especiais (CARVALHO, 1992).

Há diferentes métodos para a colheita de sêmen de garanhões, entre eles, a utilização de um preservativo de látex especial, a colheita por manipulação do pênis com auxílio de compressas aquecidas e a manipulação medicamentosa, mas o método mais difundido e utilizado é a vagina artificial. A vagina artificial que é um artefato que simula as condições anatômicas normais da vagina de uma égua, para a colheita de sêmen dos garanhões, havendo diversos modelos. A seleção do modelo mais adequado pode depender da aceitação ou preferência de determinados garanhões, do custo ou da disponibilidade no mercado (BOCHIO 2006).

Após a assepsia do pênis do garanhão devemos iniciar a colheita que pode ser feita com uma égua em cio, onde o garanhão ira subir na mesma e o veterinário desviando o pênis para a vagina assim realizando a colheita. Essa técnica é muito arriscada, pois pode provocar escoriações tanto no garanhão como na égua, não sendo muita segura para o veterinário (LEY, 2006).

A técnica mais usada e correta é a utilização de um manequim para realizar a colheita onde o garanhão ira subir no manequim em vez de subir na égua, sendo uma técnica mais segura para o garanhão, para a égua e para o médico veterinário, Porém nem todas as propriedades possuem esse manequim para que possa realizar a colheita de sêmen, então temos que ser o mais cautelosos na colheita, visando o bem estar dos animais (BOCHIO, 2006).



Após a colheita é importante que se realize a separação da fração gelatinosa do ejaculado da fração rica em espermatozoides, uma vez que esta primeira apresenta efeitos nocivos à célula espermática. Para isso, o procedimento mais comumente utilizado é a filtragem, que permite a retenção da fração gelatinosa, parte dos contaminantes bacterianos, além de sujidades (elementos estranhos) presentes no sêmen. A filtragem é realizada através do acoplamento de um filtro ao copo coletor de sêmen, ou realizada imediatamente após sua coleta (SQUIRES et al., 1999).

Após a separação das frações, o sêmen deve ser mensurado quanto ao volume da fração rica em espermatozoides e avaliado quanto à coloração seminal. Para o garanhão, o normal é a coloração branca acinzentada e qualquer alteração nesta pode indicar processo patológico ou simplesmente contaminação com urina, e/ou sujidades (LOVE, 2007).

O volume do ejaculado é muito variável com a idade, época do ano, raça, regime de coleta de sêmen, estimulação sexual prévia, entre outros fatores. A maioria dos garanhões ejacula entre 25 e 80 ml de fração rica em espermatozoides. A fração rica é avaliada com auxílio de microscópio ótico e placa aquecedora. Uma gota de sêmen é colocada entre uma lâmina e lamínula, previamente aquecidas a 35-37°C em placa ou mesa aquecedora, sendo então levada ao microscópio para serem avaliadas as características de motilidade total e progressiva em escala percentual (0 a 100%) e vigor (1 a 5). A motilidade total para a maioria dos garanhões varia de 40 a 80%, de 35 a 75% para a motilidade progressiva e vigor médio de três. Durante a avaliação de motilidade e vigor, amostras devem ser retiradas para avaliação da concentração e morfologia espermática. A concentração espermática varia de 50 a 400 milhões de espermatozoides por ml de ejaculado para a maioria dos garanhões (SILVA FILHO, 1994).

Quanto à metodologia de IA a ser empregada, diversos fatores devem ser considerados, uma vez que podem ser muitas as variáveis envolvidas no processo como: localização da(s) propriedade(s); momento inseminante (pré e/ou pós-ovulação); número total de espermatozoides; volume; diluidor; temperatura do



armazenamento; características individuais de qualidade do sêmen do garanhão; valor do sêmen; reposta inflamatória uterina da égua a ser inseminada; tipo de cio; momento da estação; raça, entre outros fatores (VALLE et al., 1999).

A utilização de sêmen, fresco, diluído e resfriado, implica em maior flexibilidade de manejos de controle folicular, momento e local de deposição do sêmen. Pelo contrário, sêmen congelado exige um manejo mais rígido, palpções retais mais frequentes e, quanto ao local de deposição, preferencialmente, o mais profundo no corno uterino ipsilateral à ovulação (SAMPER; ESTRADA; MCKINNON, 2007).

2.4 Inseminação artificial

O conceito de inseminação artificial refere-se ao processo de deposição do sêmen no sistema genital feminino, através de manipulação artificial, e no momento adequado, visando à fertilização do óvulo (BOCHIO, 2006).

Para detecção das éguas em cio é necessário a rufiação e quando não é possível executar esta prática, faz-se necessário a realização de uma avaliação ginecológica por palpção retal para identificar a presença ou não de folículos e a consistência do útero, a fim de determinar em que fase do ciclo estral se encontra o animal (BRISKO & VARNER, 1992).

O cio da égua dura de 5 a 7 dias e a ovulação ocorre no final deste período, sendo que a inseminação deve ser realizada o mais próximo possível da ovulação. O ideal é que se faça controle folicular com acompanhamento ultrasonográfico em programas de inseminação de equinos, a fim de prever a ovulação e decidir o melhor momento para inseminação, limitando assim o número de inseminações (BRISKO & VARNER, 1992).

A inseminação convencional em éguas é por via vaginal, na qual a mão enluvada do inseminador, guia uma pipeta até a passagem da cérvix e o sêmen é depositado no corpo do útero (MIES, 1997).

Para conseguir melhorar os resultados com a utilização do sêmen congelado, alguns autores têm desenvolvido técnicas como o desvio da pipeta para deposição do



sêmen na ponta do corno e a possibilidade de inseminação histeroscópica, na qual faz-se a deposição do sêmen sobre a junção útero tubárica com auxílio de um endoscópio (LEÃO, 2002).

O sêmen *in natura* deve ser colhido e utilizado, imediatamente, no próprio local. Tem como vantagens a economia do uso de diluidor, contudo, como desvantagem, a qualidade espermática não sendo preservada. Rapidamente se perdem os parâmetros de motilidade e vigor, além do metabolismo espermático manter-se elevado. O local de deposição pode ser o corpo ou o corno uterino, e o volume espermático deve ser de até 3 ml. O regime de inseminação utilizado mais recomendado é de inseminação a cada 48 horas, a partir da detecção de um folículo ovariano de 3 a 3,5 cm ou a partir do segundo dia da detecção da égua em cio (SILVA FILHO, 1994).

O sêmen diluído tem como vantagens o tratamento antibiótico, diminuindo a contaminação bacteriana deste; diluição de fatores tóxicos presentes no plasma seminal; melhora da fertilidade do sêmen devido ao aporte de nutrientes contidos no diluidor; maior flexibilidade de inseminação, onde o sêmen depois de diluído, dependendo da situação, pode ser transportado em curtas distâncias sem necessidade de resfriamento, entre haras próximos e, se devidamente protegido dos raios solares até uma hora, sem prejuízo da fertilidade; e a possibilidade do fracionamento para maior número de éguas pela expansão do volume diluidor mais o sêmen (SQUIRES et al., 1999).

Após a diluição, o sêmen pode ser transportado, resfriado ou refrigerado e utilizado em períodos que variam de 1 a 48 horas, de acordo com a temperatura de armazenamento, se próxima a 5°C ou 15 - 20°C. A utilização da temperatura como conservante do sêmen tem sido rotineiramente aplicada na indústria equestre, sendo que o abaixamento de 10°C da temperatura do sêmen provoca redução de 50% do metabolismo, sendo que a 5°C, apenas 10% do metabolismo espermático, é necessário para que as células se mantenham viáveis (CARVALHO, 1992).

As taxas ideais de resfriamento do sêmen equino foram demonstradas por, onde os autores observaram que as taxas de resfriamento podem afetar a capacidade



de retenção da motilidade. Existem diversas caixas comercializadas no Brasil, nacionais e importadas, que mantêm a temperatura a 5°C ou a 15 - 20°C. De modo geral, o sêmen mantido a 5°C, pode ser utilizado por até 48 horas. Contudo, o pico de fertilidade está entre 24°C e 36°C após a colheita. O sêmen mantido a 15 - 20°C deve ser utilizado de preferência entre as 12 horas de sua colheita, e caso queira utilizar por 24 horas recomenda-se trocar a fonte de gelo reciclável 12 horas após. O transporte do sêmen deve ser feito nas mesmas caixas utilizadas para o resfriamento ou refrigeração, com um cuidado adicional de mantê-las em locais em que as variações de temperatura ambiente não possam intervir na curva de resfriamento, e na conservação do sêmen. De acordo com o tipo de material com que a caixa é feita, a temperatura ambiente causará maior ou menor variação, e esses cuidados devem ser considerados na escolha da caixa de transporte, além do custo do equipamento (SQUIRES et al., 1999).

Já que o sêmen congelado equino tem menor habilidade em interagir com as células oviduto da fêmea, mantendo sua viabilidade por menos tempo, indica-se que a inseminação seja feita de 0 a 24 horas antes da ovulação ou até 6 horas após a ovulação (SQUIRES et al., 1999).

A Indução farmacológica da ovulação é um procedimento fundamental na maximização e sucesso de diferentes protocolos de utilização de sêmen equino. Esta ferramenta tem sido amplamente utilizada nas inseminações com sêmen refrigerado, congelado.

2.5 Seleção e manejo de éguas doadoras e receptoras

Para seleção da égua doadora deve ser considerado o seu histórico reprodutivo, a fertilidade e genitores, as diretrizes do registro da raça, o valor potencial do potro resultante, e o número de gestações desejadas. O manejo consiste em monitorar o comportamento reprodutivo, emprego da palpação transretal, ultrassonografia, vaginoscopia, exame microbiológico, citologia e se possível histológico (biopsia) do útero, a fim de detectar possíveis anormalidades ovarianas ou uterinas e para monitorar a atividade folicular e ovulação, e o uso de hormônios exógenos para



sincronizar o estro e ovulação. Quando em cio, a égua doadora é examinada diariamente para monitorar o crescimento folicular, permitindo o ótimo momento para inseminação com sêmen fresco, refrigerado ou congelado (VANDERWALL et al., WOODS et al., 2007).

Em geral as éguas velhas apresentam baixa fertilidade e quando em programas de transferência de embriões, os índices de recuperação embrionária também são baixos, refletindo a dificuldade durante o processo de fecundação ou desenvolvimento e manutenção embrionária intra-uterina. As éguas velhas com histórico de obtenção de prenhez e perda embrionária posterior são melhores doadoras que aquelas repetidoras de cio (Squires & Seidel, 1995), normalmente por apresentarem endometrite crônica degenerativa, o que dificulta a manutenção e desenvolvimento embrionário adequado, culminando em perda embrionária, porém apresentando boa fertilidade (MEIRA; 2007).

A ultra-sonografia trans-retal é um procedimento não invasivo recomendado no momento da seleção das receptoras, bem como no ato da transferência, cujo objetivo é avaliar as características uterinas e ovarianas, especialmente o corpo lúteo. Assim, anormalidades podem ser observadas por meio do exame ultrasonografia, permitindo o descarte da receptora. Já que esta irá reconhecer o embrião e terá que fornecer as condições necessárias ao seu desenvolvimento. Considerando que a qualidade da receptora é a chave para o sucesso da técnica de transferência de embriões, tais procedimentos objetivam atingir altos índices de prenhez pós ovulação (MEIRA; 2007).

Crítérios de seleção incluem ótimo peso (400 a 550 kg), idade de 3 a 10 anos, boa índole e bom desenvolvimento mamário, ciclos estrais normais e livres de anormalidades uterinas e ovarianas (FLEURY, 2007).

De acordo com Squires & Seidel (1995) a melhor égua receptora é aquela que já produziu, outros fatores como a ciclagem normal também são importantes, pois permitirá maior sucesso no momento da sincronização da ovulação doadora/receptora, a menos que se pretenda utilizar éguas acíclicas tratadas hormonalmente como receptoras (MEIRA; 2007).



As receptoras também devem ser examinadas diariamente quando em cio para monitoramento do crescimento folicular e ovulação. É preferível que pelo menos duas receptoras estejam disponíveis para cada doadora, permitindo assim, no momento da inovulação, escolher a que apresenta as melhores condições reprodutivas para receber o embrião. Classificou-as por palpação e ultrassonografia transretal em: aceitáveis, quando apresentaram corpo lúteo bem definido, tônus uterino e cervical variando de bom a excelente, e nenhuma outra alteração no útero; e marginalmente aceitáveis, quando imagem do corpo lúteo pobre ou pouca tonicidade uterina e cervical (CARNEVALE, 2000).

Uma vez em cio, tanto a égua doadora quanto a receptora devem ser submetidas à avaliação trans-retal diária por meio da palpação retal ou ultra-sonografia, cujo objetivo é avaliar o desenvolvimento folicular e realizar o processo de inseminação artificial da doadora previamente à ovulação. Ocorrida a ovulação, recomenda-se que a colheita de embriões seja realizada nos dias 7 ou 8 pós-ovulação; os dias 6 e 9 também são utilizados pelos técnicos, porém em menor frequência. Quando o objetivo da colheita é a congelamento de embrião, o controle de desenvolvimento folicular deve ser realizado com intervalos menores que 24 horas e o lavado uterino realizado no dia 6 pós-ovulação (FLEURY, 2007).

2.6 Sincronização

Nas éguas a sincronização do estro e da ovulação possui uma maior complexidade, quando comparada com outras fêmeas de animais domésticos. Provavelmente isso ocorre devido a longa fase folicular que possuem as éguas e pela dificuldade que se tem de se adequar o controle do crescimento folicular. A sincronização do estro e da ovulação permite que éguas sejam cobertas ou inseminadas artificialmente em um período pré-determinado, com ou sem a detecção de cio. A principal aplicação da sincronização do estro e da ovulação em éguas e na transferência de embriões, quando a ovulação da égua receptora deve ocorrer um dia antes a dois dias após a ovulação da égua doadora (SQUIRES, 1993).



Os estros e ovulações entre doadoras e receptoras, podem ser sincronizados, desde que as éguas estejam ciclando regularmente. A utilização da prostaglandina é uma prática comum na sincronização do cio em éguas, porém a resposta a este agente luteolítico depende da presença de corpo lúteo funcional. O intervalo entre aplicações da prostaglandina ou seus análogos e a manifestação do estro ocorre geralmente após 3 a 6 dias, e a ovulação entre 9 a 10 dias. Caso haja um folículo em crescimento dominante e dependendo do diâmetro desse folículo, a ovulação pode ocorrer em intervalos menores pós-aplicação da prostaglandina (MEIRA, 2007).

O método mais apropriado para a indução da ovulação consiste na detecção do desenvolvimento e tamanho do folículo através da palpação retal, ou preferivelmente da ultra-sonografia, induzindo-se a ovulação quando o folículo atinge um determinado tamanho. Muito embora uma dimensão mínima (em mm) a resposta ovulatória de um folículo, provocada mediante estímulo da administração de LH não ter sido especificamente estudada, relata bons resultados ao utilizar agentes indutores da ovulação em folículo mínimo de 35 mm para uma resposta satisfatória (PALMER, 1993).

Muitos estudos foram delineados com o intuito de verificar a eficácia dos progestágenos exógenos na sincronização do estro e ovulação na égua. Progestágenos associados à aplicação de estradiol, também foram testados na expectativa de melhorar o grau de sincronização da ovulação. Contrariamente a utilização da prostaglandina, os progestágenos são administrados por um longo período (15 dias), permitindo um prolongamento da fase progesterônica do ciclo. O tratamento com progestágenos pode ser reduzido para 9 a 10 dias, se associado a aplicação de prostaglandina no 9º ou 10º dia de tratamento. A resposta a sincronização de cio é mais efetiva do que a de sincronização da ovulação, devido à maior facilidade de controle da meia vida do corpo lúteo que do desenvolvimento folicular. Os tratamentos mencionados podem ser associados a gonadotrofina coriônica humana (hCG) ou fator liberador de gonadotrofina (GnRH), objetivando-se um melhor índice de sincronização das ovulações entre doadoras e receptoras. No entanto, alguns autores admitem que aplicações sucessivas de hCG induzem a



formação de anticorpos, reduzindo a sua eficiência na resposta ovulatória (MEIRA, 2007).

Das diversas possibilidades para sincronizar a ovulação da égua, o uso de análogos da prostaglandina associados à aplicação de hCG (gonadotrofina coriônica humana), que provoca a ovulação em até 48 horas, o hCG é uma grande molécula glicoproteica, que quando utilizada em repetidas aplicações promove o desenvolvimento de anticorpos tornando-a ineficiente como promotora da ovulação e o GnRH sintético (deslorelina) e o extrato de pituitária equina (EPE) estão apresentando-se como alternativas eficazes para o desencadeamento da ovulação em tempo pré-determinado sem a ocorrência da formação de anticorpos, desta forma podendo se utilizados em vários ciclos consecutivos que é a pratica mais utilizada em programas de transferência de embriões em equinos (MELO et al., 2005).

2.7 Colheita de Embriões

Existem dois métodos de colheita de embriões, o cirúrgico e o não cirúrgico. O método cirúrgico foi descrito por Allen & Rowson (1975), deve ser utilizado somente quando o objetivo for à obtenção de embriões em estágios iniciais de desenvolvimento, pois a sua realização consiste na lavagem do oviduto. O método não cirúrgico (via transcervical) foi descrito primeiramente por pesquisadores japoneses (Oguri & Tustsumi, 1972), que utilizaram um cateter de três vias, similar ao preconizado por Rowson & Dowling (1949) para colheita de embriões em bovino (OGURI, 1972).

O procedimento não cirúrgico de coleta do embrião do lúmen uterino e relativamente simples. A colheita de embriões é realizada somente a partir do 6º dia pós-ovulação, pois os embriões na égua migram ao útero com 5 ou 6 dias de idade (OGURI, 1972).

No laboratório, previamente ao *flushing*, a sonda, circuito e filtro são preparados na zona limpa, em condições de higiene, e só depois trazidos para o exterior onde se encontra a égua. Antes do procedimento de recolha, a zona vulvar e



perivulvar da égua é lavada com sabão diluído em água e, posteriormente, os lábios e comissura vulvares são limpos com algodão embebido em solução fisiológica.

O embrião é recolhido através de uma lavagem uterina (*flushing*) da égua doadora, utilizando para tal 2 a 3 litros de uma solução de Ringer Lactato previamente aquecida a 37-40°C. Utiliza-se um cateter do tipo Foley, semi rígido, que passa através da cérvix até ao corpo uterino. Este cateter possui um balão na porção anterior que, quando cheio de ar, impede que o meio de lavagem reflua através da cérvix para a vagina. O extremo posterior é ligado a um circuito de duas vias, em que uma extremidade corresponde ao recipiente com o meio de lavagem e a outra ao filtro. Quando o cateter se encontra bem posicionado procede-se à introdução do meio de lavagem e sua posterior recolha. Para facilitar este procedimento, pode-se colocar uma mão pelo reto, de modo a ser possível massagear e elevar os corpos uterinos tendo isto impacto positivo na saída do fluido. Em caso de dificuldade de extração, pode-se efetuar uma ecografia para verificar onde se encontra o fluido, de modo a poder redirecionar a sonda. O filtro deve estar protegido da luz solar, por exemplo com papel prata, para reduzir os riscos de dano ao embrião. Quando se termina o procedimento, separa-se o filtro do circuito, e, já no laboratório, transferem-se os 20 a 30 ml de meio de lavagem que ficaram residuais no filtro para placas de Petri estéreis (MC KINNON, 1988).

O embrião é então procurado nas referidas placas, através da utilização de uma lupa estereoscópica. A placa de petri deve estar previamente riscada na sua parte inferior para facilitar a localização do embrião. Uma vez localizado, este é removido por aspiração com o auxílio de uma palheta de 0,5 ou 0,25 mL, acoplada a uma seringa de insulina, e transferido para uma placa de petri menor (35 x 10 mm), contendo o meio de manutenção TQC®, Ham F10, Encare®, dentre outros. sob estritas condições de higiene ambiental e operacional. Uma vez encontrado, deve-se examinar sobretudo a sua qualidade e estado de desenvolvimento (MC KINNON, 1988).

A qualidade é avaliada segundo o critério de McKinnon e Squires (1998), no qual a categoria 1 corresponde a um embrião excelente e a 4 a um degenerado.



Quanto ao desenvolvimento, o embrião deve ser classificado em mórula, blastocisto jovem ou blastocisto expandido. Após avaliação e classificação, o embrião é lavado em 10 passagens consecutivas no meio de manutenção. O objetivo desse procedimento é eliminar as impurezas presentes na zona pelúcida antes aspirá-lo na palheta de inovulação (VANDERWALL, 2007).

O embrião é envasado em palheta plástica de 0,25 mL em porções alternadas de solução de manutenção e ar. Este procedimento minimiza os movimentos do embrião dentro da palheta e assegura a perfeita expulsão do embrião para dentro do útero (SILVA, 2003).

Em relação à égua, imediatamente após o *flushing*, é administrada PGF2 α para que se dê a luteólise e conseqüente início de um novo ciclo. Se o fluido não for recolhido na totalidade, administra-se ocitocina endovenosa (SILVA, 2003).

2.8 Transferência dos Embriões

O equipamento para inovulação mais amplamente utilizado pelos pesquisadores de embriões equinos é a pipeta de inseminação artificial. Contudo, vários outros aplicadores também tem sido descritos, como o modelo Hannover de transferência de embriões bovinos. A avaliação das receptoras, anteriormente ao ato da transferência, é de suma importância. Devendo-se selecionar a égua mais adequada para receber o embrião. Tal seleção fundamenta-se nas concentrações plasmáticas de progesterona, naquele momento, contribuindo assim, para que estas apresentem as melhores condições reprodutivas. Então, por palpação deve-se observar a cérvix firme e fechada, aumento de tônus uterino (cilíndrico e tubular). A inovulação do embrião é feita com muita habilidade do técnico no corpo do útero na região da bifurcação cornal. Além disso, não pode haver nenhuma evidência de dobras endometriais ou secreção uterina no exame ultrassonográfico. Administrando progesterona em receptoras equinas no período de D0 (dia da ovulação) a D5, possibilitaram a inovulação destas receptoras no D2, obtendo taxa de prenhez estatisticamente similar as éguas consideradas excelentes à para inovulação no D5 (CARNEVALE, 2000).



3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As biotecnologias da reprodução como a transferência de embrião e a inseminação artificial tem se destacado nas ultimas décadas pelo seu avanço científico e comercial, o qual é refletido pelo incremento da eficiência da técnica, tornando assim, a relação custo benefício cada vez mais atraente para o criador. Seguindo esse preceito, os aspectos da reprodução como a TE e a IA torna-se cada vez mais comum na indústria do cavalo, sendo então, uma ferramenta bastante promissora para os técnicos que trabalham na área.

4. REFERÊNCIAS

ARRUDA, R.P., VISINTIN, J.A., FLEURY, J.J., GARCIA, A.R., MADUREIRA, E.H., CELEGHINI E.C.C. & NEVES NETO J.R. **Existem relações entre tamanho e morfoecogenicidade do corpo lúteo detectados pelo ultra-som e os teores de progesterona plasmática em receptoras de embrião equinos?** Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 38:233-239, 2001.

BOCHIO,L; **Inseminação Artificial**; ABQM
<<http://www.abqm.com.br/SecaoTecnica/Inseminação.asp>> Acesso em 26/10/2012.

BRINSKO, S.P., VARNER, D.D. **Artificial insemination**. In: McKINNON, A.O., VOSS, J.L. Equine Reproduction. Philadelphia: Williams & Wilkins. Chapter 84, 1992, p.790- 797.

CARMO, M.T.; TRINQUE, C.L.N.; LIMA, M.M.; MEDEIROS, A.S.L.; ALVARENGA, M.A. **Estudo da incidência de múltiplas ovulações em éguas da raça Brasileiro de Hipismo e suas implicações em um programa de transferência de embriões**. Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte, v.26, n.3, 2002, pg.252 -254.

CARMO, M.T. **Comparação entre Doses Constantes e Decrescentes de Extrato Pituitário Equina na Indução de Superovulação em Éguas**. 2003, p 156.

CARNEIRO, G.F. **Transferência de embriões em equinos**. In: CONGRESSOBRASILEIRO DE REPRODUCAO ANIMAL, 16, 2005, Goiania. Anais..., 2005.

CARNEVALE, E.M., RAMIREZ, R.J., SQUIRES, E.L., ALVARENGA, M.A., VANDERWALL,I D.K. & MC CUE, P.E. 2000. **Factors affecting pregnancy rates**



and early embryonic death after equine embryo transfer. Theriogenology , 2000, p.965-979.

CARVALHO, G. R. **Fertility of the diluted equine semen**, Cold to 20°C and transported. 1992. 87 f. Thesis (Magister Scientiae) – Department of Animal Science Federal University of Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 1992.

CHALHOUB, M; CARVALHO, G; FILHO, J.M.S; FILHO, A.L.R; OLIVEIRA, J.V.L. **Fertilidade de éguas inseminadas com sêmen eqüino diluído, resfriado a 20°C e transportado a diferentes momentos da ovulação.** Revista Brasileira de Reprodução Animal.1996.

FLEURY, P.D.C., ALONSO, M.A., SOUSA, F.A.C., ANDRADE, A.F.C. & ARRUDA, R.P. **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, 2007.

LEÃO, K.M. **Inseminação artificial por endoscopia com número reduzido de espermatozoides utilizando sêmen fresco e congelado de garanhões.**2002. Tese (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

LEY, M.B.; **Reprodução em Éguas para veterinários de eqüinos**, 1ª Ed. Roca, São Paulo, 2006, p.184-191.

LIRA, R. A., PEIXOTO, G.C.X., SILVA, A.R. **Transferência de embrião em eqüinos:** Revisão. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.3, n.4, 2009, p.132-140.

LOOMIS, P. R. Advanced methods for handling and preparation of stallion Semen. **Veterinary Clinics North American Equine Practice**, v. 22, n. 3, 2006, p. 663-676.

LOVE, C. C. **Reproductive examination of the stallion: evaluation of potential breeding soundness.** In: YOUNGQUIST, R. S.; THARELFALL, W. R. Current therapy in large animal. Theriogenology. 2nd. ed. Saint Louis: Elsevier-Saunders, 2007. p. 10-14.

MC KINNON, A.O., SQUIRES, E.L. & CARNEVALE, E.M. **Ovariectomized steroid-treated mares as embryo transfer recipients and as a model to study the role of progestins in pregnancy maintenance.** Theriogenology 1988, 29:1055-1063.

McKinnon AO, Squires EL (1998) **“Morphologic assessment of the equine embryo”** J. Am. Med. Vet. Ass. 192, 401-406.



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.

MELO, C. M. **Efeito da criopreservação por 24 horas em diferentes sistemas de refrigeração sobre a viabilidade e fertilidade de sêmen congelado equino**. 2005. 104p. Tese (Mestrado) faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

MIES FILHO, A. **Inseminação Artificial**. 6 a edição. Porto Alegre: Sulina, 750p,1987.

PALMER, E. **Induction of ovulation**. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction**. Baltimore: Williams & Wilkins. p. 344-347, 1993.

SAMPER, J. C.; ESTRADA, A. J.; MCKINNON, A. O. Insemination with frozen semen. In: _____. **Current therapy in equine reproduction**. Saint Louis: Elsevier-Saunders, 2007. p. 285-288.

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

SILVA FILHO, J. M. **Aspects of the reproductive handling and of the semen in the artificial insemination in mares**. 1994. 402 f. Thesis (Doctor Scientiae) – Department of Animal Science Federal University of Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 1994.

SQUIRES, E.L. **Embryo transfer**. In: MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 357-367.

SQUIRES, E. L. et al. **Cooled and frozen stallion semen, fort collins: animal reproduction biotechnology laboratory**. Colorado State University, **Bulletin** n. 9, 1999.

SQUIRES, E.L., SEIDEL, G.E. Jr., Superovulation. In:___ **Colletion and transfer of equine embryos**. **Anim. Reprod. And Biotecology Lab.**, Bulletin n.8, Fort Collins, Colorado, 1995. P. 32-38.

VALLE, G. R. et al. **Utilização de um contêiner modelo Celle modificado para resfriamento e transporte de sêmen equino**. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.**, v. 51, n. 5, 1999, p. 505-514.

VANDERWALL D.K. & WOODS G.L. **Embryo transfer and newer assisted reproductive thecniques for horses**. In: **Youngquist R.S. & Threlfall W.R. (Eds)**



Current Therapy in Large Animal Theriogenology. Saunders, Missouri. 2007, p.211-219.

