



## Antecipação da transferência de embriões em éguas receptoras em anestro estacional

[*Embryos transfer anticipation in recipient mares during seasonal anestrus*]

### **“Artigo Científico/Scientific Article”**

Marcos Daniel Neves<sup>1</sup> , Nayara Christina Silva Laquiz<sup>1</sup> , Alessandra Crossara Testa<sup>2</sup> ,  
Amanda Pifano Neto Quintal<sup>3</sup> , André Belico de Vasconcelos<sup>1\*</sup> 

<sup>1</sup>Universidade de Uberaba, Uberaba-MG, Brasil.

<sup>2</sup>Médica-veterinária autônoma, Quirinópolis-GO, Brasil.

<sup>3</sup>Faculdades Associadas de Uberaba, Uberaba-MG, Brasil.

\*Autor para correspondência/Corresponding author: E-mail: [devasconcelos.a.b@gmail.com](mailto:devasconcelos.a.b@gmail.com)

### **Resumo**

O objetivo do trabalho foi avaliar a taxa de prenhez de éguas receptoras acíclicas preparadas com protocolo de estrógeno e progesterona (P4), em período alternativo da janela de sincronização. O estudo foi realizado em Acreúna (GO), em arrendamento comercial. Para tal, foram utilizadas éguas receptoras (n=15) divididas em três grupos: G1 (n=5) - anestro estacional natural; G2 (n=5) - éguas em anestro estacional utilizadas no terceiro dia (D3) após aplicação de P4; e G3 (n=5) - éguas em anestro estacional utilizadas no quinto dia (D5) após aplicação de P4. As éguas foram acompanhadas via palpação transretal e ultrassonografia, quanto às condições uterinas e foliculares. Foi aplicada análise descritiva em percentual, seguida do teste de contingência Qui-quadrado, avaliando as taxas de prenhez ao nível de significância de 95%. Dos resultados, observamos que éguas acíclicas usando progesterona de longa ação tiveram taxas de prenhez igual ou maior que éguas cíclicas. Conforme os dados na análise da janela de sincronização adotada neste estudo, não houve diferença entre os momentos de inovulação, uma vez que as receptoras acíclicas submetidas ao protocolo de estrógeno e progesterona e inovuladas no D3 (G2) mostraram 80% de taxa de prenhez, enquanto animais do G1 e G3 apresentaram taxa de prenhez em 60%. Assim, a antecipação da janela de sincronização convencional do quarto (D4) ao oitavo dia (D8) para D3 a D8 propicia índices gestacionais satisfatórios, otimizando o uso de receptoras acíclicas.

**Palavras-chave:** sincronização; taxa de prenhez; progesterona de longa ação.

### **Abstract**

The present work objective was to evaluate the pregnancy rate of acyclic recipient mares prepared with estrogen and progesterone (P4) protocol, in alternate period of the synchronization window. The study was carried out in Acreúna (GO), under commercial lease, for which receiving mares (n=15) were used, divided into three groups: G1 (n=5) natural seasonal anoestrus; G2 (n=5) mares in seasonal anoestrus used on the third day (D3) after P4 application; and G3 (n=5) mares in seasonal anoestrus used on the fifth day (D5), after P4 application. The mare's uterine and follicular conditions were monitored via transrectal palpation and ultrasonography. Descriptive analysis in percentage was applied, followed by Chi-square contingency test evaluating pregnancy rates, at 95% of significance level. Considering the results, we observed that acyclic mares using long-acting progesterone had pregnancy rates equal to or greater than cyclic mares. According to synchronization window adopted in this study, there was no difference between the ovulation times, since the acyclic recipients submitted to the estrogen and progesterone protocol and inoculated on D3 (Group 2) showed 80% pregnancy rate, while animals in groups G1 and G3 had 60% of a pregnancy rate. Thus, the anticipation of the conventional synchronization window from the fourth (D4) to the eighth day (D8) to D3 to D8 provides satisfactory gestational rates, optimizing the use of acyclic recipients.

**Keywords:** synchronization; pregnancy rates; long action progesterone.

Recebido 01 de setembro de 2022. Aceito 16 de maio de 2023.

DOI: <https://doi.org/10.26605/medvet-v17n2-5214>



## Introdução

O Brasil é um dos quatro países com o maior rebanho equino do mundo, com aproximadamente 5,3 milhões de cabeças e com uma estrutura tecnológica relevante para atender a demanda da equinocultura (Lima e Cintra, 2016).

As técnicas reprodutivas são as mais usualmente aplicadas para a espécie equina no Brasil, com destaque para a produção e transferência de embriões *in vitro* (Viana, 2019). Contudo, algumas dificuldades têm se estabelecido na área da reprodução, principalmente no aspecto de transferência de embriões, uma vez que se deve observar o ano hípico estabelecido por algumas associações de criadores de cavalos e as dificuldades existentes na sincronização de éguas doadoras e receptoras (Losinho e Alvarenga, 2006).

A espécie equina é classificada reprodutivamente como poliéstrica sazonal fotoperíodo, ou seja, manifesta ciclos estrais durante o período de maior luminosidade diária (Aurich, 2011). Desta forma, os eventos fisiológicos em seu ciclo estral apresentam uma duração média de  $21,7 \pm 3,5$  dias, sendo a fase de estro (fase folicular) com duração média  $6,5 \pm 2,6$  dias e a fase de diestro (fase luteal) com duração média de  $14,9 \pm 2,8$  dias, que são intervaladas entre dois períodos de cio (Blanchard et al., 2003).

A fase estral é caracterizada pela presença de um folículo dominante ( $> 30$  mm de diâmetro) responsável pela secreção de estrógeno (E2) e que propicia a elevação dos níveis do hormônio luteinizante (LH). A fase do diestro ocorre entre 24 e 48 horas após a ovulação e é caracterizada pela presença do corpo lúteo, conseqüentemente liberação de progesterona (P4), a qual permanece estável até o décimo segundo dia quando ocorre uma queda acentuada, seguida de luteólise entre o décimo quarto e décimo sexto dia do ciclo estral (Ginther et al., 2008; Oliveira et al., 2020).

A utilização de esteroides e progestágenos que causam efeito análogo ao E2 e à P4 tem sido uma referência na área de tecnologia da reprodução, pois possibilita a indução de mudanças desejáveis no útero em éguas acíclicas, parecidas com as que ocorrem no ciclo estral de éguas cíclicas (Greco et al., 2012; Oliveira et al., 2020), capacitando-as a receber um embrião e manter a gestação mesmo nesse período de anestro estacional (Riera, 2009).

Contudo, não somente o protocolo de sincronização representa o ponto chave na

transferência de embriões (TE), mas uma estratégia de sincronização entre doadora e receptora, torna-se ponto chave para o êxito da técnica. A literatura descreve que o momento de sincronização pode estar no intervalo entre o quarto dia (D4) e oitavo dia (D8) de ovulação da receptora (Greco et al., 2012; Jacob et al., 2012; Pinto et al., 2017).

Todavia, se o ambiente uterino da receptora estiver fisiologicamente compatível com o da doadora, bem como o suporte hormonal e o manejo de seleção, é possível antecipar o momento de sincronização (Cuervo-Arango et al., 2017). Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a taxa de prenhez de éguas receptoras acíclicas preparadas com protocolo de estrógeno e progesterona, e utilizadas no terceiro dia (D3), fora da janela de sincronização (D4 e D8).

## Material e Métodos

O presente estudo foi realizado em um arrendamento comercial em Acreúna (GO), durante o início da estação de monta (período transicional, setembro de 2018). Os animais foram mantidos em pastos de mombaça (*Megathyrus maximus*), com água e sal mineral *ad libitum*.

Foram utilizadas 15 éguas, sem raça definida, com peso médio de 350 kg (peso obtido através da fita de pesagem da SUPRA®, São Paulo, Brasil), com score corporal médio de 3,5 (escala de 0 a 5, em que 0 corresponde a muito magra e 5 muito acima do peso) e idade entre 3 e 10 anos.

Considerando manejo sanitário, todas as éguas receptoras foram negativas para Anemia Infecciosa Equina (AIE) e Mormo, seguido pelo controle de endo e ectoparasitas utilizando doramectina 1% (Dectomax, ZOETIS, Campinas, São Paulo).

As éguas receptoras e doadoras foram selecionadas através de palpação retal para avaliação da integridade da cérvix e complexo útero-ovários. A ultrassonografia (US) do trato reprodutivo (com ultrassom em modo B e probe retal 5 MHz - CMS600P1, Contec, China) foi utilizada para verificar a ausência de problemas que pudessem interferir na gestação, como tumor ovariano e sinais de infecção, além de uma avaliação da região do períneo, integridade de vulva, úbere e edema uterino (escala de 0 a 5), segundo Scarlet et al. (2023).

### *Éguas receptoras*

As receptoras eram éguas em anestro estacional que mostraram folículos  $<15$  mm de

diâmetro, sendo avaliadas por US (edema e tamanho do folículo) a cada 12 horas, durante um período de três semanas, para determinar o momento da transferência do embrião. Estas éguas foram divididas em três grupos, conforme Tabela 1.

O grupo 1 (G1) foi monitorado diariamente, após detecção de cio, via palpação retal e ultrassonografia, para determinar quais éguas seriam sincronizadas com ou sem a utilização do protocolo hormonal. Os animais selecionados apresentavam útero de edema 3 (com escala de 0 a 5, segundo Samper 2007), ecogenicidade uniforme e ausência de líquido, bem como folículo maior ou igual a 35 mm, para que pudessem ser induzidas no dia dois (D2) e ovularem no dia zero (D0) (Figura 1).

Para este grupo de animais a indução da ovulação foi feita com um análogo do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), 250 µg (1 ml)

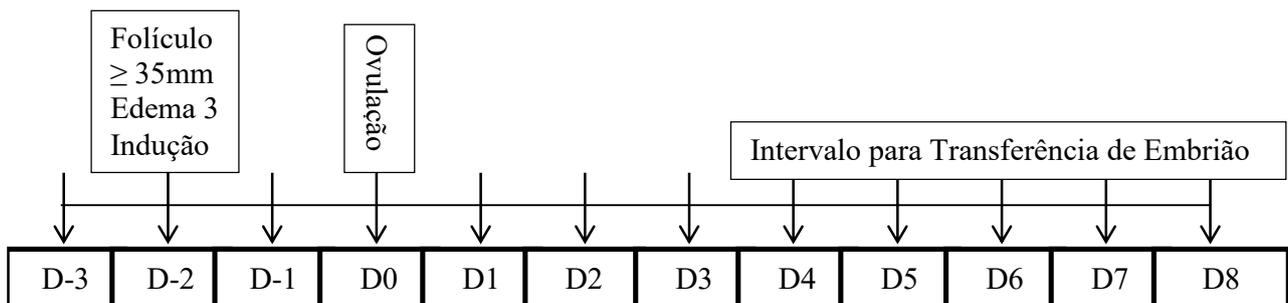
de histrelina (Strelin®, Botupharma, São Paulo, Brasil), via intramuscular profunda, entre 20 e 21 horas da noite do momento que foram avaliadas com folículo maior ou igual a 35 mm e escala de edema 3. Após 36 horas da aplicação, foi detectada ovulação via US e os animais foram utilizados entre D4 e D8 para a transferência de embrião.

O protocolo de sincronização seguiu com aplicação de progesterona de longa ação (P4LA) via intramuscular profunda nas éguas em anestro dos grupos G2 e G3, após três dias consecutivos de aplicação de estrógeno (17 BETA® – 17β Estradiol 1%, frasco de 50 ml, Botupharma, São Paulo, Brasil) via intramuscular profunda na dose de 10 mg (1 ml) no D3, 20 mg (2 ml) no D2 e 10 mg (1 ml) no D1 (Figura 2).

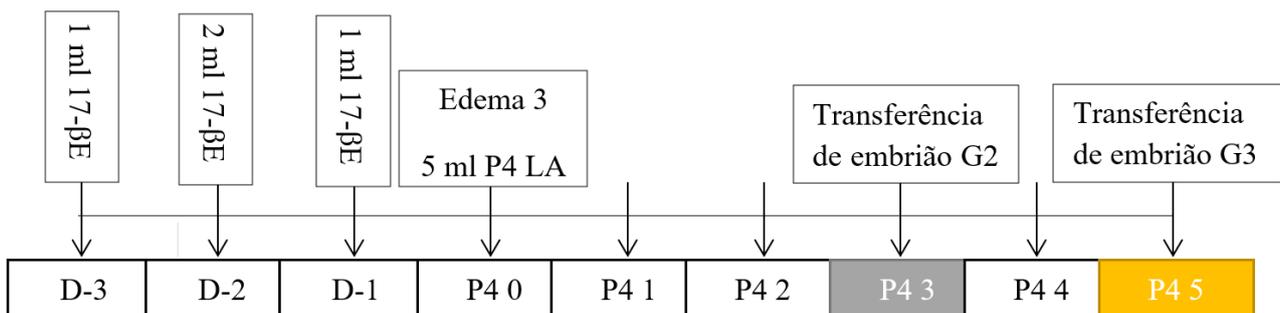
No dia inicial (D0) para os G2 e G3, antes da aplicação de progesterona intramuscular, realizou-se uma avaliação via palpação retal e US do edema uterino.

**Tabela 1.** Grupos das receptoras e suas respectivas características.

Grupos	Características
G1 – Controle (n=5)	Éguas que voltaram naturalmente do anestro estacional e ovularam após indução.
G2 – D3 (n=5)	Éguas que receberam embrião no terceiro dia (D3) após aplicação de P4
G3 – D5 (n=5)	Éguas que receberam embrião no quinto dia (D5) após aplicação de P4



**Figura 1.** Sincronização do grupo 1 – G1 (controle) para transferência de embrião entre o quarto (D4) e oitavo dia (D8) após ovulação.



**Figura 2.** Sincronização dos grupos 2 (G2) e 3 (G3) para transferência de embrião nos dias 3 (D3) e 5 (D5), respectivamente, após aplicação de progesterona de longa ação (P4LA).

Assim, os animais que apresentaram edema grau 3 foram selecionados para iniciar o tratamento com 5 ml de progesterona de longa ação (P4-300® - Botupharma, São Paulo, Brasil), 1500 mg via intramuscular profunda, aplicação única. Desta forma, os animais do G2 seguiram com a transferência de embrião, no dia 3 após aplicação de P4-300® e os animais do G3 seguiram para a transferência de embrião no dia 5 após aplicação de P4-300®.

#### Éguas doadoras

As éguas doadoras de embrião foram acompanhadas durante o cio, via palpação retal e ultrassonografia. Assim que atingiram o crescimento folicular de um folículo maior ou igual a 35 mm e edema grau 3, receberam a aplicação de 250 µg (1 ml) de histrelina (Strelin®, Botupharma, São Paulo, Brasil), via intramuscular profunda, entre 20 e 21 horas, para controle do momento da ovulação (técnica chamada de indução de ovulação).

Os embriões transferidos foram obtidos a partir de doadoras junto à Central de Reprodução de Rio Verde (GO). Todos os embriões transferidos estavam viáveis e tiveram mesma qualidade morfológica, conforme critério do próprio laboratório.

As éguas doadoras, após terem seus embriões coletados, receberam dinoprost trometamina (6,71 mg – 1 ml, Lutalyse® ZOETIS,

Campinas, São Paulo), via intramuscular profunda, para lisar o corpo lúteo.

#### Avaliação de prenhez

O exame ultrassonográfico para a confirmação de prenhez nas éguas receptoras foi realizado cinco dias após a inovulação e, posteriormente, com 25 dias de gestação, verificando a presença de batimentos cardíacos. A terceira avaliação gestacional foi realizada aos 60 dias. Todas as receptoras com diagnóstico positivo de prenhez receberam dose semanal de P4 até 120 dias de gestação, após o quarto e último exame ultrassonográfico.

Para análise estatística foi utilizado o programa GraphPadPrism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Foi aplicada análise descritiva em percentual, seguida do teste de contingência Qui-quadrado avaliando as taxas de prenhez, ao nível de significância de 95%.

#### Resultados e discussão

O G1 (éguas anestro estacional/natural - controle) e o G3 (éguas em anestro estacional / progesterona aplicada no quinto dia) apresentaram taxa de prenhez de 60%. Já o G2 (éguas em anestro estacional/progesterona aplicada no terceiro dia) apresentou 80% de prenhez (Figura 3). Houve diferença significativa entre as taxas de prenhez de G1 e G3, quando comparados com o G2 (Teste Qui-quadrado  $P = 0,0025$ ).

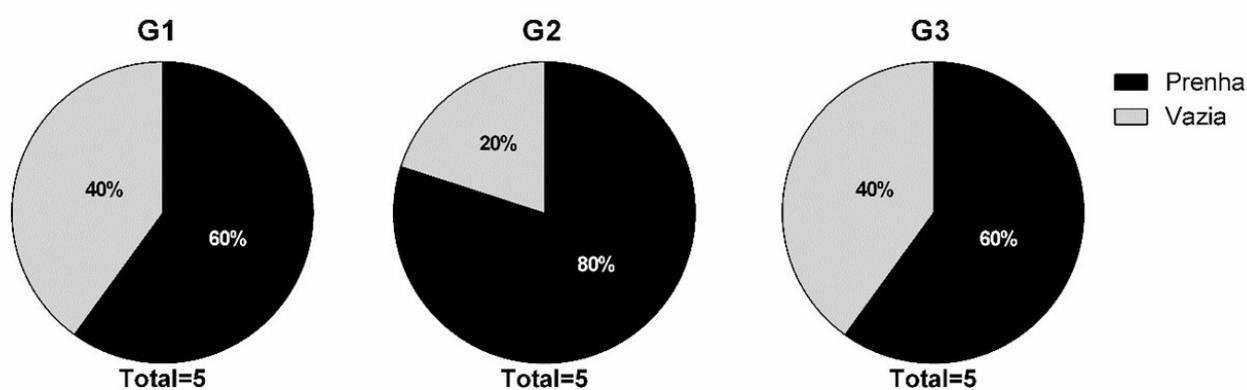


Figura 3. Taxa de prenhez dos grupos 1, 2 e 3 (G1, G2 e G3) após protocolos, no dia 12 do embrião.

No presente estudo, éguas acíclicas usando progesterona de longa ação (única aplicação de 1.500 mg a cada 7 dias) tiveram taxas de prenhez iguais ao grupo controle (cíclicas) quando utilizadas em D5 e maior que éguas cíclicas quando utilizadas em D3, como observado por Greco et al.

(2012), o que nos faz questionar se o ponto de inferência pode estar relacionado à ciclicidade da receptora, ou ao dia de transferência do embrião.

Entretanto, altas taxas de prenhez em receptoras acíclicas comparado às cíclicas não são bem descritas. Contudo, alguns fatores elucidados

por Stout (2006) podem estar relacionados, como a prevenção de luteólise prematura durante a manipulação transcervical na transferência de embrião. A redução de progesterona plasmática durante a manipulação da cérvix para transferência de embrião também foi observada por Kask et al. (1997).

Dessa maneira, éguas acíclicas possuem uma vantagem quanto à alteração da concentração de progesterona plasmática endógena, que não oscila em decorrência da manipulação cervical, pois sua fonte é exógena (Greco et al., 2012).

Outro fator capaz de ter influenciado a taxa de prenhez entre as éguas cíclicas e acíclicas pode ser o período do ano e o início de estação de monta, quando as éguas ainda estão superando o período de transição, como foi observado por Riera (2009) em seu estudo no final da estação de monta. Portanto, o presente estudo enfatizou a capacidade do uso de receptoras em anestro durante períodos de escassez de éguas cíclicas regulares, sendo a progesterona de longa ação uma alternativa promissora e segura.

No presente trabalho, a concentração de P4LA utilizada foi 1.500 mg a cada 7 dias. Hollinshead et al. (2022) citaram que, para receptoras manterem bons índices gestacionais, a manutenção dos níveis de progesterona deve ser realizada e, para tal, deve-se aplicar 1.500 mg a cada 7 dias, conforme descrito no presente estudo. Corroborando o trabalho de Kaercher et al. (2011) que também advertiram sobre o uso de progesterona na dose mínima de 1.500 mg semanalmente para éguas acíclicas.

De acordo com a janela de sincronização adotada neste estudo, os resultados foram semelhantes aos obtidos por Greco et al. (2012), em que receptoras D3, D4, D5 e D6 mostraram taxas de prenhez similares, no 12º dia (idade do embrião). Para Oliveira Neto et al. (2018), os resultados também foram satisfatórios, em que receptoras acíclicas preparadas com protocolo de estrógeno e progesterona, no D3 mostraram altas taxas de prenhez.

As receptoras de embrião em protocolo são selecionadas em cada etapa do processo de acordo com qualidade uterina, ambiente esse responsável pelo sucesso da transferência de embrião. Dessa maneira, é imprescindível a avaliação do tamanho e do tônus uterino, por palpação retal e ultrassonografia, pois qualquer sinal de alteração do estado esperado deve ser utilizado como motivo de retirada da receptora do programa de

transferência de embrião (Squires e Seidel, 1995), assim como se realizou no presente trabalho.

Além dos benefícios já citados, pode-se alcançar reduções no custo e manejo do rebanho de receptoras, uma vez que se consegue otimizar o uso de um menor número de animais logo no início da estação de monta, com janela de sincronização mais ampla (D3 a D8), reduzindo o descarte e evitando custos extras, como luz artificial (Jacob et al., 2010).

### Conclusão

A utilização de éguas receptoras acíclicas é uma forma de potencializar a reprodução de equinos, bem como a antecipação da janela de sincronização para D3, tendo resultados promissores quanto à taxa de prenhez.

### Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

### Comitê de Ética

O projeto foi submetido ao comitê de ética em experimentação animal da Universidade de Uberaba e aprovado conforme ofício CEEA 045/2019.

### Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Programa de Iniciação Científica da Universidade de Uberaba (PIBIC).

### Referências

- Aurich C. Reproductive cycles of horses. **Animal Reproduction Science**, 124: 220-228, 2011.
- Blanchard, T.L et al. **Manual of equine reproduction**. 2<sup>nd</sup> ed. Missouri: Mosby, 2003. 272 p. Cuervo-Arango, J.; Claes, A.N.; Ruijter-Villani, M.; Stout, T.A. Likelihood of pregnancy after embryo transfer is reduced in recipient mares with a short preceding oestrus. **Equine Veterinary Journal**, 50(3): 386-390, 2017.
- Ginther, O.J. et al. Characterisation of pulses of 13,14-dihydro-15-keto-PGF<sub>2</sub>α (PGFM) and relationships between PGFM pulses and luteal blood flow before, during, and after luteolysis in mares. **Reproduction, Fertility and Development**, 20: 684-693, 2008.

- Greco, G.M. et al. Use of long-acting progesterone to acyclic embryo recipient mares. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 41(3): 607-611, 2012.
- Hollinshead, F.K. et al. The correlation of endogenous progesterone concentration in diestrus on early pregnancy rate in thoroughbred mares. **Journal of Equine Veterinary Science**, 118: 104127, 2022.
- Jacob, J.C.; Santos, G.O.; Oliveira, J.P.; Gastal, M.; Gastal, E.L. Evaluation of reproductive parameters in a commercial equine embryo transfer program. **Animal Reproduction Science**, 121S: S305-S306, 2010.
- Jacob, J. C. F.; Haag, K.Y.; Santos, G.O.; Oliveira, J.P.; Gastal, M.O.; Gastal, E.L. Effect of embryo age and recipient asynchrony on pregnancy rates in a commercial equine embryo transfer program. **Theriogenology**, 77(6): 1159-1166, 2012.
- Kaercher, F.; Siqueira, M.; Mercadante, A.; Figueiredo, T.; Romualdo Weiss, R.R.; Siqueira, F.; Kozicki, L.E. Embryo transfer in no cycling crioula and quarter horse breeds treated with estradiol cypionate and long-acting progesterone. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 54(6): 1147-1150, 2011.
- Kask, K.; Odensvik, K.; Kindahl, H. Prostaglandin F2a release associated with an embryo transfer procedure in the mare. **Equine Veterinary Journal**, 29(4): 286-289, 1997.
- Lima, R.A.S.; Cintra, A.G. **Revisão do Estudo do Complexo do Agronegócio do Cavalo**. Brasília: MAPA, 2016. 56 p.
- Losinho, L.; Alvarenga, M.A. Fatores críticos em programas de transferência de embriões em equinos no Brasil e Argentina. **Acta Scientiae Veterinariae**, (34): 39-49, 2006.
- Oliveira, G.C.; Horber, D.; Quintal, A.P.N.; Vasconcelos, A.B. Efeito de protocolo hormonal e programa de luz artificial na gestação de éguas receptoras de embrião durante o período de transição de primavera. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, 27(2):88-92, 2020.
- Oliveira Neto, I.V.; Canisso, I.F.; Segabinazzi, L.G.; Dell'Aqua, C.P.F.; Alvarenga, M.A.; Papa, F.O.; Dell'Aqua, J.A. Synchronization of cyclic and cyclic embryo recipient mares with donor mares. **Animal Reproduction Science**, 190: 1-9, 2018.
- Pinto, M.R.; Miragaya, M.H., Burns, P.; Douglas, R.; Neild, D.M. Strategies for increasing Reproductive efficiency in a commercial embryo transfer program with high performance donor mares under training. **Journal Equine Veterinary Scientific**, 54: 93-97, 2017.
- Riera, F.L. Equine embryo transfer. In: Samper, J.C. (ed.) **Equine breeding management and artificial insemination**. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2009. 199 p.
- Scarlet, D. et al. Relationship between Clinical Uterine Findings, Therapy, and Fertility in the Mare. **Veterinary Sciences**, 10(4): 1-11, 2023.
- Stout, T.A.E. Equine embryo transfer: review of developing potential. **Equine Veterinary Journal**, 38(5), 467-478. 2006.
- Squires, E.L.; Seidel, G.E. Collection and transfer of equine embryos (Bulletin n.8). **Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory**. Colorado State University, USA, 1995.
- Viana, J.H.M. 2018 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. Embryo production on a new level: over one million embryos produced *in vitro*. **Embryo Technology Newsletter**, 37(4): 7-25, 2019.