

Transferência de embriões em éguas receptoras anovulatórias

Viviana Helena Vallejo Aristizábal¹ / Henry David Mogollón García² / Elisa Sant'anna Monteiro da Silva³ / José Antônio Dell'Aqua Junior⁴

Resumo

Este artigo discute os principais aspectos do uso de protocolos hormonais baseados na aplicação de estrógeno seguido de progestágenos em receptoras anovulatórias ou acíclicas, seja em anestro ou transição nos protocolos de transferência de embriões. A maioria das éguas apresentam comportamento poliéstrico estacional, com o que manifestam estro e ciclos ovulatórios nos períodos de maior luminosidade diária. O ciclo reprodutivo anual das éguas é caracterizado pela presença de quatro fases definidas pela dinâmica folicular: de anestro, de transição de primavera, ovulatória e de transição de outono. Durante as fases de transição e anestro, a incidência das ovulações diminui ou é nula, ou que dificulta a sincronização das ovulações entre doadoras e receptoras durante a preparação para a transferência de embriões. Alguns estudos mostram que as receptoras anovulatórias/acíclicas mantidas com protocolos com base em esteroides apresentam mudanças uterinas similares às que acontecem nas éguas gestantes. Contudo, não há pesquisas suficientes que permitam esclarecer o melhor protocolo de esteroides, no que se refere à dose, tempos de tratamento e vias de administração.

Palavras chave: anovulatórias, acíclicas, altrenogest, progestágenos, progesterona.

- 1 Médica veterinária, Universidad de Antioquia, Medellín, Colômbia, Msc. Biotecnologia Animal área de Reprodução Animal, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Brasil. Estudante de Doutorado em Biotecnologia Animal, área de Reprodução Animal, UNESP, Brasil.
✉ vallaristy@gmail.com.
- 2 Médico veterinário, Universidad de Pamplona, Pamplona, Colômbia. Msc. Biotecnologia Animal área de Reprodução Animal, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Brasil. Estudante de Doutorado em Biotecnologia Animal, área de Reprodução Animal, UNESP, Brasil.
✉ hdmogollong@fmvz.unesp.br.
- 3 Médica veterinária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Brasil. Dra. em Biotecnologia Animal, área de Reprodução Animal, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Brasil.
✉ elisa_santanna@yahoo.com.br
- 4 Médico veterinário, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Brasil. PhD em Medicina Veterinária Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Brasil.
✉ dellaquajunior@uol.com.br.

Como citar este artigo: Vallejo Aristizábal VH, Mogollón García HD, Monteiro da Silva ES, Dell'Aqua Junior JA. Transferência de embriões em éguas receptoras anovulatórias. *Rev Med Vet.* 2017;(33):137-47. doi: <http://dx.doi.org/10.19052/mv.4061>

Embryo transfer in anovulatory recipient mares

Abstract

This article discusses the main aspects of using hormonal protocols based on the application of estrogen followed by progestogen in anovulatory or acyclic recipients, either in anestrus or transition in embryo transfer protocols. Most mares demonstrate seasonally polyestrous behavior, by which they manifest estrus and ovulatory cycles during periods of higher daily luminosity. The annual reproductive cycle of mares is characterized by the presence of four phases defined by follicular dynamics: anestrus, spring transition, ovulatory, and autumn transition. During the phases of transition and anestrus, the incidence of ovulations decreases or is zero, making it difficult to synchronize ovulations between donors and recipients in preparation for embryo transfer. Some studies have shown that anovulatory/acyclic recipient mares managed with steroid-based protocols have similar uterine changes to those observed in pregnant mares. However, there is no sufficient research to allow to clarify the best steroid protocol with respect to dose, treatment times, and routes of administration.

Keywords: anovulatory, acyclic, altrenogest, progestogens, progesterone.

Transferencia de embriones en yeguas receptoras anovulatorias

Resumen

Este artículo discute los principales aspectos del uso de protocolos hormonales basados en la aplicación de estrógeno seguido de progestágeno en receptoras anovulatorias o acíclicas, sea en anestro o transición en los protocolos de transferencia de embriones. La mayoría de las yeguas presentan comportamiento poliéstrico estacional, con lo que manifiestan estro y ciclos ovulatorios en los periodos de mayor luminosidad diaria. El ciclo reproductivo anual de las yeguas es caracterizado por la presencia de cuatro fases definidas por la dinámica folicular: de anestro, de transición de primavera, ovulatoria y de transición de otoño. Durante las fases de transición y anestro, la incidencia de las ovulaciones disminuye o es nula, lo que dificulta la sincronización de las ovulaciones entre donadoras y receptoras durante la preparación para la transferencia de embriones. Algunos estudios han mostrado que las receptoras anovulatorias/acíclicas mantenidas con protocolos con base en esteroides presentan cambios uterinos similares a los que pasan en las yeguas gestantes. Sin embargo, no hay investigaciones suficientes que permitan aclarar el mejor protocolo de esteroides, con respecto a dosis, tiempos de tratamiento y vías de administración.

Palabras clave: anovulatorias, acíclicas, altrenogest, progestágenos, progesterona.

INTRODUÇÃO

A transferência de embriões (TE) é a técnica de reprodução assistida mais difundida na espécie equina. Segundo Hartman (1), o número de transferências realizadas nos equinos supera a implementação de inseminação artificial (IA). O Brasil e os Estados Unidos ocupam um lugar de destaque na utilização desta técnica, reportando 24.880 e 601 colheitas de embriões com 19.680 e 337 transferências, respectivamente, realizadas no ano 2014 (2).

As demandas do meio pelo número de potros nascidos e as dificuldades existentes para sincronizar éguas doadoras e receptoras sem a aplicação de hormônios tornam imprescindível aperfeiçoar os conhecimentos sobre os processos fisiológicos reprodutivos (3) e o uso de protocolos hormonais nas éguas receptoras. Neste contexto, a manipulação do ciclo reprodutivo com hormônios exógenos permite aperfeiçoar a exploração equina uma

vez que éguas em anestro, produto da sazonalidade, são aproveitadas.

Nos países mais distantes da linha do equador, éguas são consideradas poliéstricas estacionais (4) que apresentam ciclo reprodutivo dividido em quatro fases baseadas na dinâmica folicular, sendo fase de anestro, transição de primavera, ovulatória e transição de outono (5).

Sabe-se que o fotoperíodo é um dos fatores externos mais importantes que influencia o ciclo reprodutivo da égua. No hemisfério sul, a primavera e o verão se apresentam entre os meses de outubro e março e, no hemisfério norte, entre os meses de abril e setembro. Meados de primavera e verão caracterizam-se pela ocorrência de dias mais longos (mais horas-luz por dia), o que se traduz em maior estímulo reprodutivo e faz com que as éguas ativem a dinâmica ovárica (6). Porém, o início da estação reprodutiva depende também de outros fatores fisiológicos

e ambientais, tais como idade, condição corporal, raça e alimentação (7). Todos estes fatores estão associados com a variação da ocorrência das ovulações no decorrer dos meses e limitam a utilização dos animais no aspecto reprodutivo durante todo o ano.

Tanto a qualidade como a disponibilidade de receptoras cíclicas durante a estação reprodutiva representam limitações nos programas de TE, devido à dificuldade na sincronização da doadora com a receptora (8) e a ocorrência de anestro estacional ou profundo. Desta forma, o aproveitamento das éguas acíclicas por meio da administração de estrógeno e progestágenos (progesterona ou altrenogest) para estabelecer e manter a gestação, torna a técnica de TE mais produtiva ao longo do ano (9).

Diversos estudos confirmam a eficácia de protocolos que utilizam estrógeno e progestágenos para o preparo e manutenção de éguas acíclicas como receptoras de embriões em programas de TE (8,10-12). A utilização destes protocolos aumenta as taxas de prenhez ao longo do ano, diminuindo os problemas ocasionados pelo fotoperíodo, número de palpções retais e aumentando o aproveitamento de animais acíclicos (13). Além disso, éguas acíclicas mantidas em protocolos hormonais apresentam taxas de gestação similares às de receptoras cíclicas (10,14).

Neste contexto, o objetivo desta revisão é discutir sobre os principais aspectos do uso de protocolos hormonais, baseados em estrógeno e progestágenos nas éguas receptoras anovulatórias/acíclicas nos programas de TE.

REVISÃO DE LITERATURA

Estacionalidade reprodutiva e ciclo estral

A seleção evolutiva programou o cérebro da égua para reconhecer o comprimento do dia (luminosidade-fotoperíodo) e iniciar o ciclo estral apenas quando os dias estiverem suficientemente longos, ou seja, nos meses de primavera e verão. Porém, o comprimento do dia também é determinado pela latitude; assim, éguas que se encontram mais ao norte ou ao sul da linha do Equador

iniciam a ciclicidade mais tarde na estação que aquelas que estão mais próximas da linha do Equador. Éguas próximas à linha do Equador terão pouca variação estacional quanto à extensão do ciclo estral (15).

Devido às suas características fotossensíveis, as éguas apresentam comportamento poliétrico estacional (16), caracterizado pela ativação do sistema neuro-endócrino-gonadal. Tal sistema está inibido nos meses de outono e inverno pelo aumento na concentração plasmática de melatonina (17), que exerce efeito depressor ou antigonal nos ovários através da inibição na liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) pelo hipotálamo (7,18). Contrariamente, durante o estímulo luminoso (primavera e verão) a síntese de melatonina pela glândula pineal está diminuída, aumentando a liberação de GnRH pelo hipotálamo, que estimula a liberação dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) pela hipófise anterior, desencadeando alterações fisiológicas nos ovários, tais como crescimento folicular, ovulação e formação de corpo lúteo (CL) (19,20).

O ciclo estral é definido como o intervalo entre duas ovulações consecutivas e sua duração é de aproximadamente 21 dias em éguas (21). O ciclo estral é dividido em duas fases: estro ou fase folicular e diestro ou fase luteal (7).

O estro é caracterizado pela presença de folículos pré-ovulatórios (aproximadamente 35 mm de diâmetro) e pelo aumento, principalmente, do estrógeno 17 β -estradiol (22). As altas concentrações de estrógenos secretadas pelo folículo pré-ovulatório induzem aos comportamentos típicos manifestados durante o estro (23). O estro tem duração média de 5 a 7 dias e se encerra com a ovulação quando as concentrações dos estrógenos retornam aos níveis basais (24). Durante o estro e sob influência dos estrógenos, o útero apresenta aumento na vascularização e extravasamento de líquido dos vasos para a área intersticial, causando o edema endometrial, que permite o recebimento e transporte do sêmen para a tuba uterina (21).

O diestro se inicia logo após a ovulação, por meio da formação do corpo lúteo primário (CLP), responsável pela síntese de progesterona (P_4). Nesta fase ocorre a perda

do edema uterino e a égua não é mais receptiva ao macho (22,23). A P_4 é responsável pelo aumento do tônus uterino e estímulo à secreção histotrófica (25). A fase luteal tem duração aproximada de 14 a 15 dias e, na ausência de um conceito e do reconhecimento materno da gestação nos dias 13 a 16 pós-ovulação, há diminuição da síntese de P_4 pelo CLP, fenômeno denominado luteólise funcional, sendo desencadeado pela Prostaglandina F2 alfa ($PGF2\alpha$) de origem endometrial. Após a queda nas concentrações de P_4 a estrutura do CLP sofre regressão, caracterizando a luteólise estrutural. Desta forma, com a luteólise funcional e estrutural, ocorre o início de uma nova fase folicular (26).

Embora exista uma estreita relação entre o aumento da duração da luminosidade diária durante os meses de primavera e verão e uma proporcional ativação dos mecanismos envolvidos na atividade reprodutiva em diferentes latitudes, a condição nutricional das fêmeas tem uma importante participação na manifestação e regularidade dos ciclos estrais (15).

Éguas com boa condição corporal e disponibilidade de alimento, criadas em regiões próximas à linha do Equador, tendem a ciclar durante todo o ano (poliétricas anuais). Portanto, nestas regiões, o fator nutricional passa a ser relevante. Se estas mesmas éguas fossem transferidas para locais de maiores latitudes e, por conseguinte, com variações na duração do número de horas-luz nas diferentes estações do ano, provavelmente passariam a ter um comportamento reprodutivo sazonal (poliétricas estacionais) (27).

A alta demanda por embriões equinos tem estimulado pesquisadores a desenvolverem métodos que antecipam a ciclicidade das éguas por meio da utilização de programas de luz artificial (6). Porém, estes métodos são pouco viáveis para as éguas receptoras, devido aos altos custos de manutenção, motivo pelo qual diversas pesquisas vêm sendo realizadas envolvendo o uso de receptoras acíclicas (anestro ou transição) tratadas com hormônios (estrógenos e progestágenos), permitindo maior aproveitamento dos animais que apresentam as limitações impostas pela sazonalidade reprodutiva (28).

Gestação e a produção de progesterona

Contrastando com muitos animais domésticos que tem a produção total de P_4 durante a gestação devido à prolongação da funcionalidade do CL, a égua apresenta três fontes de P_4 para manter a gestação, sendo o CLP, os corpos lúteos suplementares (CLS) e a placenta (29).

A P_4 é o principal hormônio responsável pela manutenção da prenhez. A síntese constante de P_4 e de seus metabólitos, como a 5α -dihidroprogesterona (5α DHP), é necessária para manter um adequado ambiente uterino e garantir um ótimo desenvolvimento embrionário e fetal (29). Imediatamente após a ovulação e até aproximadamente o dia 40 da gestação, o CLP é o responsável pela síntese de P_4 . Em éguas gestantes, o CLP persiste além da sua vida cíclica normal de 14 a 16 dias devido ao reconhecimento materno da gestação, período no qual o embrião, por meio da migração uterina, sensibiliza o útero, evitando a liberação de prostaglandinas (30).

Este mecanismo é possivelmente mediado por processos relacionados com o sistema imune, que permitem a continuidade da gestação (7,29). Ao longo dos 20 dias seguintes ao reconhecimento materno da gestação, o CLP persiste no ovário, mas a produção de P_4 diminui de maneira constante até a formação da segunda fonte de P_4 (29).

Ao redor dos 35 dias de gestação, células da cinta coriônica do embrião invadem o epitélio uterino adjacente e diferenciam-se para formar os cálices endometriais. Estes cálices são os responsáveis pela secreção da gonadotrofina coriônica equina (eCG), que além de gerar o estímulo necessário para a manutenção do CLP, fenômeno conhecido como ressurgimento do CLP (21), leva à formação dos CLS. No início da gestação, os ovários maternos apresentam ondas de crescimento folicular, assim como no ciclo estral, que são estimuladas pela contínua secreção de FSH pela pituitária (31,32). Nas éguas gestantes o efeito negativo da P_4 sobre a secreção de LH da pituitária impede o amadurecimento destes folículos e sua ovulação (29).

No entanto, a partir dos 38 a 40 dias de gestação, com o início da secreção de eCG pelos cálices endometriais recentemente formados, se dá a formação dos CLS devido à ação luteinizante do eCG, que em éguas tem afinidade pelos receptores de LH (33). A formação dos CLS, seja pela ovulação de folículos pré-ovulatório (Corpo Lúteo Secundário ou CLs) ou pela luteinização dos folículos (Corpo Lúteo acessório ou CLa), complementa a produção de P_4 produzida inicialmente pelo CLP, fenômeno que ajuda a manter a gestação nos primeiros cinco meses de prenhez (34).

Entre os dias 40 e 120 de gestação, o alantocório encontra-se em período de expansão e as células trofoblásticas adquirem capacidade de sintetizar diversos hormônios (29). Dentre eles, destaca-se a P_4 e os metabólitos 20α -5P (20α hidroxí-5-pregnane-3-ona), 5α -DHP (5α -dihidroprogesteronas) e 3β -5P (3β -hidroxí-5 α -pregnane-20-ona), observados ao redor dos 70 dias de gestação, sendo produzidos pela utilização exclusiva de fontes maternas de colesterol (35).

Desta forma, entre os dias 70 e 150 de gestação, a concentração plasmática de P_4 é composta principalmente pela síntese de P_4 por parte dos CLP e CLS em processo de declínio e pelos progestágenos da placenta secretados pelo alantocório em crescimento (29).

Aproximadamente aos 180 dias de gestação, os CLS regridem e a produção de P_4 até a fase final da gestação é realizada pelas estruturas placentárias (7).

Seleção da égua receptora acíclica

As limitações impostas pela sazonalidade reprodutiva e a dificuldade em manter os altos custos de programas de luz artificial para éguas receptoras estimularam o desenvolvimento de diversas pesquisas que envolvem o uso de éguas receptoras anovulatórias/acíclicas preparadas e mantidas em protocolos hormonais utilizando estrógenos e progestágenos, fazendo desta metodologia uma excelente alternativa (36).

Segundo Vanderwall (25), a seleção da receptora é um fator determinante para o sucesso do programa de TE. A receptora ideal deve ter boa fertilidade, ótimo escore corporal e desenvolvimento mamário (36), ser livre de anormalidades uterinas e ovarianas (25) e preferencialmente com idade entre quatro e 10 anos. Ball et al. (37) demonstraram que a taxa da perda embrionária após TE foi maior em éguas velhas entre os dias 15 e 50 de prenhez, possivelmente devido ao fato de que éguas velhas são mais susceptíveis a apresentar anormalidades no ambiente da tuba uterina e útero.

Receptoras acíclicas são caracterizadas por apresentarem pouca ou nenhuma atividade folicular detectável pela palpação retal, ovários pequenos, útero sem influência de estrógeno e ausência de acúmulo de líquido no lúmen uterino (20). Sabe-se que condições nutricionais inadequadas podem desencadear o anestro e levar o animal a apresentar as mesmas condições descritas previamente. Assim, estabelecer diferenças entre éguas acíclicas em anestro estacional ou anestro nutricional é um fator relevante no momento da escolha da receptora.

Éguas acíclicas dividem-se em transição ou anestro. Anestro são aquelas que apresentarem folículos com diâmetro menor que 15 mm e ausência de CL e transição aquelas com folículos entre 15 a 25 mm e ausência de CL, indicando a não ocorrência da primeira ovulação da estação (20).

Foi observado que éguas com condição corporal melhor apresentaram diferenças no tamanho do folículo pré-ovulatório no primeiro ciclo reprodutivo na época de acasalamento, quando comparado com éguas de baixa condição corporal (45 vs. 51 mm respectivamente). Além disso, deficiências nutricionais afetaram a fase de recrutamento e a seleção do folículo dominante, porém, não a fase de dominância (38).

Nos protocolos com éguas receptoras acíclicas é ideal ao menos preparar hormonalmente duas éguas receptoras para cada doadora, permitindo assim a escolha da égua que se encontra em melhor condição reprodutiva para

receber o embrião no momento da TE (39). Além disso, na avaliação ultrassonográfica transretal, deve-se confirmar o status reprodutivo das éguas acíclicas.

Protocolos hormonais em receptoras acíclicas

O termo “progestágenos” se refere ao grupo dos esteroides naturais, como a progesterona (P₄), ou sintéticos, como o altrenogest (alt), que possuem a habilidade de se ligar aos receptores de progesterona (40). O altrenogest é o único progestágeno eficaz e utilizado para os tratamentos hormonais em éguas (41).

Em receptoras anovulatórias, os protocolos hormonais são baseados primeiramente na administração de estrógeno, para simular a condição hormonal de estro e estimular a expressão de receptores uterinos para P₄, se-

melhante ao que acontece no ciclo estral das éguas cíclicas previamente a ovulação (42-45).

Após 24 ou 48 horas, verifica-se a presença de edema uterino (causada pelo estrógeno) por meio de ultrassonografia. Confirmada a presença de edema, administra-se P₄ ou altrenogest, que pode ser injetável ou oral. A TE é realizada aproximadamente de 4 a 8 dias após a aplicação do progestágeno (P₄/altrenogest) (10,11).

Segundo os protocolos apresentados na tabela 1, nos anos 80, Hinrichs et al. (13,46,47), utilizavam éguas ovariectomizadas (OVH) como receptoras acíclicas ou anovulatórias. A técnica foi realizada com o objetivo de reduzir o manejo com rufiações e palpações retais normalmente realizadas em receptoras intactas. As cirurgias eram realizadas três semanas antes da TE e só o progestágeno foi aplicado, sem administração prévia de estrógeno.

Tabela 1. Protocolos de TE utilizados em éguas receptoras ovariectomizadas, em transição ou anestro

Referência	Égua	Estrógeno	P4 ou progestágenos	D TE	Taxa de gestação
Hinrichs et al. (46)	OVH*	Não aplicação	P ₄ 300mg IM q24h, 5 dias antes da TE	D7	(3/7) 43%
Hinrichs et al. (47)	OVH*	Não aplicação	A: Alt 22 mg oral q24h, 5 dias antes da TE B: Alt 66 mg oral q24h, 6 dias antes da TE C: P ₄ 300 mg IM q24h, 5 dias antes da TE	D7	(1/6) 16,6% (2/6) 33,3% (2/5) 40%
Hinrichs et al. (13)	OVH*	Não aplicação	P ₄ 300 mg IM q24h, 5 dias antes da TE	D7	(3/7) 43%
Hinrichs e Kenney (9)	OVH*	Não aplicação	A: P ₄ 300 mg IM q24h, 5 dias antes da TE B: P ₄ 300 mg IM q24h, 4 dias antes da OV	D7	(6/8) 75% (1/12) 8,3%
McKinnon et al. (48)	OVH*	1: ** 17β Estradiol 1mg SC, o dia da indução da doadora até OV da mesma 2: ** até 20 dias de gestação 3: 17β Estradiol 1mg SC, o dia da indução da doadora até OV da mesma	1: P ₄ 300 mg IM q24h, desde OV até 35 dias de gestação 2: igual ao 1, porém, até 20 dias de gestação 3: Alt 0,044mg/Kg peso vivo oral q24h, desde OV até 35 dias de gestação	D7	35 dias de gestação: (7/10) 70% (8/10) 80% (14/20) 70%
Carnevale et al. (10)	Transição	Não aplicação	Alt 0,044mg/Kg peso vivo oral q24h, 5 a 7 dias antes da TE e até 120 dias de gestação	D5-9	12 dias de gestação (10/18) 55,6% 50 dias de gestação (7/18) 39%
Pinna et al. (50)	Anovulatória	3 dias consecutivos de ECP 5-3-2 mg IM. Dia da OV doadora (D0)	4 dias após OV da doadora (D4) P ₄ LA 1500 mg IM C/7 dias até 100 dias de gestação	D6-8	100 dias de gestação (101/185) 54,5%
Greco et al. (14)	Anovulatória	3 dias consecutivos de ECP 10-6-4 mg IM. Dia da OV doadora (D0)	4 dias após OV da doadora (D4) P ₄ LA 1500 mg IM C/7 dias até 100 dias de gestação	D3-6	100 dias de gestação (139/241) 54,5%

Referência	Égua	Estrógeno	P4 ou progestágenos	D TE	Taxa de gestação
Kaercher et al. (51)	Anovulatória	3 dias consecutivos de Benzoato de estradiol (BE) 5-3-2 mg IM. Dia da OV doadora (D0)	4 dias após OV da doadora (D4) P ₄ LA 400 mg IM C/7 dias até 120 dias de gestação	D5	120 dias de gestação (27/45) 60%
Silva et al. (12)	Anovulatória	Dose única de BE 2,5 mg IM entre o primeiro e terceiro dia da OV doadora (D0)	1: 4-5 dias após OV da doadora (D4) Alt 33 mg oral q24h até 70 dias de gestação 2: 4-5 dias após OV da doadora (D4) Alt 33 mg oral q24h até 120 dias de gestação	D4-5	70 dias de gestação (5/7) 71% 120 dias de gestação (8/8) 100%
Botelho et al. (52)	Anovulatória	8 dias antes da TE dose consecutiva de BE, 5-3-2mg IM	5 dias antes da TE P4 LA 1500 mg IM C/7 dias	D5	30 dias de gestação (34/46) 74% 60 dias de gestação (32/46) 69,6%

*Dia TE.

Mckinnon et al. (48) definiram três tratamentos para receptoras OVH onde o grupo 1 recebeu 1 mg de 17 β estradiol subcutâneo (SC) até o dia da ovulação (OV) da doadora e posteriormente foram aplicados 300 mg de P₄ diariamente até o final do experimento (dia 35); o grupo 2 recebeu o mesmo tratamento do 1 com a diferença na frequência de 17 β estradiol, a qual foi continuada até o dia 20, concomitante a administração de P₄; já no grupo 3 foi administrado 17 β estradiol semelhante ao grupo 1 e no dia da OV da doadora, administrou-se diariamente via oral (VO) 0,044 mg/kg de peso vivo de altrenogest até o dia 35. Ao realizar um paralelo entre os estudos de Hinrichs et al. (46) e Mckinnon et al. (48), foram observadas taxas de gestação de 43% (3 gestações de 7 transferências) e 70 a 80% entre os protocolos testados (7/10, 8/10, 14/20), respectivamente, demonstrando que éguas receptoras OVH mantidas com progestágenos são capazes de manter a gestação (46) e que independente do período de administração do estradiol, o requisito primário para o preparo e a manutenção da gestação é uma concentração adequada de progestágeno (48).

Além disso, Hinrichs e Kenney (9) buscaram identificar a necessidade de sincronizar a ovulação da doadora com o início da administração de P₄ (sem aplicação prévia de estrógeno) nas receptoras OVH. No estudo, as éguas foram divididas em dois grupos: o grupo A recebeu 300 mg de P₄ em óleo q24h IM (cada 24 horas-intramuscular) por cinco dias antes da TE, e o grupo B, o qual recebeu a mesma dose de P₄, porém quatro dias antes da ovulação

da doadora, obtendo taxas de prenhez de grupo A 6/8 e grupo B 1/12, demonstrando a importância da sincronia do ambiente uterino entre doadora e receptora.

No entanto, éguas OVH mostraram desvantagens quando comparadas com éguas acíclicas (8). Tais desvantagens referem-se à cirurgia irreversível com riscos associados, realizada pelo menos três semanas antes de serem utilizadas como receptoras. Além disso, nas éguas acíclicas é possível reduzir o período de tratamento com progestágenos (12) uma vez que ocorre a formação dos CLS, sem prejuízo para a taxa de prenhez, ao contrário das éguas OVH, nas quais esse tratamento deve se manter até por volta de 100 a 120 dias de gestação (48).

Um estudo comparou a taxa de gestação de receptoras acíclicas em transição tratadas com altrenogest 0,044 mg/kg, q24h, VO por 5 a 7 dias antes da TE, com a taxa de receptoras cíclicas. Os autores demonstraram que não houve diferença entre as taxas de gestação no 16º dia, 55,6 vs. 67,8%, e taxas de morte embrionária, 14,5 vs. 30% nos grupos, tratado e cíclico respectivamente (10).

Seguindo a mesma linha, Rocha-Filho et al. (11) realizaram um estudo com o objetivo de comparar a taxa de gestação em receptoras cíclicas (grupo controle) e acíclicas (éguas em anestro e transição) tratadas com quatro protocolos diferentes. Em todos os protocolos foi administrada inicialmente uma dose única de ciproionato de estradiol (10 mg q24h IM) e cinco a oito dias antes da TE

foi administrado o progestágeno, sendo no grupo 1 P₄ LA 1500 mg IM a cada 7 dias no grupo 2, 1500 mg IM a cada 6 dias, no grupo 3, P₄ de curta ação 200 mg/dia IM e no grupo 4, 400 mg IM a cada dois dias, não encontrando diferença e sugerindo que ambos os tipos de P₄ foram eficazes na preparação de receptoras acíclicas. Além disso, não foi observada diferença na taxa de gestação entre as éguas cíclicas (75 %) e éguas acíclicas dos grupos tratados com P₄ (75,9%), demonstrando o sucesso na implementação do protocolo e corroborando os achados de Bringel et al. (49), os quais mostraram que o uso de 1500 mg de P₄ LA a cada sete dias em éguas com nenhuma fonte endógena de P₄ foi suficiente para manter a gestação, além de se evidenciar concentrações plasmáticas de P₄ compatíveis com os níveis da fase lútea (3,41 a 4,33 ng/mL). Pinna et al. (50) e Greco et al. (14) fizeram um comparativo entre éguas cíclicas sem tratamento e éguas acíclicas tratadas uma vez ao dia, com doses decrescentes de cipionato de estradiol e 24 horas após a última aplicação do estrógeno, com a verificação do edema uterino, iniciaram o tratamento com 1500 mg de P₄ LA semanais, alcançando bons índices de prenhez, sendo 49 % (50) e 57 % (14) nas cíclicas e 54,6 % e 57,6 % nas acíclicas, respectivamente.

O tratamento com progestágenos é comumente mantido até o período em que as estruturas placentárias assumem a manutenção da gestação, por meio da própria produção de progestágenos, aproximadamente dos 100 a 120 dias de gestação (35). Na tentativa de reduzir o tempo de tratamento com os hormônios, Lagneaux e Palmer (8) administraram extrato de pituitária (LH) às éguas em anestro com o objetivo de antecipar a secreção de progesterona ovariana por meio da formação dos CLS, de forma a reduzir a tempo de tratamento com progestágenos. No entanto, não foi observada diferença no aumento da concentração plasmática de P₄ entre éguas tratadas e não tratadas com LH, e o tratamento não foi considerado eficiente.

Baseados na premissa de Greco et al. (14) que afirmam que a interrupção do tratamento pode ser realizada antes da maturação feto-placentária, a partir dos 40 dias de gestação quando os CLS surgem nos ovários, Silva et al. (12) avaliaram a interrupção do altrenogest oral aos 70

e 120 dias de gestação (grupo 1: 70 alt e grupo 2: 120 alt respectivamente), o período de formação dos CLS e o perfil endógeno de P₄ durante os primeiros 120 dias de gestação em éguas receptoras acíclicas. O protocolo empregado nas receptoras acíclicas foi uma dose única de 2,5 mg de benzoato de estradiol e um dia pós-tratamento, confirmada a presença de edema uterino, 33 mg de altrenogest oral foram administrados, q24h, até o dia 70 ou 120 de gestação de acordo com o grupo. Neste estudo foi demonstrada a eficácia do altrenogest para a manutenção da gestação com taxas de gestação de 71 % no grupo 70 alt, 100 % no 120 alt em relação ao grupo controle 100 % (éguas receptoras cíclicas sem tratamento de esteroides). Além disso, foi observado que as éguas que se encontravam em transição no início do protocolo foram capazes de formar maior número de CLS e o aparecimento deles foi mais cedo do que nas éguas que se encontravam em anestro no início do protocolo. Esses resultados permitiram concluir que para manter a gestação nas receptoras acíclicas com interrupção do tratamento aos 70 dias é necessário que exista a formação de pelo menos um CLS com no mínimo 10 dias de formação antes da interrupção do altrenogest e a interrupção do hormônio aos 120 dias permite a manutenção da gestação em todas as éguas independentemente da formação ou não de CLS.

Adicionalmente, Kaercher et al. (51) demonstraram que taxas de gestação de éguas receptoras acíclicas (anestro ou transição) e cíclicas foram semelhantes, variando entre 60 e 71 % respectivamente. No protocolo implementado por este grupo foram administradas três doses consecutivas de benzoato de estradiol, nos dias D0 (ovulação da doadora), D1, D2 e uma dose inferior de P₄ LA (D3) 400 mg IM c/7 dias nas receptoras acíclicas quando comparado aos grupos de Pinna et al. (50) e Greco et al. (14). Porém, Kaercher et al. (51) definiram éguas acíclicas como aquelas que em fase de anestro ou transição tiveram folículos < 10 mm. Além disso, foi observado que as éguas receptoras acíclicas um dia antes da ovulação da doadora exibiram concentrações plasmáticas de 2,8 ng/mL quando, segundo Sharp (20), éguas acíclicas (seja em anestro ou transição) não desenvolvem CL. Esses achados permitem concluir que o estudo de Kaercher et al. (51) possui resultados confusos em relação às concentra-

ções plasmáticas de P₄ e que a definição de receptoras acíclicas só foi fundamentada para éguas em anestro.

Recentemente, Botelho et al. (52) replicaram o protocolo estabelecido por Pinna et al. (50) e obtiveram maior taxa de prenhez nas éguas receptoras acíclicas quando comparadas com as cíclicas: 73 % e 43,3 % no estudo de Botelho et al. (52) e 54 % e 49 % no de Pinna et al. (50) respectivamente. Porém, as éguas utilizadas pelo grupo de Botelho et al. (52) foram éguas em transição de outono, o que poderia explicar a alta taxa de gestação das éguas tratadas ou comparar com as não tratadas.

CONCLUSÕES

Os resultados favoráveis das pesquisas desenvolvidas nos permitem concluir que os tratamentos hormonais, que consistem na aplicação de estrógeno e posteriormente P₄ de curta ou de longa ação ou o uso de altrenogest em éguas receptoras acíclicas, apresentam resultados adequados, disponibilizando assim um número superior de éguas para TE com o subsequente aumento da taxa de prenhez.

Embora, o uso de receptoras acíclicas para TE mantidas com protocolos hormonais tornou-se uma alternativa vantajosa, principalmente por permitir a antecipação da estação de monta e diminuir o número de palpções e avaliações reprodutivas diárias para verificar a ciclicidade entre doadora e receptora.

REFERÊNCIAS

- Hartman DL. Embryo transfer. In: Equine Reproduction. 2nd ed. Oxford: Blackwell Publishing; 2011. p. 2871-9.
- IETS. 2013 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. [Internet]. 2014 [cited 2015 Oct 25]. Available from: http://www.iets.org/pdf/comm_data/December2014.pdf
- Campbell MLH. Embryo transfer in competition horses: Managing mares and expectations. Equine Veterinary Education. 2014;26(6):322-7. <http://dx.doi.org/10.1111/eve.12182>
- Freedman LJ, Garcia MC, Ginther OJ. Influence of photoperiod and ovaries on seasonal reproductive in mares. Biol Reprod. 1979;20(3):567-74. <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod20.3.567>
- Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Beg MA. Seasonal influence on equine follicle dynamics. Anim Reprod. 2004;1(1):31-44.
- Nagy P, Guillaume D, Daels P. Seasonality in mares. Anim Reprod. 2000;60-61:245-62. [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00133-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00133-0)
- Ginther OJ. Reproductive Biology of the Mare : Basic and applied aspect. 2nd ed. Madison: Cross Plains WI; 1992. p. 642.
- Lagneax D, Palmer E. Embryo transfer in anoestrous recipient mares: attempts to reduce altrenogest administration period by treatment with pituitary extract. Equine Vet J. 1993;25(S15):107-10. <http://dx.doi.org/10.1111/j.2042-3306.1993.tb04840.x>
- Hinrichs K, Kenney RM. Effect of timing of progesterone administration on pregnancy rate and embryo transfer in ovariectomized mares. J Reprod Fertil. 1987;(35):439-43.
- Carnevale EM, Ramirez RJ, Squires EL, Alvarenga MA, Vanderwall DK, Mc Cue PM. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. Theriogenology. 2000;54(6):965-79. [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00405-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00405-2)
- Rocha Filho AN, Pessoa MA, Gioso MM, Alvarenga MA. Transfer of equine embryos into anovulatory recipients supplemented with short or long acting progesterone. Anim Reprod. 2004;1(1):91-5.
- Silva ESM, Frade SCF, Ignácio FS, Pantoja JCF, Puoli Filho JNP, Meira C. Supplementary corpora lutea monitoring allows progestin treatment interruption on day 70 of pregnancy in non-cyclic recipient mares. Anim Reprod. 2014;144(3-4):122-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.12.004>
- Hinrichs K, Sertich PL, Palmer E, Kenney RM. Establishment and maintenance of pregnancy after embryo transfer in ovariectomized mares treated with progesterone. J Reprod Fertil. 1987;80(2):395-401. <http://dx.doi.org/10.1530/jrf.0.0800395>
- Greco GM, Burlamaqui Fabio LG, Pinna AE, De Queiroz FJR, Cunha MP dos S, Brandão FZ. Use of long-acting

- progesterone to acyclic embryo recipient mares. *R Bras Zootec.* 2012;41(3):607-11. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982012000300019>
15. Hughes J, Stabenfeldt G, Evans J. Estrous cycles and ovulation in the mare. *J Am Vet Med Assoc.* 1972;161:1367-74.
 16. Fitzgerald BP, Mcmanus CJ. Photoperiodic versus metabolic signals as determinants of seasonal anestrus in the mare. *Biol Reprod.* 2000;63(1):335-40. <http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod63.1.335>
 17. Sharp D, Grubaugh WR. Pulsatile secretion of melatonin during the scotophase in mares. *Biol Reprod.* 1983;1(28):100.
 18. Palhares MS. Inseminação artificial em equinos, incluindo transporte de sêmen. Em: *IV Simpósio Nacional de Reprodução Animal, Belo Horizonte (Campinas, SP); 1988.*
 19. Neely DP. Reproductive endocrinology and fertility in the mare. In: *Equine Reproduction Veterinary.* New Jersey: Learning Systems; 1983. p. 12-22.
 20. Sharp DC. Environmental influences on reproduction in horses. *Vet Clin North Am Large Anim Pract.* 1980;2(2):207-23.
 21. Bergfelt DR. Estrous synchronization. In: *Equine breeding management and artificial insemination.* Philadelphia: Saunders C.; 2000. p. 165-77.
 22. Satué K, Gardón JC. A review of the estrous cycle and the neuroendocrine mechanisms in the mare. *J Steroids Horm Sci.* 2013;4(2):115.
 23. Sharon L Croweell-Davis. Sexual behavior of mares. *Horm Behav.* 2007;52(1):12-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yhbeh.2007.03.020>
 24. Gastal EL. Recent advances and new concepts on follicle and endocrine dynamics during the equine periovulatory period. *Anim Reprod.* 2009;6(1):144-58.
 25. Vanderwall DK. Progesterone. In: *Equine Reproduction.* 2nd ed. New Jersey (USA): Blackweel Publishing; 2011. p. 1637-41.
 26. Daels PF, Hughes JP. The normal estrous cycle. In: *Equine reproduction.* Philadelphia: Lea & Febi; 1993. p. 121-32.
 27. Tarouco AK. Fisiologia reprodutiva da égua. [Internet]. 2000 [cited 2015 Jul 22]. p. 1-23. Available from: <https://xa.yimg.com/kq/.../FISIOLOGIAREPRODU-TIVADAEGUA.doc>
 28. Faria DR, Gradela A. Hormonioterapia aplicada à ginecologia equina. *Revista Brasileira de Reprodução Animal.* 2010;34(2):114-22.
 29. Allen WR. Luteal deficiency and embryo mortality in the mare. *Reprod Domest Anim.* 2001;36(3-4):121-31. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1439-0531.2001.d01-43.x>
 30. Allen WR. The physiology of early pregnancy in the mare. *AAEP Proceedings.* 2000;46:338-54.
 31. Evans MJ, Irvine CH. Serum concentrations of FSH, LH and progesterone during the oestrous cycle and early pregnancy in the mare. *J Reprod Fertil Suppl.* 1975;(23):193-200.
 32. Urwin VE, Allen WR. Pituitary and chorionic gonadotrophic control of ovarian function during early pregnancy in equids. *J Reprod Fertil Suppl.* 1982;(32):371-81.
 33. Stewart F, Allen WR, Moor RM. Pregnant mare serum gonadotrophin: ratio of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone activities measured by radioreceptor assay. *J Endocrinol.* 1976;71(3):371-82. <http://dx.doi.org/10.1677/joe.0.0710371>
 34. Brinsko SP, Blanchard TL, Schumacher J, Love CC. Pregnancy: physiology and diagnosis. Em: *Manual of equine reproduction.* 3th ed. Missouri: Mosby Elsevier; 2011. p. 85-93. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-06482-8.00016-8>
 35. Holtan DW, Squires EL, Lapin DR, Ginther OJ. Effect of ovariectomy on pregnancy in mares. *J Reprod Fertil.* 1979;(27):457-63.
 36. Squires EL, Mccue PM, Vanderwall D. The current status of equine embryo transfer. *Theriogenology.* 1999;51(1):91-104. [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00234-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00234-9)
 37. Ball BA, Little TV, Weber JA, Woods GL. Survival of Day-4 embryos from young, normal mares and aged, subfertile mares after transfer to normal recipient mares. *J Reprod Fertil.* 1989;85(1):187-94. <http://dx.doi.org/10.1530/jrf.0.0850187>
 38. Salazar-Ortiz J, Monget P, Guillaume D. The influence of nutrition on the insulin-like growth factor system and the concentrations of growth hormone, glucose, insulin, gonadotropins and progesterone in ovarian follicular fluid

- and plasma from adult female horses (*Equus caballus*). *Reprod Biol Endocrinol*. 2014;12(1):72. <http://dx.doi.org/10.1186/1477-7827-12-72>
39. McKinnon AO, Squires EL. Embryo transfer and related technologies. Em: *Current therapy in equine reproduction*. Philadelphia: W. B. Saunders; 2007. p. 319-34. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-7216-0252-3.50055-2>
40. Dante G, Vaccaro F, Facchinetti F. Use of progestagens during early pregnancy. *Facts Views Vis Obgyn*. 2013;5(1):66-71.
41. McKinnon AOMC, Lescun TB, Walker JH, Vasey JR, Allen WR. The inability of some synthetic progestagens to maintain pregnancy in the mare. *Equine Vet J*. 2000;32(1):83-5. <http://dx.doi.org/10.2746/042516400777612035>
42. Zavy JT, Mayer R, Vernon MW, Bazer FW, Sharp DC. An investigation of the uterine luminal environment of non-pregnant and pregnant pony mares. *J Reprod Fertil Suppl*. 1979;(27):403-11.
43. Watson ED, Skolnik SB, Zaneosky HG. Progesterone and estrogen receptor distribution in the endometrium of the mare. *Theriogenology*. 1992;38(4):575-80. [http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X\(92\)90020-R](http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X(92)90020-R)
44. Mcdowell KJ, Adams MH, Adam CY, Simpson KS. Changes in equine endometrial oestrogen receptor and progesterone receptor mRNAs during the oestrous cycle, early pregnancy and after treatment with exogenous steroids. *J Reprod Fertil*. 1997;(117):135-42.
45. Aupperle, Ozgen S, Schoon H-A, Schoon D, Hoppen H-O, Sieme H, et al. Cyclical endometrial steroid hormone receptor expression and proliferation intensity in the mare. *Equine Vet J*. 2000;32(3):228-32. <http://dx.doi.org/10.2746/042516400776563554>
46. Hinrichs K, Sertich PL, Cummings MR, Knney MR. Pregnancy in ovariectomized mares achieved by embryo transfer. *Equine Vet J*. 1985;(3):74-5.
47. Hinrichs K, Sertich PL, Kenne RM. Use of altrenogest to prepare ovariectomized mares as embryo transfer recipients. *Theriogenology*. 1986;26(4):455-60. [http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X\(86\)90037-3](http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X(86)90037-3)
48. McKinnon AO, Squires EL, Carnevale EM, Hermetet MJ. Ovariectomized steroid-treated mares as embryo transfer recipient and as a model to study the role of progestins in pregnancy maintenance. *Theriogenology*. 1988;29(5):1055-63. [http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(88\)80029-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(88)80029-3)
49. Bringel BA, Jacon JCF, Zimmerman M, Alvarenga MA, Douglas RH. Biorelease progesterone LA 150 and its application to overcome effects of premature luteolysis on progesterone levels in mares. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 2003;27:498-500.
50. Pinna AL, De Queiroz FJR, Burlamaqui fabio LG, Greco GM, Pinho TG, Brandão FZ. Taxa de gestação e incidência de morte embrionaria em éguas recep aciclicas e ciclicas tratadas com P4 LA. *Universidade Rural. Série Ciências da vida*. 2007;27(Suplemento):137-9.
51. Kaercher F, Kozicki LE, Camargo CE, Weiss RR, dos Santos IW, Muradas PR, et al. Embryo transfer in anovulatory recipient mares treated with estradiol benzoate and long-acting progesterone. *J Equine Vet Sci*. 2013;33(3):205-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2012.06.009>
52. Botelho JH V, Pessoa GO, Rocha LGP, Yeste M. Hormone supplementation protocol using estradiol benzoate and long-acting progesterone is efficient in maintaining pregnancy of anovulatory recipient mares during autumn transitional phase. *Animal Reprod*. 2015;153:39-43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.12.014>