

Uso de éguas receptoras acíclicas em programas de transferência de embrião Anovulatory recipient mares in embryo transfer programs

Daniel Carneiro Lino¹, Elisa Sant'Anna Monteiro da Silva², Rodrigo Arruda de Oliveira^{1*}

¹ Laboratório de Reprodução Animal, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil – FAV/UnB

² Laboratório de Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil

Resumo

O maior entrave para o êxito de um programa de transferência de embrião (TE) está relacionado às receptoras, tanto a qualidade de características reprodutivas, quanto a sincronização entre doadoras e receptoras. Éguas doadoras, geralmente, apresentam melhor escore corporal e disponibilidade alimentar nos períodos de seca, fazendo com que iniciem o seu ciclo estral precocemente enquanto éguas receptoras se encontram ainda em anestro ou período transicional, o que dificulta a TE. Vários estudos foram realizados com o objetivo de utilizar éguas acíclicas como receptoras de embrião. Assim, podem ser utilizadas nos programas de TE quando submetidas a protocolos hormonais que mimetizam o ciclo estral natural. Uma diversidade de protocolos é encontrada na literatura, usando diferentes doses, posologias e intervalos do uso de estradiol associado a progestágenos. Portanto, objetivou-se analisar resultados de pesquisas com protocolos hormonais que poderiam ajudar a solucionar a escassez de receptoras cíclicas e maximizar os resultados da biotécnica de transferência de embriões.

Palavras-chave: receptoras acíclicas, transferência de embrião, protocolos hormonais, progestágenos, estradiol.

Abstract

There are obstacles to the success of equine embryo transfer programs, concomitantly there has been an increase in the popularity of the technique. One of the most urgent issues to overcome is related to the recipient mare availability and the donor-recipient synchrony. Usually, the donor mares have a higher body condition score and are fed a higher quality diet than recipient mares during the non-breeding season. Therefore, the donor mares start cycling earlier than recipient mares, which makes embryo transfer challenging. Several studies have been carried on finding hormonal protocols that mimic the natural oestrous cycle to allow the use of noncycling recipient mares for embryo transfer programs. Many protocols can be found in the literature, using different doses and intervals. Among the main difference is the use of progestogens, which can be used alone or in combination with oestradiol. The aim of this review was to analyse results that could help solve the lack of recipient mares and improve the results of the embryo transfer technique.

Keywords: anovulatory recipients, embryo transfer, hormonal protocols, progestogens, oestradiol.

Introdução

Segundo Lima (2016) e IBGE (2019), no Brasil existem aproximadamente 6 milhões de equinos, o que gera mais de 3 milhões de empregos de forma direta e indireta e movimenta cerca de R\$ 16,5 bilhões de reais na economia. Para atender a esse mercado diversas biotécnicas da reprodução são utilizadas entre elas a transferência de embrião (TE).

Dentre as vantagens da TE podemos citar a produção de mais de um potro por ano, de éguas de alto potencial genético e valor zootécnico e produção de potros de éguas que não são capazes de levar uma gestação a termo, seja por uma afecção ou idade avançada (Alonso et al., 2008; De Lavor et al., 2014).

O Brasil é o maior produtor de embriões de equinos no mundo (Viana, 2020), porém a técnica ainda apresenta entraves no seu desenvolvimento, como a dificuldade de sincronia entre doadora e receptora cíclica no dia da transferência em função da baixa disponibilidade de éguas receptoras, além da qualidade reprodutiva das receptoras (De Lavor et al., 2014; Alvarenga, 2017). Uma maneira de contornar tal

*Correspondência: rodrigoarruda@unb.br

Recebido: 29/09/2021

Aceito: 19/08/2022



problema é a utilização de éguas acíclicas como receptoras, entretanto, os protocolos hormonais para o preparo destas receptoras são onerosos e demandam dedicação ao manejo, principalmente das receptoras gestantes.

Portanto, objetivou-se apresentar uma revisão de diferentes protocolos disponíveis para a utilização de éguas receptoras acíclicas, evidenciando as vantagens e desvantagens do seu uso.

Ciclo Estral

O ciclo estral em éguas tem duração média de 21 dias, podendo variar entre 19 e 25 dias, sendo dividido em 2 fases: fase de domínio do estrógeno ou fase folicular e fase de domínio da progesterona (P4) ou fase lútea. A fase folicular é marcada pelo estro, com duração de 5 a 7 dias, e a fase progesterônica é chamada de diestro, com duração de 14 a 15 dias (Ginther et al., 2004; Aurich, 2011).

A fisiologia reprodutiva das éguas é comandada pelo eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, que resulta em alterações fisiológicas, físicas e comportamentais (Aurich, 2011; Williams et al., 2012). O hipotálamo, por meio da secreção do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) sintetizado por células neuronais, sinaliza à adeno-hipófise a liberação das gonadotrofinas que são o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH). Estes, por sua vez, modulam o funcionamento das gônadas que são responsáveis pela produção de hormônios esteróides (estrógeno e progesterona) e a liberação de GnRH, pois ao atingirem o hipotálamo bloqueiam a sua liberação (*feedback* negativo). Os hormônios gonadais determinam as características da fase do ciclo estral em que se encontra a égua (Ginther et al., 2005; Crowell-Davis, 2007; Aurich, 2011).

Na fase do estro, as células da granulosa presentes nos folículos sofrem influência do FSH, liberado pela adeno-hipófise, produzindo e liberando estrógeno. Este hormônio é responsável pelas características do cio como abertura de cérvix, presença de edema endometrial, além do comportamento característico de receptividade ao macho (Crowell-Davis, 2007; Aurich, 2011).

Na ovulação, o folículo dominante sob ação de LH se rompe, liberando o oócito na fossa ovulatória. As células da granulosa, remanescentes nestes folículos, sofrem o processo de luteinização, que pela ação do LH, passam a secretar P4 e não mais o estrógeno (Aurich, 2011).

Sazonalidade

A espécie equina é considerada como poliéstrica estacional, ou sazonal, o que significa que o seu ciclo reprodutivo é afetado pelas estações climáticas. Nos períodos de primavera e verão as éguas apresentam múltiplos ciclos estrais e poucos ciclos ou nenhum nos períodos de outono e inverno (Ginther et al., 2004; Aurich, 2011; Schutzer, 2014), fato mais evidente quanto mais distante estão da linha do Equador. Tal fato é determinado pela maior incidência de horas luz/dia, maiores temperaturas, e consequentemente, a maior disponibilidade de alimento e condições de ambiente favoráveis ao desenvolvimento da prole encontrados nas estações de primavera e verão (Nagy et al., 2000; Ginther et al., 2004; Aurich, 2011; Williams et al., 2012).

Um dos mecanismos envolvidos no controle do ciclo sazonal das éguas é a melatonina, hormônio produzido pela glândula pineal que tem a sua produção controlada por estímulos nervosos oriundos do nervo óptico. A melatonina atua inibindo a produção de GnRH no hipotálamo, e o estímulo para a sua produção acontece na fase escura do dia (Malpaux et al., 1999; Nagy et al., 2000; Ginther et al., 2004; Williams et al., 2012). Sendo assim, na transição do verão para o outono, a incidência de luz diária vai diminuindo gradativamente, o que leva ao aumento da produção de melatonina, e por consequência, a diminuição da produção das gonadotrofinas. O resultado disso é o declínio da atividade folicular, e a ausência da ovulação, período este denominado de anestro estacional. Em contrapartida, na transição do inverno para a primavera, os eventos se invertem, pois com o aumento do período luminoso do dia a produção de melatonina decresce, elevando os níveis de GnRH, FSH, LH e atividade folicular (Fitzgerald e Mcmanus, 2000; Nagy et al., 2000; Ginther et al., 2004; Aurich, 2011).

Outros fatores também estão correlacionados com o mecanismo da estacionalidade reprodutiva na espécie equina. Dentre eles podemos citar fatores extrínsecos, como os nutricionais, condição corporal e temperatura; e os fatores intrínsecos como hormonais e neuroendócrinos (Nagy et al., 2000; Ginther et al., 2004; Aurich, 2011; Schutzer, 2014; Araújo e Oliveira, 2018).

Sincronia entre doadora e receptora

A sincronia entre doadora e receptora é um desafio enfrentado nos programas de TE. Mesmo que

se utilize hormonioterapia com o objetivo de sincronizar as ovulações, nem sempre isso é possível, devido à variabilidade de duração do estro e da resposta individual aos hormônios. Além disso, éguas doadoras e receptoras não recebem o mesmo manejo, sendo comumente encontradas éguas doadoras com atividade folicular seguida de ovulação, enquanto as receptoras ainda estão em anestro estacional, devido a influência nutricional no ciclo reprodutivo, o que dificulta a sincronia (Rocha Filho *et al.*, 2004; Alonso *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2016; Araújo e Oliveira, 2018).

As taxas de prenhez podem ser afetadas negativamente pela falta de sincronia entre doadora e receptora, pois o ambiente uterino da receptora deve estar em sincronia com o ambiente uterino em que o embrião foi recuperado da doadora. O embrião exposto a um útero assincrônico encontra níveis hormonais e fatores de desenvolvimento não correspondentes com a sua idade, ocasionando baixas taxas de desenvolvimento ou morte embrionária (Barnes, 2000; Ginther *et al.*, 2004; Alonso *et al.*, 2008). No entanto, estudos demonstram que o embrião equino tolera uma ampla janela de assincronia, ou seja, éguas receptoras que ovulam desde um dia antes (D+1) até cinco dias depois da doadora (D-5) podem ser utilizadas como receptoras de embriões com sete ou oito dias de idade, sem afetar significativamente as taxas de gestação, variando entre 61 a 77% (Jacob *et al.*, 2012) e ao redor de 90% entre os dias utilizados (Cuervo-Arango *et al.*, 2019).

Em éguas cíclicas, um dos protocolos mais utilizados é a aplicação de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) por via intramuscular na doadora e, um ou dois dias depois, nas éguas receptoras, com o objetivo de causar a luteólise e sincronizar o estro. Para isso é necessário que as éguas estejam entre o D5 e D14 de diestro e que no exame ultrassonográfico os ovários não apresentem um folículo pré-ovulatório, com diâmetro médio de 35mm (Allen, 2001). Ademais, monitora-se o crescimento folicular das éguas através da ultrassonografia, e então se induz a ovulação da receptora, utilizando análogos da deslorelina ou gonadotrofina coriônica equina (hCG) cerca de 48 horas após a indução da doadora, aumentando a chance de sincronia entre as duas (Duchamp *et al.*, 1987).

Para cada doadora, preconiza-se sincronizar três receptoras, mas isso demanda grande disponibilidade de animais. Dessa forma, nem sempre é possível alcançar a sincronia ideal entre as éguas (Hinrichs *et al.*, 1985; De Lavor *et al.*, 2014). Assim sendo, protocolos hormonais podem ser utilizados, de modo a alcançar, mesmo que artificialmente, a sincronização.

Características Uterinas

No diestro, a concentração de P4 está elevada, devido a formação do corpo lúteo (Figura 1a), e seu efeito no útero é responsável pelo maior tônus uterino e rigidez de cérvix, que conferem condições para manter uma gestação segura de contaminações ascendentes, além de influenciar as secreções histotróficas uterinas, que contribuem com a sobrevivência do embrião (Jones *et al.*, 1991; Eigenheer-Moreira *et al.*, 2007).

Para a seleção da receptora no dia da TE, algumas características uterinas são desejáveis e devem ser avaliadas por meio da palpação retal e ultrassonografia transretal (Squires e Seidel, 1985; Alonso *et al.*, 2008; De Lavor *et al.*, 2014). No exame de palpação retal a cérvix deve se apresentar firme, o útero arredondado com formato tubular, devido ao aumento do tônus. No exame ultrassonográfico, não deve haver evidências de dobras endometriais (Figura 1b) ou presença de fluido no lúmen uterino (Figura 1c), o formato tubular deve ser observado, com ecogenicidade, homogeneidade, apresentando diferença mínima entre miométrio e endométrio (Squires e Seidel, 1985; Hayes e Ginther, 1986; Alonso *et al.*, 2008).



Figura 1. a) Corpo lúteo. b) Edema uterino. c) Fluido uterino

Os efeitos da P4 no útero são contrários aos efeitos do estrógeno (Alonso *et al.*, 2008). No exame



ginecológico, características de flacidez e abertura de cérvix são indícios de que a égua está sob ação estrogênica, e por isso não há produção adequada de P4. Quando estas características são encontradas não é indicada a transferência do embrião, pois o ambiente uterino não está condizente com a manutenção da gestação (Carnevale et al., 2000).

Protocolos hormonais em receptoras acíclicas

No período transicional, normalmente as doadoras apresentam ciclos estrais precoces quando comparadas às receptoras, principalmente pela diferença no manejo e na disponibilidade de alimento (Silva et al., 2016). Desse modo, uma alternativa é o uso de éguas acíclicas, ou seja, em anestro ou transição, por meio de ciclos artificiais, devido à escassez de receptoras cíclicas. Éguas em anestro são aquelas que apresentam folículos ≤ 20 mm, ausência de CL e concentração de P4 abaixo de 1 ng/mL por pelo menos 21 dias. Já as éguas em transição são aquelas que apresentam, em média, folículos entre 20 e 30mm, ausência de CL e concentração de P4 abaixo de 1 ng/mL (Silva et al., 2017).

Diferentes tratamentos hormonais que mimetizam as mudanças uterinas que ocorrem em fêmeas cíclicas foram descritos, com o objetivo de aumentar a oferta de receptoras nos programas de TE. A maioria dos protocolos descritos utiliza um estradiol (E2) seguido de P4 natural ou *altrenogest*, progesterona sintética que atua nos receptores de P4 (McKinnon et al., 1988; Rocha Filho et al., 2004; Greco et al., 2012; Oliveira Neto et al., 2018; Silva et al., 2021). O estrógeno leva a formação do edema endometrial e diferenciação celular do endométrio e miométrio, além de ser determinante na ação da P4 no diestro, pois sabe-se que além de ter a função de estimular a expressão de seus próprios receptores, também estimula a manifestação dos receptores de P4 no endométrio (Rocha Filho et al., 2004; Hartt et al., 2005; Alonso et al., 2008; Kaercher et al., 2013). Já a P4 é responsável pelo aumento do tônus uterino, pelo estímulo à secreção histotrófica e pela interação conceito-maternal (Hinrichs e Kenney, 1987; Spencer e Bazer, 1995; McDowell et al., 1999; Hartt et al., 2005; Silva et al., 2016, 2017; Maciel, 2018).

Histórico

Os primeiros protocolos descritos na literatura visando o estabelecimento e manutenção da gestação em receptoras acíclicas consistiam apenas na aplicação de P4 em doses e intervalos variados, pois acreditava-se que seria o suficiente para alcançar os efeitos uterinos requeridos na receptora.

Hinrichs et al. (1986) avaliaram a taxa de prenhez em receptoras (ovariectomizadas) submetidas a protocolos hormonais com *altrenogest* (22 e 66 mg, VO) e P4 (300 mg, IM), comparada com o grupo controle (receptoras cíclicas). Não houve diferença nas taxas de prenhez entre as receptoras sincronizadas com 66 mg de *altrenogest* e 300 mg de P4 com relação ao grupo controle. O resultado inferior do grupo sincronizado com 22 mg de *altrenogest* foi atribuído às piores características de tônus de útero e de cérvix, quando comparadas às encontradas nos outros grupos. A ovariectomia de éguas receptoras pode ser vantajosa, pois diminui a necessidade de constantes exames de palpação e ultrassonografia com a finalidade de sincronização com a doadora, além de diminuir o número de receptoras por doadora necessárias no plantel. No entanto, é um processo irreversível, e que pode levar a complicações no pós-cirúrgico como o tétano, hemorragia, peritonite, deiscência da sutura, aderências e apresentar riscos cirúrgicos como a perfuração de vísceras. Além disso, a cirurgia gera custos adicionais ao protocolo.

Em pesquisa subsequente, Hinrichs e Kenney (1987) avaliaram a aplicação diária de P4 (300 mg, IM) em receptoras ovarioectomizadas, iniciando 5 ou 4 dias antes da TE. As taxas de prenhez foram superiores no grupo que recebeu por 5 dias.

McKinnon et al. (1988) avaliaram a combinação de estrógeno e progesterona para a sincronização de receptoras ovarioectomizadas em comparação com receptoras cíclicas. Foi utilizado a combinação de 1 mg 17 β estradiol, 300 mg de P4 ou 0,44 mg/kg de *altrenogest*/kg em diferentes protocolos. Não houve diferença com relação a taxa de prenhez entre o grupo controle e o de receptoras cíclicas. Os autores não puderam determinar com este trabalho, se houve aumento nas taxas de prenhez devido ao uso do estradiol. Foi levantada a hipótese de que o estrógeno produzido pelo embrião fosse o suficiente para iniciar e manter a gestação e a sua aplicação prévia talvez não apresentasse nenhuma vantagem.

Carnevale et al. (2000) utilizaram a dose diária de 0,044 mg/kg de *altronogest* VO em receptoras em fase transicional. O tratamento iniciava de 5 a 7 dias antes da transferência do embrião, e se estendia até 120 dias em éguas que confirmassem a gestação. Não houve diferença na taxa de prenhez em relação ao grupo controle de éguas cíclicas, embora o grupo controle apresentasse um número superior de éguas avaliadas. Os resultados dessas pesquisas foram importantes para a definição dos próximos protocolos de sincronização com aplicação de estrógeno e progesterona.



Protocolos que preconizam o uso de estradiol (E2) seguido de progestágenos e/ou progesterona (P4)

Comparação entre protocolos utilizando P4 de curta (CA) ou longa-ação (LA):

Rocha Filho *et al.* (2004) avaliaram a taxa de gestação em receptoras acíclicas que receberam 10 mg de cipionato de estradiol por 2 dias consecutivos e em seguida progesterona de longa (1500 mg; P4 LA) ou curta duração (200 ou 400 mg). Os resultados de taxa de prenhez não foram diferentes entre os tratamentos e em relação ao grupo controle de receptoras cíclicas. Tanto P4 de curta ou LA apresentam bons resultados, desde que seja respeitado o intervalo de aplicação para cada um. A grande vantagem encontrada no uso de P4 LA é o maior intervalo entre as aplicações (7 dias). Sendo assim, a égua receberá menos aplicações IM, e isso diminui o estresse do animal, com menor manejo, diminuindo a necessidade de mão-de-obra. Já a P4 de curta-ação precisa ser aplicada diariamente, ou em dias alternados. No entanto, permite que as receptoras que não confirmem a gestação após a TE estejam disponíveis para um novo protocolo mais rapidamente, já que os níveis da P4 estarão próximos do basal em menos tempo, tornando o útero responsivo ao estrógeno (Vanderwall *et al.*, 2007; Oliveira Neto *et al.*, 2018; Júnior *et al.*, 2021).

Protocolos utilizando cipionato (CE) ou benzoato de estradiol (BE) seguido de P4 LA:

Greco *et al.* (2012) utilizaram doses decrescentes de CE (10, 6 e 4 mg) em dias consecutivos e 1.500 mg de P4 LA no quarto dia. A P4 também foi repetida no momento da TE e semanalmente até 100 dias de gestação. O grupo de éguas sincronizadas apresentou maior taxa de prenhez (57,68%) comparado ao controle (44,12%). Os autores afirmaram que taxas de prenhez superiores podem ser obtidas quando utilizado protocolos hormonais, devido a um número maior de receptoras adequadas para receber o embrião no momento da transferência, o que facilita a seleção das éguas, melhorando as taxas de sucesso.

Já Kaercher *et al.* (2013) compararam a taxa de prenhez entre receptoras acíclicas (anestro ou transição) e cíclicas. Utilizando protocolo que consistia em 3 aplicações consecutivas com doses decrescentes de BE (5, 3 e 2 mg), seguido por baixa dose de P4 LA (400 mg) no quarto dia e, após confirmada a gestação, semanalmente até 120 dias. O intervalo entre a primeira aplicação de P4 e a TE foi de 5 dias. Não houve diferença com relação à taxa de prenhez entre os grupos, mesmo fornecendo doses mais baixas de P4 que as utilizadas por outros autores (1.500 mg). A aplicação da P4 em dose mais baixa (400 mg) se mostra vantajosa, pois isso diminui o custo do tratamento. No entanto, estas éguas apresentaram concentrações mais baixas de P4 do que as cíclicas.

Para avaliar a taxa de prenhez em receptoras acíclicas que se encontravam no período de transição, Botelho *et al.* (2015) aplicaram BE em doses decrescentes por dias consecutivos (5, 3 e 2 mg) e 1500 mg de P4 LA no quarto dia, no dia da TE e semanalmente até 120 dias se a gestação fosse confirmada. A taxa de gestação também foi superior nas éguas em protocolo hormonal aos 13, 30 e 60 dias de gestação, quando comparado ao grupo controle de receptoras cíclicas.

Com o objetivo de avaliar o grau de edema uterino e o perfil hormonal de estrógeno e P4, Silva *et al.* (2016) administraram diferentes doses de BE (2,5 mg, 5 e 10 mg) seguido de 1500 mg de P4 LA em éguas acíclicas. Os autores concluíram que o uso de 2,5 mg de BE seguido por 1.500 mg de P4 LA seria um protocolo mais apropriado para preparar éguas acíclicas, já que produziu edema uterino e perfis de estrógeno mais semelhantes aos observados em éguas cíclicas nos dias correspondentes avaliados, além de ser um procedimento mais simples, com menor número de administrações hormonais e que não reduziu significativamente as concentrações de P4 após a administração de P4 LA, como observado no grupo que recebeu 10 mg de BE.

Uma vez que o protocolo utilizando 2,5 mg de BE pareceu ser o mais apropriado para o preparo de éguas acíclicas (Silva *et al.*, 2016), Silva *et al.* (2017), em trabalho subsequente, avaliaram a expressão gênica e protéica de receptores endometriais de estrógeno e progesterona em éguas em anestro e transição, além do tônus, edema uterino e concentrações plasmáticas de E2 e P4. As mesmas éguas foram avaliadas durante os diferentes períodos do ciclo sazonal. No momento em que se encontravam em anestro, ou em transição, elas foram submetidas ao tratamento hormonal, que consistia na administração de dose única de 2,5 mg de BE, e após 48 horas, 1.500 mg de P4 LA. Quando entraram na fase cíclica foram utilizadas como grupo controle. Após a administração de P4, o edema uterino e concentrações de estrógeno dos grupos tratados diminuíram para baixos níveis, de forma semelhante ao encontrado no grupo de éguas cíclicas após a ovulação. A administração de 1.500 mg de P4 LA em éguas tratadas aumentou o tônus uterino para o nível intermediário característico observado no diestro de éguas cíclicas. Além disso, a dose administrada foi suficiente para atingir as concentrações mínimas de P4 necessárias para o estabelecimento e manutenção da prenhez (> 2,5 ng/mL). Ainda, a expressão gênica relativa dos receptores de E2 e P4 foram semelhantes



entre éguas cíclicas e não cíclicas tratadas, quando o endométrio exposto à P4 foi comparado ao exposto ao estrógeno. Nas éguas cíclicas, cinco dias após a ovulação, os receptores de P4 no epitélio glandular do endométrio diminuíram na avaliação, no entanto o mesmo não foi observado nas éguas receptoras em anestro após cinco dias da aplicação de P4. Este estudo mostrou que a aplicação do protocolo utilizado seria o mais viável (menor custo e manejo) e que forneceria condições de expressão gênica (ER α , ER β e PR), edema uterino e concentrações de E2 similares às encontradas em éguas cíclicas, nos períodos correspondentes avaliados.

Protocolo para sincronização simultânea de éguas receptoras acíclicas e cíclicas:

Oliveira Neto *et al.* (2018) buscaram otimizar a sincronização entre doadoras e receptoras, através do uso de protocolo hormona em receptoras acíclicas e cíclicas que estavam em diferentes momentos do ciclo estral. As receptoras foram divididas em grupos sendo: G1: controle; G2: anestro; G3: transição de primavera; G4: início de estro; G5: estro; G6: diestro; G7: diestro precoce (menos de 5 dias ovuladas); e G8: também de diestro precoce, mas que receberam diferentes tratamentos. A hormonioterapia consistiu no uso intramuscular de 10 mg de prostaglandina e 10 mg de 17 β estradiol seguido por 3 dias consecutivos da administração de 17 β estradiol (10, 20, 10 mg). Após 24 horas foram aplicados 300 mg de altrenogest longa-ação, assim como no dia da TE. Éguas gestantes recebiam 1500 mg de P4 LA semanalmente até 120 dias de gestação. Nas éguas do G8, a prostaglandina foi aplicada não só no primeiro, mas também no segundo dia do tratamento. As taxas de prenhez encontradas foram inferiores apenas para o G7 (40%), sendo semelhante entre os outros grupos. O menor valor encontrado para o grupo de diestro precoce (G7) foi atribuído ao fato de que éguas recém ovuladas, não respondem a uma única dose de prostaglandina. As éguas deste grupo ainda tiveram escores de edema uterino mais baixos durante o tratamento com E2, o que indica que a luteólise não foi completa e, portanto, resultando nas taxas de prenhez mais baixas. Os resultados encontrados em G7 e G8 reforçam esta ideia, ao passo que repetir a administração de prostaglandina garantiu luteólise e apresentou melhor taxa de prenhez (75%). Este trabalho mostra que receptoras em qualquer fase do ciclo estral poderiam ser sincronizadas com as éguas doadoras, diminuindo a necessidade de receptoras adicionais nos programas, e conseqüentemente o seu custo. Logo, os autores concluíram que o tratamento hormonal usando uma combinação de prostaglandina, estrogênio e progestágenos pode ser útil no uso de éguas tanto em anestro ou em transição, como em qualquer período do ciclo estral.

Protocolos utilizando dispositivo intravaginal liberador de P4:

Um fator importante sobre o uso de P4 LA é que a sua metabolização é lenta, e por isso os níveis de P4 se mantêm mais elevados que os níveis basais por mais tempo. Assim, as receptoras preparadas com este hormônio ficam bloqueadas por um período maior, mesmo que não se confirme a gestação. Este cenário se assemelha a luteólise incompleta em éguas cíclicas, no qual os níveis mais altos de P4 impedem que o útero responda a aplicação do estrógeno, não apresentando edema uterino e, portanto, com baixa taxa de prenhez nas receptoras. Júnior *et al.* (2021) compararam a taxa de prenhez em receptoras acíclicas submetidas aos protocolos com o uso de implante intravaginal liberador de P4 bovina de 1 g e P4 LA. As receptoras foram sincronizadas com 20 mg de 17 β estradiol e após 48h um grupo recebeu o implante vaginal de P4 e outro grupo 1500 mg de P4 LA, intramuscular. No dia da TE o implante foi trocado por um novo (que foi removido 3 dias após o diagnóstico de gestação) e o outro grupo recebeu mais uma dose de 1500 mg de P4 LA. Ambos os grupos receberam 1500 mg de P4 LA intramuscular, semanalmente, até 120 dias de gestação. Os níveis séricos de P4 no dia da TE não diferiram entre os grupos e foram superiores ao considerado mínimos para a manutenção da gestação (2,5 ng/mL). Não houve diferença para a taxa de gestação entre os dois grupos. Resultados similares foram encontrados em outro estudo que também comparou a utilização do implante intravaginal de P4 e a aplicação de P4 LA para o preparo de éguas receptoras acíclicas (Segabinazzi *et al.*, 2021). Uma ressalva à utilização de implantes bovinos em éguas é a ocorrência de vaginites, observada na rotina prática de campo.

Correlação entre a duração do edema e a probabilidade de gestação em éguas receptoras

Em receptoras cíclicas, um estudo demonstrou que a maior duração do período em que a receptora apresenta estro, representado pela presença de edema uterino, influencia positivamente na possibilidade de estabelecer prenhez, seja após uma luteólise espontânea ou induzida (Cuervo-Arango *et al.*, 2017). Neste contexto, com o objetivo de avaliar a expressão de genes possivelmente influenciados por estrogênios e/ou

envolvidos na formação de um endométrio “receptivo” para a sobrevivência e desenvolvimento do embrião, Silva et al. (2019) dividiram éguas em anestro em três grupos, que se diferiram pelo período em que foram submetidas ao estro artificial com o E2: estro longo (LE), estro curto (SE) e sem estro (NE). No LE as éguas foram tratadas com doses crescentes (0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0 mg) de BE por 5 dias consecutivos, e após 72 horas administraram 1500 mg de P4 LA. No SE as éguas foram tratadas com uma única dose de 2,5 mg de BE e, após dois dias receberam a mesma dose de P4 LA. Enquanto isso, no NE as éguas receberam apenas o tratamento com P4 LA. Biópsias uterinas foram colhidas quatro dias após a administração de P4 LA, para determinação da expressão gênica e proteica de receptores uterinos. O resultado mais significativo encontrado foi a maior expressão do gene *P19* no LE, o qual codifica a proteína uterocalina, que está relacionada ao transporte de lipídios, auxiliando na nutrição e no metabolismo do embrião. Dessa forma os autores concluíram que a maior expressão da uterocalina poderia contribuir para um endométrio mais receptivo em éguas após uma longa exposição ao estrógeno.

Um protocolo diário e longo pode não ser prático em condições de campo, por isso Silva et al. (2021) desenvolveram um novo estudo para avaliar a expressão da uterocalina endometrial utilizando um protocolo de estro artificial longo, porém com menor número de aplicações de BE. Para este estudo, éguas acíclicas foram divididas em três diferentes grupos para comparação. No primeiro grupo (LE5) as éguas receberam um protocolo semelhante ao do trabalho anterior com aplicação de 8 mg de BE em doses crescentes por 5 dias consecutivos. Já no segundo grupo (LE2) um novo protocolo com exposição longa de E2 foi testado, no qual as éguas receberam também 8 mg de BE, porém com apenas duas aplicações (3 e 5 mg, respectivamente) com intervalo de 72 horas entre as aplicações. No terceiro grupo (SE) dose única de 2,5 mg de BE foi administrada. Todos os grupos receberam uma dose de 1500 mg de P4 LA, sendo 72, 96 e 48 horas após a última aplicação de BE nos grupos LE5, LE2 e SE respectivamente. A expressão endometrial do gene *P19* foi maior em ambos os grupos com maior intervalo de exposição ao E2 (LE5 e LE2) quando comparado ao grupo de menor exposição (SE). A conclusão, portanto, foi de que ambos os protocolos LE5 e LE2 parecem adequados para preparação de um endométrio uterino mais “receptivo” ao embrião, sendo o protocolo com apenas duas aplicações de BE mais viável para utilização à campo.

Período de suplementação de progesterona/progestágenos para a manutenção da gestação

Indica-se a suplementação de progesterona/progestágenos até 100 até 120 dias de gestação, quando a placenta já assumiu a produção de progestágenos. No entanto, os corpos lúteos suplementares (CLs) são formados aproximadamente entre 40 e 45 dias em éguas cíclicas gestantes (Fig. 2) a partir da produção da gonadotrofina coriônica equina (eCG) secretada pelos cálices endometriais, glândulas temporárias que se formam no útero ao redor dos 38 dias. Os CLs produzem P4, para complementar a produção do hormônio pelo CL primário, até que essa função seja feita integralmente pela placenta (Allen, 2001). Sendo assim Silva et al. (2014), estudaram se receptoras acíclicas também formavam CLs, e ainda, se a interrupção da administração da P4 exógena, a partir do seu surgimento, não prejudicaria na manutenção da gestação. Caso fosse comprovado tal fato, os protocolos poderiam ter menor duração, reduzindo o seu custo, e diminuindo a necessidade de manejar a éguas induzindo-as ao estresse.



Figura 2. Corpo lúteo primário e corpos lúteos suplementares.

Para testar essa hipótese as éguas foram monitoradas e divididas em: grupo controle, composto por éguas que se tornaram gestantes na fase cíclica e dois grupos tratamento, compostos por éguas que se tornaram gestantes quando estavam em anestro ou transição, as quais receberam P4 exógena (33 mg de altrenogest oral), diariamente, até 70 ou 120 dias de gestação. O estudo mostrou que éguas em anestro levam



em média 71 dias para a formação do primeiro CLs, enquanto éguas em transição 54 dias e cíclicas 40 dias. Todas as éguas ciclantes apresentaram pelo menos um corpo lúteo com 70 dias de gestação, em contrapartida 15% das éguas no período de transição e 60% das em anestro não apresentaram nenhum CLs. Todas as éguas que tiveram o tratamento encerrado quando alcançado 120 dias da gestação, mantiveram a gestação, não sendo observado nenhum aborto. Ademais, éguas em anestro apresentaram número de CLs formados significativamente menor que as éguas em transição ou ciclantes, além de ter o início da síntese de P4 de forma mais tardia e em menores concentrações. Portanto, encerrar o protocolo hormonal de éguas em anestro aos 70 dias é de maior risco, e deve ser feito de maneira cautelosa. Em conclusão, os autores apresentaram a possibilidade de interromper o tratamento hormonal com P4 aos 70 dias de gestação em éguas acíclicas, desde que haja a presença de CLs com pelo menos 5 dias de formação, mantendo a gestação com sucesso. O trabalho também confirmou o que é observado em outras pesquisas, que a retirada da suplementação de P4 aos 120 dias de gestação garante manutenção de gestação em todas as éguas receptoras, ainda que não apresentem CLs em seus ovários.

Considerações finais

A hormonioterapia é uma solução para a assincronia entre as éguas doadoras e receptoras, otimizando o uso das receptoras. No entanto, o seu uso acarreta o aumento dos custos nos programas de TE, além de necessitar de comprometimento extremo dos funcionários com as aplicações hormonais, para que se alcancem os resultados desejados.

O protocolo mais adequado é aquele que é executável, no qual há a disponibilidade de fornecimento e armazenamento dos hormônios de forma correta, além de um funcionário, ou médico veterinário responsável pela aplicação rigorosa dos hormônios. Este deve ser o mais próximo do ciclo estral natural possível, sendo indicado o uso de ambos os hormônios gonadais (estrógeno e progesterona), bem como o adequado intervalo de exposição do ambiente uterino a estes hormônios, para obter melhores taxas de gestação com as transferências de embriões.

Referências

- Allen WR. Fetomaternal interactions and influences during equine pregnancy. *Reproduction*, v.121, p.513-527, 2001.
- Alonso MA, Fleury P, Alvarenga MA. Use of day 3 postovulation embryo transfer recipient mares. *Reprod Domest Anim*, v.43, p.98, 2008.
- Alvarenga MA, Tongu EAO. Estratégias para melhorar a eficiência reprodutiva em programas de transferência de embrião de equinos. *Rev Bras Reprod Anim*, v.41, p.19-24, 2017.
- Araújo JM, Oliveira RA. A influência da nutrição e a atuação da leptina e kisspeptina no ciclo reprodutivo da égua. *Rev Bras Reprod Anim*, v.42, p.9-14, 2018.
- Aurich C. Reproductive cycles of horses. *Anim Reprod Sci*, v.124, p.220-228, 2011.
- Barnes FL. The effects of the early uterine environment on the subsequent development of embryo and fetus. *Theriogenology*, v.53, p.649-658, 2000.
- Botelho JHV, Pessoa GO, Rocha LGP, Yeste M. Hormone supplementation protocol using estradiol benzoate and long-acting progesterone is efficient in maintaining pregnancy of anovulatory mares during autumn transitional phase. *Anim Reprod Sci*, v.153, p.39-43, 2015.
- Caiado JR, Fonseca FA, Silva JFS, Fontes RS. Tratamento de éguas receptoras de embriões visando sua utilização no segundo dia pós-ovulação. *Rev Bras Zootec*, v.36, p.360-368, 2007.
- Carnevale EM, Ramirez RJ, Squires EL, Alvarenga MA, Vanderwall DK, McCue PM. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. *Theriogenology*, v.54, p.965-979, 2000.
- Crowell-Davis SL. Sexual behavior of mares. *Horm Behav*, v.52, p.12-17, 2007.
- Cuervo-Arango J, Claes AN, Ruijter-Villani M, Stout TA. Likelihood of pregnancy after embryo transfer is reduced in recipient mares with a short preceding oestrus. *Equine Vet J*, v.50, p.386-390, 2017.
- De Lavor J, Alonso MA, Pivato I, Oliveira RA. Avaliação de receptoras para transferência de embrião em equinos. *Brazilian J Equine Med*, v.54, p.18-26, 2014.
- Duchamp G, Bour B, Combarnous Y, Palmer E. Alternative solutions to hCG induction of the ovulation in the mare. *J Reprod Fertil*, v.35, p.221-228, 1987.
- Eigenheer-Moreira JF, Fernandes FT, Queiroz FJR, Pinho TG, Ferreira AMR. Estudo comparativo de éguas repetidoras ou não de cio através da avaliação plasmática de progesterona. *Pesq Vet Bras*, v.27, p.506-512, 2007.



- Fitzgerald BP, McManus CJ.** Photoperiodic versus metabolic signals as determinants of seasonal anestrus in the mare. *Biol Reprod*, v.63, p.335-340, 2000.
- Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Beg MA.** Seasonal influence on equine follicle dynamics. *Anim Reprod*, v.1, p.31-44, 2004.
- Ginther OJ, Gastal EL, Gastal MO, Beg MA.** Regulation of circulating gonadotropins by the negative effects of ovarian hormones in mares. *Biol Reprod*, v.73, p.315-323, 2005.
- Greco GM, Burlamaqui FLG, Pinna AE, Queiroz FJR, Cunha MPS, Brandão FZ.** Use of long-acting progesterone to acyclic embryo recipient mares. *Rev Bras Zootec*, v.41, p.607-611, 2012.
- Hartt LS, Carling SJ, Joyce MM, Johnson GA, Vanderwall DK, Ott TL.** Temporal and spatial associations of oestrogen receptor alpha and progesterone receptor in the endometrium of cyclic and early pregnant mares. *Reproduction*, v.130, p.241-250, 2005.
- Hayes KEN, Ginther OJ.** Role of progesterone and estrogen in development of uterine tone in mares. *Theriogenology*, v.25, p.581-590, 1986.
- Hinrichs K, Keeney R.** Effect of timing of progesterone administration on pregnancy rate and embryo transfer in ovariectomized mares. *J Reprod Fertil*, v.35, p.439-443, 1987.
- Hinrichs K, Sertich PL, Palmer E, Kenney RM.** Establishment and maintenance of pregnancy after embryo transfer in ovariectomized mares treated with progesterone. *Reproduction*, v.80, p.395-401, 1987.
- Hinrichs K, Sertich PL, Kenney RM.** Use of altrenogest to prepare ovariectomized mares as embryo transfer recipients. *Theriogenology*, v.26, p.455-460, 1986.
- Hinrichs K, Sertich PL, Cummings MR, Kenney RM.** Pregnancy in ovarioectomized mares achieved by embryo transfer: a preliminary study. *Equine Vet J*, v.17, p.74-75, 1985.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística.** Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#resultado>>. Acesso em: setembro 2021.
- Jones DM, Fielden ED, Carr DH.** Some physiological and pharmacological factors affecting uterine motility as measured by electromyography in the mare. *J Reprod Fertil*, v.44, p.357-368, 1991.
- Júnior WLR, Neto WDC, Nogueira GP, Ferrari TA, Membrive CMB, Giomettil C, Castilho C.** Serum progesterone and conception rates in acyclic embryo recipient mares using a bovine progesterone-releasing intravaginal device. *J Equine Vet Sci*, v.97, p.103325, 2021.
- Kaercher F, Kozicki LE, Camargo CE, Weiss RR, Santos IW, Muradas PR, Bertol MAF, Abreu RA.** Embryo transfer in anovulatory recipient mares treated with estradiol benzoate and long-acting progesterone. *J Equine Vet Sci*, v.33, p.205-209, 2013.
- Lima RAS, Cintra AG.** Revisão do estudo do complexo do agronegócio do cavalo. Ministério da Agricultura, Brasília, DF, 2016.
- Maciel LFS, Silva ESM, Oliveira-Filho JP, Fritsch SC, Rossi RS, Lourenção JAC, Meira C.** Endometrial expression of estrogen and progesterone receptors in non-cyclic mares treated only with long-acting progesterone. *Theriogenology*, v.108, p.185-191, 2018.
- Malpaux B, Thiéry JC, Chemineau P.** Melatonin and the seasonal control of reproduction. *Reprod Nutr Dev*, v.39, p.355-366, 1999.
- McDowell KJ, Adams MH, Adam CY, Simpson KS.** Changes in equine endometrial oestrogen receptor α and progesterone receptor mRNAs during the oestrous cycle, early pregnancy and after treatment with exogenous steroids. *J Reprod Fertil*, v.117, p.135-142, 1999.
- McKinnon AO, Squires EL, Carnevale EM, Hermetet MJ.** Ovariectomized steroid-treated mares as embryo transfer recipients and as a model to study the role of progestins in pregnancy maintenance. *Theriogenology*, v.29, p.1055-1063, 1988.
- Nagy P, Guillaume D, Daels P.** Seasonality in mares. *Anim Reprod Sci*, v.60-61, p.245-262, 2000.
- Oliveira Neto IV, Canisso IF, Segabinazzi LG, Dell'Aqua CPF, Alvarenga MA, Papa FO, Dell'Aqua Jr JA.** Synchronization of cyclic and acyclic embryo recipient mares with donor mares. *Anim Reprod Sci*, v.190, p.1-9, 2018.
- Rocha Filho AN, Pessôa MA, Gioso MM, Alvarenga MA.** Transfer of equine embryos into anovulatory recipients supplemented with short or long-acting progesterone. *Anim Reprod*, v.1, p.91-95, 2004.
- Schutzer CGC, De Resende HL, Pantoja JCF, Alvarenga MA.** Utilização de diferentes períodos de fotoestimulação em éguas acíclicas para o controle da sazonalidade reprodutiva. *Vet Zootec*, p.148-153, 2014.
- Segabinazzi LGTM, Andrade Jr LRP, Alvarenga MA, Dell'Aqua Jr JA, Canisso IF.** Use of Intravaginal Progesterone-Releasing Device Results in Similar Pregnancy Rates and Losses to Long-Acting Progesterone to Synchronize Acyclic Embryo Recipient Mares. *Vet Sci*, v.8, p.190, 2021.
- Silva ESM, Vaz IS, Rodrigues TS, Brandão FZ, Oquendo PS, Oquendo FM, Beletti ME, Cuervo-Arango J.** Artificial long estrus protocols administered prior to progesterone increase endometrial



- uterocalin expression in anestrus mares. *J Equine Vet Sci*, v.103 p.103669, 2021.
- Silva ESM, Cuervo-Arango J, Ruijter-Villani M, Klose K, Oquendo PS, Stout TAE.** Effect of the duration of estradiol priming prior to progesterone administration on endometrial gene expression in anestrus mares. *Theriogenology*, v.131, p.96-105, 2019.
- Silva ESM, Ignácio FS, Fritsch SC, Zanoni DS, Pantoja JCF, Oliveira-Filho JP, Meira C.** Administration of 2.5 mg of estradiol followed by 1,500 mg of progesterone to anovulatory mares promote similar uterine morphology, hormone concentrations and molecular dynamics to those observed in cyclic mares. *Theriogenology*, v.97, p.159-169, 2017.
- Silva ESM, Roser JF, Gomes ARC, Fritsch SC, Pantoja JCF, Oliveira-Filho JP, Meira C.** Comparison of different regimens of estradiol benzoate treatments followed by long-acting progesterone to prepare noncycling mares as embryo recipients. *Theriogenology*, v.86, p.1749-1756, 2016.
- 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 Sci*, v.144, p.122-128, 2014.
- Spencer TE, Bazer FW.** Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. *Biol Reprod*, v.53, p.1527-1543, 1995.
- Squires EL, Seidel GE.** Collection and transfer of equine embryos. Animal Reproduction and biotechnology laboratory, Colorado State University, Bulletin n.8, 1985.
- Vanderwall DK, Marquardt JL, Woods GL.** Use of a compounded long-acting progesterone formulation for equine pregnancy maintenance. *J Equine Vet Sci*, v.27, p.62-66, 2007.
- Viana JHM.** 2019 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. Embryo Technology Newsletter, v.38, p.1-15, 2020.
- Williams GL, Thorson JF, Prezotto LD, Velez IC, Cardoso RC, Amstalden M.** Reproductive seasonality in the mare: neuroendocrine basis and pharmacologic control. *Domest Anim Endocrinol*, v.43, p.103-115, 2012.
-