

A TRANSFERÊNCIA EMBRIONÁRIA NA PRESERVAÇÃO DA RAÇA SORRAIA

EMBRYO TRANSFER IN THE PRESERVATION OF THE SORRAIA HORSE

Paula Maria Augusto Azevedo

Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Santarém, Portugal
(paula.azevedo@esa.ipsantarem.pt)

António Pedro Andrade Vicente

Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Santarém, Portugal
(antonio.vicente@esa.ipsantarem.pt)

Nuno Alexandre Reis Marques

Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Santarém, Portugal
(nuno.marques@esa.ipsantarem.pt)

Miguel Bliiebernicht

Embriovet, Prestação de Serviços Veterinários Lda., Portugal (miguel@embriovet.pt)

RESUMO

A transferência embrionária (TE) envolve a recolha de embrião de uma égua dadora e transferência para uma égua recetora. A TE tem sido utilizada para produção de múltiplos poldros/ano, de éguas reprodutivamente saudáveis, de éguas idosas e não consigam terminar a gestação e de éguas em competição sem que necessitem interromper a atividade desportiva. Em algumas raças/espécies equídeas ameaçadas, como é o caso da raça Sorraia, esta técnica poderia ser bastante vantajosa, potenciando a sua conservação. A transferência embrionária foi realizada em 2016 com a colaboração da Embriovet. A égua dadora Sorraia é uma fêmea com 6 anos, 3 partos, criada pela Escola Superior Agrária de Santarém. A égua recetora é uma fêmea Lusitana, com 3 anos, cedida por um criador particular. A dadora foi beneficiada num ciclo éstrico normal, por cobertura natural, por um garanhão da mesma raça com 13 anos. Ao 7º dia após ovulação, foi efetuada lavagem uterina para recolha do embrião. À égua recetora foi induzido o cio com prostaglandina F2 α e induzida a ovulação com hCG. Ao 10º e ao 14º dia após a ovulação da dadora, foram realizadas ecografias para diagnóstico de gestação à fêmea recetora, cujos resultados foram positivos, confirmando-se de novo cerca do 50º dia. Em Junho de 2017 a égua Lusitana pariu uma poldra Sorraia.

Palavras-chave: dadora, égua, Lusitana, recetora.

ABSTRACT

Embryo transfer (ET) involves the collection of an embryo from a donor mare and transfer to a recipient mare, which will lead the gestation to full term. ET has is for the production of multiple foals/year of healthy reproductive mares, old mares unable to complete a gestation and mares in competition. In some endangered breeds, such as the Sorraia horse, this technique could be very

advantageous, enhancing its conservation. Embryo transfer was carried out in 2016 with the collaboration of Embriovet. The Sorraia donor mare is a female 6 years old, 3 births, bred by Escola Superior Agrária de Santarém. The recipient mare is a 3-year-old Lusitano female, provided by a private breeder. The donor was covered in a normal oestrous cycle, by natural mating, by a 13-year-old Sorraia stallion. On the 7th day after ovulation, uterine lavage was performed to collect the embryo. Recipient mare was induced in oestrous with prostaglandin F₂ α and induced ovulation with hCG. On the 10th and 14th day after ovulation, ultrasounds were performed to diagnose gestation in the recipient mare, whose results were positive, confirming again around the 50th day of pregnancy. In June of 2017 the Lusitano mare gave birth to a Sorraia foal.

Keywords: donor, mare, Lusitano, recipient.

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas temos assistido a um enorme incremento de novas tecnologias reprodutivas na produção equina, sendo a transferência de embriões (TE) um procedimento que se tem tornado cada vez mais comum nesta espécie.

Esta técnica envolve a recolha de um embrião de uma égua dadora e transferência para uma égua recetora, com ovulação sincronizada e de preferência com uma boa aptidão materna, que levará a gestação a termo (Allen, 2005). A TE tem sido utilizada para a produção de múltiplos poldros por ano, de éguas reprodutivamente saudáveis, de éguas que sejam idosas e não consigam levar uma gestação a termo e de éguas em competição sem que necessitem interromper, por longos períodos de tempo, a sua atividade desportiva (Carvalho, 2012). Pode ainda ser utilizada para aumentar a descendência de éguas com alto valor genético e para obter poldros de reprodutoras subférteis. Em algumas raças/espécies equídeas em vias de extinção, como é o caso da raça Sorraia ou do burro de Miranda, esta técnica pode ser bastante vantajosa, conseguindo protegê-los da sua extinção, potenciando a sua conservação. Por último, esta técnica é ainda útil na avaliação da fertilidade de garanhões e de vários procedimentos seminais, tais como refrigeração e congelação, dando resultados ao fim de 7 dias pós-ovulação, dia da recolha do embrião na fêmea dadora (McKinnon & Squires, 2007)

Uns dos principais fatores restritivos para o uso da TE em Portugal são a baixa produtividade, os custos inerentes ao processo e, em especial, o custo de manutenção das éguas recetoras. A TE tem sido combinada com a inseminação artificial com sémen congelado ou a inseminação com doses seminais de baixa concentração. A utilização destas tecnologias faz com que sejam necessários mais estudos para aperfeiçoar a técnica, investindo na pesquisa, no sentido de desenvolver outros métodos como a criopreservação de embriões e o desenvolvimento de protocolos eficazes de superovulação em éguas (Pinto *et al.*, 2017). Poderá, assim, ser possível aumentar a eficiência reprodutiva de um programa de TE, uma vez que estes dois fatores são, atualmente, os grandes entraves na expansão desta tecnologia.

A dificuldade de um programa de TE está na organização e coordenação dos componentes que afetam o sucesso da taxa de gestação, como o manejo da égua dadora, a qualidade da égua recetora e sua sincronização e ainda a equipa técnica responsável pela transferência (Panzani, *et al.*, 2017).

2 IMPORTÂNCIA DA PRESERVAÇÃO DA RAÇA SORRAIA

O cavalo Sorraia, animal de pequeno porte, com características primitivas, muito particulares e únicas no mundo, apresenta-se como uma importante raça equina autóctone portuguesa. O nome

de Sorraia deve-se ao facto destes animais terem sido avistados pela primeira vez, pelo Dr. Ruy Andrade, no vale dos rios Sor e Raia, que constituem um dos principais afluentes do rio Tejo - o Sorraia.

Julga-se que este equídeo é um reminiscente ancestral selvagem do cavalo ibérico da região quente e meridional, existindo na Península Ibérica desde o Paleolítico Médio. Este animal, de tipo primitivo devido à sua grande capacidade de resistência e grande adaptação ao local onde se desenvolveu, nem sempre nas melhores condições meteorológicas e alimentares, foi o único que conseguiu subsistir, daí podendo-se concluir que será o mais antigo, autóctone e melhor adaptado ao local onde foi encontrado (<http://www.aicsorraia.fc.ul.pt/>).

O Sorraia é, sem dúvida, uma das raças europeias que apresenta mais caracteres primitivos (Figura 1).



Figura 1 – Exemplar da raça Sorraia.

A sua rara pelagem apresenta-se maioritariamente com as colorações pardo cinzento (rato) ou ainda pardo amarelo (baio-pardo), com crinas bicolors. Apresenta as extremidades dos membros (cabos) mais escuras, lista de mulo e lista crucial e ainda zebruras nos membros, como frequentemente assinaladas nas pinturas paleolíticas. A todas estas características ainda acresce o facto de as orelhas, orladas de pêlos mais escuros, apresentarem uma zona apical mais clara, típica de animais selvagens com características gregárias, para facilitar a localização mútua (Oom *et al.*, 2004).

Importa referir a importância da sua preservação, sendo uma das raças menos numerosas e em maior perigo de extinção em todo o mundo, não ultrapassando os 300 indivíduos, sendo o número de éguas reprodutoras cerca de 150 animais. Um problema relevante e que se tem vindo a acentuar neste cavalo primitivo é o aumento da consanguinidade média da população e a perda da variabilidade genética, fruto de uma população de reduzidíssimo número e ainda, de possíveis incorreções no maneio dos acasalamentos dos animais (Oom & Luís, 2001). Nos últimos anos temos, no entanto, assistido a uma boa gestão da sua reduzida variabilidade genética, com manutenção dos níveis de consanguinidade.

3 A TÉCNICA DE TRANSFERÊNCIA EMBRIONÁRIA

Esta biotecnologia reprodutiva envolve algumas etapas fundamentais: i) Seleção e maneio das éguas dadora e recetora; ii) Sincronização do estro e indução da ovulação; iii) Beneficiação da dadora e recolha do embrião; iv) Avaliação e manipulação do embrião; v) Transferência do embrião; vi) Controlo da recetora após transferência.

3.1 Seleção e manejo da égua dadora

A candidata ideal para égua dadora num programa de transferência de embriões, é uma fêmea com idade compreendida entre os 3 e 10 anos, em estado hígido de saúde e que não apresente qualquer problema a nível reprodutivo. Para realizar uma transferência é necessário considerar, em primeiro lugar, o valor genético da descendência das éguas dadoras, assim como a sua morfologia e a sua inserção no padrão da raça. A história reprodutiva e a fertilidade são fatores de extrema importância que vão influenciar bastante o manejo destas éguas (McKinnon & Squires, 2007).

A elevada percentagem de éguas idosas presentes em programas de TE constitui um problema, pois estas têm uma eficiência reprodutiva mais baixa do que éguas jovens. As falhas reprodutivas, normalmente observadas, estão associadas a alterações no processo de ovulação e maturação dos oócitos e/ou endometrite crónica (Panzani, *et al.*, 2017).

O manejo consiste em acompanhar o comportamento reprodutivo da égua, utilizando a palpação e a ecografia transrectal para monitorizar a atividade folicular e ovulação, e caso seja necessário, utilização de hormonas exógenas para sincronização do estro e indução da ovulação.

3.2 Seleção e manejo da égua recetora

De todos os fatores que afetam o sucesso de um programa de TE, o mais importante é provavelmente a seleção apropriada e o manejo da égua recetora. Os critérios de seleção que deverão ser considerados são a sua idade, ser de fácil manejo, ter um bom desenvolvimento mamário e boa conformação da genitália externa. A sua idade deverá situar-se entre os 3 e 10 anos, sendo preferível que já tenha parido uma ou duas vezes. Além disso, deve exibir ciclos reprodutivos normais e não ter quaisquer anomalias ováricas ou uterinas. No momento da transferência, é importante que pelo menos duas recetoras estejam disponíveis para cada dadora, permitindo assim, escolher a que apresenta melhores condições reprodutivas para receber o embrião. Estas éguas devem ser alimentadas de modo a manter uma boa condição corporal e não serem sujeitas a situações de stress (McKinnon & Squires, 2007).

3.3 Sincronização do estro e indução da ovulação

A sincronização dadora-recetora tem uma enorme influência nos resultados de um programa de transferência de embriões. A recetora deve ovular um dia antes da dadora (+1) ou até três dias depois (-3). Quando existe um grande número de recetoras, uma dadora pode ser combinada com uma recetora que tenha ovulado espontaneamente, sem recorrer à utilização de hormonas para sincronizar os seus ciclos. No entanto, quando tal não é possível, a sincronização tem que ser feita recorrendo a hormonoterapia. As hormonas mais utilizadas são a prostaglandina F_{2α}, gonadotrofina coriónica humana (hCG), análogo de GnRH e ocitocina (McKinnon & Squires, 2007; Jacob *et al.*, 2012).

3.4 Beneficiação da dadora e recolha do embrião

A dadora é beneficiada de acordo com o protocolo eleito e o oócito é fertilizado no oviduto. O embrião é transportado para o útero entre os dias 5 e 6 pós-ovulação, encontrando-se na fase de mórula compactada, pronto para o desenvolvimento inicial de blastocisto. Após entrar no lúmen uterino, o seu tamanho aumenta atingido o estadió de blastocisto expandido. Desta forma, os embriões são recolhidos no dia 6, 7 ou 8, sendo o dia 0 o que corresponde à ovulação (Panzani, *et.*

al., 2009). A recolha de embriões é realizada por via transcervical não cirúrgica em sistema fechado (Figura 2).



Figura 2 – Recolha de embrião por via transcervical não cirúrgica em sistema fechado.

3.5 Avaliação e manipulação do embrião

Após a lavagem uterina, o líquido retido no filtro (Figura 3) é vertido para uma placa de Petri (Figura 4) para ser observado à lupa (ampliação de 10x), identificar e avaliar a qualidade do embrião (Figura 5), de acordo com uma escala, sendo classificado de excelente a mau (Figura 5). Posteriormente é removido para outra placa, com vários poços, contendo um meio de lavagem próprio para embriões com antibióticos, onde se procede à sua lavagem (Figura 6) (Hinrichs, & Choi, 2005).



Figura 3- Filtro para recolha de embrião.

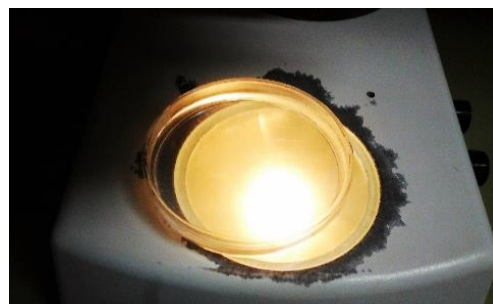


Figura 4- Placa de Petri para observação à lupa.



Figura 5- Observação do embrião colhido à fêmea Sorraia Fiona.



Figura 6- Placa destinada à lavagem do embrião.

3.6 Transferência do embrião

A transferência pode ser realizada pelo método cirúrgico e não cirúrgico transcervical, sendo esta a metodologia mais utilizada pois é menos invasiva e mais rápida, uma vez que consiste em depositar o embrião no lúmen uterino, após a sua introdução numa palheta esterilizada de 0,25 ou 0,5 ml, consoante o tamanho do mesmo (Figura 7). A palheta é preenchida com 3 colunas de líquido, separadas por espaços com ar, encontrando-se o embrião na segunda coluna de líquido (Carvalho, 2012).

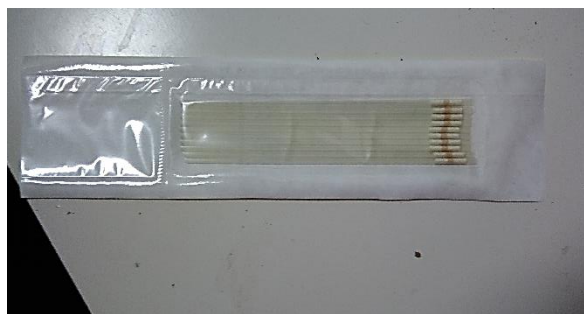


Figura 7 – Palhetas destinadas à colocação do embrião.

Posteriormente a palheta é colocada no interior de uma sonda (Figura 8), que por sua vez é acoplada a um *pistollet*, permitindo depositar o embrião no útero da égua recetora.

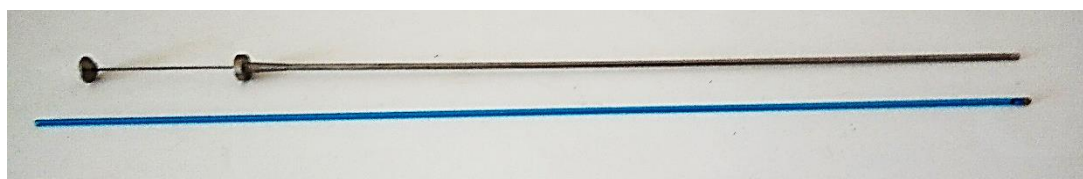


Figura 8 – Sonda descartável e *pistollet*.

3.7 Controlo da recetora após transferência

O diagnóstico de gestação nas recetoras poderá ser realizado ao 5^o dia após a transferência, que corresponderá ao 12^o - 13^o dia após ovulação da dadora. Caso seja positivo, deverá ser confirmado ao 17^o-18^o dia, de novo ao 25^o dia para verificação do batimento cardíaco e finalmente por volta dos 45 dias, quando o concepto já é considerado um feto, para verificar a ausência de morte embrionária (Cláudia, 2016).

4 A TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÃO NA RAÇA SORRAIA

A transferência embrionária nesta raça, realizada em 2016, com a fundamental colaboração da Embriovet, Prestação de Serviços Veterinários Lda foi a primeira a ser executada a nível mundial. Uma das aplicações importantes desta biotecnologia, como referimos anteriormente, é o seu contributo para a preservação de raças ameaçadas de extinção onde se inclui o cavalo Sorraia.

4.1 Caracterização das éguas, dadora e recetora

A égua dadora da raça Sorraia é uma fêmea com 6 anos, de nome Fiona (Figura 9), cujo criador é a Escola Superior Agrária de Santarém e que até 2016 já tinha produzido 3 descendentes. Os partos foram sempre normais bem como a sua atividade cíclica pós-parto.



Figura 9 – Égua dadora Sorraia, Fiona, com poldro nascido em 2016.

A recetora é uma fêmea Lusitana, de nome Índia, com 3 anos de idade em 2016 (Figura 10), cedida por um criador particular e que à data nunca tinha parido. Égua com um temperamento calmo, boa condição corporal e que apresentava ciclos éstricos normais. A avaliação realizada ao seu trato reprodutivo por palpação transretal e ecografia, não evidenciou qualquer anomalia.



Figura 10 – Índia, égua recetora.

4.2 Beneficiação da égua dadora e recolha de embrião

A égua dadora foi beneficiada num ciclo éstrico normal, sem recurso a hormonoterapia, em julho de 2016, por cobrição natural, à mão. O garanhão da mesma raça com 13 anos de idade, de nome Xearas, apresentava boa qualidade seminal avaliada através de um espermograma. Os saltos foram realizados com intervalos de 36 horas, tendo a égua sido coberta 3 vezes. Após o último salto foi realizada ecografia, tendo-se observado a presença de um corpo lúteo com cerca de 2 dias. Ao 7º dia após a ovulação, foi efetuada lavagem uterina para recolha do embrião. Este foi sujeito aos procedimentos técnicos já descritos anteriormente e transferido para a égua recetora.

4.3 Maneio da égua recetora

Nesta fêmea foi induzido o cio com recurso à administração de prostaglandina F2 α . Posteriormente foi monitorizada através de palpação transretal e ecografia tendo sido induzida a ovulação com administração de hCG (1500UI), para se conseguir a sincronização entre dadora e recetora, um dos fatores determinantes no sucesso da transferência embrionária. A recetora no dia em que foi efetuada a transferência, encontrava-se no 4º dia pós-ovulação (D4). Ao 10º e ao 14º dia após a ovulação da dadora, foram realizadas ecografias para diagnóstico de gestação à fêmea recetora, cujos resultados foram positivos (Figura 11 e Figura 12).



Figura 11- Diagnóstico de gestação positivo de 10 dias.

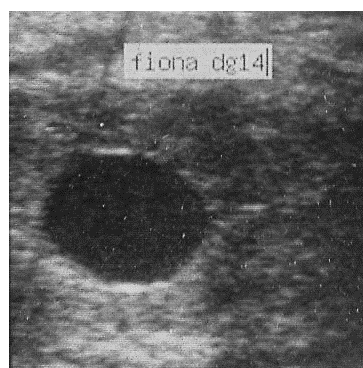


Figura 12- Diagnóstico de gestação positivo de 14 dias.

Por volta do dia 50 foi realizada nova ecografia que confirmou a não ocorrência de morte embrionária (Figura 13).



Figura 13- Diagnóstico de gestação positivo com cerca de 53 dias.

A gestação decorreu normalmente e no dia 8 de junho de 2017 a égua Lusitana Índia pariu uma poldra de raça Sorraia (Figura 14).

Foi um acontecimento relevante para a raça Sorraia, com um contributo importante para a sua divulgação e preservação.



Figura 14 – Égua Lusitana Índia com a poldra Sorraia e a sua progenitora.

5. REFERÊNCIAS

- Allen, W.R. (2005). The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. *Reprod. Domest. Anim*, 40 (4), 310-29.
- Carvalho, A.L. (2012). Fatores que influenciam o sucesso de um programa de transferência de embriões equinos. Dissertação de mestrado em medicina veterinária. Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa, 60 pp.
- Claudia, K. (2016). Maternal Recognition of Pregnancy in the Context of Equine Embryo Transfer. *Journal of Equine Veterinary Science*, 41, 22-28.
- Hinrichs, K., Choi, Y.-H. (2005). Assisted reproductive techniques in the horse. *Clinical Techniques in Equine Practice*, 4, 210-218.
- Jacob, J.C.F., Haag, K.T., Santos, G.O., Oliveira, J.P., Gastal, M.O. & Gastal, E.L. (2012). Effect of embryo age and recipient asynchrony on pregnancy rates in a comercial equine embryo transfer program. *Theriogenology*, 77, 1159-1166.
- McKinnon, A.O., Squires, E.L. (2007). Embryo Transfer and Related Tecnologies. In J.C. Samper (Ed) & J.F. Pycocok & A.O. McKinnon, *Current Therapy in Equine Reproduction*. Missouri, USA: Sauders Elsevier, 319-333.

- Omm, M.M., Luís, C. (2001). Gestão genética de uma população fragmentada: O Cavalo do Sorraia. 6ª Reunião da Sociedade Portuguesa de Ecologia, 1-3 Novembro, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.
- Oom, M. M., Andrade, J. L. e Costa-Ferreira, J. (2004). Stud Book da Raça Sorraia. Associação Internacional de Criadores de Raça Sorraia. Lisboa.
- Panzani, D., Crisci, A., Rota, A., Camillo, F. (2009). Effect of day of transfer and treatment administration on the recipient on pregnancy rates after equine embryo transfer. *Veterinary Research Communication*, 33 (1), 113-116.
- Panzani, D., Vannozzi, I., Marmorini, P., Rota, A., Camillo, F. (2017) - Factors Affecting Recipients Pregnancy, Pregnancy Loss, and Foaling Rates in a Commercial Equine Embryo Transfer Program. *Journal of Equine Veterinary Science*, 37, 17-23.
- Pinto, M.R., Miragaya, M.H., Burns, P., Douglas, R., Neild, D.M. (2017) - Strategies for Increasing Reproductive Efficiency in a Commercial Embryo Transfer Program With High Performance Donor Mares Under Training. *Journal of Equine Veterinary Science*, 54, 93-97.
- Associação Internacional de Criadores do Cavalo Ibérico do Tipo Primitivo – Sorraia (consulta efetuada a 12 de julho de 2017). Disponível em <http://www.aicsorraia.fc.ul.pt/>