

Taxa de gestação de embriões equinos mantidos em dois meios comerciais diferentes de manutenção pós-transferência de embriões

Pregnancy rate using two different comercial medium for embryo equine transfer

Letícia Patrão de Macedo Gomes¹, Daniele Gavioli¹, Júlio Ferraz Jacob², André Maciel Crespilho^{1,3}, Carlos Eduardo Cardoso¹, Gustavo Mendes Gomes¹.

Resumo

Existem diversos meios de manutenção de embriões equinos à disposição para serem utilizados desde a lavagem, transporte e inovulação do embrião na receptora. Após a lavagem, o embrião permanece durante o intervalo de tempo até a inovulação e é de fundamental importância que ele seja capaz de manter a qualidade do embrião para que os índices de fertilidade não sejam afetados. O objetivo deste trabalho foi verificar a eficiência de dois diferentes meios comerciais de manutenção de embriões equinos por até 120 minutos à temperatura ambiente em relação aos índices de gestação pós-inovulação em éguas receptoras da raça Mangalarga Marchador. Os 80 embriões coletados foram, aleatoriamente manipulados e mantidos em um dos meios de manutenção: Grupo 1 TQC Holding Plus® (n=44) ou no grupo 2 BotuEmbryo Holding® (n=36) até o momento de inovulação à temperatura ambiente por no máximo 120 minutos. A taxa de gestação aos 14 dias do Grupo 1 foi de 75% (33/44) e do Grupo 2 foi de 83,3% (30/36). Não foi observada diferença estatística em relação às taxas de gestação entre os dois meios de manutenção avaliados (p=0,3295), concluindo-se que ambos os meios se mostraram eficientes em conseguir taxas satisfatórias de gestação com embriões mantidos até 120 minutos à temperatura ambiente.

Palavras-chave: Embriões. Equinos. Meio de manutenção de embrião.

Como citar esse artigo. Gomes, LPM, Gavioli D, Jacob JF, Crespilho AM, Cardoso CE, Gomes GM. Taxa de gestação de embriões equinos mantidos em dois meios comerciais diferentes de manutenção pós-transferência de embriões. Revista Saúde. 2014 Jan./Dez.; 05 (1/2): 23-27.

Abstract

Different commercial solutions are used for washing and transport embryos during the procedures of equine embryo transfer (EET). The objective of this study was to evaluate the efficiency of two different commercial solutions for embryo transfer for 120 minutes at room temperature in relation to post-embryo transfer pregnancy rates in recipient mares of the Mangalarga Marchador. This study used 80 embryos divided randomly in two groups, Holding Plus® QFT Group 1 (n = 44) or BotuEmbryo Holding® in group 2 (n = 36) until the time of embryo transfer at room temperature kept to 120 minutes. The pregnancy rate at 14 days in Group 1 was 75% (33/44) and Group 2 was 83.3% (30/36). There was no difference statistic to pregnancy rates between the two group (p = 0.3295), concluding that both buffers were effective in pregnancy rates to 120 minutes before embryo transfer at the temperature room.

Keywords: Embryos. Equine. Medium for embryo transfer.

Introdução

O Brasil é um dos líderes no uso da Transferência de Embrião (TE) em equinos no mundo, junto aos EUA e a Argentina. No Brasil, a indústria equina gera por volta de 1,2 milhões de empregos.

A transferência de embriões foi fundamental para a criação de cavalos, por garantir o melhoramento genético nas diferentes raças. Porém, os altos custos da técnica e a estrutura para realizar a mesma são algumas das limitações para uma maior difusão da técnica. Um dos principais entraves seriam os gastos em manter as éguas receptoras¹.

A técnica da TE tem baixa complexidade quando comparada com técnicas mais avançadas, porém, a dificuldade de um programa de TE está na organização

e coordenação de componentes que afetam o sucesso da taxa de prenhez, como o manejo da égua doadora, qualidade da égua receptora e da sincronização, meio de manutenção habilidade/técnica na transferência.

A taxa de taxa de prenhez é a porcentagem de embriões transferidos que se tornam gestantes na éguareceptora de embriões. A maioria dos embriões recuperados são oriundos de ovulações simples espontâneas, resultando em uma taxa de 50% de recuperação de embrião por tentativa e em torno de 50% de taxa de prenhez após a inovulação². A taxa de recuperação embrionária e de gestação são muito importante para o sucesso na implantação de um programa de TE e pode ser influenciada por vários fatores. Dentre eles, podemos citar a qualidade dos embriões, o método de inovulação, sincronização entre doadora e receptora, condições nutricionais e uterinas

1. Universidade Severino Sombra, USS, Vassouras-RJ, Brasil.

2. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, UFRRJ, Seropédica-RJ, Brasil.

3. Universidade Santo Amaro, UNISA, São Paulo-SP, Brasil.

das doadoras e das receptoras além do manejo geral das receptoras³.

As receptoras também devem ser examinadas diariamente quando em cio para monitoramento do crescimento folicular e ovulação, permitindo assim, no momento da inovulação, escolher a que apresenta as melhores condições reprodutivas para receber o embrião⁴.

Para a transferência de embriões equinos existem diferentes meios comerciais para manutenção, manipulação, transporte e inovulação dos embriões. Dentre esses, destacam-se os que apresentam em sua formulação o tampão bicarbonato, fosfato e zwitteriônico. Exemplos desses meios são, respectivamente, a solução Ham's F10[®], a solução fosfato tamponada modificada por Dulbeco (DPBS[®]) e o Embriocare[®]. Mais recentemente surgiram o TQC Holding[®] e Botuembryo Holding[®], este último de formulação e fabricação nacional, ambos apresentando o tampão zwitteriônico em suas formulações.

Os meios tamponados por bicarbonato apresentaram taxas de gestação de 45 e 60% em receptoras classificadas como aceitáveis e marginalmente aceitáveis, respectivamente⁵. Neste experimento, os embriões foram refrigerados por um período que variou de 5 a 36 horas. O que dificulta sua utilização a campo é o fato de necessitarem de uma atmosfera gasosa. Os meios tamponados por bicarbonato apresentaram taxas de gestação composta de 5% CO₂, 5% O₂ e 90% de N₂ para manterem a estabilidade tamponante. Em 1966, Goode colaboradores criaram uma solução tampão a base de bicarbonato associada ao fosfato, denominada de solução Hepes que tem a vantagem de ser estável em atmosfera de oxigênio. Essa associação de forma uma solução metabolicamente inerte, ou seja, juntos são neutralizados. Soluções com esta característica denominam-se tampões zwitteriônicos.

Os meios tamponados com soluções Hepes (zwitteriônicas) são bastante utilizados, pois seus constituintes estabilizam a zona pelúcida, não atravessam a barreira celular e previnem uma possível inibição do crescimento que podem ser causadas pelo tampão fosfato⁶.

Outro meio tamponante que não necessita de atmosfera modificada é a solução tamponada por fosfato modificada por Dulbeco (DPBS). Nesta solução o embrião poderá permanecer por até 60 minutos em temperatura ambiente se for adicionado 10% de soro fetal bovino⁷. Já Fleury, em 1998, conseguiu 73,3% de taxa de gestação ao utilizar o meio DPBS em embriões mantidos por sessenta minutos transportados em temperatura ambiente (23 a 35°C).

Em 2009, Caiado e colaboradores avaliaram a taxa de prenhez com a utilização de dois meios comerciais de manutenção. O primeiro usado foi o meio Embriocare[®], (tampão zwitteriônico) em receptoras da

raça Mangalarga Marchador. O segundo meio usado foi DPBS com 0,4% de BSA, com tampão fosfato. Uma taxa de prenhez de 80% foi observada nas éguas inovuladas com embriões tratados com o meio Embriocare[®] com trinta minutos de descanso e uma taxa de 75% prenhez, com embriões que permaneceram em descanso no meio de manutenção por sessenta minutos.

O objetivo do presente estudo foi comparar as taxas de gestação pós-inovulação de embriões mantidos em dois diferentes meios comerciais de manutenção por até 120 minutos à temperatura ambiente.

Material e Métodos

Animais e delineamento experimental

O experimento foi desenvolvido no Centro Avançado de Reprodução Equina localizado no município de Vassouras/RJ (Latitude de 22°24'14" S; Longitude de 43°39'45" W; Altitude de 434 m), durante a estação reprodutiva nos períodos de setembro de 2012 a abril de 2013. Foram utilizadas 25 éguas (n= 25) da raça Mangalarga Marchador com idade média de 14 anos e peso corporal entre 350-500 kg, com saúde reprodutiva normal.

Para as inseminações artificiais foi utilizado sêmen diluído de dois garanhões da raça Mangalarga Marchador com idade média de 12 anos, pesando cerca de 500 kg.

As éguas eram submetidas ao controle folicular diário, através de exames palpação eultrassonografiatransretais. Ao ser detectado folículo com média de 35 mm de diâmetro associado a edema uterino ao exame ultrassonográfico, as éguas recebiam 1.666 UI de hCG para indução da ovulação e, então, a inseminação artificial era realizada no dia seguinte.

O presente trabalho foi registrado na CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Severino Sombra sob o parecer nº 2013/011.

Inseminação artificial e colheita de embriões

As doadoras foram inseminadas, utilizando a dose de sêmen fresco diluído de 500 a 1 bilhão de espermatozoides viáveis provenientes de um dos 2 garanhões utilizados no experimento. As éguas foram inseminadas por metodologia convencional (pipeta pela cérvix e deposição do sêmen no corpo do útero) utilizando o diluente comercial Botu-sêmen[®].

As colheitas dos embriões foram realizadas no oitavo dia após a última ovulação, utilizando-se 03 lavados uterinos de 1 L de ringer com lactato de sódio cada.

Somente embriões classificados em grau I de

acordo com classificação já descrita em literatura⁸ eram conduzidos a fazer parte do experimento.

Rastreamento, manipulação e inovulação dos embriões

Na etapa de rastreamento, realizada em placa de Petri descartável, com auxílio de microscópio estereoscópio com aumento máximo de 35 vezes, os embriões foram, aleatoriamente, divididos em dois grupos distintos. No Grupo 1, os embriões foram manipulados e mantidos no meio de manutenção comercial TQC Holding Plus[®] (tampão zwitteriônico). Já os embriões que pertenciam ao Grupo 2 foram manipulados e mantidos em meio comercial BotuEmbryo[®] (tampão zwitteriônico). Em ambos os Grupos (1 e 2) os embriões foram mantidos à temperatura ambiente por no máximo 120 minutos, entre a colheita e a inovulação na receptora de embriões.

As inovulações foram realizadas até 120 minutos em receptoras sincronizadas com as doadoras de acordo com técnica descrita em literatura⁹.



Figura 1. Embrião recuperado e identificado para posterior lavagem.

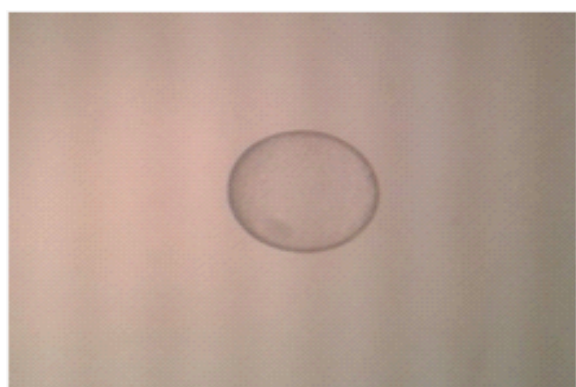


Figura 2. Foto do embrião sendo preparado para inovulação.

Diagnóstico de gestação

Após sete dias da inovulação, as receptoras foram submetidas ao exame de ultrassonografia, visando o

diagnóstico de gestação, pela visualização da vesícula embrionária.

Análise Estatística

Para comparação dos índices de confirmação embrionária (prenhez) entre os dois meios comerciais de manutenção, foi utilizado o Teste Exato de Fisher. O nível de significância foi de 5%.

Resultados e Discussão

Foram coletados 80 embriões, sendo que 44 foram mantidos no meio comercial 1 (TQC Holding Plus[®]), resultando em 33 (75,0%) éguas receptoras gestantes. No Grupo 2 (BotuEmbryo[®]), dos 36 embriões inovulados, obteve-se um total de 30 de éguas receptoras gestantes (83,3%). Os dados estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1. Número de embriões inovulados e taxa de prenhez de éguas receptoras da raça Mangalarga Marchador, submetidos a dois diferentes meios de manutenção no Grupo 1 (TQC Holding Plus[®]) e Grupo 2 (BotuEmbryo[®])

Estação de Monta 2012/2013	Embriões inovulados	N	Prenhez
Grupo 1	44	33	75,0
Grupo 2	36	30	83,3
Total	80	63	78,75

Ambos os meios de manutenção utilizados nesse experimento contém tampão zwitteriônico. Os resultados de prenhez do presente trabalho foram semelhantes aos relatados por outros pesquisadores¹⁰ que ao utilizar o meio Embriocare[®], também com tampão zwitteriônico, obteve 80% (12/15) de taxa de gestação dos embriões mantidos por até 30 minutos. Entretanto, quando são somadas as taxas de gestação de todos os grupos que utilizaram o Embriocare[®] (0, 30, 60 e 120 minutos), igualando ao tempo do presente estudo, a taxa de gestação caiu para 65% (39/60), sendo inferior às encontradas no presente estudo que foram de 75% (TQC Holding Plus[®]) e de 83,3% (BotuEmbryo[®]).

Em outra pesquisa¹¹ foi obtido taxa semelhante de prenhez (73,5%) às encontradas no presente estudo. Entretanto, com metodologia diferente, já que os embriões foram submetidos à refrigeração de 15 a 18°C por período de 1 a 4 horas.

Os resultados encontrados no presente estudo se assemelham aos encontrados anteriormente por um pesquisador¹² que obteve taxa de gestação de 73,3% com embriões transportados em temperatura ambiente por até 60 minutos em meio DPBS, sendo o tempo do

presente estudo (120 minutos) o dobro do utilizado por esse autor, ou seja, obtiveram-se taxas de prenhez também satisfatórias num intervalo de tempo maior, o que possibilita o transporte desses embriões por mais tempo, caso seja necessário.

Afim de testar qual associação seria melhor para armazenar o embrião em 24 horas¹³, alguns pesquisadores obtiveram taxa de prenhez de 70% com o meio Ham's F10[®] + CO₂, bem próxima às encontradas no presente estudo. Após 24 horas em uma temperatura reduzida (5 °C), embriões armazenados em Ham's F10 + CO₂ apresentaram melhor (p< 0,5) qualidade do que aqueles armazenados em Ham's F10 + Hepes, embora a maioria dos embriões tenham sido classificados ainda como excelente ou bom morfológicamente em ambas as associações.

Utilizando a coloração DAPI¹⁴, pesquisadores compararam a viabilidade de embriões equinos frescos ou refrigerados a 5 °C por 6 ou 24 horas em meio Ham's F-10[®] ou EmCare[®], observando-se número de células mortas significativamente menor para os embriões frescos ou refrigerados por 6 horas em comparação aos refrigerados por 24 horas, sem que fosse detectada diferença no número de células mortas entre os meios utilizados. Estudo complementar dos mesmos autores¹⁵ verificou a viabilidade *in vitro* de embriões de sete dias (D7) mantidos por 6 ou 24 horas a 5 °C em Ham's F-10[®], EmCare[®] ou em meio ViGro[®]. Os resultados indicaram viabilidade embrionária similar nos três meios avaliados, porém detectou-se aumento no número de células mortas (coloração DAPI) com o maior tempo de refrigeração. No mesmo experimento, avaliou-se a taxa de gestação após a transferência de outros embriões D7 refrigerados a 5°C por 24 horas em meio Ham's F-10[®] ou EmCare[®], obtendo-se 53% e 47% de gestação para os embriões refrigerados, respectivamente (p>0,05), indicando que a maior porcentagem de células mortas observadas *in vitro* possivelmente não influenciou nas taxas de prenhez. É possível que as taxas satisfatórias de prenhez obtidas em ambos os grupos do presente estudo sejam devido a uma baixa mortalidade das células embrionárias durante a manutenção nos dois meios e que estes embriões tenham mantido a viabilidade durante o período de transporte até a inovulação.

Um fator importante a ser analisado seria quanto ao custo dos meios TQC Holding Plus[®] e BotuEmbryo[®] encontrados no mercado. O BotuEmbryo[®] tem um custo menor, pois o preço equivalente a 8 mL do produto suficiente para as fases de rastreamento, lavagem, manutenção e inovulação do embrião, usado durante o experimento, foi de R\$ 12,00, o que corresponde a R\$ 1,50 cada 1 mL. Já o preço, de um frasco de 6mL de TQC Holding Plus[®] utilizado na fase de rastreamento, lavagem, manutenção e inovulação do embrião, foi de R\$ 11,58, correspondendo a R\$ 1,93 cada 1 mL. Fato este importante, principalmente quando se trabalha

em um programa que apresenta um volume grande de transferência de embriões realizado.

Conclusão

A partir dos resultados obtidos neste experimento, pode-se concluir que ambos os meios de manutenção de embriões com tampão zwitteriônico BotuEmbryo[®] e TQC Holding Plus[®] foram eficientes em manter embriões equinos em temperatura ambiente por até 120 minutos, resultando em taxas de prenhez satisfatórias. Essa informação é importante, pois permite o transporte de embriões sem a necessidade de refrigeração, quando o intervalo entre a coleta e a inovulação não exceder 120 minutos.

Referências

- Squires EL, Seidel GE. Collection and transfer of equine embryos. *Animal Reproduction Biotechnology Laboratory Bulletin. Colorado State University, Fort Collins*. p.397, 1995.
- Squires EL. Perspectivas para o uso de biotecnologias na reprodução equina. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.33, n.1, p.69-82, 2005.
- Squires EL, McCue PM, Vanderwall D. The current status of equine embryo transfer. *Theriogenology*, v. 51, n. 1, p. 91-104, 1999.
- McKinnon AO, Squires EL. Embryo transfer and related technologies. *Current therapy in equine reproduction*. Sant Louis: Saunders Elsevier, p. 319-334, 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, n.6, p.965-79, 2000.
- Seshagiri PB, Bavister BD. Glucose and phosphate inhibit respiration and oxidative metabolism in cultured hamster eight-cell embryos: evidence for the "crabtree effect". *Molecular Reproduction and Development*, v. 30, p. 105-111, 1991.
- Carvalho GR. Estudo de alguns aspectos da transferência de embriões eqüinos. 2000. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, 2000.
- McKinnon AO, Voss JL. *Equine Reproduction*. 5.ed. Philadelphia: Lea &Febiger, p. 1137, 1992.
- Gomes GM, Gomes LPM. Fatores que influenciam a produção de embriões em éguas doadoras. *Acta Scientiae Veterinariae*.v.36, n.2, p.s199-s206, 2008.
- Caiado JRC, Van Tilburg MF, Fonseca FA, Silva JFS, Fagundes B, Barreto MAP. Comparação entre dois meios para transferência de embriões em éguas da raça mangalarga marchador. *Ciência Animal Brasileira*, v. 10, n.3, p.938-946, 2009.
- Fleury JJ, Fleury PDC, Landim-Alvarenga FC. Effect of embryo diameter and storage period on pregnancy rates obtained with equine embryos stored in Ham's F-10 with Hepes Buffer at a temperature of 15-180 C: preliminary results. *Theriogenology*, v. 58, p. 749-750, 2002.
- Fleury JJ. Transferência não cirúrgica de embriões eqüinos colhidos no oitavo dia após a ovulação. *Arquivos da Faculdade de Veterinária, UFRGS*, v. 26, n. 1, p. 264, 1998.
- Carnevale EM, Squires EL, McKinnon AO. Comparison of Ham's F10 with CO₂ or Hepes buffer for storage of equine embryos at 5 C for 24 H. *Journal of animal science*, v. 65, n. 4, p. 1775-1781, 1987.
- Moussa MDG, Mahla R, Bruyas JF, Daels PF. Comparison of pregnancy

rates for equine embryos cooled for 24 h in Ham's F-10 and EmCare holding solutions. *Theriogenology*, v.58, p.755-757, 2002.

¹⁵ Moussa M, Duchamp G, Mahla R, Bruyas JF, Daels PF. In vitro and in vivo comparison of Ham's F-10, EmCare holding solution and Vigro holding plus for the cooled storage of equine embryos. *Theriogenology*, v.59, p.1615-1625, 2003.