



Taxa de recuperação embrionária em éguas submetidas à caminhada com útero repleto de Ringer Lactato

Recovery rate of embryos in mares walking with a filled uterus

Roberta Garbelini Gomes^[a], Camila Bizarro da Silva^[b], Thales Ricardo Rigo Barreiros^[c], Marcelo Marcondes Seneda^[d]

^[a] Médica veterinária, doutoranda em Ciência Animal, Programa de Pós-Graduação da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR – Brasil, e-mail: robs_vet@hotmail.com

^[b] Médica veterinária, mestranda em Ciência Animal, Programa de Pós-Graduação da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR – Brasil, e-mail: camilabizarros@gmail.com

^[c] Médico veterinário, doutor em Ciência Animal, professor na Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP), Bandeirantes, PR – Brasil, e-mail: thalesrigo@gmail.com

^[d] Médico veterinário, doutor em Reprodução Animal, professor adjunto na Universidade Estadual de Londrina (UEL), Laboratório de Reprodução Animal (DCV/CCA), Londrina, PR – Brasil, e-mail: mseneda@uel.br

* Autora para correspondência

Resumo

Está comprovada, na espécie bovina, o acréscimo de recuperação de embriões ao redor de 30,0 % quando as doadoras são submetidas a um certo período de caminhada com útero repleto de líquido após a última lavagem uterina. Relatos da literatura preconizam similar estratégia para éguas doadoras de embriões. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de submeter éguas à caminhada com útero repleto de Ringer Lactato na recuperação de embriões. Os procedimentos transcervicais (n=115) de recuperação embrionária foram efetuados em éguas Quarto de Milha (n=34) e, em 87 casos (grupo caminhada), realizou-se caminhada de 15 a 20 minutos com o útero repleto de Ringer na etapa da terceira lavagem. Os resultados foram comparados com 28 procedimentos obtidos através do procedimento convencional (lavagem sem caminhada - grupo controle). No grupo controle obteve-se uma eficiência de recuperação embrionária de 67 % (19/28), enquanto no grupo caminhada a taxa foi de 54 % (47/87). A taxa de recuperação de embriões entre os lavados não demonstrou uma diferença significativa. Conclui-se que a estratégia da caminhada com útero repleto em éguas doadoras de embriões no dia da coleta não traz vantagens.

Palavras-chave: Taxa de recuperação embrionária. Transferência de embriões. Equinos.

Abstract

In cattle, there is approximately a 30.0 % increase in number of embryos when the donor performs a period of walking while the uterus is filled with liquid during the last uterine flushing. Some reports have advocated a similar strategy for collecting donor mare embryos. This study evaluated the effect of walking the mares while the uterus was filled with Ringer's lactate solution for the recovery of embryos. Transcervical procedures (n = 115) for embryo recovery were performed in Quarter Horse mares (n = 34), and 87 procedures (Walking group) were performed following a 15-20 minute walk while the uterus was filled with Ringer's lactate solution during the third wash step. The results were compared with those obtained from 28 mares that underwent the conventional procedure (washing without walking - control group). In the control group it was obtained an embryo recovery efficiency of 67 % (19/28), while in the walking group the rate was 54 % (47/87). The embryo recovery rate was not significantly different between the groups (P < 0.05). In conclusion, the strategy of walking a donor mare with a filled uterus on the day of embryo collection is not advantageous.

Keywords: Recovery rate embryo. Embryo transfer. Equine.

Introdução

A técnica de transferência de embriões (TE) é uma biotécnica de grande importância na espécie equina, e vem apresentando um crescimento promissor nos últimos anos (FERREIRA; MEIRA, 2011). O Brasil tem grande expressão neste segmento, com 15.200 procedimentos de colheita de embriões em 2010, os quais resultaram em 12.422 embriões transferidos (STROUD; CALLESEN, 2012).

Apesar do expressivo crescimento da técnica, poucos avanços têm sido relatados nas últimas décadas quanto à obtenção de embriões. Entre os aspectos mais críticos estão a eficiência na lavagem uterina e as taxas de recuperação embrionária (FLEURY et al., 2001). Na espécie bovina, o principal incremento foi obtido por Castro Neto et al. (2005) ao proporem uma segunda drenagem do conteúdo uterino realizada após um período de espera, mantendo o útero repleto com o meio de lavagem. Após este procedimento, obteve-se incremento de aproximadamente 30% de embriões em comparação à coleta convencional.

Na espécie equina, as alternativas para aumentar a taxa de recuperação embrionária consistiram em massagem transretal do útero após as lavagens (VANDERWALL, 2000) ou a submissão da égua a uma caminhada curta, promovendo movimentação uterina (ALVARENGA; CARMO; LANDIM-ALVARENGA, 2008).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficiência da recuperação de embriões em éguas submetidas ou não à caminhada com útero repleto após a segunda lavagem, drenando o conteúdo na terceira.

Material e métodos

Animais e grupos experimentais

Foram utilizadas éguas (n = 34) da raça Quarto de Milha, mantidas em pasto com água e sal mineral *ad libitum* acrescidas de concentrado (1% do peso vivo ao dia). As doadoras de embriões foram divididas em dois grupos. No grupo controle, 9 éguas foram submetidas a 28 procedimentos de colheita de embriões, com média de 3,1 procedimentos de colheita por doadora, sendo que cada procedimento foi composto por três lavados uterinos sem caminhada (protocolo padrão). No grupo caminhada, 25 éguas foram submetidas a 87 procedimentos de colheita de embriões (média 3,48 procedimentos de colheita por doadora). Cada procedimento de colheita de embriões também foi composto por três lavados uterinos, sendo que após a 3ª repleção uterina com Ringer Lactato as doadoras foram submetidas a caminhadas de 15 a 20 minutos com o útero repleto. Em seguida, procedeu-se a drenagem do conteúdo uterino. As caminhadas foram realizadas com o animal guiado pelo cabresto e a sonda coletora foi mantida na cérvice.

Controle folicular e inseminação artificial

As doadoras foram submetidas a exames ultrassonográficos a cada dois dias (Ultrassom portátil Mindray®, transdutor linear - frequência de 5 MHz - modelo DP2200 VET), visando a detecção de um ou mais folículos ≥ 35 mm e presença de edema uterino grau 3 (escala 0 a 5) (SAMPER, 1997). Diante desses achados, foi realizada a indução da ovulação com hormônio Gonadotrofina coriônica humana (hCG; 1667 UI, IV ou IM; Vetecor®, Hertape Calier Saúde Animal S/A, Juatuba/MG, Brasil) associado à deslorelina (1 mg/IM, Sincrorrelin, Ourofino®, Cravinhos/SP, Brasil). No dia subsequente, foi realizada a inseminação artificial com sêmen fresco ou refrigerado, oriundos de três garanhões de fertilidade comprovada submetidos ao exame andrológico a cada colheita de sêmen. A ovulação foi detectada, em média, 36 horas após a indução, considerada como D0.

Colheita de embriões

As colheitas dos embriões (lavagem uterina) foram realizadas 7 e 8 dias após a ovulação (d7 e d8), por meio de sistema fechado de uma via (procedimento não cirúrgico, transcervical), consistindo em três lavagens uterinas com 1,5 a 2,0 litros de Ringer Lactato por lavado.

Antes de cada procedimento de colheita de embriões, já no tronco de contenção, as doadoras foram submetidas à retirada das fezes da ampolã retal, enfaixamento da cauda, higienização do períneo e vulva com água e sabão neutro e secagem com papel toalha. Em seguida, uma sonda estéril (Bivona®) preenchida com Ringer Lactato foi introduzida através da vagina com luva lubrificada e estéril (Propilenoglicol, Polietilenoglicol, Hidroxipropilcelulose e Ácido Láctico, KY-gel®; Jonhson & Jonhson, Brasil). A sonda foi posicionada na cérvix no início do corpo uterino e inflado o balonete com 30 a 45 ml de ar dependendo da dilatação da cérvix. Em seguida, a sonda era tracionada cuidadosamente para que permanecesse em uma posição capaz de vedar o orifício interno da cérvix, visando evitar o refluxo do líquido a ser infundido no útero.

Cada lavado uterino consistiu na repleção uterina com 1,5 a 2,0 litros de Ringer com Lactato à temperatura ambiente compatível com o tamanho do

útero da doadora. Uma vez preenchido, o útero era massageado via transretal e, em seguida, realizada a recuperação do fluido em filtros coletores de embriões de 75 μ m. Para a recuperação completa do fluido infundido, foi realizada a massagem uterina. O fluxo de drenagem foi controlado através de presilhas acopladas à sonda. O conteúdo de cada uma das lavagens foi recuperado em um filtro coletor diferente previamente identificado, com a permanência de no mínimo 20 ml de fluido no filtro após cada lavado para evitar a desidratação do embrião.

Localização e avaliação embrionária

O conteúdo de cada lavagem foi depositado em placas de petri (100 x 20 mm), as quais foram separadas e identificadas individualmente. Cada placa foi submetida a lavados com delicados jatos de Ringer com Lactato mediante seringa de 20 ml acoplada à agulha 40 x 12 mm, para posterior varredura de estruturas em lupa estereoscópica (Modelo HLX Electra). Os embriões encontrados foram classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento (mórula, blastocisto inicial, blastocisto ou blastocisto expandido) e com o grau de qualidade (escala de 1 a 5, sendo 1 excelente e 5 morto ou degenerado) (SQUIRES, 1993). Além disso, foram realizadas anotações a respeito do lavado que pôde ser recuperado.

Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância não paramétrica (Kruskal-Wallis), sendo significativo quando $p < 0,05$.

Resultados

Foram realizados 115 procedimentos de colheita de embriões em todo o experimento. No grupo controle, foram realizados 28 procedimentos de colheita de embriões em nove doadoras, as quais foram submetidas a três lavados uterinos, sem caminhada no 3º lavado por procedimento de colheita. No grupo caminhada, foram realizados 87 procedimentos de colheitas de embriões em 25 éguas, seguida de caminhada antes da drenagem no filtro coletor do 3º lavado de cada procedimento de colheita. Os resultados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Número de embriões e taxa de recuperação nas três lavagens uterinas realizadas em éguas submetidas ou não à caminhada por 15 a 20 minutos com útero repleto de Ringer Lactato.

Grupo	Éguas n	Procedimentos n	Taxa de Recuperação (%)	Embriões n	1º Lavagem % (n)	2º Lavagem % (n)	3º Lavagem % (n)
Controle	09	28	67,8% (19/28)	19	52,6 (10/19) ^{ba}	36,8 (7/19) ^{ab}	10,5 (2/19) ^{bc}
Caminhada	25	87	54,0% (47/87)	47	44,6 (21/47) ^{ba}	34,0 (16/47) ^{ab}	21,2 (10/47) ^{bc}

Nota: $p < 0,05$.

Legenda: Letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença entre os lavados no mesmo grupo;

Letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença entre os lavados dos diferentes grupos.

Fonte: Dados da pesquisa.

Discussão

Os trabalhos com a metodologia de repleção uterina e caminhada haviam sido realizados somente na espécie bovina (CASTRO NETO et al., 2005; CRUZ et al., 2008). Este é o primeiro estudo em que se propõe a caminhada com o útero repleto na espécie equina, visando liberar possíveis estruturas embrionárias “presas” entre as pregas endometriais e oviduto.

As taxas de recuperação embrionária no presente experimento (54% a 67,8%) estão próximas dos resultados de Vazquez et al. (2010), os quais reportam taxas de recuperação embrionária variando de 61 a 76% em programa de transferência de embriões na espécie equina, levando-se em consideração diferentes variáveis como temperatura do ambiente, tipo de sêmen, exercício e ovulação. Independentemente do método de colheita empregado, diversos estudos demonstram que a taxa de recuperação embrionária na espécie equina varia entre 40 a 80% (HINRICHS, 1990; RIERA; McDONOUGH, 1993; SQUIRES, 1993; TISCHNER; TISCHNER, 1996; FLEURY, 1998; FLEURY et al., 2001; SQUIRES et al., 2003; CAMARGO et al., 2013b).

O presente trabalho empregou a utilização de sêmen fresco ou refrigerado de três garanhões de fertilidade comprovada. Conforme Camargo et al. (2013a), sêmen fresco ou refrigerado apresentam resultados semelhantes na inseminação artificial para programas de transferência de embriões.

A manutenção do útero distendido com fluido durante a caminhada poderá promover a movimentação do órgão, contribuindo em desfazer as pregas endometriais e/ou favorecer a liberação de embriões eventualmente aderidos no limite entre o útero e a tuba (CASTRO NETO et al., 2005; CRUZ et al.,

2008). Castro Neto et al. (2005) obtiveram, em bovinos, 30% de melhora na taxa de recuperação embrionária com o preenchimento do útero por fluido seguido de caminhada. Contrariamente, no presente estudo, não houve benefícios em submeter as doadoras a uma caminhada com útero repleto no terceiro lavado, pois a eficiência de recuperação embrionária não diferiu do grupo controle. Uma possível razão para isto deve-se ao fato de que a maioria dos embriões na espécie equina são recuperados no primeiro lavado (IMEL et al., 1981; MEIRA; HENRY, 1991; FLEURY et al., 2001). Imel et al. (1981), Meira & Henry (1991) e Fleury et al. (2001), corroboram nossos resultados ao relatarem que a maioria dos embriões na espécie equina é recuperada no 1º e 2º lavados, sendo esta a provável explicação para a não obtenção de resultados pós-caminhada no 3º lavado. No presente estudo obteve-se diferença numérica na porcentagem de embriões recuperados no 3º lavado. No grupo caminhada, a taxa foi de 21,2%, enquanto que no controle foi de 10,5%, não diferindo estatisticamente.

Hinrichs (1990) propôs como forma de aumentar as taxas de recuperação embrionária a retenção de fluido, por 3 minutos, dentro do útero distendido antes da drenagem de cada uma das três lavagens. Foram utilizadas 14 éguas e realizados 20 procedimentos de colheita de embriões, sendo recuperados 21 embriões (105% de taxa de recuperação embrionária) devido à presença de duplas ovulações em alguns ciclos reprodutivos. Estes resultados não corroboram os dados do presente experimento em que, mesmo com a caminhada, obteve-se 54% de taxa de recuperação. Uma plausível explicação poderia se embasar em função da metodologia proposta (somente após o 3º lavado), visando otimizar o tempo gasto executando-se a técnica nos três lavados assim

como feito por Hinrichs (1990). Entretanto, como a maioria dos embriões é recuperada nos 1º e 2º lavados, não se obteve resultados satisfatórios como do referido autor. Por isso propõe-se a metodologia empregada no presente trabalho apenas no primeiro lavado. Dessa forma, pôde-se ter um acréscimo nas taxas de recuperação embrionária no primeiro lavado, diminuindo os gastos com o meio e o tempo.

Conclusão

Conclui-se que a caminhada com o útero repleto de fluido após o 3º lavado não incrementou a taxa de recuperação embrionária na espécie equina. Maiores estudos com o mesmo delineamento poderiam ser realizados durante o primeiro lavado, adicionando-se ocitocina para efeitos comparativos.

Referências

- ALVARENGA, M. A.; CARMO, M. T.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. Superovulation in mares: limitations and perspectives. *Pferdeheilkunde*, v. 24, n. 1, p. 88-91, 2008.
- CAMARGO, C. E. et al. Aspectos relacionados com a recuperação embrionária em éguas da raça Brasileiro de Hipismo, utilizadas em programa comercial de transferência de embrião. *Veterinária e Zootecnia*, v. 20, n. 4, p. 74-83, 2013a.
- CAMARGO, C. E. et al. Some factors affecting the rate of pregnancy after embryo transfer derived from the Brazilian Jumper horse breed. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 33, n. 11, p. 924-929, 2013b. doi:10.1016/j.jevs.2013.01.008.
- CASTRO NETO, A. S. et al. Improvement in embryo recovery using double uterine flushing. *Theriogenology*, v. 63, n. 5, p. 1249-1255, 2005. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.03.022
- CRUZ, F. B. et al. Recoleta uterina como estratégia para aumentar a taxa de embriões em fêmeas bovinas de corte e leite. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 36, n. 3, p. 249-254, 2008.
- FERREIRA, J. C.; MEIRA, C. Aplicação da ultrassonografia colorida Doppler em programas de transferência de embriões equinos. *Ciência Rural*, v. 41, n. 6, p. 1063-1069, 2011. doi:10.1590/S0103-84782011000600023.
- FLEURY, J. J. O dia da colheita na taxa de recuperação de embriões em equinos em uma central de transferência de embriões comercial. *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS*, v. 26, supl. 1, p. 268, 1998.
- FLEURY, J. J. et al. Fatores que afetam a recuperação embrionária e os índices de prenhez após transferência transcervical em equinos da raça Mangalarga. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 38, n. 1, p. 29-33, 2001. doi:10.1590/S1413-95962001000100005.
- HINRICH, K. Work in progress: a simple technique that may improve the rate of embryo recovery on uterine flushing in mares. *Theriogenology*, v. 33, n. 5, p. 937-942, 1990. PMID:16726790.
- IMEL, K. J. **Recovery, culture and transfer of equine embryos**. MS Thesis, Colorado State University, Fort Collins, CO, USA. 1981.
- MEIRA, C.; HENRY, M. Evaluation of two non-surgical equine embryo transfer methods. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 44, p. 712-713, 1991.
- RIERA, F. L.; McDONOUGH, J. Commercial embryo transfer in polo ponies in Argentina. *Equine Veterinary Journal*, v. 25, n. S15, p. 116-118, 1993. doi:10.1111/j.2042-3306.1993.tb04843.x.
- SAMPER, J. C. Ultrasonographic appearance and the use of uterine edema to time ovulation in mares. In: ANNUAL CONVENTION OF AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 43., 1997, Phoenix. *Proceedings...* Phoenix, AZ: AAEP, 1997. p. 41-43.
- SQUIRES, E. L. Embryo transfer. In: McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 357-367.
- SQUIRES, E. L. et al. Embryo technologies in the horse. *Theriogenology*, v. 59, n. 1, p. 151-70, 2003. doi:10.1016/S0093-691X(02)01268-2.
- STROUD, B.; CALLESEN, H. IETS statement on worldwide ET statistics for 2010. *Animal Reproduction*, v. 9, n. 3, p. 210-216, 2012.

TISCHNER, M., TISCHNER, M. Recovery, splitting and transfer of equine embryos. **Animal Breeding Abstract**, v. 65, p. 321, 1996.

VANDERWALL, D. K. Current equine embryo transfer techniques. In: BALL, B. A. (Ed.) **Recent advances in equine theriogenology**. Ithaca, NY: International Veterinary Information Service (IVIS), 2000. p. 1-8.

VAZQUEZ, J. J. et al. Influence of environmental temperature, exercise, semen type and ovulation characteristics on reproductive performance in a commercial embryo transfer program. **Animal Reproduction Science**, v. 121, n. 1-2, p. 301-302, 2010. doi:10.1016/j.anireprosci.2010.04.097.

Recebido: 18/10/2013

Received: 10/18/2013

Aprovado: 18/09/2014

Approved: 09/18/2014