

Transferência de embriões em equinos: avaliação do embrião¹

Introdução

Os profissionais que trabalham com transferência de embriões em equinos devem ser capazes de identificar e avaliar adequadamente os embriões. A avaliação do estágio de desenvolvimento, da qualidade e do tamanho dos embriões é fundamental e a capacidade de diferenciar embriões de ovócitos não fertilizados (UFOs) e estruturas não embriônicas que possam vir a ser coletadas durante o procedimento de lavagem também é importante.

O objetivo deste artigo é revisar os estágios de desenvolvimento do embrião equino e a sua classificação quanto ao escore de qualidade ou grau.

Materiais e métodos

A detecção de um embrião na placa deve ser seguida de um procedimento sistemático de avaliação. Esse procedimento costuma ser rápido, mas há ocasiões em que a diferenciação entre um embrião, um ovócito não fertilizado e uma estrutura não embriônica pode levar vários minutos. A avaliação deve englobar o estágio de desenvolvimento, o escore de qualidade (grau) e o tamanho.

Um microscópio de boa qualidade, munido de um micrômetro para mensuração do diâmetro

do embrião, é fundamental para uma avaliação adequada. Antes da avaliação, os embriões são lavados em 3 ou mais gotas de meio de lavagem ou meio de manutenção. O fluido inicial de lavagem contido na placa pode ter uma quantidade significativa de debris celulares e o objetivo é transferir o embrião deste meio inicial, removendo sequencialmente a maior quantidade possível de debris durante o procedimento de lavagem. Uma vez concluído o procedimento de lavagem, o embrião é mantido no meio de manutenção e avaliado antes da sua transferência, transporte para outro local para transferência futura ou criopreservação.

Foi realizada uma análise retrospectiva do escore de qualidade ou grau de 623 embriões coletados no Laboratório de Reprodução Equina da Universidade do Colorado.

Resultados

Os estágios de Desenvolvimento do embrião equino estão dispostos na **Tabela 1**.

Ovócitos não fertilizados se caracterizam por apresentarem diâmetro entre 125 e 150 µm e zona pelúcida espessa, podendo ter formato arredondado ou oval, embora sejam planos e não rolem quando manipulados (diferente do embrião). O citoplasma dessa estrutura unicelular pode se apresentar degenerado ou fragmentado, parecendo-se vagamente com os blastômeros de uma mórula. O ovócito não fertilizado geralmente fica retido no oviduto, próximo

¹ Palestra apresentada na XII Conferência Anual da Associação Brasileira de Médicos Veterinários de Equídeos (Abraveq), realizada em 11 e 12 de junho de 2011 no Royal Palm Plaza Resort, em Campinas (SP).

à junção ampulo-ístmica (BETTERIDGE, 1989; Weber et al., 1991), e costuma ser encontrado durante o procedimento de lavagem somente quando transportado através da junção útero-tubárica junto com um embrião viável (STEFFENHAGEN et al., 1972).

Estruturas não embriônicas como debris celulares, cristais de urina, matéria orgânica e outros debris podem eventualmente ser recuperadas durante as tentativas de coletas de embriões. A diferenciação entre tais estruturas

e um embrião se baseia na presença ou ausência da zona pelúcida, em seu tamanho e em seu formato.

Atualmente, empregamos um sistema de graduação modificado baseado em 4 pontos para a avaliação de embriões equinos na Universidade do Colorado (MCKINNON et al., 1988; VANDERWALL, 1996). As características empregadas na determinação do escore de qualidade ou grau são: 1) formato do embrião (esférico, oval, colapsado etc.); 2) espessura da zona pelúcida;

ESTÁGIO	TAMANHO (μM)	DESCRIÇÃO
Mórula	150 a 200 μm	Massa sólida de blastômeros; zona pelúcida espessa; blastômeros inicialmente grandes e passíveis de identificação individual, depois agregados compactos de blastômeros menores; borda externa dos blastômeros de aparência "serrilhada"; possibilidade de identificação do espaço perivitelinico entre os blastômeros e a zona pelúcida; rolamento à manipulação (Figura 1).
Blastocisto inicial	150 a 250 μm	Zona pelúcida espessa; início da formação da blastocele entre os blastômeros; mínimo espaço perivitelinico, tamanho semelhante ao da mórula (Figura 2).
Blastocisto	150 a 300 μm	Blastocele circundada por uma camada de células trofoblásticas; massa celular interna distinta; cápsula evidente entre a camada de trofoblastos e a zona pelúcida; zona pelúcida fina (Figura 3).
Blastocisto Expandido	300 to > 1,000 μm	Blastocele grande circundada por uma camada fina de células trofoblásticas; células trofoblásticas pequenas e de aparência uniforme; massa celular interna distinta insinuada no interior da blastocele; zona pelúcida ainda presente ou já desaparecida; cápsula aderida ao embrião ou levemente destacada; diâmetro do embrião variável de acordo com a idade (Figura 4).
Ovócito não fertilizado (UFO)	125 a 150 μm	Zona pelúcida espessa; formato oval; plano, não rola à manipulação; membrana celular e citoplasma podem se apresentar degenerados ou fragmentados (Figura 5).

TABELA 1 – Estágios de Desenvolvimento do Embrião Equino



Figura 1 – Embrião equino (Grau 1) no estágio de mórula.

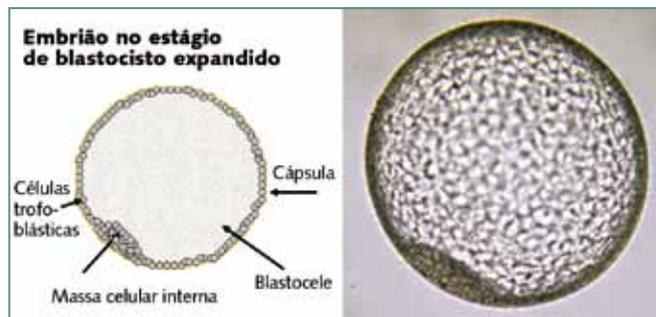


Figura 4 – Embrião equino (Grau 1) no estágio de blastocisto expandido.

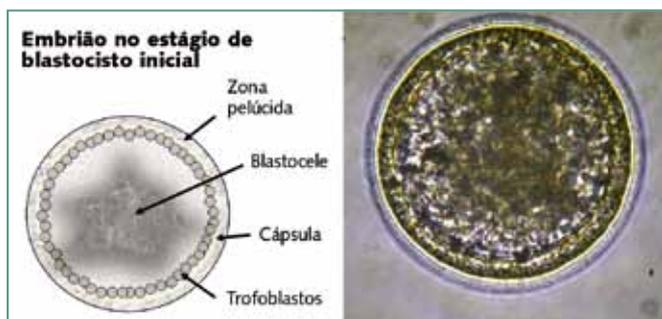


Figura 2 – Embrião equino (Grau 1) no estágio de blastocisto inicial.

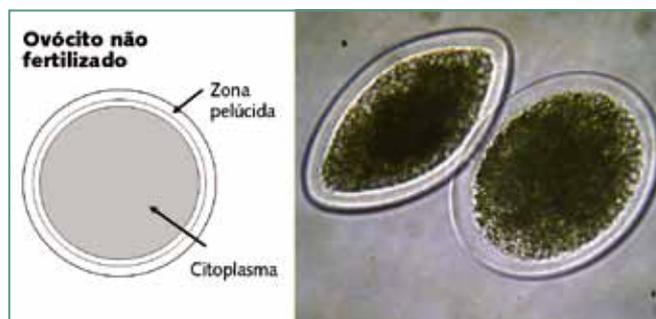


Figura 5 – Par de ovócitos não fertilizados.

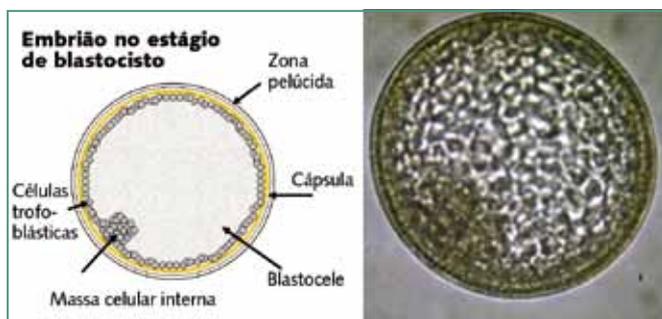


Figura 3 – Embrião equino (Grau 1) no estágio de blastocisto, com massa celular interna visível.

3) uniformidade dos blastômeros (tamanho, cor, estrutura); 4) presença/ausência de blastômeros extrusados ou degenerados; 5) compactação dos blastômeros; 6) grau de granulação ou fragmentação citoplasmática; 7) presença/ausência e tamanho do espaço perivitelínico; 8) sinais de desidratação ou enrugamento do embrião; 9) presença/ausência de anomalias da blastocele; 10) presença/ausência de lesão da zona pelúcida ou cápsula (Tabela 2).

GRAU	COMENTÁRIO	DESCRIÇÃO
1	Excelente	Sem anomalias visíveis; formato esférico; células de tamanho, cor e textura uniformes; tamanho e estágio de desenvolvimento adequados para a idade pós-ovulação (Figuras 1 a 4).
2	Bom	Imperfeições mínimas, como alguns blastômeros extrusados; pequenas irregularidades de formato, tamanho, cor ou textura; pouca separação entre a camada trofoblástica e a zona pelúcida ou cápsula (Figuras 6 e 7).
3	Ruim	Nível moderado de imperfeições, como grande percentual de blastômeros extrusados ou degenerados; colapso parcial da blastocele ou afastamento moderado do trofoblasto da zona pelúcida ou cápsula (Figura 8).
4	Degenerado ou Morto	Problemas graves de fácil identificação, como alto percentual de blastômeros extrusados, colapso total da blastocele, ruptura da zona pelúcida ou degeneração completa e morte do embrião.
UFO	UFO	Ovócito não fertilizado

TABELA 2 – Graduação do embrião de acordo com um sistema de 4 pontos

A aderência de vários agregados celulares ou outro material à zona pelúcida pode indicar endometrite da égua doadora ou contaminação do procedimento de lavagem. A presença de debris aderidos ao exterior do embrião nem sempre influencia a graduação, embora a sua presença seja muito importante do ponto de vista clínico e deva ser registrada.

A grande maioria (95,5%) dos 623 embriões coletados em nossa clínica durante um período de 4 anos era de qualidade boa ou excelente (Tabela 3).

Discussão

A grande maioria dos embriões equinos coletados é de qualidade boa ou excelente, provavelmente devido ao transporte seletivo de embriões viáveis através do oviduto (Weber et al., 1991). Embriões de má qualidade, embriões mortos e ovócitos não fertilizados costumam ficar retidos no oviduto.

A recuperação de embriões menores e/ou em um estágio de desenvolvimento mais precoce do que o esperado é comum em éguas mais velhas ou em éguas inseminadas com sêmen congelado e pode refletir atraso no desenvolvimento embrionário, inadequação do ambiente ovidutal ou uterino, ou outros fatores. A identificação do atraso do desenvolvimento embrionário é importante, uma vez que as taxas de prenhez podem ser otimizadas quando o embrião é transferido para uma égua sincronizada de acordo com desenvolvimento embrionário e não com a data da ovulação da égua doadora.

O encontro de um ovócito não fertilizado junto com um embrião viável em um lavado uterino é comum e mais frequente do que na ausência de embriões. Nessas circunstâncias, devemos considerar a probabilidade da presença de um embrião viável no útero ou no oviduto da égua, cuja recuperação pode ser obtida pela repetição da lavagem.

Conclusão

A capacidade de avaliar corretamente o estágio de desenvolvimento embrionário, a qualidade e o tamanho do embrião é fundamental para o sucesso do programa de transferência de embriões em equinos e recomenda-se o emprego de um método sistemático de avaliação, além do registro de todos os embriões, se possível com imagens fotográficas, e do sucesso das transferências. A seleção da égua receptora adequada, a estimativa da possibilidade de sucesso da transferência e a capacidade de determinar se o embrião se presta à criopreservação dependem da sua correta avaliação.

GRADUAÇÃO DO EMBRIÃO	EMBRIÕES	
	NÚMERO	%
1,0 a 1,5	470	(75,4 %)
2,0 a 2,5	125	(20,1 %)
3,0 a 3,5	26	(4,2 %)
4,0	2	(0,3 %)
Total	623	(100 %)

TABELA 3 – Embriões de equinos segundo a graduação da qualidade

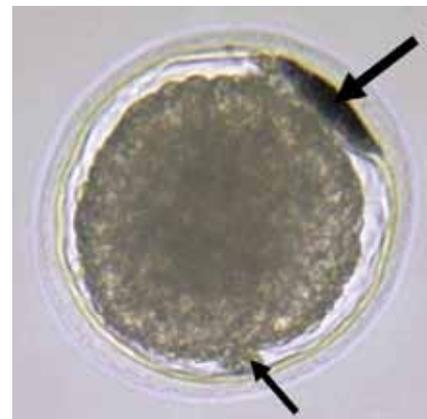


Figura 6 – Embrião de grau 2 no estágio de blastocisto inicial; presença de blastômeros extrusados (setas).



Figura 7 – Embrião de grau 3 no estágio de mórula, com grande percentual de blastômeros extrusados (setas).

Referências

1. Betteridge, K. J. The structure and function of the equine capsule in relation to embryo manipulation and transfer. In: *Equine Vet J*, 1989. Suppl 8. p. 92-100.
2. Weber, J. A.; Freeman, D. A.; Vanderwall, D. K. et al. Prostaglandin E2 secretion by oviductal transport-stage equine embryos. In: *Biol Reprod*, 1991. 45. p. 540-543.
3. Steffenhagen, W. P.; Pineda, M. H.; Ginther, O. J. Retention of unfertilized ova in uterine tubes of mares. In: *Am J Vet Res*, 1972. 33. p. 2391-2398.
4. McKinnon, A. O.; Squires, E. L. Morphologic assessment of the equine embryo. *J Am Vet Med Assoc*, 1988. 192. p. 401-406.
5. Vanderwall, D. K. Early embryonic development and evaluation of equine embryo viability. In: *Vet Clin North Am Equine Pract*, 1996. 12. p. 61-83.