

# Transferência de embriões em equinos: recuperação do embrião<sup>1</sup>

## Introdução

A transferência de embriões é uma técnica reprodutiva comum na medicina veterinária e tem a vantagem de permitir que éguas de alto valor produzam mais de um potro por ano, que éguas mais velhas doem embriões a receptoras mais novas, que éguas subférteis doem embriões a éguas em melhor condição reprodutiva e que éguas em atleta s doem embriões sem interromper o treinamento. O primeiro potro obtido por transferência de embriões nasceu em 1974. Durante os 36 anos subsequentes, vimos o desenvolvimento de equipamentos e técnicas voltados para o maior sucesso da coleta de embriões. O objetivo deste artigo é revisar as técnicas de recuperação embrionária e fornecer dados sobre o seu sucesso em programas de transferência de embriões.

## Materiais e métodos

A recuperação do embrião costuma ser tentada 7 ou 8 dias após a ovulação (MCCUE et al., 2001; SQUIRES et al., 2003). A coleta de embriões menores (< 300 µm, por exemplo) para criopreservação requer lavagem no dia 6,5 ou no início do dia

7 após a ovulação. Emprega-se um cateter de silicone de 8,0 mm de diâmetro com balonete inflável para facilitar a lavagem transcervical e um filtro coletor para embriões de 75 µm acoplado ao equipo de saída, podendo-se também regular manualmente o equipo na altura do filtro. Um conjunto estéril de equipo em Y, com sistema de regulação do fluxo de entrada e saída, é empregado para conectar o cateter ao frasco de fluido e ao filtro coletor.

A coleta do embrião pode ser feita usando-se um meio de lavagem comercial “completo” contendo um agente de tamponamento, antibiótico e surfactante, ou empregando-se simplesmente solução de Ringer com lactato acrescida ou não de soro de bezerro ou albumina sérica bovina purificada (BSA) como agente surfactante, para prevenir a aderência do embrião ao equipo, ao filtro ou à placa.

O útero da égua doadora é lavado de três a quatro vezes consecutivas com 1 litro de fluido preaquecido (30-35 °C) ou à temperatura ambiente por vez. A quantidade de fluido empregada em cada lavagem depende do tamanho do útero e/ou da paridade da égua e o objetivo é provocar expansão suficiente do lúmen uterino para que o fluido chegue a todas as suas partes, incluindo a área entre ou sob as pregas endometriais. O meio de lavagem reflui através do cateter por gravidade, passando pelo filtro coletor, podendo-se massagear o útero por via

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

retal durante o procedimento de infusão e recuperação do meio. A recuperação do fluido de lavagem pode ser monitorada empregando-se um frasco graduado para mensuração do efluente e/ou o exame ultrassonográfico do útero ao final do procedimento.

A busca do embrião pode ser iniciada após cada lavagem sucessiva ou após a recuperação do volume final de meio, despejando-se o conteúdo do filtro em uma placa e procedendo-se com o seu exame. Na ausência de embriões, pode-se realizar nova infusão de meio no útero e medicar a égua com 20 unidades de ocitocina, pela via intravenosa, a fim de estimular as contrações uterinas. O meio é mantido no útero da égua por aproximadamente 3 minutos antes de permitir seu refluxo por gravidade, estimulado pela massagem retal (HINRICHS et al., 1990; MCCUE et al., 2003). No final do procedimento de lavagem do embrião, a égua doadora recebe prostaglandinas para desencadear a luteólise.

A taxa de recuperação de embriões é influenciada por muitos fatores, como a idade e a fertilidade da égua doadora, a qualidade do sêmen do garanhão, o dia da recuperação, o número de ovulações e a experiência do clínico (MCCUE et al., 2001; SQUIRES et al., 2003), e se correlaciona com a idade e a condição reprodutiva da égua doadora. Observa-se um percentual maior de recuperação de embriões em éguas com menos de 10 anos de idade do que em éguas com mais de 15 anos de idade. A taxa de recuperação de embriões é aproximadamente 5 a 10% inferior à taxa esperada de prenhez por ciclo.

Foi realizada uma análise retrospectiva do sucesso da recuperação de embriões no programa da Universidade do Colorado. Os embriões foram avaliados quanto à qualidade, tamanho e estágio de desenvolvimento, conforme descrito anteriormente. As comparações das taxas de recuperação e do tamanho dos embriões entre os grupos foi feita através do programa SAS. Todos os valores foram apresentados como média  $\pm$  e.p.m.

## Resultados

Um total de 492 procedimentos de recuperação realizados em éguas de clientes na Universidade do Colorado entre 2004 e 2008 foi revisado, incluindo-se apenas os dados dos casos em que o manejo da égua doadora foi realizado no local. Um total de 257 embriões foi coletado e, em um pequeno número de casos, não havia registro do escore de qualidade do embrião ou do seu estágio de desenvolvimento. A idade exata do embrião em relação ao dia da coleta não era conhecida nos casos de ovulações duplas assíncronas com coleta de único embrião.

De uma forma geral, o número médio de ovulações por ciclo e o número de embriões recuperados por lavagem foi de  $1,18 \pm 0,02$  e  $0,52 \pm 0,03$ , respectivamente. As taxas de recuperação por lavagem e por ovulação ficaram em 48,1% e 45,2%, respectivamente. A maioria dos embriões (97,6%) recuperados apresentou qualidade excelente (Grau 1) ou boa (Grau 2) (**Tabela 1**). O tamanho médio (diâmetro externo) do embrião praticamente dobrou em cada dia consecutivo de coleta (**Tabela 2**). Os percentuais

GRAU	COMENTÁRIO	Nº DE EMBRIÕES	PERCENTUAL (%)
1	Excelente	198	78,9 %
2	Bom	47	18,7 %
3	Ruim	6	2,4 %
4	Degenerado ou Morto	0	0 %

**TABELA 1** – Qualidade (grau) de 251 embriões coletados de éguas doadoras

DIA DA COLETA	Nº DE EMBRIÕES	MÉDIA ± D.P. (µM)	FAIXA (µM)
6	20	191,8 ± 13,2	150-325
7	183	354,0 ± 13,9	150-900
8	35	623,9 ± 72,9	150-2500

**TABELA 2** – Diâmetro (µm) de 238 embriões em relação ao dia da coleta

ESTÁGIO	Nº DE EMBRIÕES	PERCENTUAL (%)	MÉDIA ± D.P. (µM)	FAIXA (µM)
Mórula	31	12,2	156,7 ± 3,0	125-200
Blastocisto inicial	66	25,9	188,5 ± 3,9	150-225
Blastocisto	44	17,3	295,9 ± 6,3	200-400
Blastocisto Expandido	115	45,1	598,0 ± 22,5	250-2500

**TABELA 3** – Estágio de Desenvolvimento embrionário de 256 embriões coletados de éguas doadoras

de embriões em vários estágios de desenvolvimento (mórula, blastocisto inicial, blastocisto e blastocisto expandido) estão dispostos na **Tabela 3**.

A idade da égua doadora influenciou a taxa de recuperação, obtendo-se a recuperação de um ou mais embriões em 144 de 252 lavagens (57,1%) realizadas em éguas com idade ≤ a 15 anos e em 93 de 236 lavagens (39,4%) realizadas em éguas com mais de 15 anos de idade. Os embriões recuperados de éguas de idade ≤ a 5 anos tenderam ( $p < 0,1$ ) a ser maiores em um determinado dia de coleta do que os embriões coletados de éguas de mais de 5 anos de idade. Não houve diferenças de tamanho entre os embriões coletados de éguas com idade ≤ a 15 anos e de éguas com mais de 15 anos de idade.

Éguas inseminadas com sêmen fresco ou refrigerado produziram um ou mais embriões em 51,9% (27/52) e 51,6% (182/353) dos ciclos, respectivamente. Em contrapartida, éguas inseminadas com sêmen congelado geraram um ou mais embriões em 33,3% (26/78) dos ciclos. O diâmetro dos embriões recuperados no dia 7 ( $n = 144$ ), de éguas inseminadas com sêmen refrigerado ( $401,9 \pm 19,6 \mu\text{m}$ ), foi maior ( $p < 0,05$ ) do que o dos embriões recuperados no mesmo dia, de éguas ( $n = 11$ ) inseminadas com sêmen congelado ( $258,2 \pm 33,3 \mu\text{m}$ ) (**Figura 1**). Os embriões ( $n = 24$ ) coletados no dia 8, de éguas inseminadas com sêmen refrigerado, tenderam

( $p = 0,053$ ) a ser maiores ( $716,9 \pm 104,9 \mu\text{m}$ ) do que os embriões ( $n = 10$ ) coletados no mesmo dia, de éguas inseminadas com sêmen congelado ( $383,5 \pm 54,9 \mu\text{m}$ ).

Um ou mais embriões foram recuperados em 43 de 72 ciclos (59,7%) com ovulações duplas espontâneas e em 190 de 406 ciclos (46,8%) com ovulações únicas ( $p < 0,05$ ). A taxa de recuperação de embriões por ovulação foi de 46,8% nos ciclos com ovulações únicas e de 41,1% nos ciclos com ovulações duplas. O número de embriões recuperados de 34 éguas com ovulações duplas unilaterais ( $0,9 \pm 0,8$  embriões por lavagem) não diferiu significativamente ( $p > 0,05$ ) do número de embriões recuperados de 34 éguas com ovulações duplas bilaterais ( $0,8 \pm 0,8$  embriões por lavagem).

Éguas que apresentaram quantidades mínimas ou ausência de fluido no útero após a cobertura produziram um embrião em 158 de 307 lavagens (51,5%), enquanto éguas que apresentaram acúmulo discreto a moderado de fluido após a cobertura geraram um embrião em 78 de 176 ciclos (44,3%) ( $p = 0,1016$ ). O tratamento das éguas nesta última categoria foi feito com uma combinação de lavagem uterina e agentes ecbólicos (ocitocina ou prostaglandinas).

A qualidade, ou as características, do meio recuperado mostrou relação com o sucesso da recuperação de embriões. Éguas com quantidades mínimas de debris no efluente uterino produziram um embrião em 235 de 462

lavagens (50,9%), contra apenas 2 embriões recuperados em 21 lavagens (9,5%) com saída de fluido turvo ou contendo quantidades anormais de debris ( $p < 0,001$ ).

Em 31 ocasiões, a égua doadora foi submetida à nova lavagem após a falha na recuperação do embrião, com resultados positivos em 3 destas 31 tentativas (9,7%). Na maioria das lavagens repetidas, notou-se um aumento da turbidez ou da quantidade de debris no meio recuperado.

Em geral, as éguas foram lavadas mais de uma vez por estação e o percentual de tentativas de recuperação com obtenção de um ou mais embriões tendeu ( $p = 0,1009$ ) a ser mais elevado nas éguas lavadas de 1 a 4 vezes por estação (217/439; 49,4 %) do que nas éguas lavadas 5 ou mais vezes (20/53; 37,7 %) (Tabela 4).

A presença de um ovócito não fertilizado (UFO) no meio recuperado foi registrada em 3 de 495 procedimentos de lavagem, com recuperação de um embrião junto com o UFO em 1 deles. É possível que, em alguns casos, a recuperação de um UFO não tenha sido registrada.

## Discussão

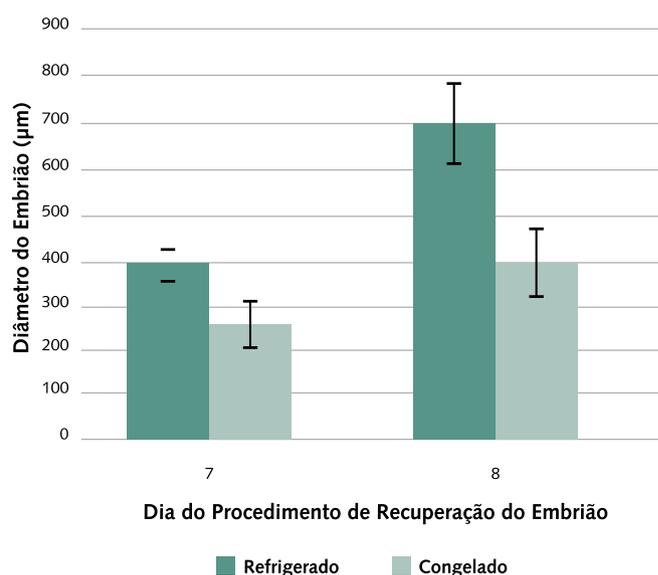
A maioria dos embriões equinos coletados apresenta qualidade boa a excelente devido ao transporte seletivo de embriões viáveis através do oviduto, que é facilitado pela secreção de prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ) pelo embrião (WEBER et al., 1991). Embriões de má qualidade, embriões mortos e ovócitos não fertilizados tendem a ficar retidos no oviduto.

A idade e a condição reprodutiva da égua doadora têm influência significativa sobre o sucesso da recuperação de embriões. As taxas de coleta de embriões foram mais altas em éguas de menos de 15 anos de idade, em éguas que não apresentaram acúmulo de fluido no útero após a inseminação e nos ciclos com pequena quantidade ou ausência de debris no lavado uterino. Esperávamos encontrar uma relação entre a idade da égua e o tamanho do embrião, com embriões menores nas éguas mais velhas, mas não houve diferenças significantes no diâmetro

dos embriões coletados no dia 7 ou 8, de éguas de idade superior ou inferior a 15 anos.

O tipo de sêmen utilizado influenciou a taxa de recuperação de embriões e o diâmetro médio dos embriões coletados em um determinado dia. Éguas inseminadas com sêmen congelado apresentaram taxas de recuperação mais baixas e geraram embriões menores em cada dia de coleta do que éguas inseminadas com sêmen fresco ou resfriado. Acredita-se que isso possa ser devido a um atraso na fertilização ou no desenvolvimento embrionário precoce associado ao uso do sêmen congelado.

Em geral, observa-se uma associação entre o aumento da taxa de ovulação e o aumento da taxa de recuperação de embriões (SQUIRES et al., 1987; LOSINNO et al., 2000), o que se comprovou em nossos resultados. Neste estudo, não houve diferenças nas taxas de recuperação de éguas com ovulações duplas unilaterais ou bilaterais,



**Figura 1** – Diâmetro médio dos embriões coletados no dia 7 ou 8 após a ovulação, de éguas inseminadas com sêmen refrigerado ou congelado.

Nº DE LAVAGENS POR ANO	Nº TOTAL DE LAVAGENS POSITIVAS	Nº TOTAL DE CICLOS	% DE LAVAGENS POSITIVAS
1	83	174	47,7
2	64	132	48,5
3	47	89	52,8
4	23	44	52,3
5	9	24	37,5
6	4	13	30,8
≥7	7	16	43,8

**TABELA 4** – Relação entre o número de tentativas de recuperação de embriões por ano e o percentual de lavagens com recuperação de um ou mais embriões

discordando de um estudo grande realizado na Argentina, em que as taxas de recuperação de embriões foram maiores nas éguas com ovulações duplas bilaterais do que nas com ovulações duplas unilaterais (RIERA, 2006).

A possibilidade de existência de um embrião no útero após uma tentativa negativa de lavagem deve ser considerada. Betteridge e colaboradores (BETTERIDGE et al., 1985) relataram a ocorrência de prenhez em 4 éguas das quais nenhum embrião havia sido recuperado em lavados uterinos realizados entre os dias 6,5 e 9,5 após a ovulação. McKinnon e colaboradores (MCKINNON et al., 1988) também diagnosticaram prenhez positiva em 9 de 27 éguas, após a falha na tentativa de recuperação de embriões 6,5 dias após a ovulação. Por este motivo, recomenda-se a administração de prostaglandinas após a conclusão do procedimento de recuperação do embrião, a fim de provocar a regressão do corpo lúteo, permitindo que a égua retorne ao cio e garantindo que ela não mantenha a prenhez caso o embrião não tenha sido recuperado.

Em nossa clínica, quando o embrião não é recuperado após uma série inicial de lavagens uterinas, uma lavagem adicional é imediatamente realizada, e a instituição dessa “lavagem extra” aumentou muito nossa taxa geral de recuperação de embriões (MCCUE et al., 2003). Não sabemos se a recuperação do embrião durante a “lavagem extra” se deve à ocitocina administrada, aos 3 minutos de dilatação uterina com meio de lavagem ou simplesmente à repetição da infusão e recuperação de fluido. Em nosso programa, não costumamos repetir a lavagem no dia seguinte a uma tentativa negativa de recuperação, embora tenhamos realizado tal procedimento inúmeras vezes ao longo dos anos, em um esforço final desesperado de recuperar o embrião. Curiosamente, obtivemos resultados positivos em 9,7% dessas tentativas e observamos que o meio recuperado costuma ser levemente turvo ou conter debris celulares.

O percentual de lavagens positivas foi maior durante as 4 primeiras lavagens da estação reprodutiva do que nas tentativas subsequentes, o que pode ser devido ao fato de algumas éguas no nosso programa serem consideradas subférteis, requerendo mais de um ciclo para que um embrião possa ser recuperado. Entretanto, isso também pode refletir alterações da condição do útero após múltiplos ciclos de inseminação e lavagem, conforme dados de um estudo prévio, em que éguas submetidas a ciclos repetidos de inseminação e coleta de embriões apresentam alterações inflamatórias uterinas crônicas (CARNEVALE et al., 2005).

Ovócitos não fertilizados (UFOs) costumam ficar retidos no oviduto, próximo à junção ampulo-ístmica (WEBER et al., 1991; BETTERIDGE, 1989; STEFFENHAGEN, 1972). Em geral, a recuperação de um UFO só ocorre quando esse é transportado através da junção

útero-tubárica junto com um embrião viável. Nos casos em que um UFO é recuperado isoladamente, recomenda-se a realização de uma lavagem adicional, na esperança de recuperar o embrião (MCCUE et al., 2009).

Em síntese, as taxas de coleta de embriões foram mais altas em éguas mais jovens e em éguas que não acumulam fluido no útero após a inseminação. O aumento da taxa de ovulação foi associado a um aumento da recuperação de embriões, sem influência do local de ocorrência das ovulações múltiplas (unilaterais ou bilaterais). Lavagens adicionais realizadas imediatamente após uma tentativa negativa de recuperação, ou no dia seguinte, levaram à recuperação de embriões.

## Referências

- McCue, P. M.; Squires, E. L.; Bruemmer, J. E. et al. Equine embryo transfer: techniques, trends and anecdotes. In: **Proceedings** Annual Conference of the Society for Theriogenology, 2001. p. 229-235.
- Squires, E. L.; Carnevale, E. M.; McCue, P. M. et al. Embryo technologies in the horse. In: **Theriogenology**, 2003. 59 . p. 151-170.
- Hinrichs, K. A simple technique that may improve the rate of embryo recovery on uterine flushing in mares. In: **Theriogenology**, 1990. 33 . p. 937-942.
- McCue, P. M.; Niswender, K. D.; Macon, K. A. Modification of the flush procedure to enhance embryo recovery. In: **J Equine Vet Sci**, 2003. 23 . p. 1-2.
- McCue, P. M.; DeLuca, C. A.; Ferris, R. A. et al. How to evaluate equine embryos. In: **Proceedings**, American Association of Equine Practitioners, 2009. 55 . p. 252-256.
- Weber, J. A.; Freeman, D. A.; Vanderwall, D. K. et al. Prostaglandin E<sub>2</sub> secretion by oviductal transport-stage equine embryos. In: **Biol Reprod**, 1991. 45 . p. 540-543.
- Squires, E. L.; McKinnon, A. O.; Carnevale, E. M. et al. Reproductive characteristics of spontaneous single and double ovulating mares and superovulated mares. **J Reprod Fertil**, 1987. Suppl 35 . p. 399-403.
- Losinno, L.; Aguilar, J. J.; Lisa, H. Impact of multiple ovulations in a commercial equine embryo transfer programme. In: **Proceedings** 5<sup>th</sup> International Symposium on Equine Embryo Transfer, 2000. p. 81-83.
- Riera, F. L.; Roldán, J. E.; Hinrichs, K. Patterns of embryo recovery in mares with unilateral and bilateral double ovulations. In: **Animal Reproduction Science**, 2006. 94 . p. 398-399.
- Betteridge, K. J.; Renard, A.; Goff, A. K. Uterine prostaglandin release relative to embryo collection, transfer procedures and maintenance of the corpus luteum. In: **Equine Vet J**, 1985. Suppl 3 . p. 25-33.
- McKinnon, A. O.; Squires, E. L.; Voss, J. L. et al. Equine embryo transfer. In: **Comp Contin Ed Pract Vet**, 1988. 10 . p. 343-355.
- McCue, P. M.; Niswender, K. D.; Macon, K. A. Modification of the flush procedure to enhance embryo recovery. In: **J Equine Vet Sci**, 2003. 23 . p. 1-2.
- Carnevale, E. M.; Beisner, A. E.; McCue, P. M. et al. Uterine changes associated with repeated inseminations and embryo collections in mares. In: **Proceedings** American Association of Equine Practitioners, 2005. 51 . p. 202-203.
- 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.
- 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.