

A bipartição como alternativa para melhorar os índices de gestação na transferência de embriões eqüinos

The embryo splitting as an alternative to improve gestation indices from embryo transfer in horses

Leonardo Luiz da Silveira¹ Regivaldo Vieira de Souza² Natalie Soter Sousa Melo¹
Tomaz Gelson Pezzini¹ Concepta McManus³ Rodolfo Rumpf⁴

RESUMO

A transferência de embriões (TE) já vem sendo utilizada em eqüinos há pelo menos duas décadas, sempre a partir de ovulação simples. Para aumentar a eficiência reprodutiva, este estudo avaliou a bipartição embrionária como uma alternativa para melhorar os índices de gestação na transferência de embriões em eqüinos. Foram utilizadas 21 éguas de diferentes padrões raciais, com idade variando entre 4 e 15 anos de idade, pesando entre 270 a 480kg. A partir da identificação do cio (rufiação), os animais foram monitorados através de exames ultra-sonográficos trans-retais até o momento da ovulação, sendo as receptoras, uma vez ao dia e as doadoras três vezes ao dia. As receptoras utilizadas ovularam um dia antes ou até três dias depois das doadoras. As doadoras foram coletadas entre 144 e 156 horas após a ovulação (D0). Foram recuperados 20 embriões (mórulas) em 29 coletas (68,96%), sendo que 10 embriões foram transferidos inteiros (T1), e 10 embriões foram bipartidos (T2), originando 20 hemi-embriões e transferidos para 20 receptoras. Não houve diferença na taxa de prenhez entre os grupos, T1, 70% (7/10), e T2, 50% (10/20) ($P>0,05$). Em relação ao número inicial de embriões em cada grupo (10), houve diferença na taxa de prenhez entre os grupos, T1, 70% (7/10) e T2, 100% (10/10) ($P<0,05$). Estes resultados indicam um incremento no número de gestações obtidas quando é utilizada a técnica de bipartição embrionária na transferência de embriões eqüinos em função do número inicial de embriões coletados. Desta forma, esta técnica pode melhorar os índices de prenhez na transferência de embriões em eqüinos.

Palavras-chave: gestação, hemi-embriões, índice de produção, prenhez.

ABSTRACT

Embryo transfer (ET) has been used in horses for at least twenty years, always from a single ovulation. In order to increase reproductive efficiency this study evaluated embryo splitting as an alternative, to improve pregnancy rates in horse embryo transfer. Twenty-one mares of different genetic groups, aged between 4 and 15 yrs, and weighing 270 to 480kg were used. Estrus was identified using a teaser and the animals were monitored with transrectal ultrasonography exams until ovulation (donors were examined three times a day and recipients once a day). The recipients ovulated one day prior, or up to 3 days after the donors. Donors were collected between 144 and 155 hours after ovulation. A total of 20 embryos (morulas) in 29 collections (68.96%) were recovered, 10 embryos were transferred intact (T1) and 10 split in two (T2), giving rise to 20 half-embryos, which were then transferred to 20 recipients. No differences in pregnancy rates were found between groups (T1: 70% (7/10) and T2: 50% (10/20) $P>0.05$). Looking at the original number of embryos, there was a significant difference in pregnancy rate (70% vs 100% for T1 and T2 respectively $P<0.05$). These results show the possibility of increasing the number of gestations using embryo splitting and transfer in horses per embryo collected. This technique may improve pregnancy indices for ET in horses.

Key words: gestation, half-embryos, pregnancy, production index.

¹Médico Veterinário, Mestrando do Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias, área Produção Animal, Universidade de Brasília (UnB), Brasília, DF, SQN 215, Bloco C, Apt 303, Asa Norte, 70874-030, Brasília. E-mail: silveiraleo@hotmail.com
Autor para correspondência.

²Biólogo, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

³Professor PhD, UnB, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária.

⁴Médico Veterinário, Pesquisador PhD, Embrapa, Recursos Genéticos e Biotecnologia.

INTRODUÇÃO

A transferência de embriões (TE) é uma importante ferramenta que visa acelerar o melhoramento genético, conferindo maior precisão e rapidez no processo de seleção animal. O primeiro relato envolvendo TE em eqüinos foi feito por pesquisadores japoneses, em 1972, embora incremento nas pesquisas só ocorresse uma década depois. No Brasil, a TE vem sendo realizada desde a segunda metade dos anos 80, ocupando, hoje, lugar de destaque no mundo, junto com os Estados Unidos e Argentina (CARMO & ALVARENGA, 2003).

O gênero *Equus* apresenta algumas peculiaridades na sua fisiologia reprodutiva, éguas produzem somente um único produto por ano (é muito raro gêmeos), similar aos bovinos, mas a superovulação, seguida por inseminação artificial, e subsequente recuperação e transferência destes vários embriões nessa espécie, tem mudado este aspecto (DAVIS MOREL, 2003). Protocolos de superovulação em éguas ainda não foram definidos com sucesso, apesar de vários experimentos realizados (ALVARENGA et al., 2003).

Assim, o número de embriões por coleta em eqüinos é limitado. Para otimização de programas de transferência de embriões eqüinos, faz-se necessária a utilização de técnicas que aumentem as taxas de prenhez por coleta realizada, e a bipartição de embriões é uma biotécnica que poderá vir a suprir esta lacuna.

Os primeiros trabalhos realizados com bipartição de embriões eqüinos para produção de gêmeos monozigóticos foram feitos por McKINNON et al. (1989) e SKIDMORE et al. (1989), estando a técnica praticamente abandonada até os dias atuais. Os novos conhecimentos da embriologia eqüina, juntamente com a possibilidade de definição precisa da ovulação, e a disponibilidade de equipamentos e meios de cultivo, entre outros, promovem novamente a utilização da bipartição na espécie eqüina. A bipartição além de produzir gêmeos monozigóticos (idênticos), e maximizar os resultados de prenhez, em programas de TE, poderá também em associação com as técnicas de congelamento e sexagem embrionária, permitir a estruturação de bancos de hemi-embriões congelados e sexados. Animais monozigóticos encontram ainda ampla utilização em experimentos associados a resposta imune, genoma funcional, nutrição, farmacologia e ambiência, entre outras áreas.

A natural ocorrência de gêmeos (monozigóticos e dizigóticos) em éguas é virtualmente impedida pela sua inabilidade de levar a gestação de

dois fetos a termo. O resultado mais usual é dos dois fetos morrerem durante a segunda metade da gestação e iniciar um processo de aborto (JEFFCOTT & WHITWELL, 1976).

Este experimento teve por objetivo determinar as taxas de prenhez de embriões eqüinos bipartidos transferidos imediatamente após a coleta.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Campo Experimental Sucupira – CES da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia em Brasília – DF. Foram utilizadas 21 éguas paridas e solteiras, de diferentes padrões raciais, com idade variando entre 4 e 15 anos, pesando entre 270 a 480kg. Todas as 21 éguas do experimento eram doadoras ou receptoras, sendo que a definição em cada programa era feita conforme as mesmas apresentavam estro e possibilidade de sincronização. As éguas foram selecionadas pelo histórico reprodutivo e por exames ginecológicos. Foram utilizados três garanhões puros, sendo dois da raça Pantaneira e outro da raça Campeira, férteis de acordo com o histórico reprodutivo e os exames andrológicos. As éguas foram mantidas a pasto (capim Coast Cross, *Cynodon dactylon x Cynodon nlenfluensis* e capim Tanzânia, *Panicum maximum cv Tanzânia*), além de receberem, suplementação com concentrado.

A sincronização do estro entre doadoras e receptoras se dava naturalmente ou através da terapia hormonal, utilizando uma única aplicação de um análogo da prostaglandina F₂ α. A sincronia entre as receptoras variou de mais (+) 1 a menos (-) 3, ou seja, as receptoras ovularam um dia antes ou até três dias depois das doadoras. Quando necessário, para obter este sincronismo, a ovulação das doadoras e receptoras era induzida com gonadotrofina coriônica humana^b via endovenosa durante o cio assim que um folículo de 35mm foi detectado.

As éguas foram monitoradas por palpação e ultra-sonografia transretal dos ovários três vezes por semana para detecção do cio. Éguas em estro passavam a ser examinadas diariamente (receptoras) e três vezes ao dia (doadoras) para identificação e monitoramento do folículo pré-ovulatório. Os critérios usados para prever ovulação foram: mudanças na flutuação e tamanho do folículo, bem como características ultra-sonográficas, entre elas a redução do edema uterino, tamanho e ecogenicidade da borda bem como forma do folículo. As cobrições ocorreram a partir da detecção de um folículo com 35mm de diâmetro, a cada 48 horas, até a ovulação.

As doadoras foram submetidas a lavados uterinos pelo método não cirúrgico entre 144 (D6) a 156 (D6,5) horas após a ovulação (D0). Após este procedimento, o embrião era avaliado e classificado de acordo com uma escala modificada, proposta inicialmente por McKINNON & SQUIRES (1988). O embrião era definido como mórula se este ainda estivesse dentro da zona pelúcida, não mostrasse sinal de blastocelo (cavidade) e quando examinado em um aumento de 40X sob microscopia, não existisse evidência de cápsula formada.

As mórulas recuperadas foram bipartidas usando um micromanipulador de embriões^c composto por 2 braços com movimentos coordenados, apoiado sobre uma base adaptada a uma lupa estereomicroscópica. O embrião a ser bipartido era então colocado em uma placa de Petri de 100mm, contendo uma gota de D-PBS sem soro fetal bovino para facilitar a secção. O embrião então era posicionado e fixado a uma micropipeta por sucção, enquanto a lâmina (mantida no segundo braço) era posicionada central e dorsalmente ao embrião e procedido o corte. Procurou-se obter na micropipeta de fixação um diâmetro interno de aproximadamente a metade do diâmetro do embrião. A curvatura e arredondamento da borda da micropipeta foram obtidos com a chama de um isqueiro a gás.

A micropipeta adaptada a um dos braços do micromanipulador serviu para posicionar e manter, por sucção, o embrião fixo para o corte, através de pressão negativa. Tentou-se fixar adequadamente o embrião, evitando-se o deslocamento da massa celular dentro da membrana pelúcida, no momento do corte, de modo que cada hemi-embrião ficasse com 50% das células totais. Para realizar a bissecção dos embriões, foi utilizada uma lâmina^d adaptada ao outro braço do micromanipulador. Esta lâmina foi orientada para cortar com a sua ponta, sendo deste modo posicionada paralelamente à superfície da placa de Petri em um plano de 90° em relação à mesma. Posteriormente a lâmina manipulada pelo braço do micromanipulador foi posicionada centralmente e dorsalmente ao embrião.

Um único movimento para baixo até a lâmina encontrar o fundo da placa e posteriormente suaves movimentos para frente e para trás foram utilizados para bipartir os embriões. Neste momento, era retirada a pressão negativa, para evitar que os hemi-embriões fossem sugados pela micropipeta de fixação. O meio de manutenção^e era adicionado imediatamente após a secção embrionária na gota de D-PBS, para facilitar a manipulação dos hemi-embriões. Posteriormente os hemi-embriões eram então

envasados em palhetas francesas de 0,25mL montadas no inovulador de embriões modelo francês.

A receptora escolhida foi selecionada por apresentar, naquele momento, sincronia com a doadora e melhores condições uterinas e de corpo lúteo, observadas pela palpação retal e ultra-sonografia. O diagnóstico de prenhez foi realizado utilizando-se a ultra-sonografia oito dias após a inovulação dos embriões. Devido ao número de fêmeas, interromperam-se as gestações no vigésimo oitavo dia de gestação, com aplicação de análogo da prostaglandina F2 α^a , após o retorno ao estro as éguas foram alocadas aleatoriamente ao lote de receptoras ou doadoras.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, foram realizadas 29 coletas entre 144 e 156 horas pós-ovulação e coberturas para produzir embriões para a bipartição e transferência embrionária. Foram recuperados 20 embriões classificados como mórula obtendo taxas de recuperação de embriões de 68,96%. Os embriões apresentaram diâmetros variando de 190 a 210mm nesta fase de desenvolvimento inicial.

Estes resultados de recuperação embrionária são compatíveis com os relatados na literatura. SKIDMORE et al. (1989) e DOMINGUES & JACOB (2002) relataram taxas de recuperação semelhantes entre eles nesta fase de desenvolvimento embrionário, 41 e 45,2% respectivamente. IULIANO et al. (1985), e PERES et al. (2002) obtiveram respectivamente 65, e 63% de embriões recuperados entre D6 e D6,5 dias pós-ovulação. Isto demonstra que é possível recuperar embriões em estágios mais precoces, aptos para a micromanipulação, sem haver perdas em relação à taxa de recuperação embrionária.

Do total de 20 embriões (mórulas) recuperados neste estudo, 10 embriões foram transferidos inteiros (T1), e 10 foram bipartidos originando 20 hemi-embriões (T2). Todos os embriões foram avaliados microscopicamente e classificados como excelentes (esférico, uniforme no tamanho, na cor e textura) conforme foi descrito.

No grupo T1, obtiveram-se 70% de gestações (7/10) e no grupo T2 observaram-se 50% de gestações (10/20) considerando o número de hemi-embriões transferidos. Se for considerado, no entanto, a taxa de gestação em função do número de embriões originais bipartidos (10), a taxa de gestação sobe para 100% (10/10).

Das 10 gestações obtidas com hemi-embriões, obtiveram-se oito gestações nas quais

apenas um dos hemi-embriões se desenvolveu e duas gestações resultantes do mesmo par de hemi-embriões. A taxa de gestação com embriões D6 pós-ovulação no grupo T1 (70%) encontradas neste trabalho é semelhante às taxas encontradas por outros autores. MCKINNON & SQUIRES, (1988), HUHTINEN et al. (1997), e PERES et al. (2002), obtiveram taxas de prenhez similares para embriões coletados no dia seis após ovulação, ou seja, 72, 75 e 64% respectivamente. SKIDMORE et al., (1989), obtiveram 80% (12/15) de gestações com embriões neste estágio desenvolvimento.

Considerando os embriões originais, um maior número gestações foi obtida pela bipartição embrionária, demonstrando desta forma um incremento no número de gestações obtidas com embriões eqüinos fazendo uso desta biotecnologia. Comparando o número de embriões transferidos (inovulações) no grupo T1 (10 embriões inteiros) e T2 (20 hemi-embriões) não há diferenças significativas. Isto demonstra que o sucesso no resultado da transferência embrionária poderá ser o mesmo sendo o embrião bipartido ou não, não havendo perdas embrionárias quando utilizamos esta biotecnologia.

Em relação ao número de prenhez gemelar, os outros trabalhos pioneiros em bipartição de embrião eqüino obtiveram resultados melhores. Neste estudo obtiveram-se 10% (1/10), ou seja, um par de hemi-embriões, enquanto, McKINNON et al. (1989) e SKIDMORE et al., (1989), obtiveram 6/41 e 2/6 de vesículas embrionárias monozigóticas respectivamente.

McKINNON et al. (1989) transferiram aos pares 22 hemi-embriões e 22 embriões inteiros para 11 receptoras em cada grupo, e demonstraram que a viabilidade de embriões eqüinos bipartidos é consideravelmente menor do que embriões inteiros, 5/22 e 16/22 de gestação, respectivamente.

No presente estudo, foram utilizadas receptoras com sincronia de ovulações variando de +1 (receptora ovulando um dia antes da doadora) a -3 (receptora ovulando até três dias após a doadora), levando em consideração que os embriões eram coletados com 6 a 6,5 dias pós-ovulação da doadora.

Os resultados dos hemi-embriões transferidos para receptoras D3 (-3), D4 (-2), D5 (-1), D6 (0) e D7 (+1), observaram-se taxas de gestação de 50; 50; 66,66; 50; e 0% respectivamente. Os estudos com bipartição de embriões eqüinos de McKINNON et al. (1989) e SKIDMORE et al. (1989), utilizaram somente receptoras ovulando um dia antes da doadora ou dois dias depois, porém nestes

trabalhos não foram citados quantos hemi-embriões foram inovulados em cada dia correspondente a ovulação da receptora em relação a ovulação da doadora.

CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos nesse experimento, a técnica de bipartição de embriões em eqüinos é uma ferramenta viável para transferência de embriões nesta espécie, não demonstrando perdas quando comparada com embriões inteiros.

Existem perspectivas de se obterem melhores índices de produção obtendo-se taxas mais elevadas de prenhez gemelares, associando aperfeiçoamento técnico (humano) e uma boa relação de receptoras/hemi-embriões (4:2). Com a possibilidade de definição precisa da ovulação, é possível realizar coletas de doadoras com ovulações mais recentes, ou seja, D6 e D6½, sem haver perdas nas taxas de recuperação embrionária, e assim obter embriões em estágios de desenvolvimento iniciais que serão aptos à bipartição ou à congelamento.

FONTES DE AQUISIÇÃO

- a- Lutalyse: Rhodia-Mérieux Veterinária LTDA, Paulínea, SP.
- b- Vetecor: Laboratórios Carlier do Brasil LTDA, Osasco, SP.
- c- Microtorno: Microtorno LTDA, Brasília, DF.
- d- Biocut-Fujihira Industry: Biocut-Fujihira Industry LTDA, Tóquio, Japão.
- e- Emcare holding: ICPbio LTD, Auchland, Nova Zelândia.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVARENGA, M.A. et al. Avaliação da resposta superovulatória em éguas tratadas com FSH equino purificado. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.31, p.216, 2003.
- CARMO, M.T.; ALVARENGA, M.A. Evoluções da transferência de embriões em eqüinos no Brasil. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.31, p.280, 2003.
- DAVIES MOREL, M.C.G. Selection of the mare and stallion for breeding. In: DAVIES MOREL, M.C.G. **Equine reproductive physiology, breeding and stud management**. Wallingford, UK : CAB International, 2003. Cap.5, p.105-130.
- DOMINGUES, I.B.; JACOB, J.F.C. Eficiência reprodutiva na utilização da técnica de transferência de embrião. *Campolina Horse*, Rio de Janeiro, Ano 6, n.13, p.10-14, 2002.
- HUHTINEN, M. et al. Successful transfer of biopsied equine embryos. *Theriogenology*, v.48, p.361-367, 1997.

IULIANO, M.F. et al. Effect of age of equine embryos and method of transfer on pregnancy rate. **Journal of Animal Science**, v.60, n.1, p.258-263, 1985.

JEFFCOTT, L.B.; WHITWELL, K. Twinning as a cause of foetal and neonatal loss in Thoroughbred mares. **Journal of Compative Pathology**, v.83, p.91-96, 1976.

McKINNON, A.O.; SQUIRES, E.L. Equine embryo transfer. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.4, n.2, p.305-333, 1988.

McKINNON, A.O. et al. Bisection of equine embryos. **Equine Veterinary Journal**, v.3, suppl.8, p.129-133, 1989.

PERES, K.R. et al. Non-surgical equine embryo transfer: a retrospective study. **Theriogenology**, v.57, n.1, p.558, 2002.

SKIDMORE, J. et al. Micromanipulation of equine embryos to produce monozygotic twins. **Equine Veterinarian Journal**, v.3, Suppl. 8, p.126-128, 1989.