

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

RECUPERAÇÃO EMBRIONÁRIA E TAXA DE PRENHEZ EM ÉGUAS DA RAÇA MANGALARGA MARCHADOR

Giovanna Veggi Bicalho Canedo¹, Amanda Carolina Tavares de Freitas²,
Bhrenda Magalhães Samora¹, Lucas da Silva Schwambach¹, Carla Braga
Martins¹

¹Universidade Federal do Espírito Santo, CCAE/UFES, Alto Universitário s/n, Alegre - ES, Brasil,
giovanna.canedo@edu.ufes.br, amandacarolinafreitas@hotmail.com, bhrenda.samora@edu.ufes.br,
lucasschwambach.vet@outlook.com, carla.martins@ufes.br.

²Médica Veterinária autônoma, com graduação pela Universidade Federal do Espírito Santo.

Resumo

A avaliação dos índices reprodutivos é importante para otimização da eficiência reprodutiva na transferência de embriões. Dessa forma, este estudo objetivou avaliar os índices reprodutivos que influenciaram na taxa de recuperação embrionária e taxa de prenhez de éguas da raça Mangalarga Marchador. Utilizou-se 38 éguas doadoras da raça Mangalarga Marchador e 67 receptoras mestiças pertencentes a diferentes criatórios. As éguas foram submetidas a exames ginecológicos por meio de palpação transretal com auxílio de ultrassom para identificação do estro, controle folicular e ovulação. Avaliou-se a influência da idade e qualidade do embrião, tipo de sêmen utilizado na inseminação artificial, idade da doadora, dia da inovulação da receptora submetida ou não a tratamento hormonal para sincronização, dia de coleta do embrião na recuperação embrionária e taxa de prenhez. Totalizou-se 138 coletas embrionárias com recuperação de 48,55% e prenhez de 58,21%. Constatou-se melhores taxas de recuperação embrionária e prenhez em éguas coletadas no oitavo dia. Éguas de 3 a 5 anos apresentaram maior taxa de recuperação embrionária.

Palavras-chave: Embriões. Equinos. Índices Reprodutivos. Prenhez.

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde - Medicina Veterinária.

Introdução

A espécie equina, especialmente a raça Mangalarga Marchador, tem sido considerada a de menor fertilidade quando comparada às demais e a outras espécies domésticas. Contudo, o emprego de biotécnicas reprodutivas como a inseminação artificial e a transferência de embrião, vem possibilitando o melhor aproveitamento desses animais e o aprimoramento da raça e seus cruzamentos (LIRA *et al.*, 2009).

A transferência de embriões (TE) é a biotécnica de reprodução assistida mais utilizada na espécie equina. A técnica viabiliza a obtenção de embriões de éguas que estão reprodutivamente fora de serviço como exemplo, as que estão em sua atividade atlética, impossibilitadas de manter a gestação. Possibilita a obtenção de vários potros de uma só égua doadora em apenas um ano, aumentando a produtividade do plantel (LEY, 2006).

Os índices reprodutivos geralmente avaliados na TE em éguas da raça Mangalarga Marchador são: taxa de recuperação embrionária em doadoras, taxa de prenhez e mortalidade embrionária precoce em receptoras. No entanto, também são evidenciados índices de duração média de gestação, intervalo entre parto e primeira cobertura, intervalo entre parto e concepção, intervalo entre partos, número de ciclos e serviços por concepção, aproveitamento do cio do potro, número de abortos, idade que o animal entrou para reprodução e idade ao primeiro parto (LEITE *et al.*, 2011).

Devido a importância de otimizar a eficiência reprodutiva na raça, este estudo objetivou avaliar os índices reprodutivos que influenciam na obtenção de embriões e potros, de éguas da raça Mangalarga Marchador.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Metodologia

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade Federal do Espírito Santo, sob número 020/2020. O estudo foi realizado com base em registros de casuística de uma Central de Embriões de Equinos, situada no município de São Francisco do Itabapoana/Rio de Janeiro, a 21°30'07.81"S de latitude e 41°11'10.40"W de longitude, com temperatura média anual em torno de 23,1°C e precipitação pluviométrica média anual de 1003 mm³.

Utilizou-se 38 éguas doadoras da raça Mangalarga Marchador, com idade de 3 a 29 anos, e 67 éguas receptoras mestiças pertencentes a diferentes propriedades, sem utilização de estímulos luminosos artificiais.

Todas as éguas foram submetidas a exames ginecológicos por meio de palpação transretal com auxílio de ultrassom para identificação do estro e controle folicular e da ovulação.

A palpação transretal foi realizada para a avaliação dos órgãos reprodutivos. Avaliou-se o tamanho, consistência e estruturas presentes no ovário, e o tamanho, forma, espessura, simetria e consistência uterina. A ultrassonografia permitiu avaliação das estruturas ovarianas e características uterina, como a presença de edema endometrial (presente durante o estro) ou homogeneidade uterina (presente na fase do diestro). Para a realização dos exames ultrassonográficos dos órgãos reprodutivos foi utilizado um aparelho de ultrassonografia modelo (Sonoscape®) equipado com um transdutor linear transretal de 7,5 MHz.

O diâmetro de cada folículo foi determinado considerando como a média da máxima área transversal entre a altura e a largura, realizando duas mensurações perpendiculares por folículo, a partir de uma imagem congelada no monitor do aparelho de ultrassonografia. A ovulação foi detectada pela ausência do folículo pré-ovulatório identificado no exame ultrassonográfico anterior e confirmada pela formação posterior do corpo hemorrágico no mesmo ovário.

O grau de edema endometrial foi determinado por meio de cortes ultrassonográficos transversais dos cornos e corpo uterino utilizando-se um sistema de escore de um a quatro (mínimo e máximo) de acordo com a intensidade do edema das pregas endometriais, conforme preconizado por GINTHER (1995).

As doadoras foram monitoradas por palpação transretal e ultrassonografia diariamente após identificação de folículo maior que 30 mm. A partir da identificação do folículo pré-ovulatório com aproximadamente 35-36 mm, as éguas foram induzidas a ovulação com administração de Histrelina Acetato (Strelin - BotuPharma®), análogo de GnRH.

As inseminações artificiais foram feitas utilizando sêmen fresco, resfriado ou congelado. O protocolo adotado para sêmen fresco ou resfriado foi inseminar 24h após a indução da ovulação e monitorar com o auxílio do ultrassom transretal até a ovulação. Se a égua não ovulasse em até 24h após inseminação, esta era realizada novamente. Já para o sêmen congelado, a doadora foi monitorada de 6 em 6 horas após indução da ovulação e inseminada no momento da ovulação.

Os embriões foram coletados no 6º ao 10º dia pós ovulação, quando a égua foi inseminada com sêmen fresco ou resfriado, e no 8º a 10º dia, quando inseminada com sêmen congelado.

Para a coleta do embrião foi realizada a lavagem uterina por via transcervical. Após higienização da região perineal com água e detergente neutro foi introduzida uma sonda específica para coleta de embriões na espécie equina (Minitube®) pela cérvix até o corpo do útero, inflando o balonete presente na extremidade anterior para impedir refluxo da solução de lavagem. Em seguida, o útero foi lavado de três a cinco vezes com um litro de Ringer Lactato, a temperatura ambiente, utilizando-se o mesmo litro para todos os lavados.

O conteúdo obtido no copo coletor foi levado ao laboratório e depositado em placa de Petri para o rastreamento das estruturas com auxílio de uma lupa estereoscópica. O embrião identificado foi transferido para placa de Petri contendo meio de cultivo distribuído em gotas, e lavado sequencialmente. Em seguida, avaliou-se a qualidade embrionária de acordo com o sistema de 4 pontos de McCUE (2011). Após a avaliação, o embrião foi transferido para a pipeta de inseminação contendo meio de cultivo, e inovulado.

Em relação às receptoras, quando em anestro, tiveram o ciclo estral sincronizado com aplicação intramuscular de 2 mL de 17β Estradiol (17 beta - BotuPharma®), e após confirmação de edema uterino por meio da ultrassonografia, foram administrados 5 mL de Progesterona (P4-300 - BotuPharma®) por via intramuscular. Entre 3 a 7 dias após a aplicação de P4, as receptoras foram utilizadas para

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

inovação de embrião. De 15 em 15 dias pós inovação foi feita a administração de 10mL de P4 nas receptoras que emprenharam. Algumas receptoras utilizadas não foram submetidas a esse protocolo, por estarem em estro e com crescimento de folículo ovulatório, sendo induzidas a ovulação com administração de Histrelina Acetato e inovuladas 3 a 7 dias após a ovulação.

A inovação foi realizada no corpo ou corno uterino da receptora que fora previamente avaliada pela palpação transretal e ultrassonografia. Os critérios adotados para a escolha da receptora foram: tonicidade uterina adequada, imagem ultrassonográfica do CL bem formado, uniforme e homogêneo; útero homogêneo, endométrio colabado com ausência de edema e líquido; e cérvix fechada.

Quando o CL é considerado inadequado e não há opção de outra receptora, administra-se uma dose de 5mL de P4 intramuscular nas receptoras ovuladas.

O diagnóstico de gestação foi realizado aproximadamente de quatro a cinco dias após a inovação, quando o embrião estará com aproximadamente 12 a 13 dias de idade. O embrião foi monitorado de 15 em 15 dias até completar 120 dias de idade, ou até a receptora voltar para sua propriedade de origem.

Os resultados obtidos foram submetidos a testes estatísticos utilizando o programa software GraphPad Prism version 5.00 para Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA. Para a avaliação dos resultados realizou-se o teste de Shapiro-Wilk para verificar a hipótese nula de que os dados são amostrados de uma distribuição gaussiana. Valores de $p < 0,05$ demonstraram que os dados se desviaram da distribuição gaussiana, portanto, foram submetidos ao teste não-paramétrico de Mann-Whitney ou análise de variância de Kruskal-Wallis seguido de teste de comparação múltipla de Dunn. Para a avaliação dos dados categóricos (de proporção) foi utilizado o teste de qui-quadrado para uma variável. Foi adotado o nível de significância de 5% de probabilidade de erro.

Resultados e Discussão

Durante a estação reprodutiva avaliada foram realizados 138 lavados uterinos, resultando recuperação embrionária de 48,55% nas doadoras, e prenhez de 58,21% nas receptoras inovuladas. A taxa de recuperação embrionária observada neste estudo mostrou-se abaixo dos valores reportados por Lopes et al. (2013), que obtiveram 72,8% em éguas da raça Mangalarga Marchador.

Neste estudo foram realizadas coletas entre seis e dez dias após a ovulação, os percentuais de embriões e de éguas prenhas obtidos estão apresentados na tabela.

Tabela 1. Percentual de embriões obtidos e éguas prenhas em relação ao total de embriões coletados de 6 a 10 dias pós ovulação.

Dia da coleta	Total de embriões recuperados (%)	Prenhez (%)
D6	1,49 ^d	2,56 ^d
D7	4,48 ^{cd}	2,56 ^d
D8	50,75 ^a	48,72 ^a
D9	32,83 ^b	35,90 ^b
D10	10,45 ^c	10,26 ^c

Letras diferentes diferem entre si a 5% de significância pelo teste de qui-quadrado.

Fonte: Elaboração do autor.

Conforme demonstrado na Tabela 1, do total de embriões obtidos, 83,58% foram coletados entre oito e nove dias. Recuperou-se maior número de embriões no 8º dia (50,75%), e consequente obteve-se maior percentual de éguas prenhas (48,72%).

Esses resultados corroboram com Squires (1993), que observou que a maioria das coletas de embrião são realizadas de seis a nove dias após a ovulação, obtendo maior taxa de prenhez quando coletados no 8º dia.

Não houve diferença significativa nos percentuais de recuperação embrionária e prenhez em relação aos dias de coleta, conforme observado na Tabela 2.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Tabela 2. Taxa de recuperação embrionária de doadoras e taxa de prenhez de receptoras de acordo com o dia da coleta do embrião.

Dia da Coleta	Lavados Uterinos (n)	Recuperação Embrionária* n (%)	Prenhez** n (%)
D6	1	1 (100)	1 (100)
D7	7	3 (42,86)	1 (33,3)
D8	71	34 (47,89)	19 (55,9)
D9	48	22 (45,83)	14 (63,6)
D10	11	7 (63,64)	4 (57,1)
Total	138	67 (48,55)	39 (58,2)

Fonte: Elaboração do autor.

Todos os embriões coletados em D10 foram originados por inseminação com sêmen congelado. De acordo com McCue (2011), a recuperação de embriões menores e/ou em 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. Dessa forma, todos os embriões coletados no D10 foram classificados com idade de 9 dias.

Na Tabela 3, observa-se que o sêmen resfriado resultou em maior percentual de recuperação embrionária. Entretanto, o valor representou apenas 4,5% do total de embriões coletados. Já que, 74,6% dos embriões coletados foram provenientes de doadoras inseminadas com sêmen fresco e 20,9% com sêmen congelado.

Tabela 3. Taxa de recuperação embrionária de doadoras de acordo com o tipo de sêmen utilizado e número de inseminações artificiais.

Tipo de sêmen	IA (n)	Recuperação Embrionária n (%)	Do total de embriões coletados (%)
Congelado	27	14 (51,85) ^b	20,9
Resfriado	3	3 (100) ^a	4,5
Fresco	108	50 (45,37) ^b	74,6
Total	138	67 (48,55)	

Letras diferentes diferem entre si a 5% de significância pelo teste de qui-quadrado.

Fonte: Elaboração do autor.

Neste estudo, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o percentual de recuperação embrionária de éguas inseminadas com sêmen congelado e éguas inseminadas com sêmen fresco. Contudo, Camargo *et al.* (2013) verificaram que as IAs processadas com sêmen congelado geraram menor número de embriões do que com o sêmen fresco ou resfriado (51,6%, 62,1% e 62,2%, respectivamente), corroborando a Backman *et al.* (2004), que relataram que a percentagem de prenhez com sêmen congelado é reduzida e bastante variável.

Em relação ao sêmen resfriado, se obteve recuperação embrionária máxima das éguas, e significativamente maior que nos demais grupos. Entretanto, esse resultado pode ser atribuído ao número de animais inferior aos utilizados nos demais grupos.

Notou-se que as éguas de 3 a 5 anos apresentaram maior número de embriões recuperados (81,8%). Não houve diferença significativa no percentual de recuperação embrionária entre os grupos 6 a 8 anos, 9 a 11 anos, 12 a 15 anos, e maiores que 20 anos.

Em relação à taxa de recuperação de embriões, observa-se diminuição de acordo com a idade da doadora, já que as éguas idosas podem constituir grande parte do contingente de doadoras de embriões (ALONSO *et al.*, 2005).

Carnevale e Ginther (1992) constataram que éguas com idade ≥ 15 anos, apresentaram perdas embrionária significativamente maiores do que as de menor idade, condizendo com os achados desse trabalho, em que o grupo de éguas de 16 a 19 anos de idade apresentaram o menor percentual de

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

embriões recuperados. Esse grupo apresentou maior número de lavados uterinos, porém com menor taxa de recuperação (27%).

Em contrapartida, as éguas com mais de 20 anos apresentaram percentual de recuperação de 46,1%, contradizendo os autores supracitados.

Squires e Seidel (1995) constataram que em éguas jovens (2 a 4 anos) a média de recuperação embrionária foi 85%; em éguas adultas (4 a 18 anos) foi 64,4%, e em éguas velhas foi 24,1%. Éguas com menos de 12 anos produzem 10% mais embriões do que éguas com mais de 18 anos (ULIANI *et al.*, 2010).

Em relação às éguas receptoras submetidas ou não a protocolo hormonal de E2 e P4, notou-se que não houve diferença significativa no percentual de prenhez entre o grupo que não recebeu tratamento hormonal em relação ao tratado, 66,6% e 54,34%, respectivamente.

Santos *et al.* (2008), concluíram que receptoras de embrião podem ser utilizadas com assincronia de um dia antes (-1) até seis dias depois (+6) em relação às doadoras de embrião. No presente estudo foram utilizadas éguas receptoras de 3 a 8 (D3 a D8) dias pós ovulação ou administração de P4.

As éguas inovuladas em D4 tiveram maior percentual de prenhez (88,9%). Entretanto, as éguas de D5 e D7 foram as mais utilizadas para inovulação neste estudo, com percentual de prenhez de 44,4% e 72,2%, respectivamente. As inovuladas em D7 apresentaram maior taxa de prenhez que as inovuladas em D5. Estes resultados diferem aos constatados por Lopes *et al.* (2013) que obtiveram melhores taxas de prenhez em receptoras inovuladas em D5 e D6.

A maioria dos embriões equinos obtidos nesse estudo apresentou qualidade boa ou excelente, provavelmente devido ao transporte seletivo de embriões viáveis através do oviduto (WEBER *et al.*, 1991).

Do total de embriões coletados, 60 (89,55%) foram classificados como embriões grau 1 com taxa de prenhez de 60%. Já aqueles classificados como grau 2, obtiveram 42,86% de prenhez. Não foram registrados embriões de classificação inferior (grau 3 e 4).

Em relação a idade embrionária, observou-se que o maior percentual de prenhez foi obtido com inovulação de embriões com 8 dias de idade. Os embriões inovulados com 6 dias apresentaram o menor percentual de prenhez (25%), no entanto o número de transferências foi menor. Não houve diferença significativa entre a idade do embrião e a taxa de prenhez das receptoras.

As receptoras utilizadas se encontravam em fazendas distantes à área central do haras e, devido a época de seca na ocasião, possuíam escore corporal muito baixo, devido à escassez de alimento. Eram extremamente agitadas e estressadas, de difícil manejo. A idade e o tamanho não são critérios de escolha adotados no local, e não são realizados exames como citologia e histopatologia uterina. Segundo Riera (2009), boas receptoras devem ter boa saúde e condição corporal; ser cabresteadas e fácil de manusear; ter tamanho semelhante ao da doadora; ter entre 4 e 10 anos de idade; ter boas características ultrassonográficas e biópsia uterina grau I ou IIA; e apresentar ciclos regulares. Assim sendo, o manejo precário das receptoras pode ter influenciado na taxa de prenhez do presente estudo.

Conclusão

O tratamento hormonal nas receptoras em anestro não resultou na melhoria da taxa de prenhez.

Constatou-se melhores taxas de recuperação embrionária e prenhez em éguas coletadas no oitavo dia após a inovulação.

Melhores taxas de recuperação embrionária foram obtidas com o sêmen resfriado. Infere-se que que o número amostral possa ter influenciado no resultado.

A faixa etária das éguas doadoras influenciou na taxa de recuperação embrionária. Éguas de 3 a 5 anos apresentaram melhores taxas de recuperação embrionária que as demais.

A qualidade dos embriões obtidos (graus 1 e 2) não influenciou na taxa de prenhez.

Referências

ALONSO, M. A. *et al.* Efeito da idade da égua doadora na taxa de perda embrionária. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, p. 204, 2005.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

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. 1, p.74- 83, 2013.

CARNEVALE, E. M.; GINTHER, O. J. Relationships of age to uterine function and reproductive efficiency in mares. **Theriogenology**, v. 37, n. 5, p. 1101-1115, 1992.

GINTHER, O. J. **Ultrasonic imaging and animal reproduction: horses**. Book 2. Cross Plains WI, Equiservices, 1995. 394 p.

LEITE, T. E. *et al.* Eficiência reprodutiva em equinos da raça Morgan. **Ciência Animal Brasileira**, v. 12, n. 2, p. 274-278, 2011.

LEY, W.B. **Reprodução em éguas para veterinários de equinos**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2006. 240 p.

LIRA, R.A.; PEIXOTO, G.C.X.; SILVA, A.R. Transferência de embrião em equinos: Revisão. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.3, n.4, p. 132-140, 2009.

LOPES, E.P. *et al.* Correlação dos fatores que interferem na eficiência reprodutiva de éguas Mangalarga Marchador em programas de transferência de embriões. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 35, n. 1, p.69-75, 2013.

McCUE, P. M. Transferência de Embriões em Equinos – Avaliação do Embrião. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP Journal of Continuing Education in Animal Science of CRMV-SP**, v. 9, n. 3, p. 80–83, 2011.

RIERA, F. L. Equine embryo transfer. In: SAMPER, J. C. **Equine breeding management and artificial insemination**, Philadelphia: Saunders Elsevier, p. 185-199, 2009.

SANTOS G.O. *et al.* Avaliação do efeito de diversos parâmetros sobre a eficiência de um programa comercial de transferência de embriões em equinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.36, p.633, 2008.

SQUIRES E.L. Embryo transfer, p.357-367. In: McKinnon A.O. & Voss J.L. **Equine reproduction**. Lea & Febiger, Philadelphia, p. 357-367, 1993.

SQUIRES, E.L.; SEIDEL, G. E. Collection and transfer of equine embryos. **Fort Collins: Colorado State University, Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory**, n.8, p.24-31, 1995.

ULIANI, R. C. *et al.* Effect of mare breed and age on embryo transfer efficiency. **Animal Reproduction Science**, v. 121, n. 1-2, p. 303-304, 2010.

WEBER, James A. *et al.* Prostaglandin E2 secretion by oviductal transport-stage equine embryos. **Biology of reproduction**, v. 45, n. 4, p. 540-543, 1991.