

Transferência embrionária em equinos: Método não cirúrgico baseado na técnica ultrassonográfica de injeção ultra uterina

Renata Leandra Braga* & Sílvia Edelweiss Crusco

*Universidade Anhanguera de São Paulo – Campus Abc, São Bernardo do Campo, Brasil.
Autor para correspondência, E-mail: renatabragaenfermeira@gmail.com*

RESUMO. A técnica ultrassonográfica de injeção ultra uterina é um método alternativo de transferência de embriões que vem sendo empregada em equinos com bons índices de fertilidade. O objetivo deste trabalho é destacar a eficiência da técnica ultrassonográfica de injeção ultra uterina como método alternativo não cirúrgico para transferência embrionária em equinos. A metodologia utilizada foi a revisão bibliográfica, a partir de pesquisas em sites acadêmicos como GOOGLE Acadêmico, BIREME, SCIELO e livros. Os resultados apontaram para aspectos relevantes quanto à sincronização de cio, inseminação artificial *in vivo* ou *in vitro* e técnica cirúrgica de transferência de embriões (injeção intrauterina) por ultrassonografia. Concluiu-se que a injeção intrauterina é mais um método alternativo de transferência de embriões, com taxas de prenhez similares aos métodos comuns e que pode ser uma opção valiosa para éguas com histórico de dificuldade de transposição da cérvix durante o procedimento de inovulação.

Palavras-chave: Transferência embrionária, equinos, técnica ultrassonográfica de injeção ultra uterina

Embryonic transfer in equins: Non-surgical method based on ultrasound technique of ultra-uterine injection

ABSTRACT. Sonographic ultra-uterine inject ultra-sonography technique is an alternative method of embryo transfer that has been used in horses with good fertility rates. The objective of this study is to highlight the efficiency of ultrasound ultra-uterine injection technique as a nonsurgical alternative method for embryo transfer in horses. The methodology used was a literature review, from research in academic sites such as GOOGLE Scholar, BIREME, SCIELO and books. The survey results pointed to relevant aspects regarding the synchronization of estrus, artificial insemination *in vivo or in vitro* and surgical technique of embryo transfer (intrauterine injection) by ultrasonography, it concluded that IUI is another alternative method of embryo transfer with Similar pregnancy rates to the current methods and can be a valuable option for mares with transposition difficult history of the cervix during the embryo transfer procedure.

Keywords: Embryo transfer, equines, technical sonographic injection ultra-uterine

Transferencia de embriones en equinos: método no quirúrgico basado en la técnica ecográfica de inyección ultra uterina

RESUMEN. La técnica ecográfico de inyección ultra uterina es un método alternativo de transferencia de embriones que se ha utilizado en caballos con buenos índices de fertilidad. El objetivo de este estudio es destacar la eficacia de la técnica ecográfica de inyección ultra uterina como un método alternativo no quirúrgico para la transferencia de embriones en los equinos. La metodología utilizada fue una revisión de la literatura, desde la consulta en

sítios acadêmicos como GOOGLE Acadêmico, BIREME, SciELO y libros. Los resultados del estudio apuntaron a aspectos relevantes con respecto a la sincronización del estro, la inseminación artificial *in vivo* o *in vitro* y la técnica quirúrgica de la transferencia de embriones (inyección intrauterina) por ecografía. En conclusión la inyección intrauterina es un método alternativo de transferencia de embriones con tasas de preñez similares a los métodos comunes y puede ser una opción valiosa para las yeguas con histórico de dificultad de transposición del cuello del útero durante el procedimiento de la transferencia de embrión.

Palabras clave: Transferencia de embriones, los caballos, técnica ecográfica de inyección ultra uterina

Introdução

Embriões equinos têm sido comumente transferidos por dois métodos: transcervical (não cirúrgico) ou cirúrgico. As taxas de prenhez originadas pelo primeiro oscilam bastante, embora seja de mais fácil aplicação. Apesar de o método cirúrgico ter originado taxa mais elevada de prenhez é bem mais oneroso (Arruda et al., 2001). Nesse universo, o desenvolvimento de novas técnicas reprodutivas possibilitou o melhor aproveitamento dos animais, tornando possível acelerar o aprimoramento das raças e seus cruzamentos. A inseminação artificial foi uma das primeiras a se destacar e, depois desta, a transferência de embriões pode ser definida como a mais promissora (Carvalho, 1992, Arruda et al., 2001). A técnica ultrassonográfica de injeção ultra uterina (IIU) desenvolvida por Gastal (1998) é um método alternativo de transferência de embriões que evita alguma desvantagens da técnica transcervical advindas da manipulação cervical. Esta técnica permite a deposição de substâncias dentro do útero com total controle do procedimento de injeção pelo monitor do ultrassom assegurando maior eficiência (Arruda et al., 2001). Dentro da espécie equina, nas raças que permitem o uso da inseminação artificial, essa técnica vem sendo empregada com bons índices de fertilidade, além de proporcionar menor desgaste do garanhão e possibilitar o progresso genético do plantel existente (Carvalho, 1992).

Sincronização de cio

Para o êxito da transferência de embriões é necessário que tanto o doador e o receptor encontrem-se dentro de certo número de dias do ciclo estral (sincronizada), uma vez que a fêmea que recebe o embrião deve ser idealmente no mesmo dia do ciclo o doador, embora um adiantamento ou um dia que está atrasado até três dias antes da ovulação da doadora tolerado. Assim, o embrião obtido vai ser colocado num fisiologicamente semelhante à do ambiente

uterino que existia no momento de recuperação (Bortot and Zappa, 2013).

A sincronização é de suma importância para a transferência do embrião, sendo a égua receptora manejada para estar em sincronismo com a égua doadora, ambas devem estar em condições adequadas, sem alterações uterinas e ovarianas, e sem problemas relatados de gestação anteriores da receptora (Bortot and Zappa, 2013).

De acordo com Bortot and Zappa (2013) alguns aspectos são fundamentais: seleção adequada da fêmea receptora; utilização de machos de boa qualidade; bom controle sanitário e mão de obra especializada; idade entre 3 (três) e 10 (dez) anos; a sincronização pode ser feito através da utilização de Prostaglandina F2 alfa (PGF2 α), associada à progesterona exógena; as fêmeas sincronizadas examinadas diariamente por palpação retal e ultrassonografia para monitoramento da ovulação e crescimento folicular - mesmo com a sincronização, fêmeas podem ovular com até 3 (três) dias de diferença. (Baraãao, 2007). Nas éguas a sincronização do estro e da ovulação possui uma maior complexidade, quando comparada com outras fêmeas de animais domésticos. Provavelmente isso ocorre devido à longa fase folicular que possuem as éguas e pela dificuldade que se tem de adequar o controle do crescimento folicular. A sincronização do estro e da ovulação permite que éguas sejam cobertas ou inseminadas artificialmente em um período pré-determinado, com ou sem a detecção de cio. A principal aplicação da sincronização do estro e da ovulação em éguas e na transferência de embriões, quando a ovulação da égua receptora deve ocorrer um dia antes e dois dias após a ovulação da égua doadora (Squires et al., 2003).

Inseminação artificial *in vivo* ou *in vitro*

A inseminação artificial, além de acelerar o melhoramento genético do rebanho, possibilita

uma larga expansão das características de garantões de qualidade genética superior. Na espécie equina, essa técnica vem alcançando bons índices de fertilidade e promovendo o progresso genético num período significativamente menor do que o dispensado com a monta natural ([Bortot and Zappa, 2013](#), [Taveiros, 2011](#)). Essa técnica ainda proporciona um menor desgaste dos garantões e a não disseminação de doenças sexualmente transmissíveis ([Fleury et al., 2007](#), [Taveiros, 2011](#)).

Também foi avaliada *in vitro* a eficiência da referida técnica na deposição de substâncias e de oócitos no lúmen uterino. As taxas de sucesso da injeção variaram de 75 a 89,8%. Mostrou-se também que essa técnica é de rápida execução ([Gastal et al., 2004](#)).

Depois de detectado o estro a fêmea doadora é inseminada em dias alternados, com doses equivalentes a 500×10^6 . Caso a inseminação seja feita *in vitro*, a mesma quantidade de sêmen deve ser administrada para fertilização dos oócitos coletados, mas a taxa de fertilização *in vitro* não tem bons resultados em equinos, assim como maturação *in vitro*. Após a fertilização dos oócitos segue-se para a próxima etapa ([Baraňao, 2007](#)).

Recuperação embrionária

De acordo com as experiências citadas por [Carnevale et al. \(2000\)](#) e [Carvalho \(1992\)](#) após sete ou oito dias da inseminação artificial é realizada a recuperação embrionária não cirúrgica. As coletas ocorrem no sétimo ou oitavo dia após a ovulação, dependendo da sincronização com as receptoras. Os autores acima destacam que a técnica de lavado uterino era realizada antigamente lavando-se o corno ipsilateral á ovulação, inflando o balão do cateter na base do corno. Atualmente infla-se o balão no corpo do útero com até 60 ml de ar lavando os dois cornos ao mesmo tempo. Para a lavagem a solução mais utilizada é a solução salina fosfatada tamponada de Dulbecco & Vogt modificada por Whittingham em ([Whittingham, 1971](#)).

Neste aspecto, são utilizados até três litros de solução, divididas em alíquotas de 500 ou 1000 ml cada, de acordo com o tamanho do útero da doadora. Sonda ou cateter é acoplado ao circuito ao qual faz a drenagem, o fluxo de recuperação pode ser recuperado em recipientes estéreis de grande volume quando o fluxo de recuperação for constante. Quando não pode ser interrompido com a utilização de uma pinça, o volume recuperado

chega até 98% do total utilizado infundido ([Peres et al., 2007](#))

Colheita de embriões e lavagem uterina

Existem dois métodos de colheita de embriões, o cirúrgico e o não cirúrgico. O método cirúrgico foi descrito por [Allen and Rowson \(1975\)](#) deve ser utilizado somente quando o objetivo for à obtenção de embriões em estágios iniciais de desenvolvimento, pois a sua realização consiste na lavagem do oviduto. O método não cirúrgico (via transcervical) foi descrito primeiramente em 1972 por [Oguri and Tsutsumi \(1972\)](#) que utilizaram um cateter de três vias, similar ao preconizado por [Rowson and Dowling \(1949\)](#) em 1949 para colheita de embriões em bovino ([Oguri and Tsutsumi, 1972](#)).

O procedimento não cirúrgico de coleta do embrião do lúmen uterino e relativamente simples. A colheita de embriões é realizada somente a partir do 6º dia pós-ovulação, pois os embriões na égua migram ao útero com 5 ou 6 dias de idade ([Oguri and Tsutsumi, 1972](#)).

No laboratório, previamente ao *flushing*, a sonda, circuito e filtro são preparados na zona limpa, em condições de higiene, e só depois trazidos para o exterior onde se encontra a égua. Antes do procedimento de recolha, a zona vulvar e perivulvar da égua são lavadas com sabão diluído em água e, posteriormente, os lábios e comissura vulvares são limpos com algodão embebido em solução fisiológica ([Anjo and Bran, 2010](#)).

O embrião é recolhido por uma lavagem uterina (*flushing*) da égua doadora, utilizando para tal 2 a 3 litros de uma solução de Ringer Lactato previamente aquecida a 37-40°C. Utiliza-se um cateter do tipo Foley, semi rígido, que passa pela cérvix até ao corpo uterino ([Vanderwall and Woods, 2007](#)). Este cateter possui um balão na porção anterior que, quando cheio de ar, impede que o meio de lavagem reflua através da cérvix para a vagina. O extremo posterior é ligado a um circuito de duas vias, em que uma extremidade corresponde ao recipiente com o meio de lavagem e a outra ao filtro. Quando o cateter se encontra bem posicionado procede-se à introdução do meio de lavagem e sua posterior recolha. Para facilitar este procedimento, pode-se colocar uma mão pelo reto, de modo a ser possível massagear e elevar os corpos uterinos tendo isto impacto positivo na saída do fluido ([McKinnon et al., 2011](#)).

Em caso de dificuldade de extração, pode-se efetuar uma ecografia para verificar onde se encontra o fluido, de modo a poder redirecionar a sonda. O filtro deve estar protegido da luz solar, por exemplo com papel prata, para reduzir os riscos de dano ao embrião. Quando se termina o procedimento, separa-se o filtro do circuito, e, já no laboratório, transferem-se os 20 a 30 ml de meio de lavagem que ficaram residuais no filtro para placas de petri estéreis ([McKinnon et al., 2011](#)).

O embrião é então procurado nas referidas placas, através da utilização de uma lupa estereoscópica. A placa de petri deve estar previamente riscada na sua parte inferior para facilitar a localização do embrião. Uma vez localizado, este é removido por aspiração com o auxílio de uma palheta de 0,5 ou 0,25 mL, acoplada a uma seringa de insulina, e transferido para uma placa de petri menor (35 x 10 mm), contendo o meio de manutenção TQC®, Ham F10, Encare®, dentre outros ([Bortot and Zappa, 2013](#)).

Quanto ao desenvolvimento, o embrião deve ser classificado em mórula, blastocisto jovem ou blastocisto expandido. Após avaliação e classificação, o embrião é lavado em 10 passagens consecutivas no meio de manutenção. O objetivo desse procedimento é eliminar as impurezas presentes na zona pelúcida antes aspirá-lo na palheta de inováção ([Vallecillo et al., 2007](#)).

O embrião é envasado em palheta plástica de 0,25 mL em porções alternadas de solução de manutenção e ar. Este procedimento minimiza os movimentos do embrião dentro da palheta e assegura a perfeita expulsão do embrião para dentro do útero ([McKinnon et al., 2011](#)).

Em relação à égua, imediatamente após o *flushing*, é administrada PGF2_α para que se dê a luteólise e consequente início de um novo ciclo. Se o fluido não for recolhido na totalidade, administra-se ocitocina endovenosa ([McKinnon et al., 2011](#)).

Transferência dos embriões (TE)

A TE é um procedimento que visa recolher o útero um embrião entre seis e oito dias após a ovulação. Pela lavagem uterina de uma égua doadora. O embrião é transferido (forma cirúrgica ou não cirúrgica) para o útero de outra égua sincronizado com o doador ([Taveiros, 2011](#)).

O equipamento para inováção mais utilizado pelos pesquisadores de embriões equinos é a pipeta de inseminação artificial. Contudo, vários outros aplicadores também têm sido descritos, como o modelo Hannover de transferência de embriões bovinos ([Lira et al., 2009](#)).

A avaliação das receptoras, anteriormente ao ato da transferência, é de suma importância. Devendo-se selecionar a égua mais adequada para receber o embrião. Tal seleção fundamenta-se nas concentrações plasmáticas de progesterona, naquele momento, contribuindo assim, para que estas apresentem as melhores condições reprodutivas. Então, por palpação deve-se observar a cérvix firme e fechada, aumento de tónus uterino (cilíndrico e tubular). A inováção do embrião é feita com muita habilidade do técnico no corpo do útero na região da bifurcação cornoal ([Riera, 2009](#)).

Além disso, não pode haver nenhuma evidência de dobras endometriais ou secreção uterina no exame ultrassonográfico. Administrando progesterona em receptoras equinas no período de D0 (dia da ovulação) a D5, possibilitaram a inováção destas receptoras no D2, obtendo taxa de prenhez estatisticamente similar as éguas consideradas excelentes à para inováção no D5 ([Carnevale et al., 2000](#)).

Técnica não cirúrgica de transferência de embriões (injeção intrauterina) por ultrassonografia.

A intensificação do uso do ultrassom na Medicina Veterinária a partir da década de 80 contribuiu para aumentar a eficiência do exame clínico-ginecológico, possibilitando detectar vesículas embrionárias entre 10 e 12 dias após a ovulação, assim como sinais precisos da evolução da gestação e da perda do concepto ([Taveiros, 2011](#)). Atualmente a técnica de injeção intrauterina por ultrassonografia, consiste na utilização de um aparelho de ultrassom equipado com transdutor convexo de 5,0 MHz acoplado a uma extensão plástica para procedimentos transvaginais em grandes animais. Cateteres flexíveis de polietileno com 0,8 mm de diâmetro externo e 0,6 mm de diâmetro interno com 100 cm de comprimento para a inováção.

De acordo com [Lira et al. \(2009\)](#) esta técnica utiliza tubo de teflon ou polietileno de diâmetro de 0,8 mm em diâmetro e 70 cm de comprimento que está acoplado a uma agulha de 56 cm de comprimento de 17 gauge são introduzidos no

canal guia metálico, que está conectado ao transdutor linear convexo. Após introduzir no canal vaginal, gira-se o transdutor 90° para visualização longitudinal do segmento posterior do corno uterino; perfurando as paredes vaginais e uterinas, se tem a confirmação do posicionamento no lúmen uterino com a agulha visualizada pelo U.S, em movimentos de vai e vem na parede do endométrio. Esta técnica pode ser utilizada para a introdução do embrião com fluidos no lúmen uterino (Lira et al., 2009). Este método pode ser vantajoso em relação às outras TE devido ao fato de:

Ser um procedimento rápido (1 a 2 minutos), necessitar de leve tranquilização do animal, ser um procedimento pouco invasivo, não necessitar de muita manipulação do útero e de nenhuma manipulação cervical, evitando assim, possível liberação de PGF e ocitocina e ser um procedimento com mínimas chances de contaminação (Lira et al., 2009).

Considerações finais

Foi possível destacar a eficiência da técnica ultrassonográfica de injeção ultra uterina (IIU) como método alternativo não cirúrgico para transferência embrionária (TE) em equinos.

A técnica IIU é mais um método alternativo de TE, com taxas de prenhez similares aos métodos atuais e que pode ser uma opção valiosa para éguas com histórico de dificuldade de transposição da cérvix durante o procedimento de inovulação.

Além disso, esse procedimento pode representar um grande potencial para maximizar a utilização da TE em outras espécies, necessitando de estudos futuros para sua aplicação.

Referências bibliográficas

- Allen, W. R. & Rowson, L. E. 1975. Surgical and non-surgical egg transfer in horses. *Journal of Reproduction and Fertility*, 23, 525-530.
- Anjo, D. & Bran, J. A. 2010. Reprodução assistida em cavalos: novas contribuições da teoria. *Revista de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 5, 56-69.
- Arruda, R. P., Visintin, J. A., Fleury, J. J., Garcia, A. R., Madureira, E. H., Celeghini, E. C. C. & Neves Neto, J. R. 2001. Existem relações entre tamanho e morfoecogenicidade do corpo lúteo detectados pelo ultra-som e os teores de progesterona plasmática em receptoras de embriões equinos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 38, 233-239.
- Barañao, L. 2007. Biotecnología en Reproducción animal. *Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.
- Bortot, D. & Zappa, V. 2013. Aspectos da reprodução equina: Inseminação artificial e transferência de embrião: Revisão de literatura. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, 21, 1-23.
- Carnevale, E. M., Ramirez, R. J., Squires, E. L., Alvarenga, M. A., Vanderwall, D. K. & McCue, P. M. 2000. Factors affecting pregnancy rates and early embryonic death after equine embryo transfer. *Theriogenology*, 54, 965-979.
- Carvalho, G. R. 1992. Fertility of the diluted equine semen, cold to 20° C and transported. *Department of Animal Science*. Federal University of Viçosa, Viçosa, Minas Gerais.
- Fleury, P. D. C., Alonso, M. A., Sousa, F. A. C., Andrade, A. F. C. & Arruda, R. P. 2007. Uso da gonadotrofina coriônica humana (hCG) visando melhorar as características reprodutivas e fertilidade de receptoras de embriões equinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 31, 27-31.
- Gastal, M. O. 1998. Effect of oxytocin, prostaglandin F2 alpha, and clenbuterol on uterine dynamics in mares. *Theriogenology*, 50, 521-534.
- Gastal, M. O., Gastal, E. L., Spinelli, V. & Ginther, O. J. 2004. Relationships between body condition and follicle development in mares. *Animal Reproduction Science*, 1, 115-121.
- Lira, R. A., Peixoto, G. C. X. & Silva, A. R. 2009. Transferência de embrião em equinos: revisão. *Acta Veterinaria Brasilica*, 3, 132-140.
- McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E. & Varner, D. D. 2011. *Equine reproduction*. John Wiley & Sons, USDA.
- Oguri, N. & Tsutsumi, Y. 1972. Non-surgical recovery of equine eggs, and an attempt at non-surgical egg transfer in horses. *Journal of Reproduction and Fertility*, 31, 187-195.
- Peres, K. R., Femandes, C. B., Alvarenga, M. A. & Alvarenga, F. C. L. 2007. Análise da viabilidade e da ultra-estrutura de embriões

- obtidos de éguas superovuladas. *Veterinária e Zootecnia*, 14, 52-61.
- Riera, F. L. 2009. Equine embryo transfer. In: Samper, J. C. (ed.) *Equine breeding management and artificial insemination*. Saunders Elsevier, St. Louis, MO.
- Rowson, L. E. A. & Dowling, D. F. 1949. An apparatus for the extraction of fertilized eggs from the living cow. *Veterinaire Recherche*, 61, 191.
- Squires, E., Carnevale, E., McCue, P. & Bruemmer, J. 2003. Embryo technologies in the horse. *Theriogenology*, 59, 151-170.
- Taveiros, A. 2011. Perda de conceito em programa de inseminação artificial e de transferência de embriões em equino da raça Mangalarga Marchador. *Revista de Medicina Veterinária*, 2, 28-33.
- Vallecillo, A., Pérez-Marín, C. C., Henríquez, O., Delgado, J. V., Cabello, A. & Lavados, Y. D. G. 2007. Potencial de la transferencia embrionaria para la conservación del caballo de raza hispano-árabe. *Archivos de Zootecnia*, 56, 581-585.
- Vanderwall, D. K. & Woods, G. L. 2007. Embryo transfer and newer assisted reproductive techniques for horses. In: Youngquist, R. S. & Threlfall, W. R. (eds.) *Current therapy in large animal theriogenology*. Missouri.
- Whittingham, D. G. 1971. Survival of mouse embryos after freezing and thawing. *Nature*, 233, 125-132.

Article History:

Received 14 November 2016

Accepted 19 December 2016

Available on line 31 January 2017

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 4.0, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited