

Influência do garanhão e da técnica de inseminação sobre os índices de recuperação embrionária e de gestação em um programa de transferência de embriões em equinos da raça Mangalarga

Influence of stallion and insemination technique on embryo recovery rates and pregnancy in a program of embryos transfer in equine Mangalarga breed

João Junqueira FLEURY¹; Abílio Junqueira PINTO²;
Eneiva Carla Carvalho CELEGHINI³; César Gonçalves LIMA⁴; Rubens Paes de ARRUDA³

CORRESPONDÊNCIA PARA:
Rubens Paes de Arruda
Departamento de Reprodução Animal
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia da USP
Av. Orlando Marques de Paiva, 87
Cidade Universitária Armando de
Salles Oliveira
05508-000 – São Paulo – SP
e-mail: arrudarp@usp.br

1- Faculdade de Medicina Veterinária "Octávio Bastos", São João da Boa Vista – SP
2- Secretaria da Agricultura do Estado de São Paulo - CATI
3- Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP – SP
4- Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da USP – SP

RESUMO

Muitos fatores podem afetar as taxas de gestação após a transferência de embriões em equinos. Este estudo teve como objetivo avaliar, em equinos da raça Mangalarga e em duas estações reprodutivas, a influência do garanhão e de três diferentes técnicas de inseminação (monta natural, inseminação artificial com sêmen diluído fresco ou resfriado) sobre os índices de recuperação de embriões e de prenhez. No primeiro ano, foram encontradas diferenças significativas ($p < 0,05$) na recuperação de embriões entre cinco garanhões estudados (28,6; 65,0; 62,9; 66,7 e 84,2%), mas não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) nos índices de prenhez (50,0; 80,7; 70,6; 70,0 e 62,5%). No segundo ano, verificou-se uma tendência à significância ($p = 0,057$), na recuperação de embriões entre quatro garanhões estudados (44,4; 56,2; 71,4 e 73,7%) e não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nos índices de prenhez (75,0; 55,6; 86,7 e 71,4%). Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nos índices de embriões recuperados e de prenhez comparando-se a monta natural (50,0 e 87,5%) e a inseminação artificial com sêmen fresco (60,6 e 73,7%) ou refrigerado (63,8 e 80,3%).

UNITERMOS: Embrião; Equinos; Transferência de embriões; Cavalos mangalarga; Prenhez..

INTRODUÇÃO

A manutenção da capacidade fertilizante dos espermatozoides mantidos no líquido seminal pode ter considerável impacto nos programas de transferência de embriões em equinos. Squires et al.⁸, após três anos de trabalho (1979, 1980 e 1981), não observaram influência do garanhão nos resultados de recuperação embrionária. No entanto, no ano de 1981, obtiveram diferenças significativas ($p < 0,10$) na porcentagem de embriões recuperados, após inseminação artificial com sêmen fresco (78%) ou diluído com leite desnatado (67%) em relação ao sêmen diluído com EDTA-Lactose (48%). Douglas-Hamilton et al.¹ avaliaram o sêmen de três garanhões diluído (2:1, diluidor: sêmen) a 37°C e em seguida resfriado (0,3°C/min) até +5°C, dentro de 10 horas. O sêmen permaneceu resfriado até 36 horas, sendo então utilizado para a inseminação artificial. Verificaram que a motilidade progressiva obtida foi de 52% ($n = 12$), 51% ($n = 7$) e 67% ($n = 17$) e a taxa de gestação de 73% (8/11), 73% (8/11) e 58% (12/24), em um ciclo estral, não tendo observado diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os três garanhões. Woods e Steiner¹⁰ utilizaram sêmen resfriado de três garanhões para inseminar doadoras de embriões. Após as colheitas, obtiveram taxas de recuperação embrionária de 29% (2/7), 63% (10/16) e 93% (14/15). Embora o trabalho não apresente análises estatísticas, houve dife-

rença numérica significativa nas taxas de recuperação embrionária entre os garanhões. A taxa de recuperação embrionária observada por Douglas² foi de 36 e 72%, quando as éguas foram cobertas por dois garanhões diferentes. McKinnon e Squires⁴ citam que o número de embriões recuperados diferiu quando foram utilizados quatro garanhões com características seminais normais.

Os objetivos deste experimento foram estudar os efeitos do garanhão e das três técnicas de inseminação: monta natural ou inseminação artificial com o sêmen fresco ou resfriado, sobre as taxas de recuperação de embriões e os índices de prenhez.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizadas como doadoras de embriões 77 fêmeas equinas da raça Mangalarga, com idades entre 3 e 18 anos e, como receptoras, 107 fêmeas sem raça definida com idades entre 3 e 10 anos. Foram consideradas doadoras e receptoras aptas as fêmeas que apresentaram ausência de alterações no útero e nos ovários detectáveis pela palpação retal ou pela ultra-sonografia. Como doadores de sêmen foram utilizados 6 garanhões da raça Mangalarga, com idades entre 5 e 10 anos, que estavam servindo normalmente em regime de monta natural ou colheita de sêmen para inseminação artificial. O período de colheitas e transferências (inovulações) dos embriões foi de setembro de

1995 a março de 1996 e de setembro de 1996 a março de 1997. As doadoras de embriões foram divididas em 3 grupos e submetidas às seguintes técnicas reprodutivas: monta natural (M.N.), inseminação artificial com sêmen fresco (I.A.F.) e inseminação artificial com sêmen resfriado (I.A.R.). Somente foram utilizados garanhões cujo sêmen apresentou as seguintes características: motilidade progressiva $\geq 60\%$, vigor (0-5) ≥ 3 , patologias espermáticas totais $\leq 30\%$. Todas as doadoras em estro foram cobertas por monta natural ou inseminadas artificialmente a cada 36 horas, a partir da detecção de um folículo de pelo menos 35 mm de diâmetro até a ovulação. A inseminação artificial foi realizada com sêmen fresco ou resfriado diluído em extensor à base de leite desnatado³. O volume e a concentração da dose inseminante foram de 20 ml e 500 milhões de espermatozoides viáveis, respectivamente. A refrigeração do sêmen foi realizada acondicionando-o em container que permitiu a curva de resfriamento de 0,3°C por minuto até +5°C, permanecendo por no máximo trinta e seis horas até a inseminação. Para a colheita dos embriões, foi utilizado o método não-cirúrgico, após adaptação do método descrito por Squires et al.⁷. As colheitas foram realizadas no 7º e 8º dias após a ovulação. Após a colheita, o líquido contido no filtro foi colocado em placas de Petri siliconizadas, procurando-se os embriões em estereomicroscópio com aumento de 10 vezes. Uma vez identificados, os embriões foram classificados quanto à morfologia segundo McKinnon e Squires⁵, com aumento de 40 vezes, e lavados através de 10 passagens consecutivas em solução salina tamponada de Dulbecco's (PBS) enriquecido com 15% de soro fetal bovino (SFB), esterilizado por filtração em membrana de 0,22 μm . Em seguida, os embriões foram acondicionados em pipetas para inseminação artificial, com 50 cm de comprimento, respeitando-se a seguinte seqüência: coluna de meio (PBS + 15% de SFB) + coluna de ar + coluna de meio contendo o embrião + coluna de ar + coluna de meio. As transferências foram executadas pela via transcervical com o auxílio de pipetas plásticas destinadas à inseminação artificial, revestidas externamente por uma fina membrana plástica ("camisa sanitária"), segundo Squires et al.⁹ Foram inovuladas as receptoras que ovularam dois dias antes da doadora (assincronia + 2); um dia antes (assincronia + 1); no mesmo dia (sincrônicas) e até dois dias após (assincronia -1 e -2). O diagnóstico de gestação foi realizado através da ultra-sonografia aos 13, 17 e 30 dias após a ovulação da receptora. Os resultados foram apresentados em tabelas de frequência, com número e proporção de dados positivos em cada grupo experimental. As comparações entre as proporções de positividade foram efetuadas utilizando-se o teste de χ^2 (Qui-quadrado), contido no programa MINITAB[®]. Os dados considerados significativos após a utilização do teste de Qui-quadrado foram submetidos a análise de variância (ANOVA), e as comparações entre as médias foram realizadas pelo teste de Tukey. A hipótese testada foi significativa quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

No ano hípico 95/96, os índices de recuperação de embriões das doadoras fecundadas pelos garanhões 1, 2, 3, 4 e 8 foram, respectivamente, 28,6%, 65,0%, 62,9%, 66,7% e 84,2%

(Tab. 1), podendo-se verificar, neste ano hípico, diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os garanhões utilizados. No ano hípico 96/97, os índices de recuperação de embriões foram 44,4%, 56,2%, 71,4% e 73,7% para os garanhões 1, 2, 3 e 9, respectivamente (Tab. 2), ao contrário do ano hípico anterior, não houve diferença significativa no número de embriões recuperados, embora estivesse no limite da significância ($p = 0,057$).

O índice de prenhez de receptoras para o ano hípico reprodutivo 95/96 foi, respectivamente, para o garanhão um 50,0%, dois 80,7%, três 70,6%, quatro 70,0% e oito 62,5% (Tab. 3), não tendo havido diferença significativa ($p > 0,05$) nas taxas de prenhez das receptoras entre os garanhões. No ano hípico 96/97, o índice de prenhez das receptoras foi para o garanhão um 75,0%, dois 55,6%, três 86,7% e nove 71,4% (Tab. 4), não tendo havido também diferença significativa ($p > 0,05$) entre os garanhões.

Tabela 1

Número de colheitas e embriões recuperados, segundo o garanhão utilizado (Ano hípico 95/96). Pirassununga – SP.

Garanhão Nº	Colheitas n	Embriões recuperados	
		n	%*
1	35	10	28,6 ^a
2	40	26	65,0 ^b
3	54	34	62,9 ^b
4	15	10	66,7 ^{ab}
8	19	16	84,2 ^b
Total	163	96	58,9

* Letras diferentes indicam valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Tabela 2

Número de colheitas e embriões recuperados, segundo o garanhão utilizado (Ano hípico 96/97). Pirassununga – SP.

Garanhão Nº	Colheitas n	Embriões recuperados	
		n	%
1	36	16	44,4
2	16	09	56,2
3	42	30	71,4
9	19	14	73,7
Total	113	69	61,1

Tabela 3

Número de embriões transferidos e índices de prenhez, segundo o garanhão utilizado (Ano hípico 95/96). Pirassununga – SP.

Garanhão Nº	Embriões transferidos n	Prenhez (receptoras)	
		n	%
1	10	05	50,0
2	26	21	80,7
3	34	24	70,6
4	10	07	70,0
8	16	10	62,5
Total	96	67	69,8

Tabela 4

Número de embriões transferidos e índices de prenhez, segundo o garanhão utilizado (Ano hípico 96/97). Pirassununga – SP.

Garanhão Nº	Embriões transferidos n	Prenhez	
		n	%
1	16	12	75,0
2	09	05	55,6
3	30	26	86,7
9	14	10	71,4
Total	69	53	76,8

Tabela 5

Número de colheitas, de embriões transferidos e índices de prenhez, segundo a técnica de inseminação utilizada (Ano hípico 96/97). Pirassununga – SP.

Técnica reprodutiva	Colheitas n	Embriões transferidos ¹		Prenhez ²	
		n	%	n	%
M.N.	16	08	50,0	07	87,5
I.A.F.	94	57	60,6	42	73,7
I.A.R.	47	30	63,8	25	80,3
Total	157	95	60,1	74	77,9

M.N. = monta natural; I.A.F. = inseminação artificial com sêmen fresco; I.A.R. = inseminação artificial com sêmen resfriado.

Os números de embriões transferidos e os índices de prenhez obtidos, com as técnicas de inseminação testadas são mostrados na Tab. 5, não tendo havido diferença significativa ($p > 0,05$) entre as técnicas utilizadas.

DISCUSSÃO

A influência do garanhão sobre os índices de recuperação de embriões obtidos no ano hípico 95/96, está de acordo com os resultados citados por Woods e Steiner¹⁰, que obtiveram índices de 29, 63 e 93% de recuperação embrionária, após usarem sêmen resfriado de três garanhões; Douglas², que obteve 36

e 72% de recuperação embrionária com doadoras submetidas a monta natural utilizando dois garanhões são semelhantes aos obtidos por McKinnon e Squires⁴, que usaram garanhões com características seminais normais. Resultados diferentes dos obtidos no ano hípico 95/96 foram relatados por Squires et al.⁸, os quais não observaram influência do garanhão sobre os índices de recuperação embrionária. Os trabalhos apontados pela literatura são poucos e os resultados deste experimento parecem indicar que os garanhões representam um fator importante para o sucesso dos programas de transferência. As diferenças nos índices de fertilidade sugerem a influência de características biológicas ainda não conhecidas com relação ao sêmen e a sua capacidade para fertilização dos oócitos.

Os resultados obtidos nos anos hípicos quanto aos índices de prenhez das receptoras em relação aos garanhões testados são semelhantes aos apontados por Douglas-Hamilton et al.¹, que, ao avaliarem o sêmen diluído e resfriado de três garanhões, obtiveram motilidade progressiva de 52,51% e 67% com índices de prenhez de 73,73 e 58%, respectivamente, não havendo diferenças significativas ($p > 0,05$) tanto na motilidade progressiva como na taxa de gestação. Squires et al.⁸ obtiveram diferenças significativas ($p < 0,10$) na taxa de recuperação embrionária durante o ano de 1981, quando realizaram inseminação artificial com sêmen fresco (78%) ou diluído com leite desnatado (67%) em relação aos 48% obtidos com sêmen diluído com EDTA-Lactose.

CONCLUSÕES

Com base nos fatores estudados que possam influenciar a taxa de gestação após a transferência transcervical de embriões em equinos da raça Mangalarga, pode-se concluir que: 1- Deverão ser dispensados cuidados especiais aos garanhões nos programas de transferência de embriões, pois estes podem influenciar a taxa de recuperação de embriões de doadoras, constatados pela significância ($p < 0,05$) no ano hípico de 95/96 e pela forte tendência ($p = 0,057$) no ano hípico 96/97; 2- O garanhão não mostrou influência sobre as taxas de prenhez das receptoras; 3- A monta natural e a inseminação artificial com o sêmen fresco ou refrigerado proporcionam bons resultados, tanto na recuperação de embriões quanto nos índices de prenhez.

SUMMARY

Many factors can affect pregnancy rates after equine embryo transfer. This study had the objective of evaluating the influence of stallion and of three different insemination techniques (natural breed, artificial insemination with fresh or cold semen), on pregnancy and on embryos recovery rates. In the first year, differences were observed ($p < 0.05$) in embryo recovery rates among the five stallions studied (28.6, 65.0, 62.9, 66.7 and 84.2%), but no statistical differences ($p > 0.05$) were detected in pregnancy rates (50.0, 80.7, 70.6, 70.0 and 62.5%). In the second year, it was observed a tendency to statistical significance ($p = 0.057$) in embryos recovery rates between the stallions (44.4, 56.2, 71.4 and 73.7%), and no statistical differences ($p > 0.05$) were detected in pregnancy rates (75.0, 55.6, 86.7 and 71.4%). There were no statistical difference ($p > 0.05$) in the number of embryos transferred and in pregnancy rates comparing natural breed (50.0 and 87.5%) and artificial insemination with fresh (60.6 and 73.7%) or cold semen (63.8 and 80.3%).

UNITERMS: Equine; Embryo transfer; Mangalarga; Pregnancy.

REFERÊNCIAS

- 1- DOUGLAS-HAMILTON, D. A.; OSOL, R. G.; DRISCOLL, D.; NOBLE, H. A field study of the fertility of transported equine semen. **Theriogenology**, v. 22, n. 3, p. 291-304, 1984.
- 2- DOUGLAS, R. H. Review of induction of superovulation and embryo transfer in the equine. **Theriogenology**, v. 11, n. 1, p. 33-46, 1979.
- 3- KENNEY, R. M.; BERGMAN, R. V.; COOPER, W. L.; MORSE, G. W. Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings. **Proceedings of the American Association of Equine Practitioners**, p. 327-336, 1975.
- 4- MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L. Equine embryo transfer. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 4, n. 2, p. 305-333, 1988a.
- 5- MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L. Morphologic assessment of equine embryo - a review. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 192, n. 3, p. 4016, 1988b.
- 6- RYAN Jr., T. A.; JOINER, B. F.; RYAN, B. F. **Minitab reference manual**. Pennsylvania : Statistics Department, Pennsylvania State University, 1981.
- 7- SQUIRES, E. L.; COOK, V. M.; VOSS, J. L. Collection and transfer of equine embryos. **Animal Reproduction Laboratory**, v. 1, p. 38, 1985.
- 8- SQUIRES, E. L.; IMEL, K. J.; IULIANO, M. F.; SHIDELER, R. K. Factors affecting reproductive efficiency in equine embryo transfer program. **Journal of Reproduction and Fertility**, p. 409-414, 1982a. Supplement 32.
- 9- SQUIRES, E. L.; IULIANO, M. F.; SHIDELER, R. K. Factors affecting the success of surgical and non-surgical equine embryo transfer. **Theriogenology**, v. 17, n. 1, p. 35-41, 1982b.
- 10- WOODS, G. L.; STEINER, J. V. Embryo transfer from mares in athletic competition. **Cornell Veterinarian**, v. 76, n. 2, p. 149-155, 1986.

Recebido para publicação: 15/06/1998

Aprovado para publicação: 02/07/2001