

Transferência de embriões em caprinos: protocolos e ferramentas visando uma maximização reprodutiva

Caprine embryo transfer: tools and protocols for a maximum reproductive performance

Gustavo Ferrer Carneiro

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Garanhuns,
CEP 55296-901 Garanhuns, PE, Brasil
E-mail: gustavo@uag.ufrpe.br

Resumo

A caprinocultura apresenta-se em franca expansão demonstrando um grande potencial para o desenvolvimento sócio-econômico dos Países em desenvolvimento. Para isso, é necessária uma organização da cadeia produtiva. A boa adaptação dos animais a um clima adverso, associado ao baixo nível de colesterol na carne faz dessa espécie um atrativo econômico bastante interessante para os produtores do semi-árido. Para que haja um aumento da produtividade, urge-se a utilização de biotecnologias agregadas ao melhoramento genético. A popularização de técnicas como sincronização de estro e ovulação, inseminação artificial (IA) com sêmen fresco ou congelado e transferência de embriões (TE) pode proporcionar esse ganho genético em um curto espaço de tempo. A colheita e inóculo de embriões pela técnica transcervical trata-se de metodologias não invasivas que apresenta resultados altamente favoráveis. Dispensa a utilização de aparato cirúrgico e pode representar uma forma exequível de maximização do potencial genético da fêmea caprina sem a necessidade de grandes investimentos, aumentando dessa forma a eficiência produtiva e incrementando o desenvolvimento de regiões desfavorecidas.

Palavras-chave: caprino, TE, transcervical.

Abstract

The goat business is in expansion, particularly in developing countries. To reach this goal, it is necessary an organization of the agribusiness. The easy adaptation to unfavorable weather associated to low cholesterol profile in the goat meat makes this segment an economic attraction for the agribusiness in semi-arid areas. The increase in productivity demands the use of biotechnology. The popularization of byotechniques such as estrous synchronization, artificial insemination (AI) with fresh or frozen semen and Embryo Transfer (ET) can offer this genetic improvement in a short time. The embryo collection and transfer using the transcervical technique, without necessity of surgery apparatus, gives an opportunity to generate a genetic gain by a non-invasive methodology with good results. The use of these techniques can accelerate the production and technological advances in this specie with a low budget, increasing therefore the productivity and the development of unfavorable regions.

Keywords: AI, caprine, ET, transcervical.

Introdução

O desenvolvimento da caprino-ovinocultura vem apresentando um ciclo de crescimento mundial. Esse crescimento foi intensificado, sobretudo nos países em desenvolvimento nos últimos anos que são detentores dos maiores rebanhos. Segundo dados do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) o rebanho de caprinos cresceu 18,5% no Brasil de 1997 a 2007. Projeta-se um crescimento da ordem de 5 vezes o rebanho atual nos próximos 20 anos multiplicando o rebanho atual em mais de 50 milhões de cabeças (Fonseca, 2005). Dentro dessa perspectiva, há uma necessidade da aplicação de técnicas de reprodução assistida com o objetivo de aumentar a eficiência reprodutiva e produtiva do rebanho para que possa haver um aproveitamento mais eficiente dos genótipos utilizados.

As técnicas de reprodução assistida como inseminação artificial (IA) e transferência de embriões (TE) foram introduzidas na indústria caprina e ovina com o objetivo principal de possibilitar a multiplicação de indivíduos geneticamente superiores. Permite ainda a redução do intervalo entre gerações por possibilitar a colheita de embriões de fêmeas caprinas jovens e pré-púberes (Salles *et al.*, 2000).

Tratamento superovulatório

Uma das barreiras e frustrações para a eficiência do tratamento superovulatório diz respeito à variabilidade individual da doadora em relação à eficiência das gonadotrofinas exógenas no recrutamento, crescimento, maturação e ovulação dos folículos (Cognié *et al.*, 2003). A partir de estudos com ultra-sonografia (Gonzales-Bulnes *et al.*, 2002) e endoscopia (Brebion *et al.*, 1992) observou-se que a variabilidade de resposta

está intimamente relacionada com a presença de folículos antrais (2-3 mm) nos ovários e que os resultados negativos no número de embriões transferíveis é diretamente afetado pela presença de grandes folículos (> 6 mm) quando do início do tratamento superovulatório (Cognié *et al.*, 2003). Cognié *et al.* (2003) destacam o uso de agonistas e antagonistas do hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH) associado ao progestágenos com o objetivo de suprimir a liberação endógena destas gonadotrofinas. Dessa forma, esse grupo testou um pré-tratamento de 2 semanas com um agonista (Buserelina, 40 µg/dia, Receptal®) ou 10 dias com um antagonista (Antarelix, 0.5 mg/dia, Teverelix®). Os resultados demonstraram uma diminuição dos folículos maiores, um aumento no número dos folículos menores e um conseqüente aumento na resposta do FSH em até 50% (Brebion *et al.*, 1992; Cognié, 1999).

Um outro problema a ser transposto diz respeito a incidência de regressão luteínica precoce em cabras superovuladas interferindo negativamente na taxa de recuperação embrionária e na qualidade e viabilidade dos embriões (Simplicio e Santos, 2000). Esta regressão precoce dos corpos lúteos pode ser prevenida com a utilização de inibidores da síntese de prostaglandina (Traldi *et al.*, 1995a, b; Salles *et al.*, 1996). A utilização dessas drogas no dia da ovulação e no dia da recuperação embrionária permite uma redução considerável na regressão prematura de CL (Battye *et al.*, 1988) e um aumento no número de embriões transferíveis por fêmea tratada (Traldi, 1995).

Colheita dos embriões

A técnica de colheita dos embriões pode ser realizada através da via cirúrgica, por laparotomia ou laparoscopia ou não cirúrgica pela via transcervical (Oliveira 1992; Ishwar e Memon, 1996; Lima *et al.*, 1996; Pinheiro *et al.*, 1996; Gonzalez *et al.*, 2002). Os procedimentos cirúrgicos são técnicas invasivas o que compromete a vida reprodutiva da doadora e limita a possibilidade de repetidas colheitas, em virtude da ocorrência de aderências (Pinheiro *et al.*, 1996). A via transcervical para a recuperação de embriões vem sendo largamente utilizada no Brasil desde a demonstração da permeabilidade da cérvix caprina por Robert Bondurant em 1984 e posteriormente diversos autores vem aprimorando essa técnica (Pereira *et al.*, 1991; Oliveira, 1992; Pinheiro *et al.*, 1996; Lima, 1997). Pereira *et al.* (1998) descreveram a técnica transcervical para a recuperação de embriões em caprinos, com a fêmea em estação, sem administração de medicamentos anestésicos além da aplicação de prostaglandina F2 alfa e ocitocina 16 horas antes do início da colheita com o intuito de aumentar a miocontratibilidade uterina facilitando assim a recuperação embrionária. A taxa de recuperação embrionária foi 91,0%. Salles (2001) desenvolveram posteriormente uma técnica transcervical de colheita de embriões em cabras em circuito fechado (Fig. 1), permitindo um fluxo contínuo, prático e asséptico utilizando-se uma média de 100ml de solução tamponada (PBS) por corno uterino, minimizando a contaminação ou perda dos embriões recolhidos. Em um programa comercial de transferência de embriões em caprinos nos anos de 2007 e 2008 adotando-se o método do circuito fechado realizamos a lavagem de 114 cabras da raça Bôer, recuperando 1104 estruturas, com média de 9,68 por animal (Carneiro, 2008). É realizada anestesia epidural com 3 mL de lidocaína para uma melhor contenção do animal, facilitando a colocação do espéculo e tracionamento cervical. O material utilizado na colheita transcervical (Fig. 1) é simples e de fácil manuseio: um espéculo tipo bico de pato (IMV) para a localização da cérvix, 2 pinças de Allis para um leve tracionamento da cérvix. Este tracionamento tem por objetivo alongar a cérvix alinhando os anéis e facilitando a passagem da sonda nasogástrica humana n. 10 conectada a um mandril para direcionar a lavagem de cada corno uterino por vez. Utilizamos a colocação de 40 mL PBS deixando retornar o fluido, medindo a quantidade de fluido do retorno, repetindo essa operação por 3 vezes (120 mL por corno uterino). Esse fluido desemboca diretamente em um filtro miliporado para posteriormente levar esse fluido a uma placa de Petri para a procura dos embriões.



Figura 1. Circuito fechado utilizado na coleta transcervical.



Figura 2. Material para coleta transcervical.

Inovulação

A técnica mais utilizada é de semi-laparoscopia, que permite a avaliação dos ovários, a exposição de pequena parte do corno uterino ipsilateral ao ovário responsivo ao tratamento de sincronização, ou seja, contendo um corpo lúteo funcional, e a transferência dos embriões contidos em Unopette® acoplado a uma seringa de 1ml (Fig. 3). A utilização da inovulação dos embriões também por via transcervical abre uma possibilidade prática de manejo reprodutivo que ficará mais facilmente ao alcance do pequeno produtor, além de minimizar custos ou riscos pela utilização de anestesia nas receptoras. Alguns trabalhos tem sido citados após a inovulação transcervical. Flores-Foxworth *et al.* (1992) reportaram 38,9% de prenhez. Agrawal e Bhattacharyya (1982), ao fazerem a inovulação pela via transcervical, conseguiram 42,9% de prenhez e uma sobrevivência embrionária de 11,8%. Já Otsuki e Soma (1964) descrevem 14,3% de partos ao fazerem, também, a inovulação pela via transcervical, enquanto Lin *et al.* (1979) alcançaram 62,5% de prenhez e uma sobrevivência embrionária de 54,5% ao inovularem 11 mórulas, através da cérvix, para oito receptoras. O grande inconveniente é a incapacidade de identificar qual o ovário que detém a presença do corpo lúteo, entretanto os autores envolvidos, citaram a colocação do embrião imediatamente no corpo uterino.



Figura 3. Material necessário para inovulação.

Criopreservação dos embriões

A criopreservação dos embriões associada a TE permite uma série de vantagens de manejo transferindo durante um período mais adequado ou com melhor disponibilização de receptoras em caso de haver um excedente de embriões ou uma quantidade limitada de receptoras, além de favorecer a exportação desse material genético. Esse transporte embrionário, possibilita ainda uma redução nos riscos de introdução ou disseminação de doenças indesejáveis. Entre as metodologias utilizadas para a criopreservação de embriões caprinos predomina o processo lento, mais conhecido como método clássico (Baril, *et al.*, 1989; Le Gal, *et al.*, 1993), no qual utiliza-se uma curva de aproximadamente uma hora até atingir a temperatura de $-35,0^{\circ}\text{C}$, quando os embriões são imersos diretamente no nitrogênio líquido a $-196,0^{\circ}\text{C}$. Embriões caprinos nos estádios mais avançados de desenvolvimento, isto é, blastocisto, blastocisto expandido suportam melhor o processo de congelamento e descongelamento, em relação aos embriões nos estádios de mórula e mórula compacta (Chemineau *et al.*, 1986; Rao *et al.*, 1988; Li *et al.*, 1990; Pegoraro-Rumpf, 1992; Fiéni *et al.*, 1995; Nowshari e Holtz, 1995). A



vitrificação, método que consiste em expor o embrião em altas concentrações do crioprotetor e subsequente imersão direta no nitrogênio líquido passa a ser uma tecnologia que aumentará a praticidade do método a um custo mais baixo pois dispensa a utilização das máquinas de congelamento, que controla a curva de congelamento precisamente, e requer um menor tempo operacional favorecendo assim a viabilidade do embrião e reduzindo os custos para facilitar ainda mais para o pequeno produtor. Traldi *et al.* (1997) relatou resultados semelhantes entre vitrificação e o método clássico, reportando taxas de prenhez de 75,0% Simplicio *et al.* (1999), descreveram uma taxa de parto de 58,9% após inovulação de embriões vitrificados e descongelados conforme descrita por Salles *et al.* (1996). El Gayar e Holtz (2001) descreveram taxa de prenhez de 100% (14 prenhez de 14 receptoras inovuladas) e taxa de nascimento de 93% (13 cabritos nascidos) em embriões caprinos vitrificados utilizando-se a técnica de Open Pulled Straw (OPS).

Conclusões

Apesar dos avanços na produção embrionária e biotecnologias aplicadas a caprinocultura, os custos envolvidos nessas técnicas tornam-se fatores limitantes para os pequenos produtores. A utilização da técnica transcervical para a colheita e inovulação dos fornece uma possibilidade prática de manejo reprodutivo a um custo baixo e com redução nos riscos. A otimização destas técnicas através de futuras pesquisas, levará a um desenvolvimento sustentável em regiões desfavoráveis.

Referências

- Agrawal KP, Bhattacharya NK.** Non-surgical transplantation of embryos in goats. *In: International Conference on Goats Production and Disease*, 3, 1982, Tucson, Arizona, USA. *Proceedings...* Tucson: University of Arizona, College of Agriculture, 1982. p.340. (Abstract).
- Baril G, Casamitjana P, Perrin J, Vallet JC.** Embryo production, freezing and transfer in Angora, Alpine and Saanen goats. *Zuchthygiene*, v.24, p.101-115, 1989.
- Battye KM, Fairclough RJ, Cameron AWN, Trounson AO.** Evidence for prostaglandin involvement in early luteal regression of the superovulated nanny goat (*capra hircus*). *J Reprod Fertil*, v.84, p.425-430, 1988.
- Bondurant RH, Skirrow S, Anderson GB.** Nonsurgical collection of blastocysts from dairy goats. *Theriogenology*, v.24, p.423, 1984.
- Brebion P, Baril G, Cognié Y, Vallet JC.** Transfert d'embryons chez les ovins et les caprins. *Ann Zootech*, v.41, p.331-339, 1992.
- Carneiro GF.** Biotécnicas da reprodução assistida em pequenos ruminantes. *Tecnol. Cien Agropec*, v.2, p.23-28, 2008.
- Chemineau P, Procureur R, Cognié Y, Lefèvre PC, Locatelli A, Chupin D.** Production, freezing and transfer of embryos from a bluetongueinfected goat herd without bluetongue transmission. *Theriogenology*, v.26, p.279-289, 1986.
- Cognié Y.** State of art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*, v.51, p.105-116, 1999.
- Cognié Y, Baril G, Poulin N, Mermillod P.** Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*, v.59, p.171-188, 2003.
- El Gayar M, Holtz W.** Vitrification of goat embryos by the open pulled-straw method. *J Anim Sci*, v.79, p.2436-2438, 2001.
- Fiéni F, Beckers JP, Buggin M, Bruyas JF, Perrin J, Daubié M, Tainturier D.** Evaluation of cryopreservation techniques for goats embryos. *Reprod Nutr Dev.*, v.35, p.367-373, 1995.
- Flores-Foxworth G, MsBride BM, Kraemer DC, Nuti LCA.** A comparison between laparoscopic and transcervical embryo collection and transfer in goats. *Theriogenology*, v.37, p.213, 1992. (Abstract).
- Fonseca, JF.** Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. *In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*, 16, 2005, Goiânia, GO. *Anais...* Goiânia: CBRA, 2005. CD-ROM.
- Gonzales-Bulnes A, Santiago-Moreno J, Cocero MJ, Souza CJH, Groome NP, Garcia-Garcia RM.** Measurement of inhibin-A and follicular status predict the response of ewes to superovulatory FSH treatments. *Theriogenology*, v.57, p.1263-1272, 2002.
- Gonzalez CIM, Soares AT, Cunha MGG.** Protocolo para superovulação de ovelhas Santa Inês no semi-árido da Paraíba. *In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, 2002, Recife. *Anais ... Recife: SBZ*, 2002. v.3, p.801-803.
- Ishwar AK, Memon MA.** Embryo transfer in sheep and goats: a review. *Small Rumin Res*, v.19, p.35-43, 1996.
- Le Gal F, Baril G, Vallet JC, Leboeuf B.** *In vivo* and *in vitro* survival of goat embryos after freezing with ethylene glycol or glycerol. *Theriogenology*, v.40, p.771-777, 1993.
- Li R, Cameron WN, Batt PA, Trounson, AO.** Maximal survival of frozen goat embryos is attained at the expanded, hatching and hatched blastocyst stages of development. *Reprod Fertil Dev*, v.2, p.345-350, 1990.
- Lima FRG.** Uso de diferentes tratamentos hormonais para sincronização do estro em cabras nativas do Nordeste do Brasil. *Rev Bras Reprod Anim*, v.21, p.136-137, 1997.



- Lima PF, Oliveira MAL, Guerra MMP.** Eficiência de diferentes métodos de colheita embrionária em caprinos (resultados preliminares). *Rev Bras Reprod Anim*, v.20, p.63-68, 1996.
- Lin A, Lee K, Chang S, Lee P.** Non-surgical embryo transfer in goats. *Memoirs of the College of Agriculture: National Taiwan University*, v.19, p.25-33, 1979.
- Nowshari MA, Holtz W.** *In vitro* culture of goat morulae to blastocysts before freezing. *Theriogenology*, v.44, p.983-988, 1995.
- Oliveira VS.** *Efeitos do hormônio folículo estimulante (FSH) e da gonadotrofina da menopausa humana (hMG) como agentes superovulantes em cabras (capra hircus Linnaeus, 1758) utilizadas em transferência de embriões.* 1992. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 1992.
- Otsuki K, Soma T.** Transfer of fertilized ova through the cervix in goats. *Bull Nat Inst Anim Ind*, v.6, p.27-33, 1964.
- Pegoraro-Rumpf LM, Bem AR, Rumpf R, Peixer MAS, Deschamps JC.** Comparação de diferentes crioprotetores na congelação de embriões caprinos. *In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões*, 7, 1992, Jaboticabal, SP. *Anais...* Jaboticabal, SP: SBTE, 1992. p.95.
- Pereira RJTA, Lima PF, Wischral A.** Colheita de embriões caprinos por via transcervical. *In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*, 9, 1991, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: CBRA, 1991. v.2, p.314. (Resumo).
- Pereira RJTA, Sohnrey B, Holtz W.** Nonsurgical embryo collection in goats treated with prostaglandin F2 α and oxytocin. *J Anim Sci*, v.76, p.360-363, 1998.
- Pinheiro AA, Salles HO, Simplicio AA.** Dose de hormônio folículo estimulante (FSH) suíno capaz de induzir superovulação em caprinos. *In: RELATÓRIO Técnico do Centro Nacional de Caprinos*. Sobral, CE: Embrapa Caprinos, 1996. p.116-117.
- Rao VH, Sarmah BC, Agrawal KP, Ansari MR, Bhattacharyya NK.** Survival of goat embryos frozen and thawed rapidly. *Anim Reprod Sci*, v.16, p.261-264, 1988.
- Salles HO.** Circuito fechado para a colheita de embriões em caprinos. 2001. Disponível em: <http://www.ruralnet.com.br/artigos>.
- Salles HO, Santos DO, Simplicio AA.** Superovulação em fêmeas caprinas pré-púberes e púberes da raça Anglo-Nubiana. *Ciênc Anim*, v.10, supl.1, p.137-138, 2000.
- Salles HO, Soares AT, Moura Sobrinho PA, Moraes MAJ, Andrioli-Pinheiro A, Azevedo HC.** Redução do número de aplicações do flunixin meglumine no controle da regressão pré-matura de corpos lúteos em cabras superovuladas. *In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária*, 24, 1996, Goiânia, GO. *Anais ...* Goiânia: Sociedade Goiana de Veterinária, 1996. p.113-114.
- Simplicio AA, Santos DO.** Transferência de embriões em caprinos no Brasil: Estádio atual e perspectivas. *In: I Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte*, 1, 2000, João Pessoa, PB. *Anais ...* João Pessoa: Simpósio, 2000. p.169-182.
- Simplicio AA, Santos DO, Souza TEF, Wanderley AAD.** Inovulação a fresco e após criopreservação de embriões caprinos produzidos *in vivo* em fêmeas pré-púberes e púberes. *Arq Fac Vet UFRGS*, v.27, p.318, 1999.
- Traldi AS.** *Superovulação com gonadotrofina da menopausa humana (hMG) e prevenção da regressão prematura dos corpos lúteos em caprinos.* São Paulo, 1995. 154f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, 1995.
- Traldi AS, Leboeuf B, Pougard JL, Baril G, Mermillod P.** Vitriificação: método alternativo para a criopreservação de embriões caprinos produzidos *in vitro*. *In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões*, 25, 1997, Foz do Iguaçu. *Anais...* Foz do Iguaçu, SBTE, 1997. p.312.
- Traldi AS, Visintin JÁ, Mizuta K, Dela Libera AMP.** Utilização de antiprostaglandínico na prevenção da regressão prematura de corpos lúteos em caprinos. *In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*, 11, 1995, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1995. p.244.
-