



Transferência de embriões como ferramenta para formação de rebanho experimental ovino e análise dos fatores que podem maximizar a multiplicação do plantel

Embryo transfer as a tool to experimental sheep flock formation and stock multiplication factors analyses

H. Rizzo^{1,8}, D. François², T. Fassier³, E. Guitton⁴, G. Baril⁵, J. Cognié⁵, A. Fatet⁵, F. Guignot⁵, P. Mermillod⁵, J.P. Petit⁵, J.F. Beckers⁶, B. Remy⁶, G. Foucras⁷, G. Meyer⁷

¹Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

²Station d'Amélioration Génétique des Animaux, INRA, Toulouse, França.

³Domaine de La Sapinière, INRA, Bourges, França.

⁴Plate-forme d'Infectiologie Expérimentale, INRA, Nouzilly, França.

⁵Physiologie de la Reproduction et des Comportements, INRA, Nouzilly, França.

⁶Faculté de Médecine Vétérinaire de l'Université de Liège, Liège, Bélgica.

⁷Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Toulouse, França.

⁸Correspondência: hubervet@gmail.com

Resumo

Visando ao aumento do plantel de ovinos da raça Black Belly na estação experimental do Institut Scientifique de Recherche Agronomique (INRA) de Bourges, França, foram utilizadas 32 ovelhas da raça Black Belly superovuladas com FSH suíno nos últimos três dias de tratamento progesterógeno de 14 dias. Após coleta cirúrgica, obtiveram-se 264 embriões transferíveis ($8,2 \pm 6,0$ /doadoras), sendo transferidos 232 a 88 receptoras da raça Romane pluríparas e 23 da raça Suffolk nulíparas. As taxas de parição e de sobrevivência embrionária foram 83,6 e 63%, respectivamente, sendo os melhores resultados observados em receptoras da raça Romane pluríparas do que nas nulíparas da raça Suffolk. O número de ovulações, de embriões transferidos e o estágio de desenvolvimento embrionário causaram efeito sobre a taxa de sobrevivência embrionária. As melhores taxas de parição e de sobrevivência embrionária foram obtidas de receptoras com mais de duas ovulações que receberam dois embriões no estágio de blastocisto.

Palavras-chave: nulíparas e múltiparas, ovinos, sobrevivência embrionária, transferência de embriões.

Abstract

With the purpose of increase the breeding of Black Belly sheep breed at the experimental station of the Institut Scientifique de Recherche Agronomique (INRA), Bourges, France, thirty-two Black Belly sheep were super ovulated with swine FSH on the last three days of a progesterone treatment. After surgical collect 264 embryos transferable were recovered (8.2 ± 6.0 / donor) and 232 were transferred to 88 multiparous Romane sheep receptors and 23 nulliparous Suffolk sheep. Birth rate and survival rate were 83.6 and 63% respectively, though the results form multiparous Romane sheep receptors were better than from nulliparous Suffolk sheep. The ovulations number, transferred embryos and development stage had an effect on embryo survival rate. The best birth and embryo survival rates were from receptors that had more than two ovulations and had two embryos implanted at the stage of blastocyst.

Keywords: embryo survival, embryo transfer, nulliparous and multiparous, ovine.

Introdução

Na espécie ovina, a transferência de embriões é geralmente aplicada com fins de ordem genética, sanitária, comercial ou para conservação da biodiversidade. Este método de reprodução assistida pode ser aplicado para multiplicar rapidamente um rebanho ou um genótipo formado por poucos indivíduos.

Alguns fatores podem influenciar nas taxas de sobrevivência embrionária e de parição. Os relacionados aos embriões transferidos são o estágio de desenvolvimento (mórula, blastocisto e blastocisto expandido), onde se observam melhores resultados na transferência de blastocistos em relação a mórulas, o uso de frescos em relação a vitrificados ou criopreservados e o número de transferidos (Széll e Hudson, 1991; McMillan e Hall, 1994; Papadopoulos et al., 2002; Bari et al., 2003). As receptoras ovinas influenciarão de acordo com número de ovulações apresentado no momento da transferência (Széll e Hudson, 1991; Bari et al., 2003) idade, parições (Bari et al., 2003) e raça, onde as de alta prolificidade como a raça Romane (INRA 401), que é uma raça sintética desenvolvida pelo L'institut National de Recherche Agronomique da França, originária do cruzamento da raça Romanov com a raça Berrichon du Cher, poderão apresentar melhores índices (Ricoardeau et al., 1992). São relatados, ainda, a época do ano de realização do protocolo de sincronização e o tratamento hormonal (FSH x



eCG) utilizado (Chagas e Silva et al., 2003), entre outros.

Atualmente é desenvolvido na França, com a raça Black Belly, originária de Barbados, no Caribe, um programa de estudo da infecção do vírus da febre catarral maligna ovina sorotipo 8 (Bluetongue), denominado BTV-infect. Não será possível a realização deste estudo sem a formação de rebanho de ovinos da raça com grande diversidade genética e quantidade suficiente de indivíduos. A fim de multiplicar o número de indivíduos e a variabilidade genética necessária à realização do estudo, foi realizado um programa de transferência de embriões, cujos resultados aqui são descritos, a partir de fêmeas pertencentes ao único rebanho francês da raça Black Belly instalado no centro INRA da cidade de Bourges.

Material e Métodos

O programa de coleta e transferência de embriões foi realizado ao término da estação sexual ovina na França, final de janeiro de 2009. Foram utilizadas como doadoras de embriões 32 ovelhas pluríparas da raça Black Belly, pesando de 40 a 45 quilos. O rebanho de receptoras foi formado por 115 ovelhas, sendo 91 pluríparas da raça Romane e 24 nulíparas da raça Suffolk. Todas as fêmeas pluríparas selecionadas haviam parido a menos de um ano e a mais de três meses antes da coleta e transferência de embriões.

A sincronização do estro das doadoras de embriões foi obtida com implantes vaginais de esponjas impregnadas com 20 mg de acetato de fluorogestona (Chronogest®, Intervet, Angers, França) durante 14 dias. O tratamento superovulatório foi realizado como descrito por Cognié et al. (1986), utilizando-se 20 mg de FSH suíno (Universidade de Liège, Bélgica), divididos em seis aplicações intramusculares decrescentes (5-5-3-3-2-2 mg), em intervalos de 12 horas nos últimos três dias do tratamento progestágeno. Foram adicionadas as duas últimas aplicações de FSH suíno, 67 e 90 µg de LH sún o (Universidade de Liège, Bélgica), respectivamente. A inseminação intrauterina foi realizada por laparoscopia 54 a 56 horas após a retirada da esponja vaginal, com sêmen congelado (200×10^6 espermatozoides/doadora) proveniente de sete reprodutores da raça Black Belly que inseminaram de três a cinco fêmeas cada um. As fêmeas doadoras de embriões não receberam tratamento luteolítico após a coleta, com o objetivo de se maximizar o número de nascimentos.

As receptoras receberam o mesmo tratamento progestágeno realizado nas doadoras, e a superovulação foi realizada mediante uma aplicação de eCG (Chronogest®, Intervet, Angers, França) no momento da retirada da esponja. A dose aplicada foi de 350 UI para as fêmeas Romane e 500 UI para as da raça Suffolk.

A coleta de embriões foi realizada por laparotomia segundo Baril et al. (1993), seis dias após inseminação intrauterina. As doadoras foram anestesiadas com 1 g de tiopental a cada 50 kg de peso vivo intravenoso e, em seguida, entubadas com isoflurano a 5%. Após a coleta, os embriões foram selecionados morfológicamente e mantidos em meio de conservação embrionária (Embryo Holding Medium®, IMV Technologies, L'Aigle, França) até o momento da transferência ou da criopreservação por vitrificação em palhetas segundo Guignot et al. (2006). A transferência de embriões foi realizada por laparoscopia, no máximo, 30 minutos após a coleta, com as receptoras sedadas, utilizando-se 0,11 mg/Kg de xilazina a 2%, seguido de 5,5 mg/kg de ketamina, ambos intra-venoso. Foram transferidos dois ($n = 97$) e, em alguns casos, um ($n = 2$) ou três ($n = 12$), embriões por receptora ao estágio de mórula a blastocisto expandido no corno uterino ipsilateral ao ovário que apresentou ao menos um corpo lúteo funcional.

Resultados

Todas as doadoras apresentaram resposta ao tratamento superovulatório, com uma variabilidade de quatro a 21 ovulações e média de $13,9 \pm 4,9$. A taxa de ovos coletados (oócitos e embriões) e a de clivados (embriões) foram, respectivamente, de 75,1% (335/446) e 80,9% (271/335). A taxa de clivagem em função do reprodutor utilizado no momento da inseminação intrauterina variou significativamente de 58,7 a 100% ($P < 0,001$).

Obteve-se média de embriões transferíveis de $8,2 \pm 6,0$ (264) por doadora; 232 foram transferidos imediatamente após a coleta, sendo que 46 em 23 receptoras Suffolk e 186 em 88 receptoras Romana; 24 foram vitrificados; e oito não foram utilizados.

Em quatro das 115 fêmeas receptoras, não foi possível a realização da transferência de embriões, pois duas não ovularam e as demais apresentaram aderência de cornos uterinos observada no momento da laparoscopia.

O número de ovulações de receptoras pluríparas da raça Romane ($2,25 \pm 0,69$) foi significativamente mais elevado que o observado nas receptoras nulíparas da raça Suffolk ($1,26 \pm 0,45$), $P < 0,001$. O resultado da transferência embrionária em uma das receptoras da raça Romane não é conhecido, pois ela veio a óbito durante a gestação.

Dentre as 110 receptoras, 92 pariram, produzindo 145 cordeiros (80 fêmeas e 65 machos), ou seja, uma taxa de parição (receptoras que pariram/receptoras transferidas $\times 100$) de 83,6% e taxa de sobrevivência embrionária (cordeiros nascidos/embriões transferidos $\times 100$) de 63%. A taxa de parição foi significativamente



superior nas receptoras pluríparas Romane (88,5%) que nas nulíparas Suffolk (65,2%), $P = 0,007$. Uma tendência similar foi observada na taxa de sobrevivência embrionária, com valores de 65,8 e 52,2% para Romane e Suffolk, respectivamente ($P = 0,088$; Tab. 1).

Tabela 1. Taxas de parição e sobrevivência embrionária de acordo com número de ovulações, raça e número de partos da receptora.

Número ovulações	Romane pluríparas		Suffolk nulíparas		Total	
	Taxa Parição	Sobrevivência embrionária	Taxa parição	Sobrevivência embrionária	Taxa parição	Sobrevivência embrionária
> 2	100% ^a (26)	76,4% ^a (55)	-	-	100% ^a (26)	76,4% ^a (55)
= 2	84,9% ^b (53)	61,6% ^a (112)	83,3% ^a (6)	58,3% ^a (12)	84,7% ^b (59)	61,3% ^b (124)
= 1	75% ^b (8)	58,8% ^a (17)	58,8% ^a (17)	50% ^a (34)	64% ^b (25)	52,9% ^b (51)
Total	88,5% (87)	65,8% (184)	65,2% (23)	51,2% (46)	83,6% (110)	63% (145/230)

() Número de receptoras ou de embriões.

A média de cordeiros produzidos foi de $4,67 \pm 3,7$ cordeiros/doadora Black Belly, sendo que 145 paridos por receptoras e quatro por doadoras de embriões. Os 149 cordeiros foram obtidos de 28/32 doadoras superovuladas e dos sete carneiros utilizados na inseminação artificial. O peso médio ao nascer foi de $3,3 \pm 0,7$ kg. Ele foi significativamente mais elevado nos animais paridos por receptoras pluríparas da raça Romana ($3,5 \pm 0,5$ kg) do que nos paridos por receptoras nulíparas da raça Suffolk ($2,3 \pm 0,6$ kg; $P < 0,001$).

As taxas de parição e de sobrevivência embrionária aumentaram de acordo com o número de ovulações apresentado pela receptora, independente da raça e do número de parto, no momento da transferência (Tab. 1). As análises dos resultados do presente experimento demonstraram que as taxas de parição e de sobrevivência embrionária foram significativamente ($P < 0,05$) mais elevadas nas receptoras que apresentaram mais de duas ovulações ($n = 26$; taxa de parição 100% e sobrevivência embrionária 76,4%) do que nas fêmeas que apresentaram duas ovulações ($n = 59$; taxa de parição 84,7% e sobrevivência embrionária 61,3%) e nas fêmeas com uma ovulação ($n = 25$; taxa de parição 64% e sobrevivência embrionária 52,9%). Este efeito foi observado tanto nas receptoras pluríparas da raça Romane quanto nas receptoras nulíparas da raça Suffolk.

As fêmeas que receberam dois embriões ($n = 96$) apresentaram taxa de sobrevivência embrionária significativamente superior às fêmeas que receberam três embriões ($n = 12$), respectivamente, 66,1 e 47,2% ($P < 0,05$) e taxa de parição sem diferença estatística de 83,3 (80/96) e 91,7% (11/12).

Considerando-se o estágio de desenvolvimento dos embriões transferidos, observa-se que as fêmeas que receberam unicamente blastocisto ($n = 35$) apresentaram sobrevivência embrionária significativamente mais elevada que as fêmeas que receberam unicamente mórula ($n = 36$), 76,8 contra 52,1%, respectivamente ($P < 0,01$; Tab.2).

Tabela 2. Média de ovulações, embriões transferidos, taxa de parição e sobrevivência embrionária em relação ao estágio fisiológico dos embriões transferidos em 110 receptoras que receberam de 1 a 3 embriões.

Estádios fisiológico dos embriões	Média de ovulações	Média de embriões transferidos	Taxa parição	Sobrevivência embrionária
Blastocisto	$1,73 \pm 0,70$	$1,97 \pm 0,17$	91,4% (35)	76,8% (69)
Ao menos 1 Blastocisto	$1,96 \pm 0,76$	$2,12 \pm 0,37$	90,5% (74)	68,2% (157)
Mórula	$2,25 \pm 0,73$	$2,03 \pm 0,29$	69,4% (36)	52,1% (73)

() Número de cordeiros paridos ou de embriões transferidos.

Os melhores resultados foram obtidos em receptoras que apresentaram ao menos duas ovulações e que receberam somente dois embriões no estágio de blastocisto ($n = 21$), a taxa de parição foi de 100% e a taxa de sobrevivência embrionária foi de 83,3%.

Discussão

Os resultados obtidos neste experimento são semelhantes aos já descritos por outros autores em ovinos (Armstrong e Evans, 1983; Brebion et al., 1992; Bari et al., 2003). Não foi possível distinguir qual fator exerceu maior influência no resultado final, raça e/ou número de partos.

Os efeitos observados do número e do estágio de desenvolvimento dos embriões transferidos, são coerentes com resultados reportados anteriormente em outros trabalhos (McMillan e Hall, 1994; Bari et al., 2003). O efeito no número de ovulações apresentado pela receptora é reportado no caso de transferência de dois embriões por fêmea (Széll e Hudson, 1991; Alabart et al., 1995). No entanto, no caso de transferência de apenas um embrião, é relatado que a taxa de sobrevivência embrionária é elevada e não há variação dela em relação ao



número de ovulações apresentado pela receptora (Széll e Hudson, 1991; Bari et al., 2003).

Considerando-se essas observações, é provável que entre as receptoras nulíparas deste estudo, no qual a maioria apresentou uma única ovulação (17/23), a taxa de sobrevivência embrionária teria sido maior se apenas um embrião fosse transferido por fêmea. Foi relatado que a taxa de sobrevivência embrionária obtida em receptoras nulíparas é mais elevada do que entre receptoras pluríparas quando apenas um embrião é transferido por receptora (Bari et al., 2003).

Além disso, o baixo peso ao nascer dos cordeiros paridos pelas receptoras nulíparas é outro argumento a favor da transferência de um único embrião em nulíparas, pois 28% dos cordeiros nascidos de partos gemelares e paridos por fêmeas nulíparas apresentaram baixo peso ao nascer ($\leq 2,0$ kg) contra apenas 1% dos cordeiros nascidos de partos gemelares e paridos por receptoras pluríparas ($P < 0,01$).

No caso de receptoras nulíparas e transferência de um único embrião por fêmea, faz-se necessário preparar um maior número de receptoras comparado à utilização de pluríparas e de transferência de dois embriões. Além disso, ao se considerarem os excelentes resultados obtidos nas fêmeas que apresentaram ao menos duas ovulações (taxa de parição 89% e sobrevivência embrionária 66%, $n = 85$), a utilização de receptoras de raça prolífica, como a raça Romane (INRA 401), de prolificidade de 2,08, é recomendada (Ricordeau et al., 1992).

Os resultados obtidos neste experimento foram satisfatórios, e sua análise mostra que é importante considerar todos os fatores de variação que podem afetar o resultado final, para, com isso, maximizar a eficiência da transferência de embriões, que é uma ferramenta eficaz para a rápida multiplicação de genótipos de plantéis reduzidos.

Agradecimentos

Este estudo foi realizado com o apoio da região Centro da França por meio de financiamento Programa BTV-infect. Os autores agradecem aos técnicos da PFIE-INRA, Nouzilly, França, e do Domaine La Sapinière INRA, Bourges, França, pelos preparativos e cuidados com os animais deste estudo.

Referências

- Alabart JL, Folch J, Fernandez-Arias A, Ramon, JP, Garbayo A, Cocero MJ.** Screening of some variables influencing the results of embryo transfer in the ewe. I. Five-day-old embryos. *Theriogenology*, v.44, p.1011-1026, 1995.
- Armstrong, DT, Evans G.** Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. *Theriogenology*, v.19, p.31-42, 1983.
- Bari F, Khalid M, Haresign W, Murray A, Merrell B.** Factors affecting the survival of sheep embryos after transfer within a MOET program. *Theriogenology*, v.59, p.1265-1275, 2003.
- Baril G, Brebion P, Chesne P.** Manuel de formation pratique pour la transplantation embryonnaire chez la brebis et la chèvre. Rome: FAO, 1993. 196p. (Etude FAO: Production et Santé Animales (FAO), n. 115).
- Brebion P, Baril G, Cognie Y, Vallet JC.** Transfert d'embryons chez les ovins et les caprins. *Ann Zootech*, v.41, p.331-339, 1992.
- Chagas e Silva J, Lopes da Costa L, Cidadão R, Robalo Silva J.** Plasma progesterone profiles, ovulation rate, donor embryo yield and recipient embryo survival in native Saloia sheep in the fall and spring breeding seasons. *Theriogenology*, v. 60, p.521-532, 2003.
- Cognie Y, Chupin D, Saumande J.** The effect of modifying the FSH/LH ratio during the superovulatory treatment in ewes. *Theriogenology*, v.25, p.148, 1986. Abstract.
- Guignot F, Bouttier A, Baril G, Salvetti P, Pignon P, Beckers JF, Touze JL, Cognie J, Traldi AS, Cognie Y, Mermillod P.** Improved vitrification method allowing direct transfer of goat embryos. *Theriogenology*, v.66, p.1004-1011, 2006.
- McMillan WH, Hall DRH.** Laparoscopic transfer of ovine and cervine embryos using the transpic technique. *Theriogenology*, v.42, p.137-146, 1994.
- Papadopoulos S, Rizos D, Duffy P, Wade M, Quinn K, Boland MP, Lonergan P.** Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, in vivo or in vitro produced ovine blastocysts. *Anim Reprod Sci*, v.74, p.35-44, 2002.
- Ricordeau G, Tchamitchian L, Brunel JC, Nguyen TC, François D.** La race ovine INRA 401: Un exemple de souche synthétique. In: INRA Productions Animales. Toulouse: INRA, 1992. p.255-262. (Hors série: 'Eléments de génétique quantitative et application aux populations')
- Széll A, Hudson RHH.** Factors affecting the survival of bisected sheep embryos in vivo. *Theriogenology*, v.36, p.379-387, 1991.