

PRODUÇÃO DE EMBRIÕES DE CABRAS SOROPOSITIVAS PARA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA A VÍRUS

Tânia Vasconcelos CAVALCANTE¹, Hévila Oliveira SALLES²,
Vicente José de Figueirêdo FREITAS^{3*}

RESUMO: Este experimento objetivou avaliar a produção de embriões em cabras soropositivas para CAEV. Foram utilizadas quatro cabras soropositivas e quatro soronegativas. As fêmeas tiveram o estro sincronizado através de esponjas vaginais durante 11 dias. No nono dia do tratamento aplicou-se 50 mg de Cloprostenol e iniciou-se o tratamento de superovulação com pFSH (16 mg). No momento da retirada das esponjas realizou-se uma injeção de 1,32 mg de pLH. Para fecundação, utilizou-se reprodutores de acordo com o estado sanitário da doadora. Sete dias após o estro foi realizada a colheita e avaliação dos embriões. Não observou-se diferença significativa entre cabras soropositivas e soronegativas, respectivamente, para os parâmetros (média \pm d.p.): intervalo retirada da esponja-início do estro (16,0 \pm 0,0 h vs 18,0 \pm 6,9 h), número de ovulações (12,5 \pm 0,6 vs 22,1 \pm 12,0), estruturas colhidas (8,8 \pm 3,4 vs 10,8 \pm 12,4), estruturas não fecundadas (3,0 \pm 5,4 vs 0,3 \pm 0,5), estruturas degeneradas (0,8 \pm 1,5 vs 0,0 \pm 0,0) e estruturas viáveis (5,8 \pm 4,0 vs 10,5 \pm 12,4). Conclui-se que cabras soropositivas respondem à superovulação, podendo ser utilizadas em programas de transferência de embriões, desde que comprovada a não soroconversão das crias.

Termos para Indexação: Caprino, CAEV, superovulação, embrião.

EMBRYO PRODUCTION FROM SEROPOSITIVE GOATS FOR CAPRINE ARTHRITIS-ENCEPHALITIS VIRUS

ABSTRACT: The aim of this experiment was to evaluate the embryo production from goats seropositive for CAEV. Seropositive (n=4) and seronegative (n=4) goats were used. Fluorogestone acetate (45 mg) sponges were placed intravaginally and left for 11 days. Females received, on day nine, 50mg of Cloprostenol and the superovulation started with pFSH (16mg). At the last day of treatment, goats received 1,32mg pLH. Seropositive and seronegative bucks were used according to female sanitary condition. Seven days after estrous the collection of embryos was performed. No significant differences were observed between both seropositive and seronegative goats, respectively, for the parameters (mean \pm s.d.): interval between sponge removal and the onset of estrous (16,0 \pm 0,0 h vs 18,0 \pm 6,9h), number of ovulations (12,5 \pm 0,6 vs 22,1 \pm 12,0), recovered structures (8,8 \pm 3,4 vs 10,8 \pm 12,4), no fertilized structures (3,0 \pm 5,4 vs 0,3 \pm 0,5), degenerated structures (0,8 \pm 1,5 vs 0,0 \pm 0,0) and viable structures (5,8 \pm 4,0 vs 10,5 \pm 12,4). In conclusion, seropositive goats had satisfactory response to the superovulatory treatment and could be used for embryo transfer programs, if no seroconversion is confirmed in the kids born.

Index Terms: Goat, CAEV, superovulation, embryo.

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a importação de raças exóticas para atender à demanda de material genético, essencial para expansão da caprinocultura leiteira, foi responsável pela introdução de algumas doenças infecciosas no Brasil, dentre elas a artrite encefalite caprina a vírus (CAEV).

A CAEV, descrita originalmente nos Estados Unidos, é provocada por um retrovírus da sub-família Lentivirinae, semelhante ao causador da anemia infecciosa equina e da síndrome da

imunodeficiência adquirida no homem (Cork et al., 1974). É uma doença que além de ser de difícil controle e ocorrer, com maior frequência, em rebanhos de alto padrão genético (Adams & Gorham, 1986), vem sendo disseminada de forma preocupante.

A utilização racional de algumas biotécnicas como a transferência de embriões (TE) tem permitido a preservação do patrimônio genético de fêmeas portadoras de agentes infecciosos que, servindo como doadoras de embriões, não representam grande risco de infecção para embriões e receptoras, bem como, para os

¹ Med. Veterinária, Profª Auxiliar, Escola Superior de Agricultura de Mossoró. Av. Francisco Mota, s/n, Bairro Presidente Costa e Silva, Caixa Postal 137, 59600 - Mossoró, RN, Mestranda UECE/FAVET

² Med. Veterinária, Pesquisadora, EMBRAPA/Centro Nacional de Pesquisa de Caprino Caixa Postal D-10, 62011-970 - Sobral-CE.

³ Med. Veterinário, Profª Adjunto, UECE / Faculdade de Veterinária. Av. Paranjana, 1700. 60740-000, Fortaleza-CE - *Autor para correspondência. E-mail: vjff@roadnet.com.br

produtos gerados (Chemineau et al., 1986). Tal possibilidade é uma conseqüência do uso de embriões sem ruptura da zona pelúcida que previne a contaminação das células embrionárias (Wrathall, 1995). A TE em caprinos é também uma alternativa viável para acelerar o melhoramento genético e incrementar a capacidade reprodutiva dos rebanhos desde que a qualidade dos animais justifique o benefício/custo (Pintado et al., 1996).

Em conseqüência da possibilidade, embora remota, de infecção dos embriões e das receptoras através da TE e de existir pouca informação sobre a utilização de cabras soropositivas para o vírus da CAEV em programas de superovulação, este trabalho teve por objetivo avaliar a resposta superovulatória e a conseqüente produção de embriões em cabras soropositivas para a referida doença.

MATERIAL E MÉTODOS

Local do Experimento

O experimento foi realizado no laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução (FAVET-UECE) na cidade de Fortaleza. Localizada em uma planície litorânea a 3° 30' 37" de longitude Oeste, apresenta temperatura, umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica anuais médias de 27°C, 75% e 1100 mm, respectivamente (SUDEC, 1990).

Animais Experimentais

Foram utilizadas oito cabras, com idade entre 3 e 5 anos, sendo quatro fêmeas soropositivas (duas Saanen e duas Alpinas) e quatro soronegativas (duas Saanen e duas Alpinas) para CAEV. O diagnóstico foi realizado pelo método de imunodifusão em ágar gel (IDAG) adaptado por Gouveia & Magalhães (1994), ressaltando-se que as fêmeas soropositivas já apresentavam lesões articulares características da doença.

Tratamento de Superovulação

Todos os animais receberam, durante 11 dias, esponjas intra-vaginais impregnadas com 45 mg de Acetato de Fluorogestona⁴. No nono dia do tratamento foi aplicado, via intramuscular (i.m.), 50 mg de Cloprostenol⁵ e iniciada a administração do hormônio foliculo estimulante⁶ (pFSH) durante 3 dias a intervalos de 12 horas (8, 4 e 4 mg nos dias 9, 10 e 11, respectivamente). No momento da retirada da esponja e da aplicação das últimas injeções de pFSH foi administrado, via i.m., 1,32 mg de hormônio luteinizante⁷ (pLH). Após 3 dias da remoção das esponjas, todas as fêmeas receberam, também via i.m., injeções de Flunixin meglumine⁸ na dose de 1,1 mg/kg de peso corporal durante 4 dias consecutivos, perfazendo oito aplicações intervaladas de 12 horas conforme proposição de Soares et al. (1996).

Deteção do Estro e Fecundação

Doze horas após a retirada das esponjas, iniciou-se a detecção do estro, com uso dos próprios reprodutores, em intervalos de 4 horas até a última fêmea apresentar estro. As coberturas foram realizadas imediatamente após a fêmea aceitar a monta pelo macho, às 12 e 24 horas após a primeira cobertura. Foram utilizados reprodutores soropositivos ou soronegativos para CAEV, conforme a condição sanitária da fêmea.

Colheita e Avaliação dos Embriões

Sete dias após o início do estro foi realizada a colheita de embriões através do método cirúrgico. Após incisão da linha branca, realizou-se a exteriorização do trato genital para observação dos ovários e contagem do número de corpos lúteos. Posteriormente, foi realizada a lavagem dos cornos uterinos com 40 ml de Phosphate Buffered Saline (PBS) adicionando-se 0,4%

4. Chrono-Gest (Intervet-França)

5. Estrumate (Pitman Moore-França)

6. Universidade de Liège (Bélgica)

7. Universidade de Liège (Bélgica)

8. Banamine (Schering-Brasil)

de Bovine Serum Albumine (BSA). O líquido colhido foi depositado em placa de Petri quadriculada e sob estereomicroscópio, em aumento de dez vezes, foi efetuado a pesquisa das estruturas. Uma vez identificados, os embriões foram transferidos para outra placa de Petri para posterior classificação sob estereomicroscópio com aumento de 60 a 80 vezes. Os embriões foram classificados considerando-se seu desenvolvimento e arranjo celular conforme sugestão de Stringfellow & Seidel (1990).

Análise Estatística

Devido à falta de normalidade dos dados, utilizou-se o teste não paramétrico de Whitney-Mann para avaliação dos resultados referentes ao momento de início do estro, número de corpos lúteos e estruturas colhidas (Sprent, 1993). As porcentagens foram comparadas pelo teste do Qui-Quadrado. Considerou-se o nível de 5% de significância.

RESULTADOS

Por não existir diferença entre as raças, os dados foram agrupados para

comparação somente entre a condição sanitária das fêmeas (soropositivas ou soronegativas).

Após a retirada das esponjas, as cabras soropositivas e soronegativas evidenciaram estro após 16 ± 0,0 horas e 18 ± 6,9 horas, respectivamente, não se constatando diferença (P > 0,05) entre ambos os tipos de animais.

Todas as fêmeas apresentaram múltiplas ovulações, não se observando diferença entre as cabras soropositivas e soronegativas no que concerne ao número médio e freqüência de ovulações (Tabela 1).

Mesmo que se tenha utilizado o tratamento com Flunixin meglumine para prevenir a regressão prematura dos corpos lúteos, uma fêmea soronegativa apresentou este problema e, conseqüentemente, não foi submetida à colheita de embriões.

Os dados referentes ao número e a qualidade das estruturas colhidas são apresentados na Tabela 2. Com relação ao estágio de desenvolvimento dos embriões viáveis, foi obtido um total de 20 estruturas

TABELA 1. Número médio e freqüência de ovulações nos ovários direito e esquerdo de cabras soropositivas ou soronegativas para a CAEV

Doadoras	O v u l a ç õ e s		
	Corpo Lúteo x̄ ± s	Óvário Direito n (%)	Óvário Esquerdo n (%)
Soropositivas	12,5 ± 0,6	19 (38,0)	31 (62,0)
Soronegativas	22,5 ± 12,1	46 (51,1)	44 (48,9)
T o t a l	17,5 ± 9,6	65 (46,4)	75 (53,6)

TABELA 2. Números médios de estruturas colhidas, não fecundadas, degeneradas e viáveis de doadoras soropositivas e soronegativas para a CAEV

Doadoras	Estruturas					
	Colhidas x̄ ± s	Não Fecundadas x̄ ± s	Degeneradas x̄ ± s	Viáveis		
				Mórula x̄ ± s	Blastocisto x̄ ± s	T o t a l x̄ ± s
Soropositivas	8,8±3,4	3,0±5,4	0,8±1,5	0,8±0,5	4,3±3,3	5,8±4,0
Soronegativas	10,8±12,4	0,3±0,5	0,0±0,0	1,8±2,2	8,8±10,2	10,5±12,4
T o t a l	9,8±8,5	1,6±4,0	0,4±1,0	1,3±1,6	6,5±7,4	8,1±8,9

provenientes de doadoras soropositivas e 42 de soronegativas, sendo que 85% e 86% eram blastocistos e 15% e 14% eram mórulas, respectivamente, para as fêmeas soropositivas e soronegativas.

DISCUSSÃO

O tratamento hormonal utilizado mostrou-se eficiente para induzir o estro das doadoras, achado importante para demonstrar, inicialmente, que a soropositividade para a CAEV, no estágio da doença em que as fêmeas se encontravam, não interfere na capacidade do animal evidenciar sintomas clínicos de estro. Os dados aqui obtidos respaldam as observações de Freitas (1996) ao comentarem que, em geral, cerca de 80% das fêmeas tratadas com o protocolo padrão de superovulação evidenciam estro. No que concerne ao início dos sintomas clínicos de estro após o tratamento hormonal, foi registrado, tanto para as fêmeas soropositivas quanto soronegativas, ser semelhante aos descritos por Amoah & Gelaye (1990) e Baril (1995).

O número médio de ovulações obtido é próximo dos de Amoah & Gelaye (1990), Armstrong et al. (1983b) e Baril (1995), entretanto, difere bastante daqueles registrados por Lima et al. (1996). De acordo com Brebion et al. (1992), em qualquer tratamento superovulatório utilizado, existe grande variação individual de resposta que pode estar entre 0 e 40 ovulações. Os dados deste trabalho juntamente com os de Salles et al. (1997) que encontraram $10,8 \pm 5,7$ e $10,8 \pm 8,6$ ovulações em cabras, respectivamente, soronegativas e soropositivas para a CAEV, evidenciam mais uma vez que animais soropositivos, mesmo aqueles que já tenham desenvolvido os sintomas clínicos desta virose, são capazes de responder à estimulação exógena com progestágenos e gonadotrofinas, pelo menos no estágio da doença dos animais aqui utilizados.

A regressão prematura de corpos lúteos em caprinos após a superovulação é bem descrita (Pendleton et al., 1992) e observada (Lima et al., 1996) na literatura, podendo

ocorrer independentemente da gonadotrofina utilizada na superovulação, sendo, porém, mais freqüentemente observada após utilização da gonadotrofina coriônica eqüina (Armstrong et al., 1983a). Neste experimento, apenas uma fêmea apresentou regressão prematura dos corpos lúteos, mesmo assim pertencia ao grupo de fêmeas soronegativas, fato que respalda a afirmação que a função ovariana das cabras soropositivas não é alterada pela CAEV.

Um maior número de embriões viáveis no estágio de blastocisto era esperado devido ao dia de realização da colheita (7 dias pós-estro). Este resultado também indica que cabras soropositivas para a CAEV apresentam desenvolvimento embrionário normal no que se refere à morfologia e à cronologia, pelo menos durante os dias que antecedem a implantação.

Chemineau et al. (1986), trabalhando com cabras soropositivas e soronegativas para o vírus da língua azul, obtiveram resultados semelhantes ao deste experimento ao não encontrarem diferenças significativas entre grupos soropositivo e soronegativo para o número médio de estruturas colhidas, não fecundadas, degeneradas e viáveis. Portanto, a soropositividade dos animais parece não influir também na produção quantitativa dos embriões de caprinos até que as lesões não determinem uma condição clínica desfavorável suficiente para interferir nos eventos reprodutivos.

Finalizando, pode-se ainda concluir que, de um modo geral, as cabras portadoras do vírus da CAEV podem servir como doadoras em programas de TE, desde que comprovada a não soroconversão de suas crias.

AGRADECIMENTOS

À CAPES (Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de mestrado da autora principal; ao Dr. Othon Chaves Bastos pela doação dos animais soropositivos e ao Dr. Jean-François Beckers pela preparação do FSH e LH de origem suína.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, D.S.; GORHAM, J.R. The gp135 of caprine arthritis-encephalitis virus afford greater sensitivity than the p28 in immunodiffusion serology. *Research Veterinary Science.*, v.40, n.2, p.157-160, 1986.
- AMOAH, E.A.; GELAYE, S. Superovulation, synchronization and breeding of does. *Small Ruminant Research.*, v.3, n.1, p.63-72, 1990.
- ARMSTRONG, D.T.; PFITZNER, A.P.; WARNES, G.M. et al. Endocrine response of goats after induction of superovulation with PMSG and FSH. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.67, n.1, p.395-401, 1983a.
- ARMSTRONG, D.T.; PFITZNER, A.P.; WARNES, G.M. et al. Superovulation treatments and embryo transfer in Angora goats. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.67, n.1, p.403-410, 1983b.
- BARIL, G. Possibilidades atuais da transferência de embriões em caprinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., 1995, Belo Horizonte. *Anais....* Belo Horizonte: CBRA, 1995. p.110-120.
- BREBION, P.; BARIL, G.; COGNIÉ, Y. et al. Transfert d'embryons chez les ovins et les caprins. *Annales Zootechnie.*, v.41, n.1, p.331-339, 1992.
- CHEMINEAU, P.; PROCUREUR, R.; COGNIÉ, Y. et al. Production, freezing and transfer of embryos from a bluetongue-infected goat herd without bluetongue transmission. *Theriogenology*, v.26, n.1, p.279-290, 1986.
- CORK, L.C.; HADLOW, W.J.; CRAWFORD, T.B. Infections leukencephalomyelitis of young goats. *Journal of Infectious Diseases*, v.129, n.2, p.134-141, 1974.
- FREITAS, V.J.F. *Étude des facteurs responsables pour la variabilité du moment d'apparition de l'oestrus et du pic préovulatoire de LH après traitement de synchronisation et/ou d'induction de l'oestrus chez la chevre.* Tours Université François Rabelais, 1996, 106p.
- LIMA, P.F.; OLIVEIRA, M.A.L.; GUERRA, M.M.P. Eficiência de diferentes métodos de colheita embrionária em caprinos – Resultados Preliminares. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.20, n.2, p.63-68, 1996.
- GOUVEIA, A.M.G.; MAGALHÃES, H.H. Avaliação de programa de controle da artrite encefalite caprina (CAEV) em rebanho comercial. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 23., 1994, Olinda. *Anais....* Olinda: Sociedade Pernambucana de Medicina Veterinária, 1994, p.105.
- PENDLETON, R.J.; YOUNGS, C.R.; RORIE, S.H. et al. Comparison of fluorogestone acetate sponges with norgestomet implants for induction of estrus and ovulation in anestrous dairy goats. *Small Ruminant Research*, v.8, n.2, p.269-273, 1992.
- PINTADO, B.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; PÉREZ, B. et al. Influence of the synchronization treatment on the superovulatory response of Murciana goats. *Small Ruminant Research*, v.23, n.2, p.135-141, 1996.
- SALLES, H.O.; ANDRIOLLI-PINHEIRO, A.; SOARES, A.T. et al. Resposta superovulatória em caprinos soropositivos para o vírus da artrite encefalite caprina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 25., 1997, Porto Alegre. *Anais....* Porto Alegre: s. ed., p.308.
- SOARES, A.; SIMPLÍCIO, A. A.; PINHEIRO-ANDRIOLLI, A.P. et al. Uso de flunixin meglumine para impedir a regressão prematura de corpos lúteos após a superovulação em caprinos. *ARS Veterinária*, v.11, n.2, p.112-113, 1996.
- SPRENT, P. *Pratique des statistiques nonparamétriques.* Paris: INRA, 1993, 158p.
- STRINFELLOW, D.E.; SEIDEL, S.M. *Manual of the international embryo transfer society*, 2: ed. Champaign: IETS, 1990. 176p.
- SUDEC (Fortaleza). *Atlas geográfico do Ceará.* Fortaleza: SUDEC, 1990. 100p.
- WRATHALL, A. Embryo transfer and disease transmission in livestock: a review of recent research. *Theriogenology*, v.43, n.1, p.81-88, 1995.