

ALGUNS ASPECTOS DA TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM CAPRINOS

Jeferson Ferreira da Fonseca

Embrapa Caprinos, CP D10, Cep. 62.011-970, Sobral, Ceará, Brasil,
jeferson@cnp.embrapa.br

Introdução

O rebanho caprino mundial aumentou 55% de 1980 a 1999. Durante este período, a produção de leite de cabra cresceu 58% (FAO, 2001). O Brasil tem a expectativa de seguir este cenário mundial e projeta um rebanho da ordem de 50 milhões de cabeças nas próximas duas décadas. Atualmente e para suportar este crescimento serão necessários programas acessórios para identificar e/ou multiplicar com alto mérito genético. Assim, biotecnologias da reprodução tendem a aumentar em número de animais assistidos, serem mais adaptadas às condições de campo bem como simplificadas para darem suporte adequado à rápida multiplicação demandada por estes animais. O estudo de biotecnologias do sêmen é importante para a preservação e multiplicação de machos. Todavia, a multiplicação de fêmeas é igualmente demanda em alta escala. Neste contexto, a superovulação e transferência de embriões podem ser muito vantajosas.

A primeira transferência de embriões caprinos com sucesso foi reportada no início dos anos 1930 (Warwick et al., 1934). Entretanto, estudos sobre a biotecnologia de embriões caprinos foram intensificados apenas a partir de 1970 (Gordon, 1997). Hoje, a transferência de embriões caprinos é uma realidade mundial e o comércio de embriões aumenta anualmente. Thibier (2005) reportou um movimento inferior a 3.000 embriões em 2004 (fresco e congelado). Certamente, o aumento no número de comunicações oficiais contribuirá para elevar o número de transferências de embriões no mundo, uma vez que dados estatísticos do setor são imprecisos.

No Brasil, os primeiros animais (raça Toggenburg) produzidos por transferência de embriões foram reportados por Jaume & Bruschi (1985). Nos últimos dez anos, o número de embriões transferidos aumentou de forma significativa, principalmente em função da importação de animais e embriões de caprinos de corte. Isto popularizou a transferência de embriões, tornando-a acessível ao setor produtivo. A simplificação desta tecnologia, bem como, o aumento no número de técnicos capacitados podem potencializar ainda mais esta expansão.

O objetivo deste artigo foi descrever de forma sucinta as etapas envolvidas na transferência de embriões em caprinos.

A técnica

A técnica de transferência de embriões caprinos, compreendendo a superovulação, acasalamento, colheita, manipulação, congelação/descongelação e inovulação embrionária, apresenta grandes variações. O conhecimento das peculiaridades comportamentais, reprodutivas e anatômicas é imprescindível para obtenção de sucesso na atividade.

O ciclo estral

A cabra é poliéstrica estacional de dia curto. Sua ciclicidade reprodutiva é dividida em estações de anestro, de transição e de acasalamento. A atividade reprodutiva inicia-se em meados do verão, atinge o esplendor no outono e cessa em meados no inverno. À medida que se aproxima da Linha do Equador, esta sazonalidade é diminuída ou findada. No Nordeste brasileiro, por

exemplo, desde que haja aporte nutricional em quantidade e qualidade suficientes, a cabra ciclará durante todo o ano. O ciclo estral caprino tem uma duração média de 21 dias. Apresenta uma fase luteínica (17 dias) e uma fase folicular (4 dias). Durante este período, duas a quatro ondas foliculares podem estar presentes. A dominância folicular parece ocorrer apenas na primeira e última ondas foliculares (Ginther & Kot, 1994). A ovulação pode ser única ou múltipla e ocorre predominantemente no final do estro ou logo após o seu final (Fonseca, 2002). Há relativamente poucos estudos envolvendo a dinâmica folicular ovariana na cabra. O aumento do conhecimento neste campo tem implicado em elevação na qualidade e quantidade das estruturas recuperadas (Menchaca et al., 2005).

Regressão pré-matura de corpo lúteo

A regressão luteal precoce é um fenômeno comum em cabras, manifestando-se na forma de ciclos estrais curtos, geralmente no início da estação de acasalamento. Este fenômeno é exacerbado em cabras superovuladas e parece estar associado a elevadas concentrações plasmáticas de estrógenos durante a fase luteal inicial. Como conseqüência, nota-se um decréscimo na resposta superovulatória. A regressão luteal precoce é evidenciada por laparoscopia cerca de quatro dias após o estro, mas as concentrações plasmáticas de progesterona incompatíveis com atividade luteal normal já são detectadas aos três dias após o estro em animais acometidos (Saharrea et al., 1998). A administração de progesterona exógena (Gusmão, 2005), agentes anti-luteolíticos (antiinflamatório) ou luteotróficos (hCG, GnRH, LH) pode prevenir ou reduzir os efeitos deletérios da regressão luteal precoce (Saharrea et al., 1998; Fonseca, 2005).

Superovulação

A superovulação em caprinos segue os mesmos princípios básicos aplicados em ovinos e bovinos. Várias preparações hormonais com variações no número de aplicações e na dose dos hormônios utilizados têm reportado sucesso. Os hormônios utilizados são FSH, eCG e hMG. A administração de preparações com múltiplas aplicações de FSH (6 a 8 aplicações) é a mais comum (Fonseca, 2005). De fato, a superovulação é uma área que demanda estudos mais aprofundados para determinação de protocolos mais simples, eficientes, menos estressantes e menos onerosos. A superovulação pode ser feita com base na observação de estro e sem uso de progestágenos durante a estação reprodutiva. Todavia, a sincronização de estro facilita e otimiza os eventos envolvidos na superovulação e colheita de embriões. Normalmente, utilizam-se progesterona ou progestágenos impregnados em dispositivos vaginais ou auriculares com um tempo de exposição superior a 10 dias (Gordon, 1997; Gusmão, 2005). A diminuição deste período de exposição (3-6 dias) pode agilizar e encurtar o processo e já tem sido aplicado com sucesso (Fonseca et al., 2005a; Fonseca et al., 2006). A administração de prostaglandina para assegurar a luteólise e estro durante o processo superovulatório é também necessária, a exemplo de outras espécies. Todavia, variações no momento da aplicação relativo ao momento da inserção do dispositivo devem ser consideradas. O conhecimento dos efeitos da progesterona exógena sobre o turnover folicular ovariano associado ao efeito luteolítico da prostaglandina em caprinos (Menchaca & Rubianes, 2002; Maffili, 2004) podem juntos proverem a melhora da resposta superovulatória.

Uma das possibilidades é o início da administração de FSH o mais próximo possível da emergência da onda folicular ovariana no início do ciclo estral (primeira e segunda ondas foliculares), evitando, desta forma, os efeitos deletérios da presença de folículos grandes neste momento (Gonzalez-Bulnes et al., 2002; Menchaca et al., 2002). Menchaca & Rubianes (2002)

reportaram a emergência da primeira e segunda ondas foliculares no dia 0 (dia da ovulação e inserção do dispositivo) e dia 4 respectivamente cabras tratadas com progesterona. A superovulação utilizando este conceito (i.e. início da administração de FSH próximo à emergência folicular) apresentou resultados satisfatórios em caprinos. Numa primeira tentativa, cabras Saanen receberam dispositivos intravaginais contendo progesterona (CIDR[®], Pfizer do Brasil), inseridos (dia 0) e removidos seis dias depois (dia 6), e 22,5 µg cloprostenol (Prolise[®], Tecnopec Ltda, São Paulo, Brasil) administradas pela via intra-vulvosubmucosal (dia 0). No dia 4, dia esperado da emergência da primeira onda folicular em cabras tratadas com progesterona (Maffili, 2004), as cabras começaram a receber seis doses decrescentes (25, 25, 15, 15, 10 e 10%) de FSH (250 a 400 UI) intervaladas de 12 horas. O acasalamento foi feito por monta natural a cada 12 horas. Três doses de 50 mg flunixin meglumine foram administradas nos dias 9, 10 e 11. Colheitas realizadas no dia 14 (6 a 7 dias após o início do estro) resultaram em cerca de 10 embriões viáveis por lavado (Fonseca et al., 2005a). Em um segundo ensaio, as cabras receberam 37,5 g d-cloprostenol (dia 0 manhã), CIDR por três dias (dias 2 a 5), FSH (dias 2 a 4), 37,5 µg d-cloprostenol (dia 5 manhã) e 500 UI hCG (dia 7 tarde). Neste caso, o dia esperado para emergência da primeira onda folicular em cabras tratadas com progesterona é o dia da inserção do CIDR (Menchaca & Rubianes, 2002). Colheitas realizadas no dia 14 (6 a 7 dias após o início do estro) resultaram em cerca de 8 embriões viáveis por lavado (Fonseca et al., 2006). Em ambos os estudos, o acompanhamento ultra-sonográfico revelou a ausência de folículos com diâmetro superior a 4 mm no momento da primeira administração de FSH, confirmando a viabilidade de se superovular cabras com base na primeira onda folicular do ciclo estral.

Colheita de embriões

A colheita de embriões em caprinos pode ser efetuada por laparotomia, laparoscopia e pela via transcervical (Andrioli et al., 1999). A laparotomia, apesar de ser uma técnica segura e precisa, apresenta todos os riscos e seqüelas inerentes aos processos cirúrgicos que envolvem exploração de órgãos abdominais, principalmente aderências. A laparoscopia é uma técnica precisa e segura, com menor índice de seqüelas que a anterior, mas envolve a necessidade de procedimentos mais laboriosos (i.e. uso de laparoscópio). No início da década passada, o procedimento de colheita não-cirúrgica trans-cervical foi desenvolvido (Pereira et al., 1991), sendo atualmente o mais utilizado no Brasil. A técnica trans-cervical combina fácil execução, baixo índice de aderências e boa taxa de recuperação (Andrioli et al., 1999). O procedimento pode ser executado com o animal em estação. Para tanto, há necessidade de administração de prostaglandina 12 horas antes da colheita ou de oxitocina no momento na colheita. Este procedimento tem o objetivo de promover a dilatação do canal cervical, o que facilita a passagem do cateter (Pereira et al., 1998).

Anestesia epidural e local (cérvice), bem como leve sedação, minimizam o desconforto animal, facilitando o processo (Fonseca et al., 2005a). A colheita deve ser efetuada seis a sete dias após o início do estro. Em média, cinco embriões viáveis são recuperados por colheita. A avaliação embrionária segue os princípios utilizados para bovinos (IETS, 1998; Strinfellow & Seidel, 1999).

Receptoras

O padrão de seleção de receptoras caprinas também acompanha o de outras espécies. As cabras devem apresentar perfeita condição clínico-patológica. Recomendam-se receptoras negativas para CAEV (Artrite-encefalite viral caprina), com vacinas atualizadas para as diferentes enfermidades. Antiparasitários não são recomendados antes dos 53 dias após a inováção

embrionária. Deve-se atentar para um plano nutricional adequado e contínuo, incluindo mineralização e fornecimento de água em boa qualidade. As receptoras deverão receber o implante de forma que a previsão de manifestação de estro coincida com o estro da doadora correspondente. Estros naturais também podem ser utilizados, desde que atendam à sincronia com a doadora.

Inovulação

A inovulação embrionária em cabras e ovelhas pode ser feita pelo método cirúrgico, laparoscópico, semilaparoscópico ou transcervical, sendo a última pouco relatada. Normalmente, observam-se taxas de gestação que variam de 40 a 80 %. Os mesmos fatores que interferem na taxa de gestação em bovinos também atuam em caprinos e ovinos. Todavia, métodos que possibilitam a observação e caracterização precisa do corpo lúteo (localização e aparência macroscópica) têm expectativas de taxas de gestação superiores, uma vez que receptoras com regressão luteal ou corpos lúteos de baixa qualidade morfológica podem ser eliminadas. Os embriões são transferidos ipsilaterais ao (s) corpo (s) lúteo (s), normalmente aos pares. A transferência de um embrião para cada corno uterino também é reportada com sucesso. A inovulação transcervical não-cirúrgica, executada de forma semelhante à colheita é talvez uma tendência futura, a exemplo do que ocorreu em bovinos. Neste caso, o corpo lúteo deve ser localizado por ultra-sonografia para determinação de qual corno receberá o embrião. Todavia, o diâmetro do inovulador, a idade e a ordem de parição poderão conferir maior ou menor facilidade à técnica (Fonseca, 2005¹), o que permanece como objeto de estudo.

Criopreservação

A criopreservação de embriões pode ser realizada de várias formas e utilizando vários crioprotetores intra e extracelulares, com apenas um crioprotetor ou com associação de crioprotetores (Fonseca et al., 2002). Em caprinos, os primeiros relatos de sucesso utilizaram glicerol como crioprotetor (Bilton & Moore, 1976) e taxa de resfriamento lenta (Whittingham et al., 1972). Todavia, estudos comparativos apontam o etileno-glicol como crioprotetor mais eficiente que o glicerol (Gal et al., 1993). As taxas de gestação médias em cabras e ovelhas inovuladas com embriões congelados/descongelados variam de 30 a 70 % em função da qualidade embrionária (Gordon, 1997). Reporta-se sucesso tanto com a congelação lenta (Fonseca et al., 2005b) quanto com a vitrificação (Gordon, 1997; Sales et al., 2002). A possibilidade de congelação/descongelação em único passo torna o uso do etileno-glicol ainda mais atraente. Em nossa rotina, os embriões são submetidos a uma solução etileno-glicol 1,5 molar por 10 minutos. Durante este período, os embriões são envasados em palhetas de 0,25 ml (coluna central com embrião e colunas adjacentes com PBS 20% soro fetal bovino) e colocados em cilindro de congelação (Freeze Control CL 5000[®]) a 20°C. A taxa de resfriamento é de 2°C/min até -6°C onde permanecem por 15 min. A indução da cristalização é feita após os 5min iniciais da estabilização. Em seguida, a taxa de resfriamento é de 0,6°C/min até -30°C, quando as palhetas são imersas em nitrogênio líquido e estocadas. A descongelação é feita em água (35°C/segundos) e os embriões diretamente transferidos (laparoscopia ou laparotomia), com taxa de gestação de 60%.

¹Dados não-publicados

Conclusões e perspectivas

A transferência de embriões caprinos reportou evolução nos conhecimentos básicos e aplicados nas últimas duas décadas. Entretanto, embora tenha havido um número crescente de técnicos envolvidos no setor, esta evolução não foi acompanhada por elevação no número de comunicações oficiais. Estes aspectos, associados à simplificação e aumento da eficiência da técnica como um todo, projetam avanços ainda superiores. Estudos sobre o detalhamento das peculiaridades reprodutivas caprinas são necessários. Neste cenário, o conhecimento ultrasonográfico da dinâmica folicular ovariana, bem como o perfil endócrino do ciclo estral natural e induzido serão importantes ferramentas. Finalmente, estima-se que o crescimento do rebanho caprino brasileiro aproxime-se de cinco vezes o atual, alcançando 50 milhões de animais nos próximos 20 anos. Isto refletirá não somente no aumento da atividade de transferência de embriões, mas também, em sua consolidação como tecnologia acessível e aplicada na rotina de manejo reprodutivo em sistemas de produção de caprinos.

Referências

- Andrioli A, Simplício AA, Soares AT, Visintin JA. Eficiência da recuperação de embriões e os efeitos de consecutivas colheitas sobre o aparelho reprodutor de doadoras da espécie caprina. **Braz J Vet Res Anim Sci** 1999, 36:136-143.
- Bilton RJ, Moore NW. In vitro culture, storage and transfer of goat embryos. **Aust J Biol Sci** 1976, 29:125-129.
- Cognié Y, Baril G, Poulin N, Mermillod P. Current status of embryo technologies in sheep and goat. **Theriogenology** 2003, 59:171-188.
- FAO, 2001. Production Yearbook 1999. Food & Agriculture Organization of the United Nations, vol. 53. **Statistical Series**, No. 156, Rome, Italy, p. 251.
- Fonseca JF, Bruschi JH, Zambrini FN, Viana JHM, Amorim LS, Camargo LSO. Superovulação de cabras utilizando a primeira onda folicular do ciclo estral. **Acta Sci Vet** 2006, 33.
- Fonseca JF, Torres CAA, Pinto Neto A. Criopreservação de embriões bovinos. **Vet Not** 2002, 8:115-123.
- Fonseca JF, Viana JHM, Bruschi JH, Zambrini FN, Palhão MP, Santos AFA. Resposta superovulatória em cabras Saanen lactantes utilizando curtos protocolos de exposição à progesterona e somatotropina bovina recombinante (rbST). **Acta Sci Vet** 2005a, 32:243.
- Fonseca JF. **Controle e perfil hormonal do ciclo estral e performance reprodutiva de cabras Alpinas e Saanen**. PhD Thesis, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.
- Fonseca, J.F.; Bruschi, J.H.; Viana, J.H.M. et al. Freezing goat embryos using ethylene glycol and a slow cooling rate. In: 9TH ANNUAL CONFERENCE OF THE EUROPEAN SOCIETY FOR REPRODUCTION IN DOMESTIC, 2005, Murcia. **Proceedings** of the 9th annual conference of the European Society for Reproduction in Domestic Animals. ESDAR, 2005b.
- Fonseca, JF. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em caprinos e ovinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16, 2005, Goiânia, **Anais...**, Goiânia, 2005.
- 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** 1993, 40:771-777.

- Ginther OJ, Kot K. Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. **Theriogenology** 1994, 42:987-1001.
- Gonzalez-Bulnes, A.; Garcia-Garcia, R.M.; Santiago-Moreno, J.; Lopez-Sebastian, A.; Cocero, M.J. Effect of follicular status on superovulatory response in ewes is influenced by the presence of corpus luteum at first FSH dose. **Theriogenology** 2002, 58:1607-1614.
- Gordon I. Controlled reproduction in sheep and goats. Cambridge, UK: **University Press**, 1997.
- Gusmão AL. Transferência de embriões em pequenos ruminantes. **O Embrião** 2005, 25:6-9.
- Jaume CM, Bruschi JH.. **Cabras sem limites**. In: Jornal “O Estado de Minas” 1985, 26 de outubro, 6-7.
- Maffili VV. **Indução e sincronização de estro em cabras**. PhD Thesis, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2004.
- Menchaca A, Pinczak A, Rubianes E. Follicular recruitment and ovulatory response to FSH treatment initiated on Day 0 or day 3 post-ovulation in goats. **Theriogenology** 2002, 58:1713-1721.
- Menchaca A, Rubianes E. Relation between progesterone concentrations during the early luteal phase and follicular dynamics in goats. **Theriogenology** 2002, 57:1411-1419
- Menchaca A, Vilariño M, Rubianes E, 2005. Resultados preliminares com um novo tratamento de superovulação em caprinos: Protocolo Dia 0. **Acta Sci Vet** 2005, 33 (Suppl):244 (abstr.).
- 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, 1991. p.314.
- Pereira RJTA, Sohrey B; Holtz W. Nonsurgical embryo collection in goats treated with prostaglandin F2 α and oxytocin. **J Anim Sci** 1998, 76:360-363.
- Saharrea A, Valencia J, Balcázar A, Medja O, Cerbón JL, Caballero V, Zarco L. Premature luteal regression in goats superovulated with PMSG: effect of hCG or GnRH administration during the early luteal phase. **Theriogenology** 1998, 50:1039-1052.
- Sales HO, Andrioli A, Simplicio AA, Medeiros JN, Machado OM. Manual de transferência de embriões em caprinos. **Embrapa Caprinos** 2002, Documentos 40.
- Stringfellow DA, Seidel SM. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. Savoy: IETS, 3 ed, 1999.
- Thibier M. Data Retrieval Committee **Annual Report** – Year 2004. Embryo Newsletter, December, 2005.
- Warwick BL, Berry RO, Horlacher WR. Results of mating rams to Angora female goats. In: **Proceedings** of the American Society of Animal Production, 1934. p.225.
- Whittingham DG, Leibo SP, Mazur P. Survival of mouse embryos frozen to –196°C and –269°C. **Science** 1972, 178:1411-414.