

GECO

TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM CAPRINOS

Prof. Adelmo Ferreira de Santana – Caprinocultura e Ovinocultura

E-mail afs@ufba.br

Departamento de Produção Animal

Escola de Medicina Veterinária

Universidade Federal da Bahia

CEP- 40.170-110 Salvador - Bahia

Juliana Bentes Hughes -Acadêmica de Medicina Veterinária

Monografia apresentada na disciplina Caprinocultura e Ovinocultura – Jukho/2000

1. INTRODUÇÃO

A caprinocultura tem crescido significativamente no últimos anos, especialmente no que se refere a produção de leite, sendo hoje uma importante fonte de renda, mediante a necessidade crescente de alimentação de origem animal, principalmente, pelas populações humanas pertencentes às regiões de clima semi-árido, como o Nordeste do Brasil. Nesta região, localiza-se a maior concentração de caprinos do país, sendo que o estado da Bahia possui o maior efetivo nacional, com aproximadamente 2 milhões de cabeças (GONZALES E OLIVEIRA, 1992).

No nordeste, os rebanhos caprinos são constituídos, em grande parte, por animais sem raça definida, cujo índices de produção e produtividade são bastantes inferiores aos da raça especializadas (GUIDO *et al*, 1999).

Com objetivo de melhorar o desempenho do rebanho, estão sendo utilizados diferentes procedimentos e técnicas, como a importação de machos e fêmeas de raças leiteiras, cruzamento entre raças nativas e homólogas importadas, inseminação artificial, indução e sincronização de estro e transferência de embriões. Sendo que estes procedimentos

GECO

devem estar associados a adoção de práticas de manejo (OLIVEIRA, 1994)

A transferência de embriões é uma técnica que consiste em aumentar a produção embrionária, através do aumento do número de óvulos liberados, após a administração de hormônios, em uma fêmea geneticamente superior, dentro de um período sexual, e transferir essas estruturas para o trato reprodutivo de fêmeas de baixo valor zootécnico, para completarem a gestação (GONZALES E OLIVEIRA, 1992). Esta técnica visa um maior aproveitamento das fêmeas durante seu período de vida reprodutiva, através da elevação da prolificidade de animais geneticamente superiores em tempo bastante curto (VALLE *et al*, 1988).

A primeira transferência de embriões(TE) em caprinos foi efetuada em cabras Angora em 1941 mas apenas descrita em 1949 por WARWICK e BERRY. Embora o maior interesse neste estudo tivesse sido a hibridação entre esta espécie e a ovina, estes autores relataram o nascimento de um cabrito cujo o embrião tinha sido colhido e reinovulado na mesma cabra. Até meados dos anos setenta conhecem-se poucas referências acerca de TE em caprinos por não ter sido a espécie eleita como instrumento de investigação em biologia da reprodução e pela ausência de estímulo para sua implantação. Contudo, devido ao interesse na produção Mohair, particularmente na Austrália onde o efetivo Angora era reduzido, e por imposição de restrições á importação, a TE em caprinos despertou a atenção dos investigadores. (POTES, 1990).

Como a inseminação artificial permite a disseminação do potencial do macho, a transferência de embriões possibilita essa mesma oportunidade às fêmeas geneticamente superiores, favorecendo uma rápida expansão de um "pool genético".(GONZALES E OLIVEIRA, 1992)

Quando são obedecidas todas as normas exigidas para a micromanipulação de embriões, a T.E. é considerada a forma mais

GECO

segura de multiplicação sob o ponto de vista sanitário (SOUZA e FILHO, 1991).

As vantagens da transferência de embriões são: multiplicação rápida de um material genético superior; possibilita a importação e exportação de embriões; melhora a adaptabilidade ao meio ambiente de cabritos nascidos dentro da região; controle de doenças infecciosas; auxilia nos testes de progênie que geralmente são lentos; possibilita futuros trabalhos na engenharia genética, como a fecundação "in vitro", sexagem de embriões, quimerismo, clonagem e indivíduos transgênicos. (GONZALES E OLIVEIRA, 1992)

Existem fatores que podem limitar o uso desta técnica: elevado custo inicial para a aquisição de instrumental e equipamentos necessários para o desenvolvimento desta biotecnologia; restrição na possibilidade de hormônios no mercado nacional; limitações no uso do método cirúrgico, em virtude dos custos e possíveis ocorrências de traumatismos pós-operatórios no genital da fêmea; dificuldades na prática da técnica não cirúrgica em pequenos ruminantes, devido ao diâmetro estreito e a irregularidade do canal cervical desses animais; e o fator alimentação, pois o emprego de um programa nutricional inadequado pode diminuir a taxa de concepção, devido a não ocorrência ou baixa intensidade de sintomas de cio, a não ocorrência ou retardo da ovulação. (GONZALES E OLIVEIRA, 1992)

A aplicação da técnica nos pequenos ruminantes necessita de adaptações, que devem ser levadas em conta, pelas suas particularidades anatômicas e fisiológicas, bem como, a avaliação e controle dos embriões transferidos, visando reduzir os riscos de transmissão de doenças (SANTANA, 1994).

O sucesso da transferência de embriões depende de vários fatores relacionados com o trinômio doadora/embrião/receptora. A fertilidade depende tanto da qualidade do embrião coletado como da condição da receptora para qual o embrião é transferido, logo, a receptora contribui

GECO

com 50% para o sucesso de um programa de transfêrencia de embriões, e o tratamento hormonal contribui para uma adequada preparação fisiológica desta fêmea, objetivando a formação de corpos lúteos de boa qualidade que possam garantir níveis elevados de progesterona circulante, pois isto pode ser um fator fundamental para assegurar a sobrevivência embrionária. Em contrapartida, vários fatores extrínsecos como: temperaturas elevadas, mudanças climáticas bruscas, traumatismos por manejo inadequado, podem influenciar na fertilidade da fêmea (SANTANA, 1994).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos fisiológicos do ciclo estral em cabras

A cabra é poliéstrica estacional de modo que os filhotes nascem durante a época mais favorável do ano, a primavera. A duração da estação sexual varia com o comprimento do dia, raça e estado nutricional. Esta estacionalidade é governada pelo fotoperiodismo com atividade estral começando durante o período em que a luz diária começa a diminuir. Na zona temperada a maioria das raças de caprinos tornam-se anovulatórias e anéstricas durante a primavera e o verão, passando a ciclar á medida que a duração de luz diária diminui durante o outono. Nas zonas tropicais, onde há menor variação de luz diária, as cabras tendem a se reproduzir durante o ano todo (JAINUDEEN e HAFEZ, 1995).

A primeira ovulação define o surgimento da puberdade, quando as fêmeas já possuem a capacidade de se reproduzirem, contudo, para um melhor aproveitamento do potencial reprodutivo destes animais, deve-se esperar que alcancem cerca de 60 a 75% do peso vivo de animais adultos, para que então possam ser introduzidas na vida reprodutiva (CORDEIRO,1997).

GECO

Nos caprinos, a puberdade ocorre aos 5 a 7 meses, sendo que a duração média do ciclo estral é de 21 dias, podendo haver uma variação de 15 até 24 dias e o estro pode durar de 24 a 48 horas. A cabra em cio fica inquieta, berra freqüentemente, balança a cauda constante e rapidamente, e a vulva fica edemaciada com corrimento mucoso através da vagina; pode apresentar pouco apetite e diminuição da produção leiteira (JAINUDEEN e HAFEZ, 1995).

Em muitas raças de caprinos dois ou mais óvulos são liberados durante o cio. A taxa de ovulação aumenta com a idade e atinge um máximo dos 3 aos 6 anos, declinando gradualmente então (JAINUDEEN e HAFEZ, 1995).

A ovulação ocorre normalmente no início do metaestro ou no final do estro, quando então ocorre a formação do corpo lúteo que, na espécie caprina, é a fonte mais importante de progesterona, sintetizada e secretada durante o ciclo estral (metaestro e diestro) e essencialmente durante a fase gestacional (CORDEIRO,1997). A duração normal da gestação é de cerca de 149 dias (JAINUDEEN e HAFEZ, 1995).

2.2 Seleção das doadoras

Para um programa de reprodução controlada como a transferência de embrião, é de fundamental importância ter um rigoroso esquema de seleção dos animais a serem utilizados, pois, problemas de ordem nutricional ou sanitário podem prejudicar o sucesso do trabalho.

A qualidade genética é fator determinante na escolha das doadoras, aliada ao estado fisiológico e sanitário que são de fundamental importância. Além disso, outros critérios devem ser considerados : idade, histórico reprodutivo sem problemas, devem apresentar-se em perfeito estado sanitário ao exame clínico e

GECO

ginecológico que deve ser feito três meses antes do início do tratamento hormonal, respeitando um intervalo de no mínimo, cinco meses entre a última parição e o início do tratamento (SANTANA,1994).

As doadoras escolhidas para serem incluídas no programa devem apresentar fertilidade comprovada, serem pluríparas, idade entre 24 e 72 meses, progênie que tenha produção compatível com uma média de destaque, fenótipo que se enquadra nos padrões de qualidade leiteira, ou seja, boa aptidão leiteira (SANTANA,1994).

2.3 Seleção das receptoras

A escolha da fêmea que se portará como receptora tem a mesma importância do que a doadora de embriões, visto que a mesma deve apresentar boas condições para levar a gestação até o seu final. Os critérios a serem considerados para a escolha das fêmeas são baseadas nos seguintes pontos : as fêmeas devem exteriorizar sinais de estros regulares, em média a cada 21 dias; os animais devem encontrar-se em bom estado nutricional e sanitário; livres de doenças do sistema reprodutor; boa habilidade materna, isto é, não serem predispostas á rejeição da cria; boa aptidão leiteira, ou seja, capazes de alimentar e criar os produtos (OLIVEIRA e GONZALES, 1992).

As receptoras são fêmeas que deveram assegurar a sobrevivência e o desenvolvimento embrionário, e o valor genético destas pouco importa (SANTANA,1994).

As fêmeas devem ter idade, no mínimo, sete meses e pesar entre 30 a 35 kg. As núlparas são bem recomendadas, pois os resultados de fertilidade obtidos são superiores, em torno de 10% sobre as pluríparas (SANTANA,1994).

Desde três meses antes das operações e até a parição, os diversos tipos de "stress", como os de origem alimentar, traumática e sanitárias

GECO

devem ser evitados. e sanitária devem ser evitados. Nenhum tratamento antiparasitário, descorna, limpeza dos cascos deve ser realizado três semanas antes da sincronização. É fundamental que os animais selecionados se integrem ao rebanho, ou sejam transferidos para um mesmo local, pelo menos três meses antes do início do tratamento hormonal, período necessário para uma boa adaptação. As mudanças bruscas no clima, como calor intenso, contribuem negativamente na taxa de prenhez (SANTANA,1994).

2.4. Sincronização do cio

Uma das condições necessárias para a viabilidade da transferência embrionária é a existência de uma perfeita sincronia entre o desenvolvimento e o estado correspondente do trato genital no momento da inovulação (POTES,1990).

Por isso o sucesso de um programa de T.E. depende entre outros aspectos da sincronização adequada do ciclo estríco entre a doadora e a(s) receptora(s) pelo que a detecção do estro tem de ser cuidadosa, adequada e conscienciosa. Para que se obtenha uma alta percentagem de gestações é necessário que a receptora esteja em estro simultaneamente ou com diferença de mais ou menos um dia relativamente à doadora (POTES,1990).

Antes de instituir qualquer hormonoterapia é imprescindível controlar pelo menos um ciclo estral normal, ou vários se os ciclos forem irregulares ou anormais (POTES, 1990).

A sincronização do estro em cabras pode ser controlada por dois métodos básicos: regressão do corpo lúteo utilizando prostaglandina ou bloqueio do estro usando progesterona, ou combinando os dois métodos. A progesterona pode ser administrada em forma de injeção, esponjas intravaginais, implantes de silício na orelha e de forma oral, enquanto que a prostaglandina apenas é administrada por via injetável (OLIVEIRA,1994).

GECO

O método mais utilizado para sincronização do estro é através da administração de progesterona ou de seus análogos. Vários tratamentos cuja eficácia é similar podem ser empregados; eles diferem essencialmente pelo progestágeno e a via de administração utilizada. A injeção diária de 12mg de progesterona durante 17 dias é um método eficaz porém de difícil aplicação. O tratamento progestativo é assim realizado com ajuda de implantes sub-cutâneos impregnados com 3mg de Norgestomet. No entanto os implantes vaginais são mais frequentemente empregados, tais como: C.I.D.R. impregnados de progesterona, ou esponjas intravaginais de acetato de flugestona (FGA) na dose de 40 a 45 mg/kg, ou de acetato demedroxiprogesterona (MAP) na dose de 50 a 60 mg/kg (BARRIL,1995).

O C.I.D.R. (controlled internal drug release) é um dispositivo de nylon que possui "asas" que se fixam nas fêmeas. As esponjas são lubrificadas com creme de Savlon e podem ser inseridas com aplicador ou com os dedos, e o C.I.D.R. são lubrificadas com lubrificante obstétrico e inseridos através de uma pistola. Não existe diferença na eficácia destas técnicas, contudo o C.I.D.R. pode causar ablação interna em pequenos animais (RUSSELL, 1998).

A duração do tratamento progestativo pode ser de 10 a 12 dias ou de 17 a 21 dias, contudo o tratamento curto tem apresentado melhor resultado do que durante um longo período de tempo (BARRIL,1995).

Pode-se fazer uso da prostaglandina F2-alfa sozinha, para a indução e sincronização do estro em cabras, aplicada em duas doses, com 11 dias de intervalo entre as aplicações. Pelo fato deste hormônio agir em primeira instância sobre o corpo lúteo, deve-se levar em conta para a sua aplicação o estado reprodutivo em que a fêmea se encontra. A ação da PGF2-alfa é de promover luteólise, tendo efeito apenas a partir do quarto dia do ciclo estral (dia 0= dia do estro) em diante, e durante qualquer fase da gestação (CORDEIRO,1997).

GECO

Um dos métodos de sincronização mais usados no Brasil é o de esquema curto, com dez dias, usando-se esponjas impregnadas com progestágenos, colocadas na porção cranial da vaginal, associado a uma aplicação de 100mg de um análogo de PGF2 alfa (cloprostenol) no oitavo dia. A retirada da esponja se faz no 10^o dia, com aparecimento de estro em torno de 24 a 54 horas. Essa variação é menor nas doadoras (24 a 36 horas). Isto se deve às altas doses de gonadotrofina utilizadas para a superovulação, que desencadeia um processo de sincronização mais preciso nas doadoras. E considerando a maior variação do aparecimento do estro nas receptoras recomenda-se a retirada das esponjas vaginais 24 horas antes das doadoras (GONZALEZ e OLIVEIRA, 1991).

Comparando-se o MAP e Norgestomet em relação a influência do tipo de progestágeno sobre a ovulação de cabras, concluiu-se que ambos os progestágenos podem ser utilizados em programas de sincronização de estro, todavia recomenda-se o norgestomet, através do implante auricular subcutâneo, por não determinar resposta inflamatória no local de administração. O implante vaginal pode determinar reação inflamatória na cévix e vagina, além de determinar o aparecimento de infecções secundárias comprometendo o programa de suprovulação, em função de mascarar os resultados de inseminação natural ou artificial (RABELO,1999).

Os tratamentos hormonais apresentam resultados biológicos variáveis e ainda são onerosos quando a relação custo-benefício é avaliada, por isso foi testado reutilização do implante C.I.D.R., sendo que os resultados mostraram ser possível esta prática (GUIDO et al, 1999).

A sincronização do estro e da ovulação, no Brasil, em especial no Nordeste, ainda tem seu uso limitado pelo elevado custo e pela pequena disponibilidade, no mercado nacional, de hormônios ou substâncias correlatas com comprovada atividade gonadotrófica (SANTANA,1994).

GECO

2.5. Superovulação

Sabe-se que as fêmeas mamíferas desde o seu nascimento possuem milhares de oócitos, embora um número limitado de descendentes sejam produzidos. Este fato está relacionado com os períodos de gestação, a espécie, a raça e o próprio animal, reduzindo assim as oportunidades de ovulação para um, dois ou três óvulos para cada ciclo ovárico das fêmeas não multíparas (GONZALEZ e OLIVEIRA, 1991).

A superovulação é definida como sendo a superestimulação ovariana, através de gonadotrofinas exógenas, permitindo a obtenção de números de óvulos superior àquele que é normalmente produzido em cada ciclo reprodutivo (SANTANA,1994).

O aumento do número de folículos pré-ovulatórios, o qual conduz à superovulação, é obtido pela administração massiva de hormônios gonadotrópicos de origem coriônica (PMSG ou eCG) ou hipofisária (FSH e LH) (BARIL, 1995)

Nas cabras cíclicas, o tratamento gonadotrópico pode ser realizado no momento da fase folicular do ciclo estral. Porém, este método não é aplicável a um grupo de fêmeas tratadas simultaneamente sem uma sincronização anterior do ciclo sexual, e em adição ele é ineficaz em período anovulatório. Portanto, a estimulação ovariana acontece geralmente no fim do tratamento progestativo (BARIL, 1995).

A superovulação em cabras é freqüentemente limitada devido ao custo de gonadotropina e os requerimentos durante o manejo. PMSG (gonadotrofina sérica da égua prenhe) possui as vantagens de ter baixo custo e de ser usado em dose única, mas a variabilidade da resposta obtida restringe seu uso (PINTADO et al, 1998).

GECO

Antigamente, PMSG era o hormônio mais utilizado na maioria dos países, entretanto hoje há algumas restrições do seu uso, pelos inconvenientes provocados pela sua longa meia vida, afetando a migração dos gametas e os primeiros estágios de desenvolvimento embrionário. Além disso, o uso do PMSG está associado à regressão dos corpos lúteos, resultando no encurtamento do ciclo subsequente e/ou mortalidade embrionária (GONZALEZ e OLIVEIRA, 1991). A baixa produção de embriões com este tratamento, faz com que ele seja pouco utilizado para induzir superovulação na cabra (BARIL, 1995).

No caso de doadoras permanentes, a administração repetida de FSH suíno provoca a aparição de anticorpos anti-pFSH. Esta resposta imunitária provoca uma diminuição do número de ovulações em 40 a 50% das cabras desde o terceiro tratamento. A indução repetida da superovulação com FSH de origem ovina não provoca a diminuição da resposta ovulatória. O emprego deste hormônio em cabras submetidas a vários tratamentos é aconselhado (BARIL, 1995).

Dois fatores limitantes tem sido identificado em T.E. em cabras, a variabilidade de resposta ao tratamento e a prematura regressão do corpo lúteo. Esta variabilidade é mais marcante, quando a gonodotrofina usada é o PMSG, entretanto o baixo custo da PMSG e suas vantagens de manejo sobre o FSH, justifica seu uso em algumas circunstâncias. PINTADO et al (1998) realizou experimento com cabras da raça Murciana mostrando que o tratamento feito com PMSG associado a anticorpos de PMSG aumenta o número de embriões viáveis, e que a reposição parcial de FSH por PMSG no final do tratamento não compromete o número de embriões coletados.

TSUODA e SUGIE (1989) obtiveram com cabras superovuladas com FSH e PMSG, a percentagem de embriões colhidos foi altamente significativa em favor do FSH, com um média entre 9,4 a 5,6, e 5,7 a 4,4 por fêmea tratada com FSH e PMSG, respectivamente.

GECO

Muitos têm sido os estudos acerca dos efeitos da PMSG versus FSH na estimulação ovárica, qualidade dos oócitos ou embriões, produção de gestações múltiplas e endocrinologia da superovulação. A principal conclusão tem sido unânime: existe uma enorme e irresolúvel variação individual na resposta a superovulação quer com PMSG quer com FSH. Além disso ambos são bioactivamente ricos em hormônio luteinizante LH e ambos variam consideravelmente entre lotes nas razões entre FSH:LH (POTES, 1990)

Outro hormônio que vem sendo usado com resultados favoráveis é a Gonadotrofina da Menopausa Humana (HMG), extraída da vagina da mulher em menopausa. A dose usada para a superovulação nos pequenos ruminantes, é de 1200U.I, administrado em doses decrescentes (SANTANA,1994). Sua composição apresenta relação igual de FSH e LH. Os primeiros resultados do uso de HMG como agente superovulante na Estação Experimental de Pendência (EMEPA-PB), mostraram melhores taxas com relação ao número de corpos lúteos do que o FSH nacional (GONZALES e OLIVEIRA,1991).

A gonadotrofina coriônica equina (eCG) também pode ser utilizada na superovulação, Entretanto, estudos realizados comparando sua eficiência com o FSH, constatou-se que a taxa de embriões no grupo tratado com FSH foi maior.. O eCG não deve ser recomendado por determinar uma instabilidade bastante acentuada na resposta superovulatória (COLETO et al, 1999).

A utilização de gonadotrofina coriônica humana (hCG) para incrementar a resposta superovulatória de cabras superovuladas com hormônio folículo estimulante (FSH) não influenciou a resposta superovulatória e nem o número de embriões recuperados (LIMA et al, 1999).

Mesmo que as causas da luteólise prematura não sejam conhecidas, a administração de um inibidor da síntese de prostaglandina (Flunixin Meglumina) diminui a frequência de aparição

GECO

deste fenômeno nas cabras superovuladas, mas a produção de embriões não é melhorada por este tratamento (BARIL, 1995).

A resposta ovulatória média é geralmente compreendida entre 12 e 16 ovulações, mas qualquer que seja o tratamento existe uma grande variação da resposta individual (0 a 40 corpos lúteos) (BARIL, 1995). Esta resposta é influenciada por diversos fatores, como idade, estação do ano, condição corporal, raça, nutrição, fase de lactação e stress (BUCKRELL,1999)

2.6. Fecundação das doadoras

Na prática o estro, quando o mesmo pode ser em 90% dos casos, é a prova mais confiável, que revela a proximidade da ovulação. Em geral o estro é detectado três vezes por dia com ajuda de machos vasectomizados, os quais são mantidos com as fêmeas a fim de determinar com precisão seus primeiros sinais (SANTANA,1994)

A monta natural é um método eficaz, mas frequentemente não pode ser realizado devido aos machos de alto valor genético estarem localizados em diferentes centros de I.A. e não nos rebanhos (BARIL,1995).

Nos pequenos ruminantes, as doadoras de embriões são normalmente inseminadas *in utero* sob controle endoscópico, afim de depositar os espermatozóides á proximidade do local de fecundação. Com este método a taxa de ovos fecundados é superior áquela obtida após I.A. cervical e utilizando um número menor de espermatozóides. A taxa de ovos fecundados, após I.A. por endoscopia, não é diferente daquela obtida após monta natural (BARIL,1995).

GECO

2.7. Coleta de Embriões

2.7.1 Momento da Coleta

Os embriões são normalmente coletados por lavagem dos cornos uterinos entre o 6^o e 8^o dia após o início do estro. Quando os embriões devem ser congelados, é aconselhado efetuar a coleta no 7^o ou 8^o dia para obter o máximo de embriões ao estado de blastocisto, no qual a congelação em caprinos é melhor controlada. No caso de transplante de embriões executado no dia da coleta, esta pode ser efetuada pela lavagem dos ovidutos entre 2^o e o 4^o dia, afim de reduzir a perda de embriões devido á luteólise prematura dos corpos lúteos (BARIL,1995).

2.7.2. Meio de Coleta

A viabilidade embrionária tem que ser preservada desde a colheita até a transferência de embriões. Vários tipos de meios são utilizados, entretanto o mais comum é o PBS (Dulbecco Salino fosfato tamponado enriquecido com soro fetal bovino, avino ou caprino (5-10%) e antibióticos (GONZALES e OLIVEIRA,1991).

2.7.3. Métodos de Coleta

Nos pequenos ruminantes a colheita de embriões pode ser realizada através de 3 diferentes métodos: cirúrgico com laparotomia; não cirúrgico via transcervical; não cirúrgico por endoscopia.

Método Cirúrgico

Inicialmente, deve ser suspenso o oferecimento de alimento e água a partir de 24 horas antes da cirurgia, para prevenir o aparecimento de timpanismo no pós cirúrgico. A área abdominal perto do úbere deve ser feito a tricotomia e assepsia com desinfetante cirúrgico para remover qualquer debris que possa causar infecção na região da incisão (RUSSELL,1998)

GECO

Os pré anestésicos e anestésicos utilizados pelos diversos autores são: inalação com halotano; cloridrato de xilasina como tranquilizante , seguido de infiltração local de lidocaína; ou hidrocloreto de clorpromazine (OLIVEIRA, 1994).

Uma vez anestesiados, as fêmeas são contidas numa mesa móvel inclinada (num ângulo de 45°), em decúbito dorsal, de tal forma que a cabeça do animal fique numa posição mais baixa que o corpo, permitindo assim, um acesso fácil aos órgãos genitais (OLIVEIRA, 1994).

Faz-se uma incisão cirúrgica de 8 cm na linha alba, imediatamente anterior à glândula mamária, expondo-se os cornos uterinos (OLIVEIRA, 1994). A colheita de embriões é feita através da lavagem dos cornos uterinos, que é menos traumática do que a lavagem de ovidutos. Essa técnica consiste na injeção de meio a 2-3 cm da junção útero-tubárica, através de um catéter endovenoso e recolhimento por um catéter de Foley introduzido próximo a bifurcação uterina. Como este método limita-se a colheita de embriões que se encontram no útero, deve ser usado somente após o quarto dia da cobertura (SANTANA,1994).

Esta técnica é a que provoca menos trauma e, conseqüentemente, menos aderências a nível de ovários e ovidutos. Esta ausência de lesões é atribuída a uma mínima manipulação dos ovidutos e estruturas adjacentes (SANTANA, 1994).

O inconveniente da técnica de lavagem uterina é a dificuldade de recolhimento de embriões que se encontram nas extremidades dos cornos uterinos, muito estreitos, longos e tortuosos na cabra (POTES,1990).

Para a minimização da possível ocorrência de aderências nas partes de trato genital exposto, que deve ser manipulado com cuidado,

GECO

e proceder uma lavagem com soro fisiológico heparinizado, durante a exposição deste no meio ambiente. Após sua reintrodução na cavidade, deve-se seguir os procedimentos de um intervenção cirúrgica abdominal (OLIVEIRA e GONZALES,1992).

Esta técnica é a mais utilizada para coletar embriões de cabras. A taxa de ovos coletados é de 70 a 90%. No entanto, nas doadoras permanentes, nas quais a coleta é repetida, a aparição de aderências do útero, ovidutos e ovários tem por consequência a diminuição da taxa de recuperação dos ovos (BARIL,1995).

O cateter é um dos instrumentos mais importantes na recolha de embriões. O mais utilizado em pequenos ruminantes é o "Foley" com duas vias, uma para o balão (cuff) de adaptação ao corno uterino e a outra para instilar e/ou recolher o meio. Usam-se normalmente cateteres dos números 8, 10 e 12 com balão de 3 a 5 ml. Existe também cateter de 3 vias, sendo uma para o ar, uma segunda para injeção do meio e uma terceira para o recolhimento do líquido (POTES,1990)

Método Não Cirúrgico (Via Transcervical)

Embora a técnica de colheita cirúrgica de embriões em caprinos venha sendo utilizada com bons índices de recuperação, apresenta o inconveniente de limitar o seu uso em doadoras por no máximo 2 a 3 vezes, devido aos traumas cirúrgicos, aderências pós-operatórias, custos elevados e exigência de mão de obra especializada (GONZALES e OLIVEIRA, 1992).

Visando minimizar os traumas e diminuir a relação custo benefício da técnica cirúrgica, procurou-se adaptar ao caprino a técnica de colheita cervical, utilizada com êxito nos bovinos. Todavia, uma das dificuldades no uso desta técnica é o diâmetro estreito do canal cervical da cabra, restringindo a passagem do cateter (GONZALES e OLIVEIRA, 1992).

GECO

Para a realização deste procedimento os animais devem ser sedados ou mantidos sob anestesia geral ou epidural. Os animais podem ser contidos em estação, em décubito esternal ou dorsal, ou em tronco apropriado com os membros posteriores elevados (CORDEIRO,1997)

A primeira coleta não cirúrgica em pequenos ruminantes foi reportada por BONDURANT et al (1984) que obtiveram blastocistos de caprinos leiteiros não cirurgicamente com auxílio de Laminaria japônica (dilatador cervical metálico). Os resultados desta técnica não foram positivos na maioria dos casos (GONZALES e OLIVEIRA, 1992).

PINHEIRO et al com um espéculo bico de pato localizou a abertura da cervix e com auxílio de duas pinças de Allis esta foi tracionada e fixadas lateralmente para a passagem da sonda de 3 vias direcionada a um dos cornos uterinos. O balão foi inflado com 3cm³de ar e foram administrados 20 ml de PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) em pequenas quantidades, recuperando-os em um tubo coletor graduado sob o sistema de vácuo. Após a colheita foi administrado 5ml de solução anti-séptica na vagina a fim de prevenir infecções devido aos traumatismos causados pelas pinças de Allis (CORDEIRO,1997).

Objetivando facilitar a passagem do cateter através da cérvix em cabras, VAN NIEKERK et al utilizaram dois tratamentos diferentes. Em cinco cabras foram colocadas, dois dias após a cobertura, esponjas impregnadas de medroxiprogesterona (MAP) na dose de 60mg até o dia da colheita. Outras cinco cabras foram tratadas com 1mg de prostaglandina E2 instilada na porção externa da cérvix (24 e 12 horas antes da colheita), associada ao cipionato de estradiol (1mg via intramuscular). Nas cinco cabras tratadas com esponjas, não foi possível a passagem do cateter em duas delas. Naquelas tratadas com PGE2 e estradiol o cateter pôde passar facilmente através da cérvix, em todas elas. (CORDEIRO,1997).

GECO

FLOHR et al (1999) e WULSTER et al (1999) utilizaram estradiol-17 beta e occitocina para dilatar a cervix de ovelhas, e este procedimento, em ambas experiências, facilitou a aplicação da técnica de coleta transcervical.

Comparando o método de colheita embrionária pela via transcervical ao método cirúrgico (laparotomia) não existe diferença significativa entre eles, recomendando-se o uso do primeiro para caprinos (CORDEIRO,1997).

Método por Laparoscopia

A principal vantagem desta técnica é o fato de produzir menos traumatismos ao sistema genital da doadora comparado ao método cirúrgico, contudo apresenta restrições ao seu uso por necessitar, para a sua execução, de pessoal especializado e por ser de alto custo o aparelho utilizado neste procedimento (CORDEIRO,1997).

Os animais ficam em jejum hidro-alimentar por 24 horas e recebem anestesia geral. Em uma mesa especial o animal é contido com a cabeça para baixo. A técnica consiste na introdução de um trocáter (7mm de diâmetro) na cavidade abdominal para a passagem da fonte óptica (endoscópio rígido) para a visualização dos órgãos genitais. Dois outros trocâteres são introduzidos próximo ao primeiro para a passagem de uma pinça de manipulação e de fixação dos cornos uterinos e um cateter de foley para o recolhimento do meio, o qual é introduzido por um catéter endovenoso inserido próximo da junção útero-tubárica. Quando é utilizado um cateter rígido de três vias, para introdução e recolhimento do meio, consegue-se melhorar os índices de recuperação dos embriões (GONZALES e OLIVEIRA,1992).

Pode ainda ser usado nesta técnica, o enchimento da cavidade abdominal com ar (CO₂) para facilitar a visualização e localização, através do endoscópio, do sistema genital da doadora (CORDEIRO,1997).

GECO

PINHEIRO et al coletou embriões por laparoscopia de dez cabras. Estas foram anestesiadas e contidas em mesa cirúrgica própria em decúbito dorsal com inclinação de 45° com o plano horizontal e após a tricotomia e assepsia da região abdominal foram feitas três perfurações, sendo a primeira e a segunda equidistantes 2cm da linha alba e 5cm do úbere e a terceira sobre a linha alba a 8cm do úbere. Pela primeira incisão (à esquerda) foi introduzido o laparoscópio, pela segunda (à direita), a pinça de manipulação e pela terceira incisão foi introduzido um trocater de 3 mm de diâmetro, o qual fez a perfuração do útero, após este ter sido pinçado próximo à bifurcação. Após a retirada do trocater, uma sonda de três vias foi introduzida e o balão inflado com 3cm³ de ar e então o útero foi liberado e pinçado na porção cranial para evitar a perda de líquido pelas tubas. Administrou-se 20 ml de PBS em cada corno pela segunda via da sonda e recuperado pela terceira via, em um recipiente graduado sob sistema de vácuo (CORDEIRO,1997)

Nas cabras submetidas a uma primeira coleta, a taxa de ovos coletados por endoscopia é inferior de 10 a 15% em relação aquela obtida por laparotomia. No entanto, no caso de cabras doadoras permanentes, esta taxa não diminui com a repetição das coletas. Nestas fêmeas é preconizado utilizar a coleta de embriões sob controle do endoscópio (BARIL,1995).

Esta técnica apresenta com vantagens a ausência de aderências, menos stress e possibilidade do uso de fêmeas geneticamente superiores por várias vezes, sem os traumas cirúrgicos. O alto custo do aparelho de laparoscopia e a necessidade de uma equipe com treinamento especial são limitações, que restringem a utilização deste método nas instituições de pesquisa e universidade (GONZALES e OLIVEIRA,1992).

GECO

2.8. Avaliação dos Embriões

Antes dos embriões serem transferidos para as receptoras, eles são avaliados, principalmente quanto ao seu estágio de desenvolvimento. Geralmente 80% dos embriões coletados são considerados de boa qualidade(internet)

Após ter deixado sedimentar os embriões dentro do líquido de coleta, estes são avaliados em um lupa binocular a fim de observar sua viabilidade sobres os critérios morfológicos em função do dia da coleta. Assim no 7^o dia, o estágio característico é de mórula, ao 8^o dia é de blastocisto. Além da diferença entre dois estágios, isto é, desenvolvimento mais ou menos pronunciado de blastocle e início de formação do botão embrionário, os embriões que não apresentem este tipo de arranjo celular são considerados mortos ou degenerados, ou em via de degeneração. Somente os embriões julgados, pelo menos, de boa qualidade devem ser utilizados (SANTANA, 1994)

LINDNER e WRIGHT (1983) estabeleceram os seguintes critérios de avaliação de embriões: excelente, que corresponde ao embrião ideal, esférico, simétrico, possuidos de células de tamanho, cor e textura uniforme; bom, que apresenta pequenas imperfeições, por exemplo blastômeros separados, uma forma irregular, algumas vesículas; medíocre, possuem defeitos mais visíveis mas sem gravidade, presença de blastômeros, forma irregular, algumas vesículas; mau, apresenta defeitos graves, muitos blastômeros separados, células degeneradas, células de diferentes tamanhos, múltiplas vesículas, mas aparêcia de uma massa embrionária viável (POTES,1990).

Existem outros métodos mais ou menos complexos, entretanto não aplicáveis na prática na determinação da viabilidade embrionária: desenvolvimento depois na cultura "in vitro"; desenvolvimento depois da transferência para ovidutos de coelhas, determinação de anomalias cromossômicas e teste de coloração (POTES,1990).

GECO

O método mais largamente empregue continua sendo o da avaliação morfológica. Contudo, é possível obter um gestação de um embrião de fraca aparência numa boa doadora, enquanto que um bom embrião pode sucumbir numa receptora fraca (POTES,1990).

2.9. Conservação de Embriões

Os embriões selecionados são conservados dentro de meio próprio sob atmosfera e temperatura controlada. Após a conservação é recomendado que os embriões sejam transferidos dentro de um espaço de duas horas seguintes a sua coleta, sem ultrapassar das quatro horas (SANTANA,1994).

Pode ser usado o resfriamento dos embriões a $+4^{\circ}\text{C}$ para conservação que não ultrapasse 24 horas (BARIL, 1995)

Para uma conservação de longa duração, os embriões são congelados a -196°C . Menos de 3 horas após a coleta, os embriões mantidos entre $+20^{\circ}\text{C}$ e $+30^{\circ}\text{C}$ são passados sucessivamente em 2 a 3 banhos de concentração crescente em crioprotetor (glicerol 0,7M e 1,4M; DMSO ou etilenoglicol 0,5M; 1,0M e após 1,5M). Os embriões são condicionados em paillette de propileno de 0,25ml. Desde o condicionamento os embriões são resfriados em razão de 1 a $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ até 7°C , temperatura na qual ocorre a cristalização. Em seguida, o resfriamento prossegue em razão de $0,3^{\circ}\text{C}$ até -30 a -35°C e logo após são emergidos diretamente no Nitrogênio líquido a -196°C (BARIL,1995).

O descongelamento faz-se colocando os "paillettes" em contato com a água a 37°C . A retirada do crioprotetor é feita através de passagem dos embriões em 2 a 3 banhos de concentração decrescente de crioprotetor, ou por passagem direta em um solução de PBS com sucrose 0,25M. (BARIL,1995).

GECO

2.10. Transferência de Embriões

Os embriões são geralmente transplantados em um só corno uterino, do lado ipsilateral ao ovário apresentando pelo menos um corpo lúteo funcional (BARIL,1995). A taxa de sobrevivência embrionária é maior, quando são transferidos 2 ou 3 embriões, comparando-se com a transferência de apenas um embrião (BUCKRELL,1999)

Outro método de transferência é através da laparoscopia. A técnica consiste na visualização dos órgãos genitais com o uso do laparoscópio. Duas aberturas são feitas com o trocater, para a introdução na cavidade abdominal de um pinça de fixação dos cornos uterinos e uma pipeta de vidro ou um cateter contendo o embrião. As transferências realizadas no 6^o e 7^o dia do ciclo estral apresentam maior percentual de prenhez em relação às realizadas no 5^o dia (GONZALES e OLIVEIRA,1992).

A taxa de sobrevivência dos embriões após o transplante é normalmente próxima de 50%, porém vários parâmetros podem fazê-la variar (BARIL,1995).

A transferência de embriões é a forma mais segura de permuta de genes do ponto de vista sanitário, quer seja de um Estado para o outro ou de um continente a outro. Assim esta técnica permite contornar a proibição de importação de animais vivos dentro de numerosos países (SANTANA, 1994).

3. Conclusão

- A transferência de embriões é uma moderna tecnologia capaz de promover o melhoramento genético dos rebanhos caprinos mais

GECO

rapidamente. Esta técnica consiste em aumentar a produção embrionária, através do aumento do número de óvulos liberados, após a administração de hormônios, em uma fêmea geneticamente superior e transferir os embriões para uma fêmea de baixo valor zootécnico;

- A transferência de embriões deve seguir o seguinte plano de trabalho : seleção das doadoras e receptoras, sincronização do ciclo estral, superovulação, colheita de embriões, avaliação e transferência dos mesmos;

- A doadora deve ser geneticamente superiores, ter fertilidade comprovada, ser plurípara, idade entre 24 e 72 meses, boa aptidão leiteira, bom estado nutricional e sanitário. A escolha da receptora é tão importante quanto a doadora, a receptora deve apresentar ciclos estrais normais, nulíparas, bom estado nutricional e sanitário e boa habilidade materna;

- O método mais eficiente para a sincronização do ciclo estral é o uso de esponja impregnada de progestágenos durante 10 dias , associado a aplicação de PGF2- alfa no 8º dia. Para promover a superovulação nas doadoras geralmente utiliza-se FSH;

- A fecundação da doadora pode ser feita através de monta natural ou inseminação artificial;

- Os embriões são normalmente coletados entre o 6º e o 8º dia após o início do estro. A solução utilizada é o P.B.S. adicionado de 10% de soro fetal de bezerros ou cabrito;

- Os métodos de coleta são: cirúrgico por laparotomia, não cirúrgico por laparoscopia e por via transcervical. O método cirúrgico é efetivo, no entanto pode levar á formação de aderências, devido a manipulação dos órgão genitais. Os métodos por laparoscopia e via transcervical são menos traumatizantes e permitem colheitas repetidas;

GECO

- Deve-se fazer avaliação da viabilidade dos embriões, através de suas características morfológicas;
- Deve-se transplantar dois ou três embriões em cada receptora desde que esteja presente um corpo lúteo ativo;
- O controle sanitário e manejo adequados são fundamentais para o desenvolvimento eficiente desta técnica;

4. Referências Bibliográficas

- BARIL,G. *Possibilidades atuais da transferência de embriões em caprinos*. Congresso brasileiro de reprodução animal, v.11, 111-119p, 1995
- BUCKRELL,B. What is embryo transfer? Disponível na internet via aztec-net.com/~srgenetics/et.htm, 1999
- COLETO,Z.F.; LIMA,P.F.; OLIVEIRA,M.A.L.; WISCHARAL,A.; GUIDO,S.I.; SOUZA,D.M.B. Superovulação de cabras mestiças com eCG e FSH. *Revista Bras. Reprod. Anim.* Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. V. 23,n. 3, 371-373p, 1999
- CORDEIRO, M.F. *Alguns aspectos sobre métodos de colheita de embriões em caprinos*. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – UFBA, 1997, p.
- FLOHR,S.F., WULSTER,M.C.; LEWIS,G.S. Technical note: development of a transcervical oocyte recovery procedure for sheep. Disponível na Internet via <http://www.healthgate.com/healthgate/MEDLINE/search-advanced.shtml>, 1999

GECO

- HAFEZ, E.S.E. Ovinos e caprinos. In: JAINUDEEN, M.R.; HAFEZ, E.S.E. Reprodução animal. 6^o edição. São Paulo: Manole, 1995. 582p. 335-347p.
- LIMA, P.F.; OLIVEIRA, M.A.L.; GUIDO, S.I.; SANTOS FILHO, A.S.; WISCHARAL, A. Administração de hCG em cabras superovuladas com F.S.H. *Revista Bras. Reprod. Anim.* Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. V. 23, n. 3, 373-375p, 1999.
- OLIVEIRA, V.S.; GONZALES, C.I.M. Técnicas para incrementar a eficiência reprodutiva de caprinos e ovinos. XXVIII Reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia. Paraíba, 1991
- OLIVEIRA, V.S.; GONZALES, C.I.M. *Transferência de embriões em caprinos*. I Simpósio nordestino sobre caprinos e ovinos deslançados. 21-32p, 1992
- OLIVEIRA, C.C. *Métodos empregados e alguns fatores que interferem na transferência de embriões em caprinos*. Monografia (graduação em Medicina Veterinária) – UFBA, 1994, p.
- PINTADO, B.; ADAN, A.G.; LLANO, B.P. Superovulatory response of murciana goats to treatments based on PMSG/ anti-PMSG or combined FSH/PMSG administration. *Theriogenology*. V.50, 357-364p, 1998.
- POTES, J.A.C. *Transferência embrionária em caprinos*. Vila Real. Universidade de trás-os-Montes e Alto Douro, 1990, 54 p. Tese de Doutorado.
- RUSSELL, D. Embryo tranfer in sheep and goats. Disponível na internet via 1998.
- SANTANA, A. F de. *Transferência de embriões em caprinos*. Seminário apresentado no curso de mestrado em produção e reprodução de

GECO

pequenos ruminantes da faculdade de veterinária da Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza-Ceará, 1994.

VALLE, M.A.G.; AMÂNCIO, M..J.J.; ANDRADE, S.J.T.; CHOW, L.A. Transferência de embriões em caprinos leiteiros. *Cabras & Bodes*. Ano IV, nº 16, 13-14p, 1988.

WULSTER, M.C.; LEWIS, G.S; COSTINE, B.A. Estradiol-17 beta-oxytocin-induced cervical dilatation in sheep: application to transcervical embryo transfer. Disponível na internet via <http://www.Healthgatecom./healthgate/MEDLINE/search-advaced.shtml>, 1999

RABELO, M.C.; PEREIRA, R.J.T.; GUERRA, M.M.P.; FALCÃO FILHO, M.C.; MERGULHÃO, F.C.C. Administração de diferentes progestágenos em receptoras caprinas sem raça definida (SRD). *Revista Bras. Reprod. Anim.* Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. V. 23, n. 3, 375-377p, 1999.