

## TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES OVINOS EM CONDIÇÕES DE CAMPO<sup>(1)</sup>

RAFAEL HERRERA ALVAREZ<sup>(2)</sup> e ADELMA SANTANA LEAL FEITOZA<sup>(3)</sup>

**RESUMO:** Foi avaliada a eficácia de um programa de transferência de embriões ovinos a nível de campo. Dez ovelhas da raça Ideal, divididas em dois lotes de cinco animais, foram superovuladas com HMG (gonadotrofina da mulher na menopausa) ou PMSG (gonadotrofina sérica de égua prenhe) respectivamente e cobertas no cio induzido após um tratamento de sincronização utilizando esponjas vaginais de medroxiprogesterona durante doze dias. A coleta de embriões foi realizada pela via cirúrgica sete dias após a cobertura. Em média foram observados 8,1 corpos lúteos; 1,4 folículos e recuperados 4,8 embriões, dos quais 2,1 embriões viáveis por doadora coletada. A taxa de embriões viáveis do tratamento HMG (62,5%) foi maior que a observada no tratamento PMSG (17,8%). Sete ovelhas mestiças suffolk receberam cirurgicamente um ou dois embriões, tendo obtido quatro (57,1%) gestações.

**Termos para indexação:** ovinos, transferência de embriões, superovulação, PMSG, HMG, sincronização do cio.

### *Sheep embryo transfer on farm conditions*

**SUMMARY:** The efficiency of an embryo transfer program was evaluated with sheep on farm conditions. After a 12 days medroxiprogesterone intravaginal device treatment for oestrus synchronization, ten Ideal ewes were superovulated with HMG (Human Menopausal Gonadotrophin) or PMSG (Pregnant Mare Serum Gonadotrophin), five in each treatment. Seven days after the mating, the embryos were surgically recovered. The following mean results were observed per donor: 8.1 corpora lutea, 1.4 follicles, and 4.8 total embryos from which 2.1 were of good quality. The rate of good embryos from the HMG treatment was greater than the PMSG treatment (62.5% and 17.8%, respectively). Seven crossbred Suffolk ewes received surgically one or two embryos from which four (57.1%) pregnancies were obtained.

**Index terms:** sheep, embryo transfer, superovulation, PMSG, HMG, oestrus synchronization

- (1) Projeto IZ- 14-031/88. Recebido para publicação em janeiro de 1991.
- (2) Seção de Reprodução e Inseminação Artificial. Divisão de Técnica Básica e Auxiliar.
- (3) Posto de Ovinos e Caprinos de Itapetininga. Instituto de Zootecnia.

## INTRODUÇÃO

A transferência de embriões na espécie ovina está longe de ser uma novidade pois já nos anos trinta, Warrick e Berry (1933) citados por ARMSTRONG & EVANS (1983) relataram o nascimento do primeiro carneiro oriundo dessa técnica. Embora os diversos estudos realizados desde essa época tenham contribuído substancialmente para o aprimoramento das técnicas de coleta e transferência, pouco tem sido acrescentado aos resultados iniciais de produção de embriões, estando implicados fatores limitantes como clima (RIDDELL, et al., 1988), tratamento de superovulação, (WALKER et al., 1989), prolificidade (BINDON et al., 1986), entre outros.

Desta forma, atualmente os programas de reprodução que visam a multiplicação rápida da descendência de fêmeas de elevado valor genético ou comercial ainda ficam condicionados à disponibilidade de um número considerável de embriões viáveis. Em função deste obstáculo, o uso da transferência de embriões na espécie ovina fica restrito, na maioria das vezes, a trabalhos no âmbito de pesquisa. Entretanto, recentemente DEGUET et al. (1989) mostraram na espécie caprina, a qual apresenta rendimentos semelhantes à espécie ovina, que esta técnica pode ser perfeitamente realizável a nível comercial, em condições de campo.

Os tratamentos convencionais de superovulação consistem na aplicação exógena de hormônios, de origem coriônica ou hipofisiária possuindo atividade folículo estimulante. O PMSG (gonadotrofina sérica de égua prenhe) é o mais comumente utilizado pela sua simplicidade de aplicação embora apresente grande variabilidade de resposta ovariana (HUNTER, 1955). Já os hormônios parcialmente purificados de hipófises de origem suína (TORRES & COGNIE, 1984) e equina (AL-KAMALI et al., 1985) apresentam menor variação da resposta mas, em função de sua curta meia vida, necessitam ser aplicados várias vezes para manter um nível de estímulo satisfatório.

Recentes trabalhos sugerem a possibilidade de induzir uma superovulação com HMG (gonadotrofina extraída da urina da mulher na menopausa) com resultados superiores ao tratamento com PMSG (MARTEMUCCI et al., 1988). Para serem eficazes, estes tratamentos devem estar associados a substâncias que permitam a manipulação do ciclo sexual. Isso é conseguido pela aplicação de progestágenos sintéticos administrados na forma de esponja vaginal ou de implante auricular subcutâneo. No caso de dispor de um cio de referência, pode ser utilizada a prostaglandina F2 (MULTIGA & BAKER, 1982).

Considerando a falta de informações sobre a reprodução e transferência de embriões na espécie ovina no Brasil, o presente estudo objetiva avaliar a eficácia da implantação de um programa de transferência de embriões ovinos, realizado em condições de campo.

## MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi realizado nos meses de maio e junho no Posto de Ovinos e Caprinos de Itapetinga, SP, localizado na latitude 23°35'S, longitude 48°02'W.

Como doadoras foram utilizadas 10 ovelhas nuli-paras da raça Ideal, com idade média de 26,5 meses e peso médio de 32,8 kg e como receptoras, selecionaram-se 20 ovelhas mestiças-suffolk primíparas com idade média de 32,4 meses pesando em média 42,9 kg. O estado cíclico dos animais foi constatado nos 30 dias anteriores ao experimento pela observação da aceitação da monta utilizando carneiros vasectomizados.

No início do experimento, todos os animais, os quais encontravam-se em diferentes fases do ciclo sexual, foram tratados com esponjas vaginais impregnadas de 50 mg de medroxi-progesterona (Promone-E, lab. Upjhon - Brasil) durante 12 dias. Vinte e quatro horas antes do retiro da esponja, as doadoras foram separadas das receptoras e divididas ao acaso em dois grupos de cinco animais. Cada animal do grupo 1 recebeu injeção única de 1250 UI de PMSG (Folligon, lab. Intervet - México) enquanto que os animais do grupo 2 foram tratados com 675 UI de FSH (Pergovet, lab. Serrono - Brasil), equivalente a 9 ampolas de HMG (1 ampola = 75 UI de atividade FSH e 75 UI de atividade LH) administradas em doses decrescentes (3-3-2-1 ampolas) com intervalo de 12 horas.

Após o retiro das esponjas, as ovelhas foram colocadas na presença de machos vasectomizados para detectar o cio. As doadoras foram cobertas com machos da mesma raça no início e no final da receptividade sexual.

Do sexto ao sétimo dias posteriores à cobertura, a coleta de embriões foi realizada pelo método cirúrgico. Após jejum de 24 horas, uma sedação total foi obtida com a injeção intramuscular de 0,1 ml de xilazina 2% (Rumpun, lab. Bayer)/10 kg de peso vivo. A ovelha foi colocada em decúbito dorsal, na posição inclinada aproximadamente 30° em direção da cabeça. Após laparotomia sobre a linha branca, o útero foi facilmente exteriorizado e anotada a presença das estruturas ovarianas (corpos lúteos e folículos). A coleta foi realizada para cada corno segundo técnica descrita por HUNTER (1955) com algumas modificações (figura 1). Um cateter fino, tipo sonda uretral foi introduzido e fixado ao extremo do corno, próximo à junção utero-tubária. Em seguida, utilizando seringas de 20 ml com agulha de ponta romba, foram injetados sessenta ml de PBS (Phosphate Buffered Salina enriquecida com 2% de Soro Fetal Bovino) à altura da bifurcação dos cornos uterinos, fazendo pressão com os dedos para evitar o refluxo. O líquido foi recuperado diretamente em placas de Petri (9 x 9 cm). As suturas da parede abdominal e da pele foram efetuadas seguindo as técnicas de cirurgia clássicas.

Imediatamente após a coleta, procedeu-se à procura dos embriões sob a lupa binocular ( $\times 10$ ). Os embriões foram colocados em placas com 4 compartimentos ( $3 \times 3$  cm) contendo PBS enriquecido de 20% de Soro Fetal Bovino. Uma primeira avaliação permitiu diferenciar os óvulos não fecundados dos embriões. Estes últimos foram julgados segundo dois critérios: 1) correspondência entre o estado de maturação embriológica no momento da coleta (mórula, blastocisto jovem, blastocisto expandido) 2) aspecto qualitativo clássico (tamanho, esfericidade, estado de agregação das células, integridade das células e da zona pelúcida, ausência de pontos picnóticos no citoplasma celular). Considerando esses critérios, os embriões foram classificados como bons, regulares e degenerados. Somente os embriões bons e regulares foram utilizados após lavagem nos quatro compartimentos da placa e finalmente condicionados em palhetas estéreis de 0,25 ml.

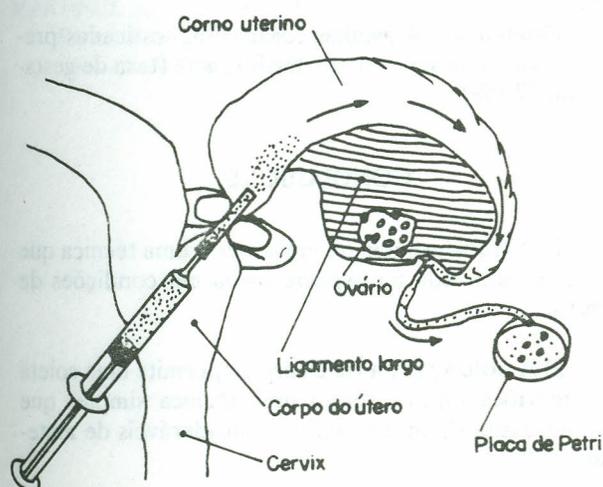


Figura 1. Representação esquemática do método de coleta de embriões ovinos pela via cirúrgica modificada de HUNTER et al. (1955).

A transferência foi realizada por via cirúrgica nas duas horas que seguiram a coleta. A exposição do útero da receptora foi feito da mesma forma que a doadora. O exame dos ovários permitiu verificar a presença e qualidade do corpo lúteo presente. Para cada ovelha receptora foram transferidos um ou dois embriões após punção, com agulhas de ponta romba, no corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo. A palheta foi introduzida no orifício da punção e direcionada no sentido da junção uterotubária. O conteúdo foi injetado lentamente retirando simultaneamente a palheta. Em seguida procedeu-se a sutura da parede abdominal e da pele da maneira clássica.

#### Análise dos resultados

A resposta ovariana em função dos tratamentos

foi analisada através do teste t ao nível de 5%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### A) Doadoras

Das 10 ovelhas tratadas, nove (90%) apresentaram um comportamento estral 24 a 48 horas após o retiro da esponja vaginal. A ovelha que não manifestou cio foi igualmente coberta após imobilização.

Os resultados da resposta ovariana, avaliada em função do número de corpos lúteos, folículos e embriões recuperados são apresentados no quadro 1.

Quadro 1. Descrição geral de resposta ovariana das ovelhas submetidas ao processo de superovulação e coleta de embriões

Nº de ovelhas tratadas	10
Nº de ovelhas com boa resposta ( $> 2$ CL)	9
Taxa de boa resposta (%)	90
Nº total de Corpos Lúteos (CL)	81
Média $\pm$ desvio padrão	8,1 $\pm$ 6,5
Nº máximo de CL/ovelha	17
Nº mínimo de CL/ovelha	1
Nº total de folículos	14
Média $\pm$ desvio padrão	1,4 $\pm$ 1,5
Nº máximo de folículos/ovelha	4
Nº mínimo de folículos/ovelha	0
Nº de ovelhas coletadas	9*
Nº total de embriões recuperados	43
Média $\pm$ desvio padrão	4,8 $\pm$ 4,2
Nº máximo de embriões/ovelha	11
Nº mínimo de embriões/ovelha	1
Taxa de recuperação (%)	55,1%
Nº de embriões viáveis	19
Média $\pm$ desvio padrão	2,1 $\pm$ 2,3
Taxa de viabilidade (%)	38,8

\* um animal apresentou problemas na recuperação do líquido de coleta

O líquido de lavagem uterina, foi recuperado de todas as ovelhas, com exceção de um animal que apresentou problemas de refluxo. O número de corpos lúteos observados variou de 1 a 17 por ovelha, com uma média de 8,1. Do total de corpos lúteos presentes nos ovários, 44 (55%) foram observados no ovário esquerdo ( $\bar{x} = 4,4$ ) e 37 (45%) no ovário direito ( $\bar{x} = 3,7$ ). Por sua vez, o número de folículos variou de 0 a 4 com média de 1,4; estando presentes 6 no ovário esquerdo ( $\bar{x} = 0,6$ ) e 8 no ovário direito ( $\bar{x} = 0,8$ ). O número de embriões coletados por ovelha variou conjuntamente de 1 a 11 com média de 4,8 (taxa de recuperação de 55,1%). Esses resultados são próximos aos encontrados por MULTIGA & BAKER (1982), ARMSTRONG & EVANS (1983), RUTTLE et al. (1988) nas raças Merino, Suffolk e Rambouillet respectivamente e inferiores aos relatados por MARTINEZ et al., (1985) e BUILLY RAMBOZ et al. (1987) no cruzamento F1 berrichon  $\times$  romanov. Essa diferença provavelmente

seja causada pela maior ou menor habilidade em realizar a coleta cirúrgica pois a prolificidade dessas raças é aproximadamente equivalente (BINDON et al., 1986).

Dos 43 embriões recuperados, seis apresentaram um estágio inferior a 8 células e 18 foram não fecundados, de forma que foram aproveitados unicamente 2,1 embriões transferíveis por doadora (taxa de viabilidade de 38,8%). A ovelha que não manifestou cio apresentou quatro corpos lúteos e foram recuperados dois embriões viáveis.

Quando comparados os dois tratamentos de superovulação, não existiu nenhuma diferença aparente ( $P > 0,05$ ). As cinco ovelhas superovuladas com PMSG responderam ao tratamento com  $8,8 \pm 7,1$  corpos lúteos,  $1,4 \pm 1,5$  folículos e  $3,8 \pm 4,1$  embriões em média. Aquelas tratadas com HMG responderam em média com  $7,4 \pm 6,7$  corpos lúteos,  $1,4 \pm 1,7$  folículos e  $4,8 \pm 4,8$  embriões. Um animal desse grupo não respondeu ao tratamento de superovulação. Por outro lado, a taxa de viabilidade de tratamento HMG (62,5%) foi superior ao tratamento PMSG (17,8%) (quadro 2).

**Quadro 2.** Resposta ovariana de ovelhas ideal superovuladas com PMSG e HMG ( $\bar{x} \pm$  desvio padrão)

Trat. Anim	Nº	Boa resp.	Nº de CL	Nº de Fol.	Embriões	
					total	bons
PMSG	5	5	(8,8 ± 7,1) <sub>a</sub>	(1,41 ± 1,5) <sub>a</sub>	(3,8 ± 4,1) <sub>a</sub> *	(0,8 ± 0,8) <sub>a</sub>
HMG	5	4	(7,4 ± 6,7) <sub>a</sub>	(1,4 ± 1,7) <sub>a</sub>	(4,8 ± 4,8) <sub>a</sub> **	(3,0 ± 2,8) <sub>b</sub>

\* A média considera o animal com boa resposta e que não foi coletado.

\*\* A média considera o animal que não respondeu à superovulação. Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si pelo teste t ( $P < 0,05$ ).

Resultados semelhantes foram relatados por MARTEMUCCI et al. (1988). Não são claras as causas dessa diferença pois contrariamente às observações de ARMSTRONG & EVANS (1983), TORRES & COGNIE (1984) e MARTEMUCCI et al. (1988), os quais atribuem um efeito negativo à presença de um grande número de folículos anovulatórios, o número de folículos não foi maior com o tratamento PMSG. Dessa forma, a causa de não fecundação dos óvulos não pode ser atribuída à produção esteroidogênica desses folículos.

### B) Receptoras

Todas as ovelhas receptoras foram observadas no cio. O início do comportamento estral apareceu 24 horas após o retiro da esponja vaginal e durou de 24 a 48 horas.

Oito dos embriões viáveis foram colocados em

cultivo e utilizados em outro experimento, de forma que unicamente sete ovelhas receberam um ou dois embriões após constatação da presença de um corpo lúteo. Uma das ovelhas utilizada como receptora apresentou um folículo e nenhum corpo lúteo. Esse animal não recebeu embrião.

Resultados de DEGUET et al. (1989), na espécie caprina, mostram que aproximadamente 10% dos animais não apresentaram corpo lúteo no momento da transferência. Se existe a suposição que em algumas receptoras a esponja vaginal é colocada no início do ciclo sexual natural, o retiro da mesma após 12 dias pode provocar um comportamento de cio não ovulatório. O ciclo natural prossegue normalmente e um segundo comportamento estral desta vez com ovulação que pode acontecer alguns dias mais tarde. Para resolver esse problema, ARMSTRONG & EVANS (1983), sugerem deixar a esponja vaginal durante um tempo maior (17 a 18 dias).

Finalmente, 4 ovelhas foram diagnosticadas prenhes, quatro meses após a transferência (taxa de gestação de 57,1%).

## CONCLUSÕES

1) A transferência de embriões é uma técnica que pode ser utilizada na espécie ovina em condições de campo.

2) A utilização da via cirúrgica permite uma coleta de embriões rápida, sendo uma técnica simples que não necessita de investimentos consideráveis de material.

## AGRADECIMENTOS

Aos senhores Pedro Joaquim da Silva, da SE-RIART; Luis Pereira, Antonio Teodoro Vieira e Pedro Vieira de Barros do Posto de Ovinos e Caprinos de Itapetininga, SP., pelas suas valiosas colaborações, nas atividades de campo.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-KAMALI, A.A.; ROLAND, M.P.; CROSBY, T.F. & GORDON, I. Reduced superovulatory response in the ewe following repeated gonadotrophin treatment. *Vet. Rec.*, London, 116(7):180-1, 1985.
- ARMSTRONG, D.T. & EVANS, G. Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. *Theriogenology*, Los Altos, CA, 19(1):31-42, 1983.
- BINDON, B.M.; PIPER, L.R.; GAHILL, L.P.; DRINCOURT, M.A. & O'SHEA, T.O. Genetic and hormonal factors affecting superovulation. *Theriogenology*, Los Altos, CA, 25(1):53-70, 1986.

- BULLY RAMBOZ, J.P.; NIBART, M.; HUMBLLOT, P. & THIBIER, M. Production d'embryons ovins. Influence de la saison et du traitement progestatif sur des brebis F1 (Berrichon x Romanov) superovulées par FSH-P. *Elev. Insem.*, Paris, 220:3-12, 1987.
- DEGUET, M.; JOISEL, F.; BOENDER, G. & DOBBELAERE, T. Transplantations pratiques dans 3 élevages de chevres angora. *Rec. Med. Vet.*, Paris, 165(10):807-13, 1989.
- HUNTER, G.L. Inter-breed ovum transfer in sheep. *J. Agric. Sci., Cambridge*, 46(2):143-9, 1955.
- MARTEMUCCI, G.; GAMBACORTA, M.; TOTEDA, F.; MANCHISI, A. & BELLITTI, E. Induzione della superovulazione nella pecora con PMSG, FSH-P, hMG, per il trapiano di embrioni. *Zootec. Nutr. Anim.*, Bologna, 15(5):379-86, 1988.
- MARTINEZ, A. L.; NIBART, M.; HUMBLLOT, P. & THIBIER, M. Production et congelation d'embryons chez la brebis. *Elev. Insem.*, Paris, 208:7-16, 1985.
- MULTIGA, E.R. & BAKER, A.A. Ovarian response, ova recovery and fertility in merino ewes superovulated either during the luteal phase of their oestrus cycle or after intravaginal progestagen treatment. *Theriogenology*, Los Altos, CA, 17(5):537-44, 1982.
- RIDDELL, M.G.; WOLFE, D.F. & STRINGFELLOW, D.A. Superovulation of sheep during the spring and summer in the southeastern United States. *Theriogenology*, Los Altos, CA, 29(1):297, 1988.
- RUTTLE, J.; LUCERO, S.; KEY, S.; DANIELS, M.; RODRIGUEZ, F. & YIM, H.S. Ovine oestrus synchronization and superovulation using norgetomet B and follicle stimulation hormone-pituitary. *Theriogenology*, Los Altos, CA, 30(2):421-7, 1988.
- TORRES, S. & COGNIE, Y. Superovulation and egg transfer in the ewe. *Reprod. Nutr. Dev.*, Paris, 24(5a):623-31, 1984.
- WALKER, S.K.; SMITH, D.H.; FRENHAM, A.; ASHMAN, R.J. & SEAMARK, R.F. The use of synthetic gonadotropin releasing treatment in the collection of sheep embryos. *Theriogenology*, Los Altos, CA, 31(4):741-52, 1989.