

MÚLTIPLA OVULAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM OVINOS

[Multiple ovulation and embryo transfer in sheep]

Edilson Soares Lopes Júnior^{1*}, Mayara de Souza Miranda¹, Ana Arlete de Amorim Silva¹

¹ Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal (LAFIBRA), Campus de Ciências Agrárias (CCA), Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Petrolina, Pernambuco, Brasil. *Autor para correspondência: e-mail: edilsonlopesjunior@yahoo.com.br

Resumo - A Múltipla Ovulação e Transferência de Embriões (MOTE) é uma biotécnica da reprodução de aplicação imediata em animais de fazenda e é uma importante ferramenta de melhoramento genético. Este trabalho foi elaborado para abordar alguns aspectos significativos para o sucesso da MOTE na espécie ovina.

Palavras-Chave: biotécnica; ovelha; superovulação.

Abstract - The Multiple Ovulation and Embryo Transfer (MOET) is a reproductive biotechnology that it is immediately applied in farm animals and it is an important tool of genetic improvement. This paper was prepared in order to comment some significant aspects that lead to success of MOET in ovine species.

Keywords: biotechnology; sheep; superovulation.

INTRODUÇÃO

O Nordeste do Brasil conta com a produção de diversas raças ovinas deslanadas, dentre elas, as raças Morada Nova e Santa Inês, que merecem destaque por serem animais adaptados ao clima tropical da região devido a sua alta rusticidade.

Os animais da raça Morada Nova apresentam boa aptidão para carne e pele. São animais de pequeno porte, não apresentam chifres, possuem tórax profundo, coxas musculosas e os pelos rasos, finos e ásperos. São considerados como uma importante fonte de proteína na alimentação de pequenos ovinocultores no semiárido nordestino (Laiza, 2012).

A raça Santa Inês é uma das mais utilizadas, seja em sistema extensivo seja semi-intensivo. Esta raça é nativa do Nordeste brasileiro, sendo proveniente de cruzamentos alternados com raças mais antigas, tais como a Morada Nova, Bergamácia e Crioula. A sua difusão em grande parte do Nordeste brasileiro é devida a sua rusticidade, produtividade e habilidade materna em qualquer clima do Brasil. Outro fator que contribuiu para sua disseminação é a característica de duplo propósito, produzindo tanto carne quanto pele (Silva et al., 2004). Os ovinos desta raça apresentam grande porte, sendo que os machos adultos apresentam massa corpórea de 80 a 100 kg, enquanto as fêmeas, 60 a 80 kg, com excelente qualidade de carne e baixo teor de

gordura. Além disso, apresentam, frequentemente, partos duplos, e excelente capacidade leiteira (Oliveira, 2001).

A exploração de ovinos deslanados na região Nordeste é realizada, desde criadores de subsistência, até criadores de animais de alta genética, o que demonstra a importância desses animais para a região.

PRODUÇÃO *IN VIVO* DE EMBRIÕES

A introdução de novas técnicas de colheita e transferência de embriões constitui uma ferramenta útil para o melhoramento genético, principalmente com a maximização da taxa de ovulação e quantidade de embriões produzidos. Portanto, aprimorar e maximizar os resultados, bem como diminuir custos são desafios a serem alcançados.

A produção *in vivo* de embriões consiste em promover uma estimulação hormonal ovariana, para induzir o desenvolvimento e a maturação de vários folículos simultaneamente.

O emprego desta biotécnica é capaz de promover uma rápida expansão genética em núcleos de fêmeas pré-selecionadas e, conseqüentemente, um aumento na intensidade de seleção das mesmas; transportar material genético com reduzido risco de transmissão de doenças; realizar estudos sobre a

interação materno-fetal; permitir a conservação de raças em perigo de extinção.

Porém, para o sucesso da mesma, deve-se levar em consideração alguns aspectos, a exemplo do estado nutricional e fisiológico da doadora, qualidade dos hormônios e adequação dos protocolos hormonais a serem utilizados e qualidade do sêmen.

Para a realização desta biotécnica, três etapas são fundamentais: sincronização do estro e superovulação; fecundação das doadoras; e colheita de embriões.

SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO E DA OVULAÇÃO

Para que todas as fêmeas entrem em estro e ovulem no mesmo momento, quando se realizará a fecundação, seja por monta natural ou inseminação artificial, faz-se necessária a sincronização do estro e da ovulação, a qual constitui uma importante ferramenta para obter o maior número possível de embriões, com o mesmo estágio de desenvolvimento, em todas as ovelhas que passaram pelo tratamento, bem como para equiparar cronologicamente os estados fisiológicos de receptoras e doadoras (Baril et al., 1995). A sincronização do estro também é responsável por diminuir o anestro pós-parto, acelerar a seleção de animais geneticamente superiores, diminuir o intervalo entre gerações e concentrar as parições no momento mais desejável para o produtor, sendo de fundamental importância para um bom programa de manejo reprodutivo em ovinos (Paula, 2008).

Nos ovinos, o desenvolvimento folicular ocorre em um padrão contínuo de ondas, onde aquela mais proeminente ocorre durante o estro, pois, nessa fase do ciclo estral, há o aumento na concentração de FSH, estimulando o surgimento de um crescimento sincrônico de pequenos folículos. Dependendo de fatores intrínsecos ou extrínsecos, um ou mais folículos com diâmetro acima de 5 mm, adquire dominância, ovulando pouco depois. Os folículos menores (subordinados) entram em processo de atresia, podendo ser capazes de responder a estímulos de gonadotrofina exógena e retomar o crescimento (Amiridis e Cseh, 2012).

O protocolo de sincronização mais comumente utilizado em ovinos é baseado no tratamento com progestágeno ou progesterona na forma de dispositivos intravaginais (esponja e CIDR) (Abecia et al., 2012). As esponjas vaginais de liberação lenta, impregnadas com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP), são muito utilizadas. O CIDR[®], que contém 0,33 g de progesterona natural, tem custo mais elevado, mas

apresenta também maior eficiência (Castilho et al., 2013).

Existem diferentes protocolos hormonais, dentre eles o de curto prazo, que, segundo Vilarinho et al. (2013), tem sido desenvolvido para controlar o desenvolvimento folicular e ovariano e a função lútea em ovinos. Este tratamento reduz a exposição ao progestágeno de 14 dias para 5-7 dias, reduzindo a possibilidade de folículos persistentes, embora protocolos de 14 dias estabeleçam maior sincronia da ovulação.

O protocolo a ser utilizado deve levar em consideração a fase em que o animal se encontra. Segundo Castilho et al. (2013), para realizar a sincronização do estro durante o anestro estacional, é necessário que o progestágeno seja acompanhado de eCG, o qual atua induzindo o desenvolvimento de folículos durante os períodos de inatividade hipotalâmica – hipofisária.

A sincronização do estro também pode ser realizada apenas com PGF_{2α} ou associada a progestágenos ou progesterona. O uso da PGF_{2α} leva à sincronização do estro através da luteólise e esse hormônio ou seus análogos sintéticos vêm sendo administrados em um programa de duas injeções intramusculares, intervaladas por 11 dias, em fêmeas que estejam ciclando (Deligiannis et al., 2005).

No que consiste em aumentar a resposta ovariana, a eCG atua no eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano, regulando mecanismos intra ovarianos e, por possuir uma meia-vida longa e mimetizar os efeitos dos hormônios FSH e LH, é, geralmente, o hormônio de eleição para induzir a ovulação. Apenas uma aplicação de eCG, após tratamento com progestágenos, eleva a resposta ovariana, a taxa de concepção e o percentual de nascimentos múltiplos (Barrett et al., 2004). Contudo, seu uso prolongado desencadeia respostas fisiológicas indesejáveis, dentre as quais se destacam a resposta imunológica anti-eCG, a dificuldade de locomoção dos espermatozoides no trato genital feminino e a formação de cistos ovarianos (Martemucci e D'Alessandro, 2010).

Na tentativa de evitar os efeitos adversos da eCG, as pesquisas atuais introduzem, cada vez mais, protocolos que utilizam o GnRH para a realização da sincronização, o qual, de acordo com Cunningham (2008), é responsável por desencadear a liberação do FSH e LH, os quais são indispensáveis para que ocorra a maturação oocitária e ovulação. Segundo Martemucci e D'Alessandro (2010), protocolos com GnRH estão conferindo bons resultados de prolificidade após estro induzido, algo em torno de 175%. E, em associação ao GnRH, se pode-se utilizar o efeito macho, que consiste em deixar o reprodutor fora do

rebanho por um período de 20 dias e, ao reintroduzi-lo, as fêmeas começam apresentar estro. Porém, o efeito macho é considerado uma ferramenta auxiliar para maximizar os resultados do GnRH, já que, para Fonseca (2005), este sozinho pode ou não homogeneizar o aparecimento do estro e ovulação.

TRATAMENTOS HORMONAIS DE SUPEROVULAÇÃO

O tratamento superovulatório é um caminho viável para otimizar a produção *in vivo* de embriões em fêmeas que tem alto valor genético ou de uma raça ameaçada ou que estejam no final de suas vidas reprodutivas.

Os hormônios que são empregados nos protocolos de superovulação, quando em razão da aplicação de gonadotrofinas exógenas, agem através de três mecanismos: (1) quando um determinado número de folículos está em estágio inicial de atresia, estes são "resgatados", em razão da estimulação hormonal que tende a induzir a reativação dos mecanismos normais, culminando na esteroidogênese normal e também em elevado índice de mitose; (2) pequenos folículos, às vezes de classificações morfológicas e funcionais distintas, poderiam ser estimulados em conjunto, num ritmo de desenvolvimento superior ao normal, passando a atingir, concomitantemente, um mesmo estágio de desenvolvimento num menor espaço de tempo; (3) O processo de atresia folicular seria reduzido (Fernandes, 2003).

A variabilidade imprevisível na resposta superovulatória é uma das etapas mais críticas em programas de produção de embriões ovinos. Isto ocorre em razão de fatores endógenos, a exemplo da genética, estado nutricional e estado folicular; e exógenos, como tratamento de superovulação, o tipo de gonadotrofina e estação do ano (Amiridis e Cseh, 2012).

As gonadotrofinas que têm sido usadas para superovulação incluem gonadotrofina menopáusic humana (hMG), eCG e FSH, sendo este último de origens suína ou ovina.

A hMG tem sido pouco utilizada, devido a sua desvantagem de induzir regressão lútea prematura.

Quanto à eCG, o principal problema do seu uso, se dá após seu uso repetido, o que promove uma resposta humoral a esta gonadotrofina e consequente indução da produção de anticorpos anti-eCG, o que pode afetar a fertilidade (Forcada et al., 2011). Essa gonadotrofina tem sido utilizada para superovulação em ovelhas, sozinha ou em combinação com FSH. Estudos anteriores têm demonstrado que a resposta superovulatória,

utilizando eCG, é menor em comparação com a FSH, enquanto o tempo de ovulação não está bem sincronizado (Amiridis e Cseh, 2012).

O FSH pode ser administrado em seis a oito doses decrescentes, intervaladas por 12 horas, durante três a quatro dias, iniciadas dois a três dias antes da remoção do progestágeno, geralmente em doses de 240 a 250 UI quando a via de administração é intramuscular. Segundo Loiola Filho (2013), essa dose pode ser reduzida para 128 UI, a fim de evitar o hiperestrogenismo e reduzir custos. O FSH tem mostrado superioridade à eCG em termos de taxas de ovulação e fecundação e na produção de embriões de boa qualidade.

Alguns fatores contribuem para a redução das recuperações embrionárias após superovulação, como a regressão lútea precoce antes da época normal para a colheita embrionária, que pode ser decorrente do uso de análogos sintéticos de prostaglandinas, elevando a concentração de LH e estradiol. Além disso, a população folicular presente no ovário no momento do início do tratamento com FSH tem grande influência na resposta ao protocolo. Com a utilização dos protocolos convencionais, a população folicular existente no início do tratamento com gonadotrofina é desconhecida. Por esta razão, o resultado para um mesmo tratamento pode variar entre 0 e 30 embriões transferíveis (Varago et al., 2008).

A elevada variabilidade na resposta superovulatória, notada, principalmente, em ovelhas, tende a prejudicar o processo de fecundação (Hawk et al., 1987). Diante dos diversos tratamentos superovulatórios, a falha na fecundação ocorre, particularmente, em ovelhas que mostram uma elevada resposta ovulatória. Isto está vinculado com os elevados níveis de estradiol produzidos pelos folículos, que, conseqüentemente, dificultam a locomoção dos espermatozoides no trato genital feminino, diminuindo, significativamente, as taxas de fertilidade (Martemucci e D'Alessandro, 2010).

MÉTODOS DE FECUNDAÇÃO DAS DOADORAS DE EMBRIÕES

Para que as fêmeas doadoras de embriões sejam fecundadas com sucesso é fundamental que haja um número viável de espermatozoides móveis dentro do trato genital da fêmea, no momento apropriado (Baril et al., 1995). Outro fator importante é a simultaneidade entre os momentos das inseminações e ovulações. A monta natural e a inseminação artificial são técnicas que têm sido empregadas utilmente para a obtenção da fecundação das fêmeas. Contudo, torna-se

necessária a utilização de machos de fertilidade comprovada.

Na monta natural, machos e fêmeas tendem a ficar juntos, na proporção de um macho para três a quatro fêmeas (Baril et al., 1995), devendo os machos selecionados apresentarem tanto condições físicas quanto aptidão sexual satisfatórias, para alcançar o número desejado de montas. Essa técnica torna-se limitada, uma vez que os melhores reprodutores estão concentrados nos grandes centros de inseminação artificial. Segundo Murray et al. (1994), na técnica de monta controlada, os machos ficam com as fêmeas em períodos determinados de cobertura, pelo menos, duas vezes durante o período de estro, com intervalo de 12 horas. As montas, consideradas mais eficazes, são aquelas realizadas em intervalos entre 12 e 24 horas após o início do estro. Durante o processo de fecundação, ocorrem falhas que são, na maioria das vezes, mais evidentes em ovelhas, sendo estas, naturalmente ou artificialmente, inseminadas, como resultado do processo de transporte espermático através da cérvix. Este problema pode vir a ser sanado com a deposição de sêmen no lúmen uterino através de métodos cirúrgicos (Trousseau e Moore, 1974) ou por inseminação laparoscópica em ovelhas superovuladas (Ehling et al., 2003).

A IA é uma biotécnica largamente difundida, sendo caracterizada como um método eficaz, uma vez que permite disseminar num reduzido espaço de tempo, o material genético do macho, uma vez que um único ejaculado pode vir a resultar na fecundação de várias fêmeas. Nesta técnica, características singulares são estimadas como: a aptidão do macho para ejacular em vagina artificial e a qualidade do sêmen produzido. Além disso, a técnica ainda permite aproveitar o material genético de animais que já não são capazes de acasalar, como em casos em que estes sejam portadores de patologias que impeçam a monta, ou até em casos de morte de reprodutores de elevado potencial genético, onde seu sêmen, possivelmente, será colhido e armazenado para uma futura aplicação.

MÉTODOS DE COLHEITA DE EMBRIÕES

A colheita embrionária consiste em submeter a luz uterina ou tubária a um processo de lavagem, objetivando a recuperação dos embriões produzidos, podendo ser alcançada, quer seja pelo método Cirúrgico (Laparotomia), Semi-cirúrgico (Laparoscopia) ou, ainda, Não Cirúrgico (Transcervical) (Selvaraju et al., 2003).

A colheita Transcervical, largamente utilizada e com êxito em vacas, é uma opção para os métodos Cirúrgico e Semi-cirúrgico utilizados em ovelhas. Para tanto, a cérvix é tracionada com o auxílio de

pinças de Allys e, com um cateter de três vias, ultrapassa-se a cérvix, chegando ao útero, quando, através de uma das vias, é injetado ar para inflar o balão do cateter de três vias no lúmen de cada corno uterino, obstruindo o mesmo. Então, por outra via, ocorre a injeção de Solução Salina Fosfato-Tamponada (PBS), carreando os embriões para a terceira via, a qual desembocará num tubo plástico, recuperando meio PBS e, possivelmente, embriões. Porém, um dos problemas que restringe o uso desta técnica na ovelha é a disposição irregular dos anéis cervicais, encurtando a passagem do cateter. Visando solucionar este problema, vêm sendo testadas aplicações prévias de fármacos que promovam a dilatação cervical, horas antes da colheita (Pereira et al., 1998). As taxas de recuperação obtidas pelo método Cirúrgico ainda são superiores, variando de 70% a 90% (Forcada et al., 2011), quando comparadas às taxas conseguidas pelo método Transcervical em caprinos, que giram em torno de 60% (Lima-Verde et al., 2003).

No tocante à colheita de embriões por Laparoscopia, esta é feita em maca de imobilização específica. Logo após, é estabelecido um pneumoperitônio para início do procedimento de colheita, para o qual são efetuadas três punções abdominais, sendo uma para o endoscópio, outra para uma sonda de três vias e uma última para a pinça de manipulação. Contudo, a exposição do animal a riscos de aderências, o alto custo do aparelho de Laparoscopia e a necessidade de uma equipe especializada são limitações que restringem a utilização desta técnica (Freitas & Simplício, 2001).

A técnica de Laparotomia é considerada a mais empregada e mais eficaz em pequenos ruminantes (Selvaraju et al., 2003). Neste método, os embriões podem ser colhidos com êxito tanto da tuba uterina quanto do útero. Para tanto, as fêmeas doadoras de embriões devem ser, anteriormente, submetidas a jejum hídrico e alimentar, por 12 e 24 horas, respectivamente, para, em seguida, serem submetidas aos procedimentos de anestesia geral. As fêmeas são sedadas com cloridrato de xilazina, na proporção de 0,11 mg/kg PV, recebendo ketamina, na razão de 5,5 mg/kg PV, dez minutos depois, sendo ambas as aplicações por via intramuscular. Deve-se realizar uma aplicação local e subcutânea de cloridrato de lidocaína (0,1 g/animal) na linha alba, onde será realizada uma incisão de 15 a 20 cm de comprimento, cranialmente à base do úbere (Ishwar & Memon, 1996). O processo de exteriorização dos cornos uterinos, tubas uterinas e dos ovários deve ser realizado com a fêmea em decúbito dorsal, em maca apropriada, com inclinação ântero-posterior de 30° a 45°. Uma vez exteriorizados os ovários, é feita a contagem dos corpos lúteos, tornando

possível avaliar a eficácia do tratamento superovulatório através da contagem de corpos lúteos, e do método cirúrgico de colheita de embriões através da obtenção da taxa de recuperação embrionária. A lavagem para recuperação embrionária é realizada com PBS, a 37°C. A colheita tubária deve ser realizada dois a quatro dias após o início do estro (BARIL et al., 1995), sendo as tubas uterinas cateterizadas através do infundíbulo com um cateter plástico. Em seguida, após a inserção de uma agulha 25 g acoplada a uma seringa de 20 mL na junção útero-tubária, o meio de lavagem é injetado em direção ao infundíbulo (Ishwar e Memon, 1996).

A colheita uterina deve ser realizada cinco a seis dias após o início do estro. Para tanto, uma punção na base do corno uterino é realizada para introduzir um cateter de colheita na luz uterina, a qual deve ser obstruída através de compressão digital ou pelo uso de pinça atraumática. Então, uma seringa de 50 mL, acoplada a uma agulha de 18 g é inserida na luz uterina, próximo à junção útero-tubária e 30 mL a 40 mL de meio de lavagem a 37°C são injetados no interior de cada corno uterino e recuperado por outra via do cateter de Foley. Os lavados são vertidos em placas de Petri, plásticas, para avaliação imediata e contagem em estereomicroscópio em um aumento de 40 a 70 vezes.

A colheita cirúrgica é o método de recuperação utilizado em pequenos ruminantes, mais eficiente quanto às taxas de recuperação, mostrando-se superior aos demais, variando de 70% a 90% (Forcada et al., 2011). Contudo, essa técnica, quando realizada continuamente na mesma fêmea doadora, influencia, negativamente, a taxa de recuperação embrionária. Todavia, podem-se reduzir esses efeitos através da aspersão do útero e dos ovários com soro fisiológico heparinizado (50 UI de heparina sódica/mL) ou com solução de Dextran 70 g a 6,0%. A sutura pode ser feita com um padrão simples interrompido com fio de poliglactina 2-0 (Ishwar e Memon, 1996).

AVALIAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DOS EMBRIÕES

Os embriões são avaliados quanto às suas características morfológicas e, a partir disso, é possível determinar o seu estágio de desenvolvimento. Essa classificação leva em consideração a presença e a intensidade de imperfeições, tais como presença de blastômeros de tamanhos irregulares, em extrusão, morte ou fragmentação, alterações de cor ou tamanho da massa celular, ausência de compactação e danos na zona pelúcida. A avaliação dos embriões é feita em

função do percentual da massa celular intacta, livre de alterações.

A classificação mundialmente utilizada foi proposta pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), a qual dividiu, morfológicamente, em nove categorias (Tabela 1).

De acordo com Oliveira (2009), o estágio do desenvolvimento embrionário é de fundamental importância para a classificação dos embriões, pois está diretamente relacionado com sua posterior sobrevivência. Relata também que as taxas de sobrevivência embrionária de mórulas é menor que a de blastocistos (Tabela 2). Os achados do mencionado autor, quanto à correlação entre a sobrevivência embrionária e o estágio dos embriões corroboram com os resultados encontrados por Bari et al. (2003), os quais compararam mórulas e blastocistos.

Os embriões ainda são avaliados quanto às características morfológicas individualizadas, como: padrão de cor, tamanho, forma, integridade da zona pelúcida, homogeneidade do citoplasma e presença de células no espaço perivitelínico, sendo esses caracteres responsáveis pela definição quanto a sua qualidade (Tabela 3).

Bari et al. (2003) relataram que embriões de Graus 3 e 4 toleram melhor a assincronia do estro entre doadora e receptora, do que os embriões de Graus 1 e 2, e que as mórulas iniciais toleram melhor esta assincronia do que embriões em outros estádios.

Os autores relatam também que não houve diferença na taxa de sobrevivência entre embriões de Graus 1 e 2 (75,6% e 73,8%, respectivamente). Entretanto, conforme a qualidade do embrião declinou, as diferenças se tornaram mais notáveis. Os embriões de Grau 3 tiveram uma menor taxa de sobrevivência (61,4%), comparado aos embriões de Graus 1 e 2, com uma redução mais notável na taxa de sobrevivência dos embriões de Grau 4 (37,5%), embora deva-se notar que o número de embriões de Grau 4 transferidos foi, relativamente, menor. Ainda segundo eles, devido ao fato de todos os embriões terem sido transferidos para receptoras com perfil semelhante de sincronização de estro com as ovelhas doadoras, a melhor taxa de sobrevivência dos embriões de alto grau deve ser devida a sua melhor habilidade em ajustar ou alterar o ambiente uterino ao seu favor.

Oliveira (2009) observou que os embriões de Grau 1 obtiveram melhores percentuais de sobrevivência quando comparados aos de Grau 2, como demonstrado na Tabela 4.

Tabela 1. Estádios embrionários e suas respectivas características morfológicas (Adaptado de Robertson e Nelson, 2010).

Estádio Embrionário	Características
1 célula	Zigoto recém-formado, com apenas uma célula circundada pela zona pelúcida e apresentando o 2º. corpúsculo polar no espaço perivitelínico (EPV). Estádio onde ocorrem as clivagens iniciais, sendo possível contabilizar o número de blastômeros.
2-16 células	Massa de células com separação nítida entre os blastômeros ocupando quase a totalidade do EPV.
Mórula inicial (Mi)	Blastômeros agregados entre si formando uma massa compacta, ocupando 60% a 70% do EPV.
Mórula compacta (Mc)	Início da formação da blastocele e diferenciação entre o trofoblasto e o botão embrionário; o embrião ocupando 70% a 80% do EPV.
Blastocisto inicial (Bi)	Evidente diferenciação entre as células do trofoblasto e do botão embrionário; as células do botão embrionário estão compactadas, a blastocele é predominante.
Blastocisto (Bl)	O embrião aumenta 1,2 a 1,5 vezes o seu diâmetro e a zona pelúcida diminui em 1/3 a sua espessura; é evidente a pressão do líquido da blastocele, que empurra o trofoblasto contra a zona pelúcida.
Blastocisto expandido (Bx)	O embrião está iniciando o processo de saída da z O embrião está iniciando o processo de saída da zona pelúcida.
Blastocisto em eclosão (Bn)	O embrião está completamente livre da zona pelúcida; ainda é nítida a presença da blastocele.
Blastocisto eclodido (Be)	

Tabela 2. Sobrevivência embrionária de acordo com o estágio de desenvolvimento dos embriões ovinos da raça Santa Inês transferidos (Adaptado de Oliveira, 2009).

Estádio embrionário	Sobrevivência embrionária (%)
Mórula	15/59* (25,4)
Blastocisto inicial	0/3* (0,0)
Blastocisto	10/22* (45,5)
Blastocisto expandido	3/6* (50,0)
Total	28/90* (31,1)

Nº de crias / *Nº de embriões transferido.

Ainda com relação à morfologia embrionária, Monte (2013) propôs uma classificação para melhor determinar os graus de qualidade, estabelecendo as categorias: Proporção de extrusão embrionária (Baixa – 0 a 5%, Média – 6 a 15% e Alta - >15%); Proporção de cada nível de homogeneidade da massa embrionária (Homogênea, Levemente Heterogênea e Heterogênea); Percentual de embriões com cada grau de retração (Sem retração; Levemente retraída;

Com retração). Nesse mesmo trabalho, avaliando embriões antes e após o congelamento/descongelamento a autora afirmou que parâmetros, tais como extrusão e homogeneidade da massa celular interna podem afetar a posterior qualidade e, conseqüentemente, sobrevivência embrionária, mas isso pode variar de acordo com o tratamento que é dado à célula, a exemplo da adição e remoção de crioprotetores.

Tabela 3. Qualidade embrionária e suas respectivas características (Adaptado de Robertson e Nelson, 2010).

Qualidade embrionária	Características
Grau 1: Excelente ou Bom	Massa embrionária simétrica e esférica com blastômeros (células) individuais, que são uniformes em tamanho, cor e densidade. Irregularidades devem ser relativamente menores e ao menos 85% do material celular devem ser de massa embrionária viável intacta. A zona pelúcida deve ser lisa e não ter superfícies côncavas ou planas.
Grau 2: Regular	Irregularidades moderadas na forma geral da massa embrionária ou no tamanho, cor e densidade das células individuais. Ao menos 50% do material celular devem compor uma massa embrionária viável, intacta.
Grau 3: Pobre	Irregularidades maiores na forma da massa embrionária ou no tamanho, cor e densidade das células individuais. Ao menos 25% do material celular devem formar uma massa embrionária viável, intacta.
	Embriões em degeneração, oócitos ou embriões de uma célula: não viáveis.
Grau 4: Morto ou degenerado	

Tabela 4. Sobrevivência embrionária de acordo com a qualidade dos embriões ovinos da raça Santa Inês transferidos (Adaptado de Oliveira, 2009).

Qualidade embrionária	Sobrevivência embrionária(%)
Grau 1	18/59* (30,5)
Grau 2	9/31* (29,0)
Total	28/90* (31,1)

Nº de crias / *Nº de embriões transferidos.

FATORES QUE INFLUENCIAM A PRODUÇÃO IN VIVO DE EMBRIÕES

São vários os fatores capazes de promover a morte embrionária, necessitando, ainda, ser melhor caracterizados. Esses fatores podem estar vinculados ao próprio embrião ou ao ambiente uterino.

Estima-se que a principal causa seja decorrente de problemas de sinalização entre o conceito e a mãe, o que pode proporcionar um desenvolvimento assíncrono ou um retardo no crescimento embrionário, bem como a falha na produção de Interferon T (Spencer et al., 2004). Outro fator que pode estar vinculado à morte embrionária é a síntese inadequada de hormônios e fatores de crescimento oriundos do embrião (Riley & Moley, 2006).

Com relação às perdas embrionárias que possuem como origem, fatores intrínsecos ao ambiente uterino e outras situações ligadas à mãe, observa-se inúmeras causas. Dentre elas, o estado sanitário, conforto térmico, manejo e nutrição adequada. Em meio a estes fatores, possui maior relevância, o fornecimento de nutrientes, os quais são

indispensáveis ao desenvolvimento folicular, maturação dos oócitos, fertilidade e desenvolvimento embrionário, além da própria manutenção da gestação, pois atuam nas concentrações séricas de hormônios e outros metabólitos, influenciados por nutrientes ou oriundos dos mesmos (McEvoy et al., 2001).

Principalmente na fase que antecede a implantação, os embriões sofrem muito a influência do ambiente onde estão se desenvolvendo, especificamente em relação aos nutrientes que são oferecidos à doadora. A dieta fornecida à matriz é de extrema importância sobre o embrião durante o período de pré-implantação e por todo o seu desenvolvimento (Ashworth, 1995).

As substâncias nutritivas presentes no útero de ovelhas prenhes são provenientes da alimentação. Desta forma, a mãe precisa estar bem nutrida, já que, de modo geral, os ruminantes apresentam uma implantação não invasiva.

Segundo McEvoy et al. (2001), alimentos contendo altos níveis proteicos para ovelhas influenciam, negativamente, o desenvolvimento embrionário, por resultar em crias, excessivamente, grandes. Em

contraste, Edwards e McMillen (2002) afirmam que o déficit proteico no período de pré-implantação de embriões pode promover problemas no desenvolvimento. Somado a isso, ressalta-se a quantidade específica dos componentes da ração, bem como a quantidade de alimento fornecido às matrizes. Estes precisam ser respeitados e analisados para não afetar a produção de embriões, pois, a depender da quantidade de alimento, haverá um maior ou menor fornecimento de componentes. Em experimento com ovelhas superalimentadas durante o início da gestação, Ashworth (1995) relatou um decréscimo na proporção de embriões produzidos, o que complementa os achados por Williams & Cumming (1982 apud Squires, 1993, p. 308). Imagina-se que esta redução resulte do aumento do metabolismo da P₄ pelo fígado. Assim, a progesterona plasmática será metabolizada quase que totalmente em uma única passagem pelo fígado, provocando o declínio de suas concentrações periféricas.

Em contradição, Dunne et al. (1997) comprovaram que a diminuição da alimentação, por um curto período de tempo, aumentaram a taxa de gestação em bovinos. Mantovani (1993) também observou uma relevante redução na produção de embriões transferíveis em novilhas de corte que tiveram livre acesso a concentrado, quando comparadas àquelas que foram submetidas à restrição energética.

Yaakub et al. (1996), trabalhando com novilhas de corte, relataram que restrições alimentares melhoraram a taxa de desenvolvimento embrionário, aumentando o número de blastocistos e o número de células totais dos blastocistos, o que demonstra a evolução no seu desenvolvimento.

O semiárido nordestino, especialmente a microrregião do Submédio São Francisco, apresenta sérios problemas no âmbito alimentar, pois há escassez de alimento por longos períodos do ano. Devido às condições climáticas desfavoráveis ao desenvolvimento vegetal, as plantas perdem suas folhas e têm seu valor nutricional reduzido. Sendo assim, solucionar esses entraves para maximizar os resultados, bem como diminuir custos são desafios a serem alcançados. Neste contexto, o produtor necessita de uma alternativa para suplementar seus animais na época seca, já que esta compreende um lapso muito grande, sendo suficiente para interferir negativamente em todo o sistema reprodutivo das fêmeas criadas nesta região.

Assim, sabendo destas deficiências alimentares, a expansão da fruticultura no semiárido nordestino desponta como uma importante saída para a pecuária desta região, já que é caracterizada pela produção de toneladas de resíduos de abacaxi,

melão, manga, acerola e uva, no decorrer de todo ano (CQBAL, 2012).

No que diz respeito à uva, dentre as fruteiras cultivadas comercialmente no Submédio São Francisco, aparece como a terceira mais importante cultura local em termos de área plantada e atinge uma produção anual de 240.000 t (Valexport, 2002). Entre desbrotas, despontas, raleio e desbastes dos cachos, além do manuseio inadequado, as perdas do fruto, no que diz respeito ao consumo humano, podem variar de 20 a 95% (Choudhury e Costa, 2004).

Esse resíduo surge então, como uma fonte potencial para a alimentação animal, devido a sua grande disponibilidade. Além disso, autores como Rotava (2007), afirmam que o subproduto da uva é capaz de fornecer níveis protéicos razoavelmente elevados, girando em torno de 12,8% de proteína bruta no bagaço e 10,3% na semente; que apresentam, ainda, na composição da sua semente, altos níveis de ácidos oléico (19,07%) e linoleico (67,73%), os quais são elementos essenciais para os animais; além de apresentar altos teores de Tanino, considerado um antioxidante, sendo capaz, então, de aumentar o tempo de vida dos espermatozoides no trato feminino e proteger os óocitos e embriões de danos oxidativos à nível de membrana e núcleo celulares (PASA, 2010).

Maggioni et al. (2008) afirmam, ainda, que o fornecimento de alimento com moderado teor de tanino consensado é capaz de promover ganho de peso, aumento do escore de condição corporal e, principalmente, a redução de perdas embrionárias, já que o tanino induz a diminuição da catálise de proteínas da qual resultariam metabólitos tóxicos como uréia e amônia, que são responsáveis por alterar o gradiente de pH que existe entre as células apicais e basais da parede uterina, o qual é regulado pela P₄. Na presença desses metabólitos, a progesterona torna-se incapaz de manter o meio, levando a um aumento de PGF_{2α}, a qual afeta, negativamente, o desenvolvimento embrionário, assim como sua sobrevivência.

Porém, quando utilizado, o subproduto da uva tem sido fornecido de maneira empírica, sem avaliar os possíveis efeitos positivos e, principalmente, negativos da sua utilização.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho se propôs a abordar diferentes aspectos da produção *in vivo* de embriões em ovinos. Diversos são os desafios a serem enfrentados para otimizar o uso da MOTE em ovinos, sobretudo criados no semiárido do Nordeste do Brasil.

REFERÊNCIAS

- ABECIA, J. A.; FORCADA, F.; GONZÁLEZ-BULNES, A. Hormonal control of reproduction in small ruminants. *Animal Reproduction Science*, v. 130, p. 173–179, 2012.
- AMIRIDIS, G. S.; CSEH, S. Tecnologias de reprodução assistida no manejo reprodutivo de pequenos ruminantes. *Ciência e Reprodução Animal*, v. 130, p. 152-161, 2012.
- ASHWORTH, C.J. Maternal and conceptus factors affecting histotrophic nutrition and survival of embryos. *Livestock Production Science*, v. 44, p. 99-105, 1995.
- BARI, F. et al. Factors affecting the survival of sheep embryos after transfer within a MOET program. *Theriogenology*, v. 59, p. 1265-1275, 2003.
- BARIL, G.; BREBION, P.; CHESNÉ, P. *Manual de Formación Práctica para el Trasplante de Embriones en Ovejas y Cabras*. FAO, Roma, 1995, p.182.
- BARRETT, D.M.W. et al. Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to a single dose of 500 IU of eCG following a 12-day treatment with progestogen-releasing intravaginal sponges in the breeding and nonbreeding seasons in ewes. *Theriogenology*, v. 61, p. 311–327, 2004.
- CASTILHO, C. et al. Protocolos de indução e sincronização do estro em ovelhas. *Ciência Animal Brasileira*, v.14, p. 91-97, 2013.
- CHOUDHURY, M. M.; COSTA, T. S. Colheita e pós colheita da videira, 2004. <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/UVa/CultivodaVideira/colheita.htm>. Acesso em 28 de julho de 2013.
- Composição Química e Bioquímica de Alimentos (CQBAL 3.0) 2012. Disponível em: <http://cqbal.agropecuaria.ws/webcqbal/en/index.php>. Acesso em 05 de dezembro de 2012.
- CUNNINGHAM, J.G. *Tratado de fisiologia*, 4ª edição, Rio de Janeiro, Elsevier, 2008, p. 469-470.
- DELIGIANNIS, C. et al. Synchronization of ovulation and fixed time intrauterine insemination in ewes. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 40, p. 6–10, 2005.
- DUNNE L. D. et al. Nutrition and embryo survival in cattle. *Irish Journal of Agriculture and Food Research*, v. 36, p. 95, 1997.
- EDWARDS, L. J.; McMILLEN, I. C. Periconceptional nutrition programs development of the cardiovascular system in the fetal sheep. *American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, v.283, p. 669–679, 2002.
- EHLING, C. et al. Laparoscopic intrauterine insemination with different doses of fresh, onserved, and frozen semen for the production of ovine zygotes. *Theriogenology*, v. 60, p. 777–787, 2003.
- FERNANDES, C. A. C. *Superovulação em bovinos*. Alfenas-MG, 2003.
- FONSECA J. F. *Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos*. Embrapa Caprinos, CP D10, CEP 62011-970, Sobral, Ceará, Brasil. 2005.
- FORCADA, F. et al. Repeated superovulation using a simplified FSH/eCG treatment for in vivo embryo production in sheep. *Theriogenology*, v. 75, p. 769–776, 2011.
- FREITAS, V. J. F.; SIMPLÍCIO, A. A. Transferência de embriões em caprinos. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. 1ª Ed.São Paulo: Varela, Cap. 9, 2001, p.179-194.
- HAWK, H. W.; COOPER, B. S.; CONLEY, H. H. Inhibition of sperm transport and fertilization in superovulating ewes. *Theriogenology*, v. 28, p. 139-153, 1987.
- ISHWAR, A. K.; MEMON, M. A. Embryo transfer in sheep and goats: a review. *Small Ruminant Research*, v. 19, p. 35-46, 1996.
- LAIZA, B. Principais raças deslanadas de ovinos criados no Brasil. Portal Agropecuário, 2 de Março de 2012. Disponível em: <http://www.portalagropecuario.com.br/ovinos-e-caprinos/criacao-de-ovelhas-conheca-as-principais-racas-deslanadas-de-ovinos-criadas-no-brasil/>.
- LIMA-VERDE, J. B. et al. Transcervical embryo recovery in Saanen goats. *South African Society for Animal Science*, v.33, p.127-131, 2003.
- LOIOLA FILHO, J. B. *Efeito da dose de pFSH na produção in vivo de embriões em ovelhas Dorper pertencentes a duas categorias de peso corporal*. 2013. 70f: Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias, Petrolina, 2013.
- MAGGIONI, D. et al. Influência da proteína sobre a reprodução animal. *Campo Digital*, v.1, p.105-110, 2008.
- MANTOVANI, R. Effect of nutrition and dose of follicle stimulating hormone (FSH) on superovulatory response in beef heifers. *Proceedings of the 9th meeting of the Association Europeenne de Transfert Embryonnaire*, Lyon, 1993, p. 234.
- MARTEMUCCI, G; D’ALESSANDRO, A. Estrous and fertility responses of dairy ewes synchronized with combined short term GnRH, PGF2α and estradiol benzoate treatments. *Small Ruminant Research*, v. 93, p. 41–47, 2010.
- McEVOY, T. G.; ROBINSON, J. J.; ASHWORTH, C. J.; ROOKE, J. A.; SINCLAIR, K. D. Feed and forage toxicant affecting embryo survival and fetal development. *Theriogenology*, v.55, p.113–129, 2001.
- MONTE, A. P. O. *Adição de sacarose na solução crioprotetora de vitrificação de embriões ovinos Dorper produzidos in vivo*. 2013. 71 f: Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias, Petrolina, 2013.
- MURRAY, J. F. et al. Heterogeneity in ovarian steroid secretion response to treatment with PMSG in ewes during the breeding season and anestrus. *Theriogenology*, v. 42, p. 1337–1347, 1994.
- OLIVEIRA, G. J. C. A raça Santa Inês no contexto da expansão da ovinocultura In: SIMPÓSIO MINEIRO DE OVINOCULTURA: PRODUÇÃO DE CARNE NO CONTEXTO ATUAL, 1., 2001, Lavras. *Anais...Lavras: UFLA*, p.121, 2001.
- OLIVEIRA, M. E. F. *Parâmetros quali-quantitativos na seleção de receptora sem programas de transferência de embriões ovinos*, 2009, p. 25-31.
- PASA, C. Relação reprodução animal e os minerais. *Revista Biodiversidade*, v. 9, p.101-122, 2010.
- PAULA, N. R. O. *Parâmetros clínicos, hematológicos, sorológicos e reprodutivos em reprodutores natural e experimentalmente infectados com CAEV*. 2008. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Veterinária – UECE, Fortaleza-CE, 2008.

- PEREIRA, R. J. T. A.; SOHNREY, B.; HOLTZ, W. Nonsurgical embryo collection in goats treated with prostaglandin F₂-alpha and oxytocin. *Journal of Animal Science*, v.76, p.360-363, 1998.
- RILEY, J. K.; MOLEY, K. H. Glucose utilization and the PI3-K pathway: mechanisms for cell survival in preimplantation embryos. *Reproduction*, v.131, p.823-835, 2006.
- ROBERTSON, I.; NELSON, R. Certification and identification of embryos. In: D. A. Stringfellow; M.D. Givens (eds.), *Proceedings of Guide of International embryo Transfer Society*, 2010, 86-105.
- ROTAVA, R. *Subprodutos da uva para utilização em dietas de frango de corte*. 2007. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Zootecnia) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.
- SELVARAJU, S. et al. Ovarian response, embryo production and hormonal profile in superovulated goats. *Theriogenology*, v. 59, p. 1459-1468, 2003.
- SILVA, D. F. et al. Exploração da caatinga no manejo alimentar sustentável de pequenos ruminantes. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA, 2004, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte:UFMG, 2004.
- SPENCER, T. E. et al. Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy. *Animal Reproduction Science*, v.82-83, p.537-550, 2004.
- TROUSON, A. O.; MOORE, N. W. Fertilization in the ewe following multiple ovulation and uterine insemination. *Australian Journal of Biological Science*, v. 27, p. 301-304, 1974.
- VALEXPORT. *Há 14 anos unindo forças para o desenvolvimento do Vale do São Francisco*. Petrolina - PE: 2002, p. 16.
- VARAGO, F. C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. A. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.32, n. 2, p.100-109, 2008.
- VILARIÑO, M.; RUBINAES, E.; MENCHACA, A. Ovarian response and pregnancy rate with previously used intravaginal progesterone releasing devices for fixed-time artificial insemination in sheep. *Theriogenology*, v.79, p.206-210, 2013.
- WILLIAMS, A. H.; CUMMING, I. A. Inverse relationship between concentrations of progesterone and nutrition in ewes. *Journal of Agriculture Science*, v.98, p.517-522, 1982 *apud* SQUIRES, T. J. et al. Feed intake affects metabolic clearance rate of progesterone in sheep. *Veterinary Science*, p. 306-310, 1993.
- YAAKUB, H.; O'CALLAGHAN, D.; DUFFY, P.; DUBY, R. T.; BOLAND, M. P. Effect of concentrate type and quality on superovulation in cattle. *Proceedings of Techniques for gamete manipulation and storage*. Hamilton, New Zealand, 1996, p.37.