

PRODUÇÃO *IN VIVO* DE EMBRIÕES CAPRINOS E OVINOS SUBMETIDOS AO MEIO DE MANUTENÇÃO ACP®

*(In vivo production of goat and sheep embryos submitted
to the ACP® maintenance médium)*

Letícia Soares de Araújo TEIXEIRA^{1*}; Francisco Felipe Ferreira SOARES¹; Clarissa de Castro e BRAGA¹; Kenney de Paiva PORFIRIO³; Ana Lys Bezerra Barradas MINEIRO⁴; Janaina de Fátima Saraiva CARDOSO⁴; Ney Rômulo de Oliveira PAULA⁴

¹Residência Multiprofissional, Universidade Federal do Piauí (UFPI). *Campus* Universitário
Ministro Petrônio Portella, Bairro Ininga, Teresina/PI. CEP: 64.049-550

*E-mail: leticiasoateixeira@gmail.com

ABSTRACT

The use of ACP® as a means of maintenance in the stages of multiple ovulation and embryo transfer, has not yet been reported in the literature, although ACP® is a plant fluid rich in nutrients. Thus, the objective was to compare the efficiency of ACP® as a substitute for embryo maintenance medium during MOTE biotechnology in goats and sheep. For this, three donor goats, Anglo-Nubian breed and three donor sheep, Dorper breed were used. Fifteen recipient females of each species were used. The donors were submitted to the superovulation protocol and inseminated, and later the embryos were collected. After harvesting, the embryos were submitted to the control maintenance medium, TQC Holding® or ACP® maintenance medium. The recipients were synchronized simultaneously with the donors, and after 30 days the pregnancy diagnosis was made. It was obtained 10% of pregnant in goats and 75% of pregnant in sheep, whose embryos were submitted to the ACP® maintenance medium before the innovation. It is concluded that the means of maintenance of ACP® embryos did not negatively influence the embryonic quality and the development of pregnancy in small ruminants.

Key words: Embryo, Small ruminants, MOTE.

INTRODUÇÃO

Dentre as biotécnicas reprodutivas em pequenos ruminantes, a múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE) reúne um conjunto de atividades necessárias para induzir o crescimento e ovulação de múltiplos folículos, a fecundação de oócitos e a retirada dos embriões de um útero de fêmea doadora para uma posterior inovulação do embrião em uma fêmea receptora, com finalidade de completar o período gestacional (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Esta biotécnica vem contribuindo para a multiplicação dos pequenos ruminantes em todo o mundo (MENCHACA *et al.*, 2010). A utilização dessa ferramenta reprodutiva permite a maximização da disseminação do material genético de fêmeas doadoras de embriões, dessa forma, a MOTE é uma técnica considerada tão importante para as fêmeas quanto à inseminação artificial é para os machos (FONSECA *et al.*, 2010).

Em virtude dos inúmeros benefícios relacionados à implantação dos programas de MOTE, tem se observado um cenário amplo de crescimento com acelerada multiplicação do rebanho. Nos pequenos ruminantes é uma realidade, visto a grande demanda pela intensificação dos programas de melhoramento genético e sistemas produtivos nessas espécies (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

No que diz respeito às inovações biotecnológicas, a água de coco em pó (ACP®) tem sido utilizada em várias biotécnicas relacionadas à reprodução animal. Excelentes resultados

têm sido obtidos com o uso da água de coco em pó em estudos de preservação seminal em animais domésticos como caprinos, ovinos, bovinos, bubalinos, suínos, caninos, equinos, coelhos, galos, felídeos, peixes de água doce como tambaqui, carpa, pirapitinga, além de animais silvestres como o macaco-prego, bem como em estudos recentes na preservação da viabilidade de oócitos ovinos e caprinos, chegando a ter resultados semelhantes aos observados nos meios comerciais (SALGUEIRO *et al.*, 2012).

Nesse contexto, objetivou-se comparar a eficiência de uma nova formulação da ACP[®] como substituto ao meio convencional de manutenção de embriões, durante a biotecnologia de múltipla ovulação e transferência de embriões em pequenos ruminantes.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e local de realização da pesquisa

Esse trabalho foi realizado em uma fazenda parceira, localizada na região Sudeste do estado do Piauí. Foram utilizadas três Doadoras da espécie caprina da raça Anglo Nubiana e três doadoras ovinas da raça Dorper. E como receptoras, 26 cabras sem padrão racial definido e 15 Fêmeas ovinas sem padrão racial definido de cada espécie. As fêmeas doadoras apresentavam características fenotípicas e genotípicas as quais são de interesse nos animais do rebanho. As receptoras sem padrão racial definido foram escolhidas de acordo com a idade, sanidade e estado de condição corporal. Os animais passaram por avaliação ginecológica bem como pela avaliação complementar ultrassonográfica transretal com auxílio de aparelho ultrassonográfico (Sonoscape A5 Vet[®], China) equipado com transdutor linear multifrequencial. Os animais ficaram alojados em piquetes com capim (*Cynodon spp.*) tendo acesso à água e sal mineral *ad libitum*. A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Piauí (UFPI), sob o protocolo de n^o 637/20.

Tratamento de Superovulação e Inseminação Artificial por Laparoscopia

Após a avaliação ginecológica, as fêmeas doadoras foram submetidas a um protocolo de tratamento para estimular a superovulação. No dia 0 (D0) ou dia inicial do tratamento, os animais receberam esponja impregnada com 60mg de Acetato de medroxiprogesterona (Progespon[®], Zoetis, São Paulo, Brasil). O tratamento gonadotrófico com 200mg de pFSH (Folltropin[®], Vetoquinol, Kikland, Canadá) em doses decrescentes em intervalos de 12 horas (20%, 20%, 15%, 15%, 10%, 10%, 5% e 5% do pFSH), foi iniciado no dia 8 (D8) após a introdução das esponjas com administração de 2mL de pFSH mais 2mL de PGF_{2α} (Ciosin[®], MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil) em cada animal pela manhã, e pela tarde 2mL de pFSH. No dia 9 (D9), os animais receberam 1,5mL de pFSH pela manhã e 1,5mL de pFSH pela tarde. No dia 10 (D10), as esponjas foram retiradas dos animais, e administrado 1mL de pFSH durante a manhã e a mesma dose de 1 mL de pFSH no período da tarde. No dia 11 (D11) foi aplicado 0,5mL de pFSH pela manhã e 0,5mL de pFSH + 2mL de GnRh (Gestan plus[®], Tecnopec, São Paulo, Brasil), no turno da tarde.

As fêmeas doadoras foram submetidas a laparoscopia, visando a deposição do sêmen no interior do útero, no dia 12 (D12). Estas foram previamente contidas na posição de decúbito em céfalodeclive (posição de *Trendelenburg*). Vale ressaltar que as fêmeas estavam em jejum

alimentar e hídrico a 24h e 12h, respectivamente. Receberam sedação com 0,5mg/Kg de Xilazina (Anasedan[®], Ceva, São Paulo, Brasil) e indução e manutenção anestésica inalatória com isoflurano (Isoforine[®], Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil). E em seguida, procedeu-se a laparoscopia.

Tratamento de Sincronização de Estro e Ovulação

No D0 as fêmeas receptoras foram submetidas ao processo de sincronização de estro, sendo no D0 introduzida a esponja intravaginal contendo 60mg de Acetato de medroxiprogesterona (MAP) (Progespon[®], Zoetis, São Paulo, Brasil) e removidas a tarde no D9 e administrados 500UI de eCG (Novormon[®], Zoetis, São Paulo, Brasil) e 2,0mL de PGF_{2α} (Ciosin[®], MSD MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil). No D11 foi administrado 1mL de GnRH (Gestan plus[®], Tecnopec, São Paulo, Brasil). No D17 iniciou-se pela manhã o jejum alimentar, e durante a tarde o jejum hídrico. A Inovação ocorreu no 18^o dia do protocolo, no turno da tarde.

Colheita e Classificação Embrionária

As fêmeas doadoras foram submetidas a lavagem uterina, o anestésico foi semelhante ao da inseminação laparoscópica. A colheita dos embriões ocorreu no dia 18 (D18), por meio de laparotomia mediana ventral e exposição dos cornos uterinos. Os cornos uterinos foram lavados com 40mL de meio PBS (DMPBS[®] Nutricell - Nutrients Celulares, Campinas, São Paulo, Brasil), pré-aquecido a 37 °C, divididas em 2 lavagens de 20mL de PBS, bem como a mesma medida para a lavagem do outro corno uterino.

A solução resultante da lavagem uterina foi depositada em uma placa de Petri pré-aquecida a 37 °C e analisada com auxílio de estereomicroscópio, a fim de identificar os embriões, aqueles classificados em grau I e II foram selecionados para inovação e mantidos em meio de manutenção (*Holding Plus*[®], Biodux, Campinas, São Paulo, Brasil) formando ou em meio ACP[®] específico para manutenção de embriões.

Inovação de Embriões

Em seguida, os embriões foram aleatoriamente divididos em 2 grupos. Os embriões do grupo I foram manipulados e mantidos em meio de manutenção convencional (*TQC Holding Plus*[®], Biodux, Campinas, São Paulo, Brasil), e os embriões do Grupo II foram manipulados e mantidos em meio ACP[®] a 37° C. Imediatamente as fêmeas receptoras foram submetidas a sedação com 0,03mg/kg de Xilazina (Anasedan[®], Ceva, São Paulo, Brasil), seguida de indução e manutenção por anestesia inalatória com Isoflurano (Isoforine[®], Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil), então foi realizada a laparotomia com exposição do corno uterino, bem como observação dos ovários para avaliar a presença de corpo lúteo, em seguida os embriões foram inovulados no corno ipsilateral ao ovário com corpo lúteo.

Diagnóstico de Gestação

O diagnóstico de gestação foi feito com auxílio de aparelho de ultrassonografia (Sonoscape A5 Vet[®], China) no 30^o dia após a inovação, utilizando um transdutor transretal de 5MHz.

Análise Estatística

Os resultados obtidos foram avaliados por um teste não paramétrico Qui-Quadrado (χ^2) a um nível de significância 5% (0,05).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No total, foram recuperados 20 embriões caprinos e 15 embriões ovinos, os quais foram distribuídos em partes iguais nos dois tratamentos. Os embriões foram depositados em dois meios de manutenção, Grupo TQC Holding[®] ou Grupo ACP[®] manutenção, como apresentado na Tab. 01.

Tabela 01: Total de embriões recuperados nas fêmeas doadoras das espécies caprina e ovina, seus respectivos tratamentos (ACP[®] ou TQC Holding[®]) e a taxa de gestação de cada grupo após o diagnóstico de gestação realizado aos 30 dias.

Embriões	Caprinos	Taxa de gestação	Ovinos	Taxa de gestação
ACP [®]	10	1/10(10%) ^a	8	6/8 (75%) ^a
TQC Holding [®]	10	0/10 (0%) ^b	7	5/7 (71%) ^a
Total	20	5%	15	73%

*Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ao teste X2.

A taxa de prenhes dos ovinos (73%) foi maior que dos caprinos (5%), razão esta que pode estar relacionada a vários fatores que podem influenciar a sobrevivência dos embriões após um programa de TE. Entre eles, destacam-se a fase de desenvolvimento embrionário, a qualidade do embrião, o número de corpos lúteos a idade da receptora e condição nutricional.

Uma baixa sincronia das ovulações após a retirada da esponja em fêmeas tratadas com FSH é uma possível causa de falha na sincronização de fêmeas receptoras para programas de TE. Nas ovelhas, há uma boa sincronia nos surtos de LH e no momento em que as ovelhas começaram a superovular, com tempo médio da primeira à última ovulação de 6h. Em cabras superovuladas, dois fatores contribuem para a disseminação no tempo da ovulação (média±DP = 63±9h). Em primeiro lugar, surtos de LH são observados entre 24 e 64 h após a remoção da esponja e, em segundo lugar, o tempo médio da primeira à última ovulação é de 12 h (COGNIE *et al.*, 2003).

Após as transferências dos embriões ovinos e realização do exame ultrassonográfico aos 30 dias, foi realizada análise estatística constatando que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos tratados com ACP[®] (75%) ou TQC Holding[®] (71%).

CONCLUSÕES

Conclui-se com os resultados obtidos que o meio ACP[®] (água de coco em pó), desenvolvido para utilização como meio de manutenção nos programas de transferência de embriões de pequenos ruminantes, é eficaz e pode ser um meio alternativo de escolha nos

protocolos de TE. Além disso, se faz necessário novos estudos para a consolidação desse bioproduto, visando sua ampla utilização.

REFERÊNCIAS

COGNIÉ, Y.; BARIL, G.; POULIN, P.; MERMILLOD, P. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*, v.59, p.171-188, 2003.

FONSECA, J.F.; SOUZA, J.M.G.; CAMARGO, L.S.A. Produção de oócitos e embriões de pequenos ruminantes: passado, presente e futuro. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.38, p.337-369, 2010.

MENCHACA, A.; VILARIÑO, M.; CRISPO, M.; CASTRO, T.; RUBIANES, E. New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*, v.22, p.113-118, 2010.

OLIVEIRA, M.E.F.; TEIXEIRA, P.P.M.; VICENTE, W.R.R. Biotécnicas reprodutivas em ovinos e caprinos. 1ª ed., São Paulo. MedVet, 2013. 135p.

SALGUEIROS, C.C.M; NUNES, J.F. Água de coco em pó em biotécnicas da reprodução de caprinos. *Ciência Animal*, v.22, p.20-32, 2012.