

Coleta transcervical de embriões em ovinos da raça Dorper no semiárido do Nordeste brasileiro

[*Transcervical embryo recovery in Dorper ewes in The Brazilian semi-arid Northeast*]

A.L. Gusmão, J.C. Silva, T.C.C. Bittencourt, L.E.P. Martins, H.D. Gordiano, L.P. Barbosa

Escola de Medicina Veterinária - UFBA
Av. Ademar de Barros, 500
40170-110 – Salvador, BA

RESUMO

Estudou-se o efeito da aplicação de misoprostol intravaginal, na dilatação cervical de ovelhas Dorper, com o objetivo de se viabilizar a coleta transcervical de embriões. Para isso, 68 fêmeas foram sincronizadas com dispositivo intravaginal de progesterona, superovuladas com FSHp, inseminadas por laparoscopia com sêmen fresco, 36 horas após a remoção do dispositivo intravaginal, e submetidas à coleta transcervical de embriões. Os animais foram distribuídos em dois tratamentos: tratamento 1 (n=10), controle, sem aplicação de misoprostol intravaginal antes da coleta de embriões, e tratamento 2 (n=58), com aplicação prévia de 200µg de misoprostol no fundo do saco vaginal, cinco horas antes da coleta dos embriões. Não foi possível realizar a transposição cervical em nenhum dos animais do tratamento 1, o que inviabilizou as coletas dos embriões, diferentemente do tratamento 2, em que foi possível a transposição cervical em 94,8% dos animais ($P<0,05$). A técnica de coleta descrita foi realizada no tempo médio de $30,14\pm 9,00$ minutos, com recuperação média de $6,02\pm 3,61$ embriões/animal. Conclui-se que a técnica transcervical, com administração prévia vaginal de misoprostol, mostrou-se viável para coleta de embriões em ovelhas Dorper.

Palavras-chave: ovino, embrião, coleta transcervical, Dorper

ABSTRACT

The effect of intravaginal misoprostol application on the cervical expansion in Dorper ewes was evaluated to make feasible the transcervical embryo recovery. Sixty-eight female donors were synchronized with an impregnated vaginal device of progesterone; superovulated with FSHp; inseminated by laparoscopy technique with fresh semen, 36 hours after the removal of impregnated vaginal device; and submitted to transcervical embryo recovery. The ewes were arranged in two treatments: treatment 1 (n=10), representing the control group, without intravaginal misoprostol application before embryo recovery; and treatment 2 (n=58), with application of 200µg of misoprostol in the vagine, five hours before the embryo recovery. The control group did not allow the cervical transposition, making unfeasible the recovery. Animals from treatment 2 reached 94.8% of cervical transposition, resulting in significant ($P<0.05$) difference between treatments. The described recovery technique was accomplished in a mean time of 30.14 ± 9.00 minutes, allowing a mean recovery of 6.02 ± 3.61 of embryos per animal. It was concluded that the transcervical technique, with previous intravaginal misoprostol application, was a feasible method to recover embryos of Dorper ewes.

Keywords: sheep, embryo, transcervical recovery, Dorper

Recebido em 4 de abril de 2008

Aceito em 13 de abril de 2008

E-mail: gusmao@ufba.br

INTRODUÇÃO

A cérvix da ovelha é uma estrutura complexa e consistente, que se estreita à medida que se aproxima do lúmen uterino, apresentando anéis que se dispõem excêntrica e lhe conferem uma forma intrincada e de difícil acesso. A porção caudal possui formato de bico de pato, *flap*, roseta ou espiral (Silva et al., 2004), criando um obstáculo à passagem de instrumentos que permitam o acesso ao útero pela via transcervical, dificultando a inseminação artificial e a coleta de embriões. A baixa fertilidade de ovelhas obtida na inseminação artificial cervical é causada, principalmente, pelo comprometimento do espermatozoide em seu deslocamento através da cérvix. Dessa forma, a utilização comercial dessas biotécnicas, particularmente da transferência de embriões, fica limitada aos procedimentos cirúrgico e laparoscópico, que favorecem a formação de aderências (Andrioli et al., 1999).

O sucesso da transposição da barreira cervical parece depender de vários fatores, como raça, ordem de partos e outros, inerentes ao indivíduo (Sousa, 1999; Almeida et al., 2002).

Pesquisadores têm testado vários tipos de medicamentos com o objetivo de promover o relaxamento cervical e viabilizar a coleta de embriões e a inseminação artificial através do canal cervical em ovelhas. Foi testada uma combinação de PGE_{2α} associada ao estradiol (Barry et al., 1990; McKelvey et al., 1997), à ocitocina (Sayre e Lewis, 1996), à ocitocina com estradiol (Flohr et al., 1999; Wulster-Radcliffe et al., 1999), à PGF_{2α} (Sousa, 1999), à interleucina humana (Croy et al., 1999), ao cloridrato de bromexina (Almeida et al., 2002), ao PGE₁ e ao estradiol (Oliveira, 1992; Ishwar e Memon, 1996). Foi relatada, nesse contexto, a não interferência dessas drogas na qualidade e viabilidade dos embriões. Ainda, os autores obtiveram passagem transcervical que variou de 33,0% a 100,0%.

Dentro dessa perspectiva, este estudo teve como objetivo avaliar o efeito da aplicação do misoprostol intravaginal na dilatação cervical de ovelhas Dorper, superovuladas com FSHp, tornando viável a coleta de embriões pela técnica transcervical.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 68 ovelhas da raça Dorper, pluríparas, híginas, com faixa etária de dois a cinco anos, mantidas em regime semi-intensivo de manejo, alimentadas, diariamente, com pasto de capim-buffel e 200 gramas diárias de ração comercial, sendo, além disso, fornecida suplementação mineral e água à vontade.

As fêmeas foram sincronizadas utilizando-se dispositivos intravaginais impregnados com 0,33g de progesterona¹ durante 13 dias, que foram trocados no nono dia de tratamento por dispositivos novos. O tratamento superovulatório teve início no 11º dia, sendo utilizados 200mg NIH-FSH-S1 de FSHp² divididos em seis aplicações, em doses decrescentes, administradas em intervalos de 12 horas. No momento da última aplicação de FSHp, foram administradas também 200UI de eCG³, com retirada da fonte de progesterona. A inseminação artificial foi realizada com sêmen fresco de reprodutores da mesma propriedade, utilizando-se a técnica laparoscópica com deposição seminal intra-uterina, 36 horas após a remoção do dispositivo intravaginal de progesterona.

As doadoras foram submetidas à coleta transcervical de embriões no 21º dia do programa, sendo distribuídas em dois tratamentos: T1 – controle (n=10), referente aos animais que não receberam aplicação prévia de misoprostol para promover a dilatação cervical antes da coleta de embriões e T2 (n=58), referente aos animais que receberam infusão de 200µg de misoprostol⁴, análogo sintético da prostaglandina E₁ (PGE₁), no fundo do saco vaginal, cinco horas antes da coleta de embriões.

Para a coleta dos embriões via transcervical, os animais foram mantidos em estação, numa plataforma de contenção, sendo feita, em seguida, a higienização da região perineal. Foi realizada, então, anestesia epidural, utilizando-se 1mL de lidocaína⁵ a 1,0%, introduzindo-se, mais adiante, um espécuro vaginal para visualização e localização cervical, a qual foi fixada com o auxílio de duas pinças modelo Pozzi e tracionada

¹CIDR-G, InterAg - Nova Zelândia.

²Vetrepharm Inc. - Canadá.

³Syntex - Argentina.

⁴Searle - Brasil.

⁵Pearson - Brasil.

até o ponto mais próximo possível do vestíbulo vaginal.

Com uma vela de Hegar, o óstio caudal da cérvix foi transposto e dilatado mecanicamente e, imediatamente, foi introduzida, com o auxílio de um mandril de aço inoxidável, uma sonda desprovida de balão, com via única tipo Nelaton-Robinson⁶ até o corpo do útero, sendo direcionada ao corno desejado. A sonda foi acoplada a uma mangueira de duas vias, sendo, por uma das extremidades, introduzido o meio de lavagem constituído de solução salina fosfatada tamponada⁷ a 37°C, acrescido 0,5% de surfactante⁸. Cada corno uterino foi lavado 12 vezes, utilizando-se 20mL de meio por lavagem, totalizando 240mL por corno uterino e 480mL para cada animal.

Pela outra extremidade da sonda, a solução foi recolhida em filtro coletor e levada ao estereomicroscópio para identificação, remoção e avaliação dos embriões. O tempo gasto para a realização do processo, desde a contenção até o fim da coleta e liberação do animal, foi registrado para posterior avaliação.

Os animais foram manejados e submetidos às diferentes etapas inerentes ao processo, de acordo com os princípios éticos da experimentação animal dispostos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Os dados foram submetidos à análise de variância com auxílio do Programa SPSS (SPSS..., 1992), comparando-se as médias por meio do teste Tukey.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A coleta transcervical de embriões, nas ovelhas do T1, foi impossível em 100,0% dos animais (Tab. 1). Este resultado ratifica aqueles descritos por Barry et al. (1990), McKelvey et al. (1997), Sousa (1999) e Almeida et al. (2002), que também não obtiveram êxito na transposição do canal cervical de animais não tratados previamente.

Das 58 ovelhas do T2, não foi possível transpor a barreira cervical em, apenas, três animais (5,2%), o que demonstra a eficiência da técnica de coleta transcervical em ovelhas da raça Dorper, submetidas à aplicação prévia de misoprostol.

Dos três animais em que a passagem cervical foi impossível, pôde-se perceber, em um deles, uma disposição anormal do óstio caudal do canal cervical.

Os resultados de permeabilidade da cérvix foram mais elevados que os descritos por McKelvey et al. (1997), que utilizaram quatro dias de tratamento com PGE₂ e estradiol e conseguiram 33,0% de eficiência na transposição do canal cervical de ovelhas Suffolk. Além disso, superaram também os resultados encontrados por Croy et al. (1999), que fizeram uso da interleucina humana e só alcançaram transposição cervical parcial das fêmeas tratadas. Houve, no entanto, similaridades com os resultados descritos por Barry et al. (1990), Oliveira (1992), Sayre e Lewis (1996) e Sousa (1999), que utilizaram PGE₂ associado ao estradiol, PGE₁ associado ao estradiol, à ocitocina e ao PGF_{2α}, respectivamente, como agentes dilatadores do canal cervical em ovelhas.

A condição de plurípara das fêmeas usadas, provavelmente, facilitou a passagem do equipamento de coleta. Sousa (1999) conseguiu a passagem cervical em 100,0% das fêmeas ovinas Santa Inês pluríparas, enquanto, nas fêmeas nulíparas, o insucesso foi também de 100,0%.

Ressalta-se que, além da utilização da PGE₁, a tração cervical com pinças de Pozzi e o emprego de velas tipo Hegar para auxiliar na dilatação mecânica do canal cervical foram indispensáveis para a execução da técnica com sucesso. O calibre da vela, nº 2 ou 3, variou de acordo com o diâmetro do canal cervical do animal em coleta. Souza et al. (1994) também descreveram a tração cervical como um passo fundamental para a transposição da cérvix na espécie ovina.

A porcentagem média de recuperação do meio de lavagem alcançada neste estudo foi de 95,7% (Tab. 1), resultado semelhante ao alcançado com coletas de embriões realizadas em circuito fechado por Salles (2002) e Gusmão et al. (2002), na espécie caprina (95,0%). No entanto, o valor foi mais alto que os descritos por Barry et al. (1990) e Oliveira (1992), quando utilizaram previamente o mesmo medicamento para provocar relaxamento cervical.

⁶Rusch (ref. 220500 n. 10) - EUA.

⁷Dulbecco Modificado-DPBS, Embriocare, Cutilab - Brasil.

⁸E.T.Surfactante, Vetrepharm Inc. - Canadá.

Tabela 1. Transposição da cérvix e coleta transcervical de embriões, sem e com administração de misoprostol como agente dilatador cervical em ovelhas Dorper superovuladas com FSHp

Variável	T1*	T2**
Animais (n)	10	58
Animais coletados (n)	0a	55b
Execução (min) ($\chi \pm \sigma$)	-	30,14 \pm 9,0
Meio recuperado (%)	-	95,7

*Tratamento 1: sem aplicação de misoprostol; **tratamento 2: com aplicação de misoprostol, cinco horas antes da coleta transcervical no canal vaginal.

Valores seguidos por letras diferentes, na mesma linha, diferem entre si pelo teste Tuckey ($P < 0,05$).

O período de tempo para execução da coleta transcervical em circuito fechado foi de 30,14 minutos, em média (Tab. 1), sendo superior aos 21,32 minutos gastos por Andrioli et al. (1999) para a coleta transcervical em caprinos, e aos 20 minutos gastos por McKelvey et al. (1997), quando realizaram coletas transcervicais em ovelhas tratadas com estradiol e PGE₂ como agentes dilatadores cervicais. Isso evidencia que a técnica descrita é de rápida execução quando comparada com os resultados obtidos por Andrioli et al. (1999) na coleta laparoscópica e cirúrgica em pequenos ruminantes. Ressalta-se a importância da qualificação técnica e da habilidade do operador para o alcance do sucesso com a técnica.

Neste estudo, não foi avaliada a taxa de recuperação embrionária, pois a coleta de embriões foi realizada pela técnica transcervical,

o que não permitiu a visualização prévia dos ovários e a contagem dos corpos lúteos. Dessa forma, a resposta ao desafio superovulatório foi avaliada somente pela quantidade total de embriões recuperados por animal (Tab. 2).

A porcentagem de animais que não respondeu ao desafio superovulatório, quando se considerou como uma resposta positiva a obtenção de mais de dois embriões por doadora, foi de 15,5%, valor semelhante ao encontrado por Cognie (1999), de 20,0%, para ovelhas não responsivas em programas de múltiplas ovulações. Ainda assim, os valores citados foram mais baixos que os descritos por Naqvi e Gulyani (1999), que alcançaram índice de 100,0%, quando associaram o FSHp ao eCG, e de 75,0%, quando usaram somente o FSHp.

Tabela 2. Resposta superovulatória e número de embriões coletados sem e com administração de misoprostol como agente dilatador cervical em ovelhas Dorper superovuladas com FSHp

Variável	T1*	T2**
Animais coletados (n)	0a	55b
Resposta à superovulação (%)	-	85
Embriões viáveis/animal ($\chi \pm \sigma$)	-	3,50 \pm 3,18
Estruturas degeneradas/animal ($\chi \pm \sigma$)	-	2,52 \pm 2,43
Total de embriões/animal ($\chi \pm \sigma$)	-	6,02 \pm 3,61

*Tratamento 1: sem aplicação de misoprostol; **tratamento 2: com aplicação de misoprostol, cinco horas antes da coleta transcervical.

Valores seguidos por letras diferentes, na mesma linha, diferem entre si pelo teste Tuckey ($P < 0,05$).

Existiu uma grande variabilidade individual na resposta superovulatória dos animais, dentro de um mesmo tratamento. Essa variabilidade confirma os achados de Naqvi e Gulyani (1999), Traldi (2000), Silva et al. (2001) e Naqvi et al. (2001), ao descreverem essa situação como um importante entrave para a difusão da biotécnica.

Os valores médios do número total de embriões, de embriões viáveis e de estruturas degeneradas, por animal, encontram-se na Tab. 2. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por

Blanco et al. (2003), 5,2 embriões totais/doadora, utilizando a associação de eCG e FSHp, e por Folch et al. (2001), com 3,9 embriões viáveis por doadora, e empregando hormônio de crescimento, em ovelhas superovuladas com FSHp. Contudo, os resultados de coleta de embriões alcançados neste estudo foram mais altos que os obtidos por Barry et al. (1990), que alcançaram média de 2,2 embriões por fêmea superovulada, e mais baixos que os de Steyn (2000), que relata a coleta de 4,8 embriões

transferíveis por doadora, aplicando protocolo similar ao utilizado neste estudo.

Pode-se concluir que o misoprostol tornou possível a transposição do canal cervical e a coleta não-cirúrgica de embriões, em circuito fechado, em ovelhas da raça Dorper pluríparas.

AGRADECIMENTOS

À Agência Japonesa de Cooperação Internacional (JICA), pelo apoio e pela doação de equipamentos, e à Fazenda Jataí, pela disponibilização dos animais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, V.M.; CÂMARA, D.R.; SALLES, H.O. et al. Colheita de embriões via transcervical em ovinos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.26, supl.5, p.82-84, 2002
- ANDRIOLI, A.; SIMPLÍCIO, A.A.; SOARES, A.T. et al. Eficiência da recuperação de embriões e os efeitos de consecutivas colheitas sobre o aparelho reprodutor de doadoras da espécie caprina. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.36, p.136-146, 1999.
- BARRY, D.M.; VAN NIEKERK, C.H.; RUST, J. et al. Cervical embryo collection in sheep after ripening of the cervix with prostaglandin E2 and estradiol. *Theriogenology*, v.33, p.190, 1990.
- BLANCO, M.R.; SIMONETI, L.; RIVERA, O.E. Embryo production and progesterona profiles in ewes superovulated with different hormonal treatments. *Small Rum. Res.*, v.47, p.183-191, 2003.
- COGNIE, Y. State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*, v.51, p.105-116, 1999.
- CROY, B.A.; PRUDENCIO, J.; MINHAS, K. et al. A preliminary study on the usefulness of huil-8 in cervical relaxation of the ewe for artificial insemination and for embryo transfer. *Theriogenology*, v.52, p.271-287, 1999.
- FLOHR, S.F.; WULSTER-RADCLIFFE, M.C.; LEWIS, G.S. Technical Note: Development of transcervical oocyte recovery procedure for sheep. *J. Anim. Sci.*, v.77, p.2583-2586, 1999.
- FOLCH, J.; RAMÓN, J.P.; COCERO, M.J. et al. Exogenous growth hormone improves the number of transferable embryos in superovulated ewes. *Theriogenology*, v.55, p.1777-1785, 2001.
- GUSMÃO, A.L.; RESENDE, J.; OLIVEIRA, J.V.L. et al. Modificação da técnica de colheita transcervical de embriões de cabras com cateter desprovido de balão. *Rev. Bras. Rep. Anim.*, v.26, supl.5, p.101-103, 2002.
- ISHWAR, A.K.; MEMON, M.A. Embryo transfer in sheep and goats: a review. *small Rum. Res.*, v.19, p.35-43, 1996.
- McKELVEY, W.A.C.; McEVOY, T.G.; DINGWALL et al. The use of exogenous hormones to facilitate transcervical embryo recovery in sheep and their effect on embryo development. *Theriogenology*, v.47, p.369, 1997.
- NAQVI, S.M.K.; GULYANI, R. Ovarian response and embryo recovery to different superovulatory regimens in Rambouillet ewes under semi-arid conditions. *Small Rum. Res.*, v.34, p.127-131, 1999.
- NAQVI, S.M.K.; ANIL JOSHI, G.K.; MITTAL, J.P. Development and application of ovine reproductive Technologies: an Indian experience. *Small Rum. Res.*, v.39, p.199-208, 2001.
- OLIVEIRA, V. S. *Efeitos do hormônio foliculo estimulante (FSH) e da gonadotrofina da menopausa humana (hMG) como agentes superovulantes em cabras (Capra hircus, Linnaeus, 1758) utilizadas em transferência de embriões.* 97f. 1992. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- SALLES, H.O. Circuito fechado para colheita de embriões em caprinos. Disponível em: <<http://www.cnpc.embrapa.br/embrioes.htm>>. Acessado em: 8 ago. 2002.
- SAYRE, B.L.; LEWIS, G.S. Cervical dilation with exogenous oxytocin does not affect sperm movement into the oviducts in ewes. *Theriogenology*, v.46, p.233-241, 1996.
- SILVA, J.C.; MELLO, A.; RESENDE, J. et al. Superovulação de ovelhas Santa Inês através de uma única injeção subcutânea de FSH dissolvido em polivinilpirrolidona. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 24., 2001, Belo Horizonte. *Anais ...* Belo Horizonte: CBRA, 2001. p.500. (Resumo).

SILVA, A.C.J.; SOUSA, M.R.Q.; MESSIAS, J.B. Noções básicas da anatomia funcional do sistema reprodutor da cabra e da ovelha. In: SANTOS, M.H.B.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F. (Eds). *Diagnóstico de gestação na cabra e na ovelha*. São Paulo: Varela, 2004. p.9-16.

SOUSA, J.H.M. *Coleta de embriões e resposta superovulatória utilizando diferentes preparações de FSH em ovelhas deslanadas na região semi-árida da Paraíba*. 1999. 57f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Paraíba, Areia.

SOUZA, M.I.L.; GONÇALVES, P.B.D.; LUZ, S.L.N. et al. Características morfológicas e penetrabilidade cervical visando à inseminação artificial em ovinos. *Cienc. Rural*, v.24, p.591-595, 1994.

STEYN, J.J. Embryo transfer in sheep and goats in South Africa present state and future perspectives.

In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE, 1., 2000, João Pessoa. *Anais...* João Pessoa: EMEPA, 2000. p.265 (Resumo).

SPSS for windows base system user's guide release 5.0. Chicago: SPSS, 1992. 672p.

TRALDI, A.S. Controle farmacológico do ciclo estral e da superovulação em caprinos e ovinos. In: BARUSELLI, P.S.; MADUREIRA, E.H. *Controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes*. São Paulo: FMVZ-USP, 2000. p.306-332.

WULSTER-RADCLIFFE, M.C.; COSTINE, B.A.; LEWIS, G.S. Estradiol-17 β - oxytocin – induced cervical dilation in sheep: application to transcervical embryo transfer. *J. Anim. Sci.*, v.77, p.2587-2593, 1999.