

BIOTÉCNICAS DA REPRODUÇÃO APLICADAS A PEQUENOS RUMINANTES

Fabiana Cristina Varago, Valéria Spyridion Moustacas, Cruz, B. C., Bruno Campos de Carvalho, Luiza Fernandes Mendonça, Monique de Albuquerque Lagares, Marc Roger Jean Marie Henry
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG
Escola de Veterinária, Belo Horizonte, MG

Introdução

A ovinocultura e a caprinocultura são atividades econômicas em contínua expansão no Brasil. Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) permitem observar que entre os anos de 1975 e 2003, o rebanho ovino brasileiro chegou a crescer até 455% em algumas regiões brasileiras. Isto mostra aumento da importância da atividade e, conseqüentemente, sua contribuição para a composição do produto interno bruto do agronegócio brasileiro.

A criação de pequenos ruminantes ainda apresenta potencial de expansão, uma vez que, mesmo com todo o crescimento apontado pelo IBGE, o fornecimento interno de carne ovina ainda está aquém da real demanda, e o país importa grande parte da carne consumida do Uruguai e da Nova Zelândia. Na espécie caprina, a atividade leiteira é uma grande promessa, uma vez que o produto obtido tem alto valor agregado. Além disso, a atividade atua como importante instrumento em ações de desenvolvimento social, sobretudo por essas espécies se adaptarem a diversos ambientes e a sua grande importância como fonte de alimentação às populações carentes, principalmente no norte e nordeste do país.

Nos sistemas de produção em escala, a produtividade dos rebanhos, a precocidade do animal ao abate, a qualidade do produto final e a eficiência reprodutiva são entraves no Brasil para uma maior rentabilidade e conseqüentemente um crescimento ainda maior deste segmento do agronegócio. Nesse contexto, a intensificação do manejo reprodutivo e o melhoramento genético constituem etapas fundamentais para a expansão da atividade de forma competitiva, sendo os programas de reprodução assistida e o uso de biotecnologias ferramentas otimizadoras do processo (Bicudo et al., 2003). O objetivo desta revisão é abordar, de maneira sucinta, as principais técnicas utilizadas na reprodução assistida de pequenos ruminantes.

Inseminação Artificial

Dentre as biotecnologias da reprodução, a inseminação artificial (IA) é a mais simples e difundida e, certamente, a de maior impacto para os programas de melhoramento animal, permitindo rápida difusão do material genético de reprodutores superiores. No entanto, a inseminação artificial em pequenos ruminantes ainda não é utilizada na mesma proporção que em bovinos, e isto provavelmente se deve à peculiaridade anatômica da cérvix, que dificulta sua transposição e requer mão-de-obra treinada para executá-la de forma segura, principalmente na espécie ovina.

Em cabras, a inseminação geralmente é realizada pela técnica transcervical (intra-uterina). Nesta, com o auxílio de um espelho, o ósteo cervical caudal é localizado e com um aplicador os anéis cervicais podem ser ultrapassados para que o sêmen seja depositado diretamente no corpo do útero. Já nas ovelhas, a transposição cervical é particularmente difícil, devido à sinuosidade dos anéis cervicais e à diversidade de formas anatômicas que os mesmos podem apresentar (Halbert et al., 1990; Kershaw et al., 2005; Anel et al., 2006). Em ovelhas da raça Santa Inês, por exemplo, foi relatada a ocorrência de 100% de formações de fundo de saco nos dois primeiros anéis cervicais, o que acaba por funcionar como uma barreira adicional à transposição da mesma (Cruz Jr., 2006).

A tração do primeiro anel cervical, com o auxílio de uma pinça cirúrgica, até exteriorização de seu ósteo, é uma prática amplamente adotada. Porém, o sucesso de transposição ainda é inconsistente e, quando a IA é realizada com sêmen fresco, os resultados de fertilidade com deposição de sêmen intra-uterina não diferem daqueles obtidos com a deposição do sêmen pelo método tradicional no ósteo cervical caudal (Silva et al, 2005), não sendo, portanto, justificável o seu uso com sêmen fresco. Adicionalmente, a tração, quando não realizada de forma correta, pode gerar pequenas lesões e até sangramentos da mucosa cervical, levando à reação inflamatória local, aumentando a possibilidade de queda de fertilidade.

Por outro lado, espermatozóides criopreservados têm menor habilidade de penetrar no muco cervical e por isso, quando do seu uso, as taxas de prenhes após IA com deposição vaginal profunda ou cervical superficial não são boas, estando em torno de 25% (Mortimer e Maxwell, 2004). Portanto, a deposição dos espermatozóides no

lúmen uterino passa a ser uma necessidade para obtenção de índices aceitáveis de fertilidade.

Visando minimizar esta restrição, técnicas de inseminação por laparoscopia, com deposição intrauterina do sêmen, têm sido amplamente estudadas e aprimoradas (Anel et al., 2006). Esta requer equipamentos caros e mão-de-obra especializada. Conseqüentemente, sua implementação em um rebanho dependerá do sistema de produção adotado e da relação custo-benefício proporcionada. As taxas de fertilidade com sêmen congelado com deposição intra-uterina pela via laparoscópica estão em torno de 40% a 70% (Maxwell et al., 1999; Anel et al., 2006).

Na tentativa de relaxar a cérvix e facilitar a transposição da mesma, tratamentos hormonais foram testados. A relaxina, a ocitocina e as prostaglandinas foram utilizadas com o fim já citado, mas também visando aumentar a contratilidade uterina, o que facilitaria o transporte espermático pelo trato reprodutivo (Salamon e Maxwell, 2000). Porém, os resultados obtidos ainda deixam a desejar.

Criopreservação espermática

Além de facilitar o uso da inseminação artificial, o congelamento de sêmen permite ainda o armazenamento e intercâmbio deste material entre propriedades, bem como permite utilizar os reprodutores em um número muito maior de fêmeas do que aquele que seria obtido em regime de monta natural. A inseminação artificial com sêmen congelado pode também evitar a disseminação de doenças infecciosas, uma vez que, quando utilizados de forma adequada, os antibióticos adicionados aos meios diluidores proporcionam controle microbiológico eficiente (Xavier et al, 2009).

O congelamento de sêmen permite ainda o armazenamento de material para programas de inseminação fora da estação reprodutiva fisiológica, uma vez que diversas raças de ovinos e caprinos são estacionais e o volume e a qualidade do sêmen tendem a diminuir fora da estação (Thimonier, 1981). A composição do plasma seminal de ovinos e caprinos também sofre influência das estações do ano, levando à diminuição da congelabilidade espermática fora da estação reprodutiva (Aisen, 2008).

Apesar dessas vantagens, ainda existem limitações quanto ao uso do sêmen criopreservado, pois além das dificuldades de transposição cervical o poder fecundante dos espermatozóides congelados é menor se comparado ao obtido com sêmen fresco (Salamon e Maxwell, 1995; Salamon e Maxwell, 2000; Anel et al., 2006). Isto porque

durante o processo de congelamento ocorrem lesões à estrutura espermática, principalmente desestabilização das membranas celulares. Tais danos são muitas vezes irreversíveis, diminuindo a viabilidade dos gametas (Holt, 2000). Em função disto, a expansão da inseminação artificial utilizando sêmen congelado fica comprometida para as duas espécies, particularmente quando a via de deposição é no óstio cervical caudal.

Sexagem espermática

A pré-seleção do sexo dos animais é uma estratégia atrativa para diversos produtores. Já na década de 80, pesquisadores relataram a utilização da técnica com sêmen de suínos, bovinos e ovinos (Johnson e Clarke, 1988). A sexagem é realizada por citometria de fluxo, uma técnica que permite separar os espermatozoides X e Y pelo seu conteúdo de DNA. Um fluorocromo com afinidade por DNA é utilizado e a fluorescência emitida, que é proporcional ao conteúdo de DNA, é captada por um sistema computadorizado que separa as células com 80 a 90% de eficácia (Johnson, 1995). No entanto, por si só o processo de sexagem reduz a longevidade e a viabilidade espermática (Hollinshead, et al. 2003). Dessa forma, o momento da inseminação tem papel ainda mais crucial para a obtenção de resultados de prenhes aceitáveis. Para ovinos, a combinação da IA com protocolos de sincronização de estro reduz este problema, aumentando as taxas de prenhez. Em estudos recentes, utilizando-se sêmen criopreservado, os resultados de fertilidade estiveram em torno de 45 a 50% (Beilby et al, 2009). A dose mínima recomendada é de 1×10^6 de espermatozoides móveis, e a inseminação deve ser por laparoscopia. O uso de sêmen sexado permite obter até mais de 93% de animais com o sexo pré-determinado (Beilby et al, 2009). O uso da técnica de sexagem em caprinos foi descrita apenas em 2004 (Parila et al., 2004) e até hoje existem poucos relatos de seu uso, constituindo-se, portanto, uma área interessante de pesquisa nesta espécie.

Sincronização e indução de estro e ovulação

As ovelhas e cabras são poliéstricas podendo ser estacionais ou não dependendo da raça e da latitude em que se encontram, sendo consideradas, quando sazonais, espécies de fotoperíodo negativo (dias curtos), com maior concentração de estros no outono e inverno. Para atenuar essa característica, programas sincronização e indução de estros acabam sendo adotados por inúmeros produtores. Estes programas permitem a

concentração das inseminações (ou cobrições), dos partos e das lactações na época desejada ou até durante o ano inteiro. O produtor pode assim planejar a oferta de leite e de crias ao mercado, bem como usufruir da maior facilidade de manejo geral do rebanho. Protocolos hormonais, manipulação do fotoperíodo e efeito macho são ferramentas que podem ser utilizadas isoladamente ou em combinações, permitindo a melhoria dos resultados obtidos.

O ciclo estral pode ser manipulado por diversos fármacos, hormônios naturais ou sintéticos. Comumente são utilizados pressários intra-vaginais impregnados com progestágenos, como o norgestomet e o acetato de medroxiprogesterona, que permanecem por 6 a 14 dias em contato com a mucosa, elevando a concentração plasmática de progesterona. Após a retirada do dispositivo, os animais manifestam estro e ovulam em até quatro dias. Com o objetivo de melhorar a sincronização do estro e obter melhores índices melhores após a inseminação, alguns protocolos associam a utilização de gonadotrofinas, ex. 300 UI de eCG (gonadotrof na coriônica eqüina) 24 a 48h antes da retirada do dispositivo vaginal, podendo também ser utilizado o hCG (gonadotrofina coriônica humana) (Fonseca, 2005; Fonseca et al., 2004). Agentes luteolíticos também podem ser utilizados durante a estação resprodutiva, desde que o animal apresente corpo lúteo funcional (do 5° a 11° dia do ciclo estral em ovinos e do 5° ao 15° em caprinos ; estro = dia 0). Nestas condições, quando administrada a prostaglandina-F_{2-α}, 60 a 70% das fêmeas apresentam estro dentro de 3 a 4 dias (Rubianes, 2000).

Fatores ambientais, como o fotoperíodo, nutrição e presença do macho também influenciam a manifestação de estro e a ocorrência de ovulação dos pequenos ruminantes. Quando esses fatores são manipulados artificialmente, o processo é chamado de bioestimulação. O efeito macho é uma das formas de bioestimulação, na qual um macho é introduzido em um rebanho de fêmeas previamente isoladas por no mínimo 60 dias (Granados e Dias, 2000). A manifestação de estro inicia-se quatro dias após o contato com o macho. No entanto, os cios manifestados nos primeiros sete dias após introdução do macho tendem a ser menos férteis, sendo recomendada a inseminação após o oitavo dia ou no cio subsequente (Andrioli et al., 2006).

A manipulação do fotoperíodo é outra técnica de reprodução assistida que pode ser utilizada para induzir o estro e a ovulação fora da estação reprodutiva. As fêmeas são submetidas a 16h de luz seguidas de 8h de obscuridade por um período mínimo de

60 dias. Terminado o tratamento com luz, os animais ficam expostos à luz natural, sendo que a manifestação dos estros tem início 60 dias após a reintrodução da iluminação natural. Para sincronizar o aparecimento dos estros, a administração de PGF2 α pode ser realizada ao final dos 60 dias após a reintrodução da luminosidade natural (Simplício et al., 2007).

Transferência de embriões

A transferência de embriões (TE) é um método de reprodução artificial que tem como principal objetivo a maximização reprodutiva da fêmea através da disseminação de animais geneticamente superiores e a redução do intervalo entre gerações. Ela também possibilita uma garantia sanitária, ou seja, o seu uso é um método eficaz para evitar a introdução ou transmissão de agentes infecciosos, bacterianos e virais entre animais e propriedades. Esta possibilidade depende da presença e da integridade da zona pelúcida, a qual isola o embrião dos agentes infecciosos presentes no ambiente uterino (Shisong & Wrathall, 1989).

Doadoras

A escolha das doadoras deve levar em conta o seu valor genético bem como os seus antecedentes produtivos. Devem ser selecionados animais que têm demonstrado uma produção de carne, leite ou lã, significativamente superior a média da população da qual provêm. No entanto, na maioria das vezes, o técnico que executa a transferência de embriões não tem nenhuma influência na escolha das matrizes, prevalecendo a vontade do criador. Independente do critério de seleção, boas condições gerais e um bom estado reprodutivo, sanitário e nutricional são imprescindíveis às doadoras (Baldassare, 2008).

Superovulação

As doadoras devem passar por um tratamento hormonal específico com o objetivo de induzir a ovulação múltipla, geralmente pela aplicação de FSH exógeno em doses decrescentes. Segundo Armstrong e Evans (1983), a resposta ao protocolo de superovulação está sujeita tanto a fatores intrínsecos (raça, idade, variação individual, estágio da lactação) quanto extrínsecos (nutrição, saúde, época do ano e protocolo utilizado), o que acarreta uma grande variabilidade de resposta entre os animais.

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 (tabela 1), 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 (Baldassare, 2008). Com o intuito de melhorar a resposta ao tratamento superovulatório em pequenos ruminantes, protocolos que possibilitem conhecer a fase do ciclo estral em que se encontra a fêmea, têm sido desenvolvidos. Estes protocolos permitem iniciar o tratamento superovulatório no “Dia 0” e fundamentam-se na aplicação da primeira dose de FSH paralelamente a ocorrência de ovulação e emergência da primeira onda folicular. Com a utilização deste tipo de protocolo pode-se reduzir a duração da permanência do dispositivo intravaginal de progesterona, minimizando os riscos de perdas e reduzindo também a incidência de vaginites (Rubianes e Menchaca, 2006; Fonseca, 2007).

Tabela 1. Protocolo convencional de superovulação em caprinos e ovinos

Ovelha	Cabra
Dia 0 – Colocação implante ou esponja de progesterona	Dia 0 – Colocação implante ou esponja de progesterona
Dia 12 – manhã – 1° injeção de FSH	Dia 8 – manhã – 1° injeção de FSH
Dia 12 – tarde – 2° injeção de FSH	Dia 8 – tarde – 2° injeção de FSH
Dia 13 – manhã – 3° injeção de FSH	Dia 9 – manhã – 3° injeção de FSH
Dia 13 – tarde – 4° injeção de FSH	Dia 9 – tarde – 4° injeção de FSH
Dia 14 – manhã – 5° injeção de FSH + retirada da esponja	Dia 10 – manhã – 5° injeção de FSH + retirada da esponja
Dia 14 – tarde – 6° injeção de FSH + 0,5ml de PGF2 α	Dia 10 – tarde – 6° injeção de FSH + 0,5ml de PGF2 α
Dia 15 – Observação de estro e monta natural ou IA	Dia 11 – Observação de estro e monta natural ou IA
Dia 16 – Observação de estro e monta natural ou IA	Dia 12 – Observação de estro e monta natural ou IA
Dia 21 ou 22 - coleta dos embriões	Dia 17 ou 18 - coleta dos embriões

Fertilização das doadoras

A fertilização das doadoras pode ser realizada através da monta natural ou inseminação artificial com sêmen fresco ou congelado (transcervical). A inseminação deve ser realizada 12 horas após a detecção do estro e repetida 8 horas após. Quando da utilização da monta natural, os carneiros devem ser mantidos com as doadoras por 72 horas após a retirada do dispositivo de progesterona (Baldassare, 2008). No entanto,

após a superovulação recomenda-se o emprego da deposição seminal por laparoscopia, realizando-se uma ou duas inseminações com intervalo de 12 horas. Esta técnica tem a vantagem de possibilitar a deposição do sêmen nos cornos uterinos próximo ao local da fertilização. O uso desta técnica permite aumentar as taxas de fertilização e possibilita o uso de sêmen congelado com maior eficiência. Quando da utilização de inseminação única com sêmen fresco, esta deve ser realizada 36 horas após a retirada do dispositivo de progesterona tanto para ovinos quanto para caprinos (Gusmão, 2006)

Coleta de embriões

A coleta dos embriões deve ser realizada entre o sexto e o sétimo dia do ciclo estral. Nesta fase os embriões coletados estão no estágio de mórula a blastocisto. O método de colheita mais utilizado em pequenos ruminantes ainda é a laparotomia (Loi *et al.*, 1998) Contudo, existe a necessidade de se desenvolver técnicas menos invasivas para colheita e transferência de embriões, uma vez que repetidas colheitas cirúrgicas, no mesmo animal, contribuem para a redução da taxa de fecundação e recuperação de embriões em decorrência do desenvolvimento de aderências do sistema genital. Em menor escala, a coleta também tem sido feita pela técnica de laparoscopia, que por ser uma técnica menos traumática, diminui o número de aderências e permite uma maior utilização da mesma doadora. No entanto, o custo do equipamento ainda é elevado e sua utilização requer treinamento. Além disso, a taxa de recuperação é muito variável uma vez que com esta técnica úteros muito sinuosos apresentam taxa de recuperação muito baixa. Assim sendo, na grande maioria das vezes, quando se dispõe de um laparoscópio, recomenda-se a utilização da técnica mista, ou hemi-laparoscópica. Com o laparoscópio é possível visualizar o sistema genital feminino, o que permite uma incisão bem menor para retirada do útero, além de permitir a avaliação da resposta superovulatória previamente, evitando assim a realização de uma laparotomia em uma doadora que não respondeu de forma satisfatória. Todas as técnicas com o uso de laparoscópio devem ser feitas sob anestesia geral e após jejum alimentar e hídrico de 24 horas. A coleta pela via transcervical tem sido utilizada mais na espécie caprina, uma vez que os resultados na espécie ovina ainda são inconsistentes.

Inovulação

A transferência dos embriões pode ser realizada pelas técnicas de laparotomia, laparoscopia, hemi-laparoscopia ou transcervical, sendo que a laparoscopia tem sido amplamente utilizada, permitindo a transferência dos embriões próximo à junção útero-tubárica e minimizando a possível ocorrência de aderências. A técnica de inovulação transcervical tem sido utilizada apenas na espécie caprina.

Receptoras

As receptoras de embriões são tão importantes no sucesso do programa de transferência quanto as doadoras, por esta razão, o mesmo cuidado deve ser dado a seleção das receptoras. Tendo este critério estabelecido, é importante que as receptoras tenham boa saúde reprodutiva, boa condição corporal e habilidade materna conhecida. A sincronização da ovulação entre doadoras e receptoras também é de fundamental importância para obtenção de bons índices de prenhes após a transferência. Receptoras apresentando estro natural também podem ser utilizadas desde que este esteja em sincronia com o estro da doadora (Simplício et al., 2007, Fonseca, 2007)

Criopreservação embriões

A criopreservação de embriões permite a utilização maximizada da transferência bem como a comercialização dos embriões entre diferentes países. A criopreservação pode ser realizada pelo método lento (convencional) ou pela técnica de vitrificação (ultra-rápida). Para ambas as técnicas o resultado obtido depende do meio utilizado, da qualidade do embrião e também da habilidade do técnico, sendo que este último ponto é especialmente importante quando se utiliza a vitrificação. Para os pequenos ruminantes o método lento, em máquinas de congelamento, tem sido mais utilizado adotando-se como crioprotetor o etilenoglicol ou o glicerol, resultando em taxas de gestação que variam entre 30 e 70% (Dattena, 2000, Simplício et al., 2007). A vitrificação por se tratar de uma técnica de custo mais acessível e de realização mais rápida, se constitui em uma alternativa de grande interesse tanto para a pesquisa como para sua aplicação a campo. Por hora, o número de avaliações da eficácia da inovulação após a vitrificação ainda são limitados em pequenos ruminantes. Usando essa técnica Bari et al. (2001) obtiveram 53% de gestação para a espécie ovina.

Produção *in vitro* de embriões

Dentre as biotécnicas da reprodução mais recentemente desenvolvidas, a produção *in vitro* (PIV) de embriões em ovinos e caprinos apresenta-se como uma alternativa capaz de gerar maior quantidade de filhos oriundos de fêmeas geneticamente superiores quando comparado a superovulação e a transferência de embriões convencional. A produção *in vitro* de embriões através da punção ovariana por laparoscopia em pequenos ruminantes evita obstáculos encontrados na transferência de embriões convencional tais como: variações na resposta superovulatória, baixa taxa de fecundação, regressão prematura do corpo lúteo, variações na taxa de recuperação dos embriões e problemas de aderência (Cox e Alfaro, 2007).

São quatro as etapas da produção *in vitro* de embriões: obtenção, maturação e fecundação dos oócitos e cultivo dos zigotos até o estágio de mórula ou blastocisto. O detalhamento de cada etapa será abordado a seguir.

Origem e obtenção dos oócitos

Os oócitos utilizados para PIV de embriões ovinos e caprinos podem ser obtidos de fêmeas adultas ou de fêmeas pré-púberes (submetidas ou não a indução hormonal de crescimento folicular). Em condições experimentais, os ovários podem ser obtidos após o abate das fêmeas, sem estimulação hormonal prévia. Nesse caso, os ovários devem ser transportados, do abatedouro até o laboratório, em solução salina tamponada fosfatada (PBS) ou em solução cloreto de sódio (NaCl) a 0,9% entre 35 e 37°C, na presença de antimicrobianos.

A obtenção dos oócitos utilizando-se a laparoscopia, comumente chamada de LOPU (laparoscopic ovum pick-up) tem sido amplamente utilizada na espécie ovina e caprina. O procedimento de aspiração é simples e rápido, porém necessita de técnico treinado para sua realização. O número de oócitos obtidos tem grande variação entre os animais, mas encontra-se entre 3 a 14/animal (Baldassare et al., 1994; Bernardi, 2005). A laparoscopia possui a vantagem de não ser traumática como a laparotomia, e não deixa seqüelas ou efeitos negativos na fertilidade futura das fêmeas doadoras, mesmo após 8 a 20 aspirações repetidas (Stangl et al., 1999).

O tratamento hormonal, visando estimular o crescimento folicular e obtenção de um maior número de oócitos por ovário, é indicado principalmente para fêmeas pré-púberes, fêmeas em anestro estacional ou para fêmeas geneticamente superiores e segue

o mesmo protocolo dos tratamentos superovulatórios descritos para transferência convencional de embriões. Em geral, em fêmeas previamente estimuladas com hormônios, o número de oócitos obtidos é maior do que aquele obtido de fêmeas não estimuladas, independentemente do método utilizado (Baldassare et al., 1994).

Maturação dos oócitos

O meio mais empregado para a maturação dos oócitos é o TCM 199, acrescido de 10% de Soro Fetal Bovino (SFB). A maturação é geralmente efetuada na presença dos hormônios FSH (0,1 a 10 mg/mL), LH (0,02 a 10 mg/mL) e 17 β -estradiol (1 mg/mL), durante 22 a 24 horas, a 38,5-39°C, em atmosfera de 5% de CO₂ em ar. A presença de estradiol no meio de maturação possui efeito positivo nas taxas de clivagem e de formação de blastocistos, mas pode ser substituído por líquido folicular. A presença de gonadotrofinas parece ser indispensável para a maturação de oócitos oriundos de fêmeas imaturas (Bernardi, 2005),

Fecundação dos oócitos

A fertilização *in vitro* (FIV) pode ser realizada com sêmen fresco ou congelado. Porém, devido à praticidade e ao sucesso da utilização de sêmen congelado, o mesmo foi incluído na maioria dos protocolos de fertilização em pequenos ruminantes. Segundo Maxwell et al., (1996), o número de oócitos fecundados é semelhante quando é usado o sêmen fresco ou congelado. Contudo, os zigotos fecundados com sêmen congelado são mais avançados no desenvolvimento do que os fecundados com sêmen fresco.

A seleção dos espermatozóides é preferencialmente feita em gradiente de Percoll (45%/90%), no qual os gametas são centrifugados durante 20 minutos a 500-700g. A capacitação dos espermatozóides é geralmente realizada em meio SOF (Synthetic Oviduct Fluid) acrescido de 10% de soro de ovelha em estro. Na espécie ovina, não é habitual o uso de heparina no processo de capacitação. A fertilização se processa a 38,5-39°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂, com tempo de co-incubação de aproximadamente 20 horas. A dose inseminante mais comumente utilizada é de 1x10⁶ espermatozóides/mL. A adição de cafeína ao meio de FIV em ovinos pode melhorar as taxas de fertilização uma vez que há redução da polispermia e maior capacidade de desenvolvimento até o estágio de blastocisto (Campbell et al., 2009).

Cultivo dos embriões

Embora alguns progressos já tenham sido obtidos, o cultivo *in vitro* ainda é uma das etapas limitantes na produção *in vitro* de embriões em pequenos ruminantes. Dentre os meios comumente utilizados encontra-se o SOF ou SOFaaci (acrescido de aminoácidos) suplementados com soro fetal bovino ou soro humano e o TCM-199 com piruvato de sódio e soro fetal bovino. Usualmente, cerca de 50% do meio de cultivo é repostado a cada dois dias e a adição de soro fetal bovino ao meio contendo os embriões é realizada após 24 horas do início do cultivo. O cultivo deve ser realizado em atmosfera de 5% de CO₂ ou em mistura de gases: 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂, a 38,5-39°C por 6 ou 7 dias.

Clonagem e Transgenia

Em animais de produção, a clonagem foi feita pela primeira vez em ovinos usando-se a técnica de transferência de núcleos embrionários para oócitos enucleados, porém essa técnica é limitada devido ao pequeno número de núcleos disponíveis (Willadsen, 1986). A clonagem do primeiro mamífero a partir de uma célula somática retirada de um animal adulto foi uma grande conquista da pesquisa e esta tecnologia teve uma rápida expansão sendo utilizada para diversas espécies. Apesar disto a taxa de sucesso na clonagem de animais, é na maioria das vezes não superior a 1% (Carneiro, 2007).

O uso da clonagem em caprinos e ovinos com fins reprodutivos está praticamente limitado a clonagem de animais transgênicos de alto valor, devido ao alto custo e a ineficiência da tecnologia. Essa técnica, provavelmente, não deverá ser muito difundida para programas de melhoramento genético dos rebanhos de pequenos ruminantes, devido ao baixo valor dos animais, principalmente se compararmos com espécies como bovinos e equinos (Baldassare, 2007).

A transgenia é a modificação da informação genética de um organismo através de técnicas de recombinação de DNA. Um animal transgênico é aquele que adquiriu uma nova informação genética como resultado de manipulação do seu DNA (Carneiro, 2007).

A microinjeção de DNA no pró-núcleo e a transferência nuclear de células somáticas são os dois métodos mais utilizados para a produção de caprinos e ovinos

transgênicos. A microinjeção pronuclear é um método muito confiável, porém de baixa eficiência, já que menos de 10% das crias nascidas são transgênicas (Baldassare et al., 2004). O DNA exógeno introduzido no pró-núcleo é altamente mitogênico. Isto induz à morte de uma grande proporção de embriões (30% ou mais) e também rearranjos desconhecidos do genoma. Para ser transgênico, um animal deve apresentar o DNA exógeno em todas as suas células, incluindo os gametas, para permitir a transmissão à progênie. (Houdebine, 2005).

A transferência nuclear de células somáticas usa células transfectadas *in vitro* com vetores para expressão de DNA. Assim o DNA é incorporado ao genoma do animal. A maioria das crias nascidas utilizando essa técnica é transgênica (Houdebine, 2005).

Os caprinos e ovinos apresentam características favoráveis que os qualificam como excelentes modelos para a transgênese, destacando-se um intervalo entre gerações curto, prolificidade elevada e um baixo custo para manutenção. Nenhum efeito adverso do transgênese foi observado sobre a sanidade e a reprodução dos animais. (Simplício et al., 2007). O uso da tecnologia da transgenia em pequenos ruminantes atualmente está voltada somente para a produção de proteínas recombinantes de interesse farmacológico e na biomedicina (Baldassare et al., 2003). Podemos citar alguns exemplos de proteínas recombinantes produzidas no leite de caprinos e ovinos como: Antitrombina III, que é um anticoagulante; os Fatores VIII e IX, usados no tratamento da hemofilia; e a Alfa-1-antitripsina, usada no tratamento da fibrose cística e enfisema (Carneiro, 2007).

Considerações Finais

O uso das biotécnicas da reprodução em pequenos ruminantes vem aumentando com o passar dos anos, mas apenas algumas delas são de maior aplicabilidade aos rebanhos brasileiros. A restrição do uso de certas técnicas é devido ao alto custo e à baixa eficiência das mesmas, e ao valor relativamente baixo das doadoras. As técnicas de sincronização do estro e inseminação artificial são as que apresentam maior aplicabilidade aos rebanhos atuais, e a transferência de embriões e a produção *in vitro* de embriões tem tido seu uso restrito à multiplicação de alguns animais de alto valor genético e comercial.

A produção de animais transgênicos e clones tem sido usada até a presente data para a produção de proteínas de uso farmacológico. Estas técnicas não serão úteis para melhoramento genético de rebanhos enquanto os seus custos forem muito altos e as suas

eficiências baixas. Além disto, enquanto não houver o esclarecimento da população quanto à segurança no consumo de produtos derivados deste tipo de animal e de sua prole as mesmas encontrarão restrições ao seu uso.

Referencias

1. ANDRIOLI, A.; SANTOS, D.O.; ELOY, A.M.X. Manejo reprodutivo de matrizes e reprodutores caprinos em sistema de produção de leite. Embrapa caprinos, 2006.
2. ANEL L.; ALAVAREZ, M.; MARTINEZ-PASTOR, F. et al. Improvement strategies in ovine artificial insemination. *Reproduction in Domestic Animals*, v.41,supl.2, p.30-42, 2006.
3. ARMSTRONG, D. T.; EVANS, G. M. Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. *Theriogenology*, v, 19, p. 31-42, 1983.
4. BALDASSARE, H.; CASTRO, T. E.; FURNUS, C. C.; et al. In vitro maturation and fertilization of sheep oocytes collected by laparoscopic folliculocentesis. *Theriogenology*, v.41, p.159, 1994.
5. BALDASSARE, H.; WANG, B.; KEEFER, C.L. et al. State of the art in the production of transgenic goats. *Reproduction, Fertility and Development*, v.16, p.465-470, 2004.
6. BALDASSARE, H. Reproducción asistida en la especie caprina: inseminación artificial a clonación. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.31, n.2, p.274-282, 2007.
7. BALDASSARE, H. Coleta, conservação e transferência de embrião. In: Aisen, E.G. *Reprodução ovina e caprina*. São Paulo: MedVet. Cap 11, p.143-152, 2008.
8. BARI, F.; KHALID, M.; WOLF, B. et al. The repeatability of superovulatory response and embryo recovery in sheep. *Theriogenology*, v.56, p.147-155, 2001.
9. BEILBY, K.H.; GRUPEN, C.G.; THOMSON, P.C. et al. The effect of insemination time and sperm dose on pregnancy rate using sex-sorted ram sperm. *Theriogenology*, v.71, p.829–835, 2009.
10. BERGERON, A.; MANJUNATH P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Molecular Reproduction and Development*, v.73, p.1338–1344, 2006.
11. BERNARDI, M.L. Produção “in vitro” de embriões ovinos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.33 (1), p.1-16, 2005.

12. CAMPBELL, K. H. S.; MAALOUF, W. E.; LEE, J. H. Effects of caffeine, cumulus cell removal and aging on polyspermy and embryo development on in vitro matured and fertilized ovine oocytes. *Theriogenology*, v. 71, p. 1083-1092, 2009.
13. BICUDO, S.D.; SOUZA, D.B.; TAKADA, L. Possibilidades e limitações da inseminação com sêmen ovino refrigerado e biotécnicas associadas como estratégias de intensificação do manejo reprodutivo. In: *Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*, 15, 2003. Porto Seguro – BA. Anais... Belo Horizonte - MG: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2003.
14. CARNEIRO, G.F. Biotecnologia da reprodução na espécie caprina: perspectivas atuais. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.31, n.2, p.268-273, 2007.
15. COX, J.F.; ALFARO, V. In vitro fertilization and development of OPU derived goat and sheep oocytes. *Reproduction of Domestic Animals*, v.42, p.83-87, 2007.
16. CRUZ JÚNIOR, C.A. *Caracterização anatômica e histológica da cérviz de ovelhas da raça Santa Inês*. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias), 45p, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2006.
17. DATTENA, M.; PTAK, G.; LOI, P. et al. Survival and viability of vitrified “in vivo” and “in vitro” produced ovine blastocysts. *Theriogenology*, v.53, p.1511-1519, 2000.
18. FONSECA, JF. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em caprinos e ovinos. In: *Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*, 16, 2005, Goiânia. Anais ... Belo Horizonte: CBRA, 2005. CD-ROM.
19. FONSECA, J.F.; BRUSCHI, J.H.; VIANA, J.H.M., et al. Induction of synchronized estrus in Santa Inês sheep. In: *Jornada de Medicina Veterinária da UNIPAR*, 9, 2004, Umuarama, PR. Anais ... Umuarama, PR:UNIPAR, 2004. CD-ROM.
20. FREITAS, V. J. F.; LIMA VERDE, J. B.; RONDINA, D. Produção in vitro de embriões ovinos. *Ciência Animal*, v.13, p.79-78, 2003.
21. GRANADOS, L.B.C.; DIAS, A.J.B. *Aspectos Gerais da Reprodução de Caprinos e Ovinos*. 1ª ed., Campos dos Goytacazes, RJ, 2006.
22. GUSMÃO, A.L. Transferência de embriões em pequenos ruminantes. *O embrião*, v.25, p.6-9, 2006.
23. HOLLINSHEAD, F. K.; GILLIAN, L.; O'BRIEN, J. K. et al. In vitro and in vivo assessment of functional capacity of flow cytometrically sorted ram spermatozoa after freezing and thawing. *Reproduction, Fertility and Development*, v.15, p.351–359, 1995.

24. HOLT, W.V. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, v.53, p.47-58, 2000.
25. HOUDEBINE, L.M. Métodos de gerar animais transgênicos e controle da expressão gênica. In: COLLARES, T. *Animais transgênicos: Princípios e Métodos*. Botucatu, SBG, p. 82-114, 2005.
26. JOHNSON, L.A.; CLARKE, R.N. Flow sorting of X and Y chromosome-bearing mammalian sperm: activation and pronuclear development of sorted bull, boar, and ram sperm microinjected into hamster oocytes. *Gamete Research*, v.21, P.335-343, 1988.
27. JOHNSON, L.A. Sex preselection by flow cytometric separation of X and Y chromosome-bearing sperm based on DNA difference: a review. *Reproduction, Fertility and Development*, v.7, p.893-903, 1995.
28. KERSHAW, C.M.; KHALID, M.; MCGOWAN, M.R. et al. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology*, v.64, p.1225-1235, 2005.
29. LOI, P.; PTAK, G.; DATTENA, M.; et al. Embryo transfer and related Technologies in sheep reproduction. *Reproduction Nutrition and Development.*, v. 38, p. 615-628, 1998.
30. MAXWELL, W.M.C.; CATT, S.L.; EVANS, G. Dose of fresh and frozen thawed spermatozoa for in vitro fertilization of sheep oocytes. *Theriogenology*, v. 45, p.262, 1996.
31. MORTIMER S.T.; MAXWELL, W.M.C. Effect of medium on kinematics of frozen-thawed ram spermatozoa. *Reproduction*, v.127, p. 285-291, 2004.
32. PARRILLA, I.; VAZQUEZ, J.M.; ROCA, J. et al. Flow cytometry identification of X- and Y-chromosome-bearing goat spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, V.39, p.58-60, 2004.
33. RUBIANES, E. Control farmacológico del ciclo estral en caprinos y ovinos. In: *Controle Farmacológico do Ciclo Estral em Pequenos Ruminantes*, São Paulo, Anais...p.255-282, 2000.
34. RUBIANES, E.; MENCHACA, A. Dinâmica folicular, sincronização do estro e superovulação em ovinos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.34, p.251-261, 2006.
35. SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Animal Reproduction Science*, v.37, p.185-249, 1995.

36. SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, v.62, p.77-111, 2000.
37. SHISONG, C.; WRATHALL, A.E. The importance of the zona pellucida for disease control in livestock by embryo transfer. *British Veterinary Journal*, v.145, p.129-140, 1989.
39. SILVA, J.C.B.; OLIVEIRA, R.; SCHNEIDER, C. et al. Inseminação artificial intra-uterina em ovinos por tração cervical. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.33; Supl. 1, p.307, 2005.
40. SIMPLÍCIO, A.A.; FREITAS, V.J.F.; FONSECA, J.F. Biotécnicas da reprodução como técnicas de manejo reprodutivo em ovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.31, p. 34-246, 2007.
41. STANGL, M.; KUH HOLZER, B.; BESENFELDER, U.; et al. Repeated Endoscopic ovum pick-up in sheep. *Theriogenology*, v. 52, p.709-716.
42. THIMONIER, J. Control of seasonal reproduction in sheep and goats by light and hormones. *Journal of Reproduction and Fertility*, supl. 30, p.30-45, 1981.
43. WILLADSEN, S.M. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*, v.320, p.63-65, 1986.
44. XAVIER, M.N.; MOUSTACAS, V.S.; CARVALHO JÚNIOR, C. A.; et al. Avaliação de diferentes antibióticos na inibição do crescimento de *Brucella ovis* em sêmen ovino congelado. In: XVIII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 2009, Belo Horizonte, MG. *Anais ...* Belo Horizonte: CBRA, 2009. (CD-ROM). ISSN1984-871.