

TRANFERÊNCIA EMBRIONÁRIA E INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL NA PRODUÇÃO PECUÁRIA. PERSPECTIVAS.

António Eduardo Monteiro Horta
Investigador Auxiliar INIA-EZN

1. Introdução

Assiste-se na Europa comunitária a grandes esforços no sentido de controlar os excedentes de leite e laticínios. Se há mais de vinte anos o objectivo era aumentar a produção agrícola e pecuária, hoje os europeus interrogam-se sobre o futuro dos modelos de exploração agrária.

Os consideráveis avanços realizados na bovinicultura dos países industrializados durante os últimos três ou quatro decénios, ficaram a dever-se à rápida evolução da indústria pecuária graças ao aumento e melhoria da produção e abastecimento de alimentos, ao adequado alojamento dos animais, a uma gestão eficiente e programas modernos de selecção e criação, não havendo a menor dúvida que a inseminação artificial (IA) contribuiu consideravelmente para estes resultados.

Porém, nos últimos anos constata-se uma diminuição da rapidez do melhoramento. A transferência de embriões (TE), aliada a técnicas de engenharia genética, parece ser agora a técnica ideal para recuperar o ritmo. Ela já permitiu aumentar a intensidade de selecção relativamente às mães dos touros, reduzir os intervalos entre gerações e aumentar o número de crias a partir de progenitores de grande qualidade.

A transferência embrionária (TE) é uma técnica pela qual embriões colhidos de uma fêmea dadora são transferidos para uma ou várias fêmeas receptoras da mesma espécie que servirão de mães substitutas para prosseguirem com a gestação.

São centenas os grupos comerciais de TE formados até ao presente, mas muitos deles não sobreviveram. A TE é uma técnica com instalação e manutenção dispendiosas e requer uma atenção cuidadosa em cada uma das suas fases. Em 1984, Seidel calculou o valor comercial de um produto resultante de TE em cerca de 375.000\$00 para poder cobrir os custos.

A técnica de TE continuou a avançar nos últimos anos, podendo afirmar-se sem receio de errar que a congelação e a divisão embrionárias chegaram a uma fase tal que a aplicação rotineira permite obter resultados satisfatórios, pelo que se dispõem de maiores possibilidades de aplicação. Por outro lado, as técnicas mais complicadas de sexagem e o amplo campo de manipulação genética, não chegaram ainda à fase de aplicação prática, pese embora a aquisição de grandes êxitos na fase de experimentação.

Embora insipiente no nosso país, é bem conhecida a generalização progressiva da técnica de TE nos países em desenvolvimento. A FAO está prestando apoio a vários projectos, existindo outros em fase de formulação. Convém salientar, no entanto, que a TE não é a nova técnica que vá solucionar todos os problemas com que se tem

defrontado a produção bovina. Como se disse anteriormente, a TE representa um investimento importante e exige uma dedicação permanente. A sua aplicação não é difícil, mas cada um dos passos da técnica requer uma atenção especial para que toda a operação tenha êxito (organização excelente).

A organização de programas de TE em países em desenvolvimento deve ser lógica. Há que dominar perfeitamente técnicas básicas, como a superovulação, a lavagem e transferência cirúrgica/não cirúrgica de embriões antes de se iniciar a congelação e micromanipulação. O estudo ulterior dos resultados dessas técnicas básicas permitirá aos investigadores obter informações valiosas sobre o comportamento reprodutivo das raças autóctones num determinado meio ambiente. A partir do momento em que se dominem essas técnicas básicas, podem implementar-se as acções ulteriores. Todo este esforço deve ter por objectivo máximo a obtenção de produtos vivos e viáveis.

Na fase actual, é importante realçar que a TE não deve ser utilizada exclusivamente como uma técnica veterinária, mas fazer parte integrante de uma estratégia da reprodução no sentido de melhorar qualitativa e quantitativamente a produção bovina.

2. Referências históricas

A primeira transferência embrionária com êxito foi levada a cabo em coelhas em 1890. Nos bovinos, a primeira recolha de embriões foi realizada nos anos 30 deste século. Apesar da primeira transferência ter sido noticiada há tantos anos, a principal tecnologia que o permite fazer com a segurança dos nossos dias só foi desenvolvida de há 20 anos a esta parte. É a partir dos anos 70 que se desenvolve o interesse comercial pela técnica. Em 1974 existiam 82 membros da IETS (International Embryo Transfer Society) representando 7 países, enquanto que em 1983 eram conhecidos 832 membros daquela sociedade, representando 35 países.

Um dos centros onde nasceu a moderna técnica de transplante de embriões (TE) é o famoso Serviço de Reprodução de Cambridge, então dirigido por Sir John Hammond, que também alcançou fama como ganadeiro. O seu objectivo residia em intensificar a selecção não só pela via paterna (objectivo bem servido pela inseminação artificial), mas também pela materna. Devido ao notável trabalho de investigação levado a cabo sobretudo nos Estados Unidos e na Europa, conseguiram-se melhorar consideravelmente os resultados da TE. Em 1982 nos EUA estimou-se que 35.000 gestações em bovinos resultaram desta técnica. Hoje realizam-se mais de 100.000 TE por ano nos Estados Unidos, e de 25.000 a 30.000 na Europa. As actividades de investigação não se concentraram somente no gado vacum, mas também em equinos, ovinos, caprinos, suínos e animais de jardim zoológico com êxito não uniforme. Para as experiências em grande escala utilizaram-se pequenos animais de laboratório como ratos e coelhos, fáceis de adquirir em grandes quantidades.

Na espécie humana o último decénio revelou um interesse cada vez maior por esta técnica, aproveitando a experiência alcançada na medicina veterinária. Aos congressos sobre a transferência de embriões assistiram tanto médicos como veterinários com a finalidade de trocarem experiências recíprocas. No dia 25 de Julho de 1978 nasceu o primeiro bebé humano resultante de uma fecundação in vitro e de uma

transferência embrionária. Na Alemanha federal, entre 1980 e 31 de Março de 1985 registaram-se 102 nascimentos, fruto de 131 gestações provocadas por este procedimento. Porém, a taxa das gestações assim conseguidas foi muito baixa. Segundo as estimativas, só 6,1% das TE na mulher dão origem a uma gravidez. Os aspectos morais, éticos e jurídicos do tema obrigaram vários governos a iniciar a preparação de medidas legislativas respeitantes ao mesmo.

Nos últimos 5 anos, as investigações no domínio da produção animal têm incidido na tecnologia da micromanipulação dos embriões. A bissecção embrionária para obtenção de irmãos idênticos começou já a ser explorada comercialmente. A produção de quimeras dentro e entre espécies foi já referenciada. A transplantação nuclear resultou no nascimento de borregos idênticos ou clonados e na produção de embriões clonados no estado de blastocito na espécie bovina. Avanços na biologia molecular com a utilização de micro-injecção de DNA já levou à produção de animais transgénicos.

Embora os recentes avanços tecnológicos e o seu potencial para otimizar a produção animal sejam enormes, deverá decorrer ainda algum tempo para definir como e onde eles devem ser integrados nos programas da reprodução animal.

3. Aplicações da transferência embrionária

As utilizações ou potenciais utilizações da TE dependem primariamente das espécies envolvidas.

Nos animais de laboratório, a técnica é principalmente utilizada como uma metodologia da investigação da fisiologia da reprodução. Os primeiros estudos concentraram-se na maturação do oócito, no processo da fertilização e na fase inicial do desenvolvimento embrionário, enquanto que trabalhos posteriores se dedicam sobretudo às interações entre o embrião e o meio uterino.

Particularizando, alguns dos factores que afectam a sobrevivência embrionária, como a sincronização embrio-uterina, número limitante de embriões, necessidades em esteróides para o estabelecimento da gestação, os factores envolvidos na senescência do tracto genital feminino e a genética do crescimento fetal, mereceram a atenção dos investigadores.

Estudos mais recentes envolvendo a reconstrução experimental de ovos e embriões de ratinhos têm aumentado significativamente os conhecimentos e compreensão da embriologia dos mamíferos.

Na espécie humana houve um aumento espectacular da utilização da TE para solucionar distúrbios específicos da fertilidade. Quando a oclusão das trompas de Falópio constitui o problema, a solução passa habitualmente pela recolha dos oócitos dos folículos ovários; maturação e fertilização dos mesmos *in vitro*; e transferência dos jovens embriões para o útero. O procedimento mais recente para solucionar a infertilidade idiopática consiste na técnica de transferência de gâmetas para as trompas de pacientes com pelo menos uma das trompas funcional.

Neste método, os oócitos pré-ovulatórios e os espermatozóides são colocados directamente na ampola das trompas.

Nos animais zootécnicos a técnica apresenta não só o potencial para aumentar a taxa de fertilidade mas também, devido ao número, para controlar e manipular o

genotipo e a idade dos embriões e o local de transferência. Nestas espécies a TE pode-se aplicar tanto a fins científicos como comerciais.

3.1. Proliferação de genótipos desejáveis

Como a mais óbvia utilização da TE, esta proliferação envolve habitualmente a superovulação das fêmeas dadoras com o objectivo de aumentar o número de embriões disponíveis para a transferência, especialmente em espécies que só parem um indivíduo. Contudo a proliferação pode igualmente ser conseguida por colheitas singulares de embriões em ciclos sucessivos de dadoras não tratadas.

Existem companhias comerciais dedicadas à proliferação de raças bovinas exóticas que têm grande procura devido à alta performance reconhecida pelo mercado. A TE tem sido utilizada em vários países para proliferar igualmente raças ou cruzamentos particulares de ovinos. Na Austrália foram produzidos por TE 277 borregos a partir de 86 ovelhas Merino muito procuradas.

3.2. Melhoramento genético

Os ganhos genéticos que podem vir ser obtidos pela TE foram muitas vezes sobrestimados, acreditando muitos geneticistas que o progresso genético através do uso da TE será inferior ao que se consegue com a inseminação artificial convencional (IA).

Sendo isto verdade à escala nacional, a nível das explorações pode-se aumentar substancialmente o melhoramento por TE devido ao aumento da intensidade de selecção e diminuição do intervalo entre gerações que esta técnica proporciona. Foi demonstrado que a produção de cerca de 6 nascimentos por dadora pode duplicar a intensidade de selecção e a velocidade de resposta à selecção para factores como o crescimento, que podem ser medidos em ambos os sexos. Isto poderá ser especialmente vantajoso para a criação de explorações de elite, a partir das quais o ganho genético conseguido poderia ser disseminado por uma população maior, utilizando a IA.

Embora a intensidade de selecção para factores cuja mensuração se encontra limitada a um dos sexos, como a produção de leite, possa igualmente ser aumentada pela TE, os autores concluem geralmente que os ganhos seriam marginais e certamente inferiores aos que podem ser obtidos pela optimização dos esquemas de selecção e reprodução convencionais.

Os testes de descendência (progeny tests) de fêmeas dadoras podem ser uma realidade pela utilização da TE e poderão aumentar a precisão da selecção de fêmeas, mas sente-se que isto pouco adicionará ao processo mais simples de testagem da descendência masculina em programas de reprodução em grande escala.

A selecção para a produção de gemelares será possível pelo emprego da TE, mas o progresso seria demorado e sujeito a limitações. A selecção para a gemelaridade pode ser desejável nos bovinos creatopoiéticos mas não nos de vocação leiteira.

Os conhecimentos actuais não permitem prever que os avanços técnicos futuros possam conduzir a grandes incrementos na velocidade do ganho genético, embora possam conduzir a uma diminuição dos custos. A disponibilidade de grande número de embriões de vacas elite poderá, contudo, aumentar a qualidade genética média da população para onde sejam transferidos.

Com o melhoramento das técnicas de preservação, será possível utilizar embriões congelados para o controlo do ganho genético visto que animais melhorados após um longo processo de selecção podem ser contemporaneamente comparados com representantes da população de partida que foram preservados. A congelação facilitará igualmente a criação de bancos de genes, permitindo preservar embriões de raças em extinção.

Algumas organizações de IA utilizam a TE para testarem rapidamente os touros geneticamente portadores de factores indesejáveis que possam vir a ser transmitidos à descendência.

3.3. Importação e exportação de animais

O movimento internacional de carne é um processo extremamente complicado e oneroso. O transporte intercontinental de gado atinge cifras da ordem dos 150.000\$00 por cabeça, enquanto que o envio de uma manada inteira na forma de embriões congelados pode custar o equivalente à taxa de uma encomenda normal. Este processo evitará igualmente a necessidade de parques especiais para quarentena, exigidos em muitos países a quando da importação de animais vivos.

3.4. Controlo de doenças

Embora pela transferência embrionária possa haver a possibilidade de transmissão de determinados agentes patogénicos veiculados pelos gâmetas, tal facto não mereceu ainda um estudo suficientemente exaustivo que permita ser confirmado. Por outro lado, através da técnica é possível introduzir rapidamente numa exploração afectada por organismos específicos, novas linhas de animais provenientes de explorações não contaminadas. Esta acção foi já realizada nalgumas explorações de suínos.

3.5. Engenharia genética

Um bovinicultor que seleccione touros para IA na base de uma melhor produção leiteira das suas filhas poderia considerar-se como um engenheiro genético, no sentido lato. Com efeito, qualquer alteração provocada ao nível da constituição genética das espécies e raças, contrariando a evolução natural das mesmas, é permissa aceite para definir a engenharia genética.

Actualmente essas alterações do genoma são realizadas com muito maior precisão e rapidez do que anteriormente, conseguindo-se isolar, alterar, sintetizar e fazer transmitir à descendência unidades muito pequenas de material genético contidas no ADN, graças às modernas técnicas da engenharia genética. A IA e TE são ferramentas essenciais para a aplicação das novas descobertas da engenharia genética.

Com estas técnicas torna-se possível produzir animais transgénicos, que são indivíduos aos quais se injectou durante a fase de ovo unicelular um ou mais genes provenientes de outro animal, ficando portadores e transmissores das informações contidas nesses genes. O objectivo desta técnica é poder duplicar a velocidade de

melhoramento e produzir alterações que não são possíveis por selecção ou cruzamento convencionais.

Na prática o potencial desta técnica só se desenvolverá se se conseguirem isolar genes responsáveis por factores de produção desejáveis, por exemplo a prolificidade, e a sua expressão no animal transgénico poder ser controlada. A maior parte dos estudos da transferência de genes nos animais zootécnicos tem sido feita com genes modificados, responsáveis pela produção de hormona do crescimento. Já foram produzidos alguns animais transgénicos em coelhos, ovinos e porcos, embora eles nem sempre exprimam a acção do gene incorporado. Os primeiros 21 novilhos transgénicos foram produzidos em 1987 estando ainda a ser testados quanto aos efeitos da incorporação genética efectuada.

3.6. Sexagem de embriões

Na investigação em produção animal tem sido dada muita atenção à possibilidade de controlar o sexo da descendência através da separação dos espermatozoides portadores de cromossoma X (sexo feminino) ou Y (sexo masculino). Contudo esta via permanece ainda como uma possibilidade remota. Com o advento da TE tornou-se possível encarar a investigação noutra vertente, ou seja, identificar e separar os embriões masculinos dos femininos, após a recolha. Através da utilização de soros contendo anticorpos formados contra as células masculinas, é já possível identificar embriões masculinos com uma precisão de 84% para os bovinos, 81% para suínos e 90% para os ovinos.

3.7. Produção de irmãos idênticos

A microdissecção dos jovens embriões permite produzir vários animais (até 4) geneticamente idênticos. Esta técnica aliada à TE, pode resultar importante na criação de cópias de indivíduos seleccionados para factores particulares. A produção de indivíduos idênticos permite eliminar muita da variação genética indesejável nas populações utilizadas em delineamentos experimentais no domínio da investigação científica.

3.8. Transferência nuclear

Os múltiplos idênticos produzidos por microdissecção são cópias genéticas, mas somente um número limitado de indivíduos pode ser produzido a partir de um embrião. O desenvolvimento de procedimentos para clonagem por transferência nuclear já resultou na produção de borregos idênticos. Esta técnica consiste na fusão de núcleos retirados de blastómeros embrionários com oito células, com oócitos enucleados não fertilizados. Com esta técnica torna-se possível encarar a produção de explorações contendo animais geneticamente idênticos.

4. Resultados práticos da TE

A taxa de êxito da transferência embrionária definida como a percentagem de gestações obtidas relativamente ao número de transferências realizadas, pode variar muito de acordo com a técnica empregue, profissionalismo da equipe que realiza a operação e condições locais da exploração que possui as fêmeas receptoras.

A técnica que melhores resultados tem obtido é a transferência cirúrgica com valores situados entre 60 e 90%. Com a técnica não cirúrgica, que tem a vantagem de ser uma operação menos dispendiosa, as taxas de gestação obtidas rondam 55-65%, 50% ou 40%, quando se trata respectivamente de embriões frescos, congelados ou vitrificados.

5. Perspectivas em Portugal

Embora já tenham sido realizadas transferências embrionárias no nosso país na espécie bovina (Paisana, Duarte, e França; 1984), não é do nosso conhecimento a existência de equipas de profissionais dedicadas à comercialização desta técnica.

Neste momento, é do nosso conhecimento a existência de uma equipa que trabalha neste domínio, instalada na Estação Nacional de Selecção e Reprodução Animal (ENSRA). A sua finalidade principal reside na aplicação da TE a partir de dadoras das explorações privadas ou não que, pela sua ascendência e produções tenham revelado um potencial melhorador muito acima da média da exploração. Estas fêmeas são superovuladas e beneficiadas com sémen escolhido pela ENSRA, sendo os embriões transferidos para receptoras instaladas naquela instituição.

A política seguida parece estar de acordo com uma utilização racional da TE e às orientações preconizadas pela FAO para países com o nosso nível de desenvolvimento, visto que deste modo será possível tirar proveito de animais com alto valor genético que existem já no nosso país por via da utilização de sémen de elevada qualidade, que de outro modo seriam inutilizados no fim da sua vida útil. Uma vez que os machos nascidos destas dadoras serão comprados pela instituição e testados quanto à sua capacidade de transmitir às filhas o potencial produtivo dos seus progenitores, este potencial melhorador poderá então ser disseminado a nível nacional por IA.

É desaconselhável neste momento a importação pelos bovinicultores ou suas associações de embriões de elevada qualidade que, pelo seu elevado custo e ausência de equipas de transferência embrionária ao nível local, tornam o investimento não lucrativo dados os baixos resultados e pouca disseminação do material genético melhorador conseguidos com estas restrições. Com efeito, só na presença de equipas profissionais com larga experiência em TE e alicerçados num programa melhorador previamente definido será possível rentabilizar um tal processo.

Sugestões bibliográficas para consulta:

- BETTERIDGE, K.J. (1980). (1) Introduction to embryo transfer in farm animals. (2) Procedures and results obtainable in cattle. In: *Current Therapy in Theriogenology*, D.A. Morrow (ED), pp. 69-88.
- MAPLETOFT, R.J. (1986). Embryo transfer and genetic engineering: Introduction. In: *Current Therapy in Theriogenology 2*, D.A. Morrow (ED), pp. 51-53.
- PAISANA, G., FRANÇA, R. e DUARTE, J.C.N. (1986). Colheita e transferência de embriões em Portugal na espécie bovina. *Proceedings do 2º Simposium Internacional de Reprodução Animal*, 21-24 Nov., Lisboa.

- SREENAN, J.M. (1988). Embryo transfer: Its uses and recent developments. *The Veterinary Record*, June 25:624-629.
- WAGNER, H.-G.R. (1987). Situación actual del trasplante de embriones en vacunos. *Revista Mundial de Zootecnia*, 64:1-11.