

# Produção e transferência de embriões: uma técnica em expansão\*

**A produção e transferência de embriões é uma biotecnologia da reprodução em franca expansão em Portugal. Tem como grandes vantagens a rápida disseminação do progresso genético, a facilidade de trocas nacionais e internacionais de material genético, constituindo um agronegócio mundial.**

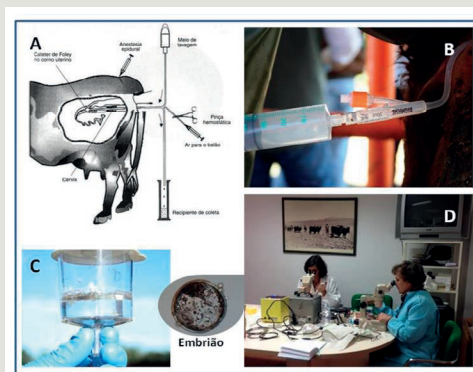
Rosa Lino Neto Pereira e Carla Cruz Marques  
INIAV, I.P.



O desenvolvimento de biotecnologias da reprodução animal é primordial para aumentar a eficiência produtiva. Tecnologias como a transferência de embriões produzidos por superovulação e lavagem uterina de dadoras ou no laboratório, após a maturação e fertilização de oócitos de várias origens, têm sido utilizadas com sucesso. De facto, a produção e transferência de embriões é um(a) técnica/negócio em expansão. A primeira transferência experimental com nascimento de um vitelo foi realizada em 1951, mas só em 1970 foi concretizada, em Inglaterra, a primeira transferência comercial. Desde então, a evolução desta técnica foi impressionante, tornando-a mais comum, eficiente e económica, sendo hoje um dos métodos mais utilizados para obter um rápido progresso genético, a conservação de espécies ou como agronegócio, em trocas nacionais e internacionais. Em Portugal, esta tecnologia tem sido utilizada com sucesso na bovinicultura leiteira, estando a dar os primeiros passos em bovinos de carne. A produção de embriões bovinos e ovinos realiza-se no Laboratório de Embriologia, do INIAV-Polo de Santarém, em colaboração com diferentes Associações de Criadores, quer para transferência para vacas receptoras em fresco ou após congelação. No caso das raças autóctones, os embriões congelados podem ser conservados no Banco Português de Germoplasma Animal (BPGA).

## Produção de embriões com superovulação das dadoras e lavagem uterina

A produção e transferência de embriões é uma biotecnologia que permite aumentar o número de descendentes de uma determinada fêmea. A escolha da fêmea dependerá do seu mérito genético, da sua representatividade na população/raça e/ou de ser portadora de alguma(s) característica(s) de interesse. O macho terá também de ser alvo de seleção de acordo com os objetivos



**Figura 1** – Recolha de embriões: A) esquema da lavagem uterina na vaca (adaptado de Hafez 2004); B) recolha do meio de lavagem com os embriões; C) filtro com o meio de lavagem e embriões; D) pesquisa e seleção de embriões com auxílio de lupa

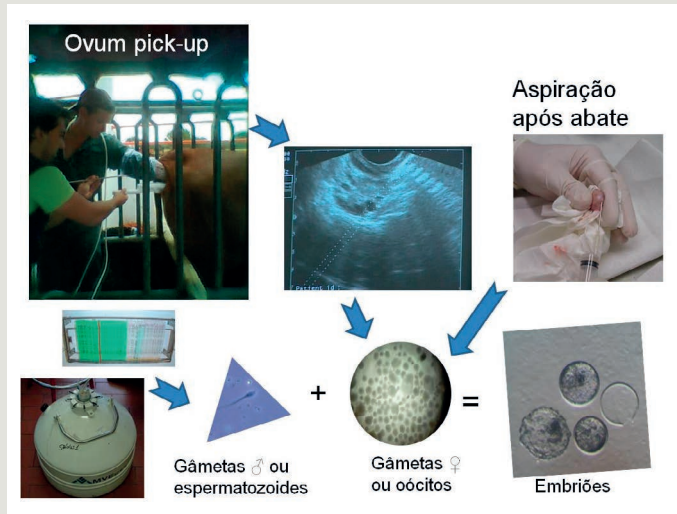
pretendidos, para que seja predefinido o emparelhamento.

A primeira fase para a produção dos embriões, no caso dos ruminantes, consiste na superovulação de fêmeas reprodutoras ativas, seguida de inseminação artificial (IA) ou monta natural, para posterior lavagem uterina e recolha dos embriões (Figura 1). Assim, após a seleção da fêmea de que se pretende obter descendentes (fêmeas dadoras), esta deve ser submetida a tratamento hormonal específico para produzir mais oócitos que numa situação normal. Após esta superovulação, a fêmea é inseminada e 7 a 8 dias após, efetua-se a lavagem uterina de forma a recolher os embriões. Posteriormente, os embriões são classificados e selecionados para poderem depois ser transferidos ainda em fresco para outras fêmeas (receptoras), ou ser congelados (trocas comerciais ou BPGA). Em condições normais, uma vaca poderá produzir um

descendente por ano, mas através da superovulação da fêmea e posterior transferência de embriões poder-se-á atingir mais de 20 descendentes/ano/fêmea, sem que, para isso, tenha de passar por uma gestação completa e parto.

## Produção de embriões no laboratório

A produção de embriões no laboratório inicia-se pela recolha do gameta feminino, o oócito. Esta recolha é efetuada por aspiração dos folículos dos ovários das vacas vivas por via transvaginal ou imediatamente após o abate (Figura 2). A recolha de oócitos por punção ovárica usando a via transvaginal com recurso à ultrassonografia (ovum pick-up – OPU), é uma técnica com boas perspetivas. Para isso, é necessário equipamento específico, nomeadamente, uma agulha acoplada na ponta da sonda (transdutor) ligada a uma bomba de vácuo. Depois de recolhidos, os oócitos são colocados em meio apropriado e encaminhados para o laboratório para serem maturados, procedendo-se depois à sua fertilização. Esta técnica envolve diversas etapas, desde a recolha, matura-



**Figura 2** – Produção de embriões no laboratório: ovum pick-up ou punção transvaginal dos folículos ováricos em vacas de raça Alentejana na Herdade da Coutada Real no Assumar e aspiração dos ovários após abate no Laboratório de Embriologia. Os oócitos obtidos são maturados e fertilizados *in vitro*, dando origem a embriões transferíveis

ção do gâmeta feminino, fertilização com os espermatozoides, cultura e desenvolvimento do embrião em laboratório, num ambiente totalmente controlado com o objetivo de maximizar a utilização dos gâmetas (oócitos e espermatozoides) de animais geneticamente superiores.

A recolha de oócitos também poderá efetuar-se por aspiração, a partir dos ovários de vacas abatidas, seguindo-se todo o processo de maturação do gâmeta feminino, fertilização com os espermatozoides e cultura. Ao final de 7 ou 8 dias, é possível avaliar quais e quantos os embriões que poderão ser congelados em condições de, após transferência para uma vaca recetora, dar origem a um vitelo.

### Crioconservação

A crioconservação dos embriões é realizada em azoto líquido (LN<sub>2</sub>, Figura 3), interrompendo o metabolismo celular e permitindo a sua conservação durante longos períodos de tempo, com manutenção das suas características. É realizada essencialmente por dois métodos: a congelação lenta ou convencional e a vitrificação. A primeira técnica exige a utilização de congeladoras programáveis, acondicionando-se os embriões em palhinhas de 0,25 mL, mergulhados em soluções com concentrações baixas de crioprotetores. Este método necessita de um longo período de tempo para ser executado, já que tanto a congelação como a descongelação se processam de forma lenta, com uma taxa de descida da temperatura de 1 °C/min (de 20 °C a -7 °C), de 0,3 °C/min (de -7 °C a -30 °C), mergulhando-se depois em LN<sub>2</sub> (-196 °C).

A vitrificação é uma tecnologia que se iniciou nos anos 80 do século anterior, já com



**Figura 3** – Contentor de armazenamento de embriões em azoto líquido

décadas de investigação, e cada vez mais utilizada, sobretudo quando se congelam oócitos ou embriões mais sensíveis à criopreservação. Na vitrificação há incorporação de elevadas concentrações de crioprotetores nas soluções, aumentando a velocidade de arrefecimento que pode atingir os 2000 °C/min, evitando a formação de cristais de gelo responsáveis pelos danos das membranas e organelos celulares.

A crioconservação permite a dissociação cronológica entre a recolha/produção e a

transferência dos embriões. Facilita o comércio e as trocas nacionais e internacionais de material genético, evitando o transporte de animais de alto valor genético, com diminuição do custo, limitando os riscos sanitários e de lesões. Permite a salvaguarda das espécies ou raças em vias de extinção. De facto, o estabelecimento de bancos de germoplasma onde o material biológico animal é conservado durante longos períodos de tempo em LN<sub>2</sub>, constitui uma obrigação de todos os países, decretada pela Convenção do Rio de Janeiro em 1992. O INIAV instituiu o BPGA no Polo de Santarém, onde estão congelados gâmetas masculinos (sêmen), femininos (oócitos) e embriões de animais domésticos.

### Sexagem de embriões

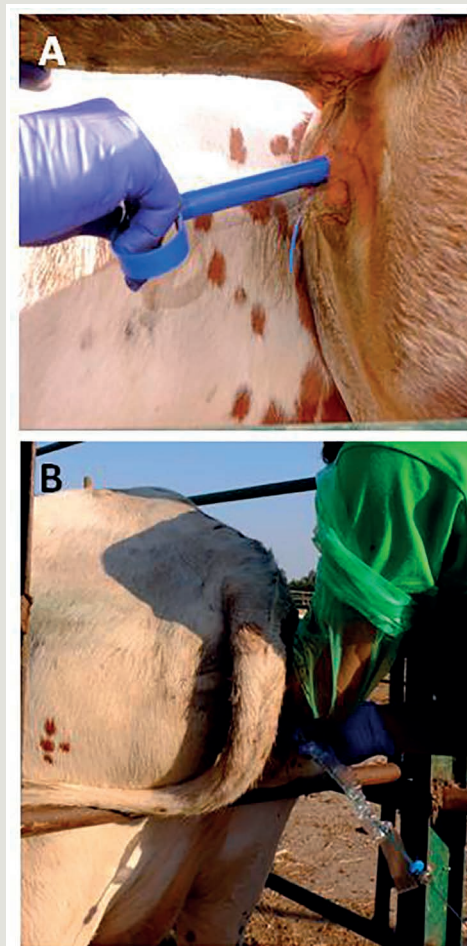
A escolha do sexo ou sexagem do neonato pelo criador é uma das técnicas disponíveis atualmente. A sexagem dos embriões antes da transferência é realizada essencialmente de duas maneiras. A utilização de sêmen sexado, i.e. com espermatozoides portadores do cromossoma Y (originam machos) ou apenas do cromossoma X (originam fêmeas), permite determinar antes da IA da dadora qual o sexo pretendido para os embriões a recolher. A outra opção será efetuando uma biopsia aos embriões, no estadio de blastocisto, antes da transferência para as vacas recetoras. A partir das células da biopsia é determinado o sexo do embrião, utilizando a técnica do PCR, podendo igualmente ser pesquisadas outras informações genéticas, como doenças ou características produtivas.

### Transferência de embriões

Para a transferência dos embriões produzidos temos de ter uma vaca recetora sincronizada com a idade do embrião a transferir. Assim, o cio pode ser induzido através da colocação de dispositivo intravaginal bovino e uso de hormonas (Figura 4). Sete dias após o cio e exame da recetora, procede-se à colocação do embrião por via transvaginal. O diagnóstico de gestação por ecografia ou palpação retal será realizado entre os 25 a 35 dias.

### Perspetivas futuras

Nos últimos anos tem-se assistido a uma procura crescente de embriões bovinos de diferentes raças, constituindo uma oportunidade de negócio para os criadores nacionais. A introdução e expansão do uso desta biotecnologia deverão contribuir para um rápido progresso genético e, aliadas à sexagem, poderão incrementar os resultados económicos dos criadores num futuro mui-



**Figura 4** – Transferência de embriões na Herdade Contenda (INIAV): A) sincronização de cios das vacas recetoras da raça Mertolenga; B) transferência de embriões com auxílio de pistola

to próximo. A redução dos custos da produção de embriões, ainda elevados, poderá ajudar na disseminação desta tecnologia. ☹

### Bibliografia

- Hansen, P.J., 2014 Current and future assisted reproductive technologies for mammalian farm animals. *Adv Exp Med Biol.* 752:1-22.
- Marques, C.C.; Santos-Silva, C.; Rodrigues, C.; Matos, J.E.; Moura, T.; Baptista, M.C.; Horta, A.E.M.; Soveral, G.; Pereira, R.M.L.N., 2016. Effect of different cocktails of cryoprotectants and calcium on bovine oocyte membrane permeability and cryosurvival. *Reproduction in Domestic Animals* 51:114.
- Pereira, R.M.L.N.; Marques, C.C., 2008. Animal oocyte and embryo cryopreservation. *Cell Tissue Bank.* 9: 267-77.
- Pereira, R.M.L.N., 2016. Beyond the cryobanking: purposes for the preservation of Portuguese animal genetic resources. *Proc. X Congresso Ibérico sobre Recursos Genéticos Animais (SPREGA-SERGA 2016)*, Castelo Branco 15 a 17 de Setembro, pp. 6-7.
- Phillips, P.E.; Jahnke, M.M., 2016. Embryo transfer (Techniques, Donors, and Recipients). *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 32:365-85.

\*suportado pelo projeto ALT20-03-0246-FEDER-000021

AltBiotech<sup>RepGen</sup> Recursos genéticos animais: projeção para o futuro