

## State-of-the-art in the transcervical embryo collection in goats and sheep

Alberto Lopes Gusmão

### ABSTRACT

**Background:** The Embryo Transfer (ET) in small ruminants raised in the last ten years, the interest of business people and veterinarians, because of the great movement of frozen embryos that entered Brazil, from South Africa and Australia. The heat generated from the market demands have stimulated our technicians to look to develop skills to meet these demands. The immediate need to produce results and profits, made the TE was used in animals with a genetic quality and undervalued using with greater frequency, methods that can jeopardize the future reproductive donor, as is the case of harvested by laparotomy or better known as surgical harvesting. In seeking to develop an alternative, less aggressive and given to animals appeals to the modern animal welfare, many researchers have developed techniques to overcome the barriers imposed by the anatomy of the female genital tract of small ruminants and managed to collect embryos of sheep and goats or via transcervical non-surgical. This review aims to gather information about the current availability of this technique of embryo collection and propose a new approach for this purpose.

**Review:** In goats, the distribution of the cervical rings allows transposition to be easily obtained, and it is quite possible to get goat embryos using urethral catheters devoid of balloons. In sheep, the obstacle is presented by the great difficulty of transposing the cervical canal, as it is long and winding, with excentric openings of the rings and small diameter. Studies have tested a wide variety of drugs with the purpose of promoting cervical relaxation in sheep, in order to overcome the barrier of the cervical canal. The administration of substances such as oxytocin, estradiol, and interleukin 8, produced results incompatible with the requirements for utilization of the method on a commercial scale. Promising results were obtained however by inserting a vaginal device containing prostaglandin E (PGE<sub>2</sub>). The natural softening of the cervix has been described as the result of intrinsic changes of the extracellular components of the stroma. The most striking change is caused by a reduction in the concentration of collagen and glycosaminoglycans (GAGs), associated with a significant elevation of one of the primary GAGs, hyaluronic acid (HA), which has high affinity for water molecules. The relaxation of the cervix observed during estrus is associated with a high content of HA and water. Positive results were obtained when HA was injected into the cervix of ewes to be inseminated cervically. Using Posi tweezers for traction and fixation of the cervix, is essential to achieving success in the transcervical collection, for both goat and sheep.

**Conclusion:** The growing awareness around animal welfare issues seems to be one of the factors that favor the use of transcervical sampling in small ruminants, however further studies are necessary in order to make this technique fully viable in the field, especially in sheep. Injecting HA into the cervix before the transcervical collection, in my opinion, represents a new alternative to be investigated in the pursuit of full success in this method in sheep.

**Keywords:** embryos,goat, sheep, transcervical.

**I. INTRODUÇÃO****II. COLETA TRANSCERVICAL NA CABRA****III. COLETA TRANSCERVICAL NA OVELHA****IV. CONCLUSÕES****V. REFERÊNCIAS****I. INTRODUÇÃO**

Com a crescente demanda por produtos destas espécies, e um grande número de empresários dispostos a investirem nessa atividade, a agroindústria instalada e as tecnologias já disponibilizadas pela pesquisa, capazes de atender aos diversos segmentos da cadeia produtiva, a ovinocaprinocultura tem se destacado no cenário brasileiro como atividade de grande impacto sócioeconômico.

Apesar das limitações existentes, tem havido uma crescente demanda por parte da iniciativa privada, por biotécnicas da reprodução que visem o incremento da produtividade e da rentabilidade dos rebanhos e das unidades produtivas. Dentre estas biotécnicas podemos ressaltar a sincronização de estros, a inseminação artificial, o diagnóstico precoce de prenhez, Transferência de Embriões (TE) e mais recentemente, coleta de oócitos e produção de embriões em laboratório através da fertilização *in vitro*.

A principal limitação da TE em pequenos ruminantes sempre esteve relacionada a dois fatores: o custo e a metodologia cirúrgica de coleta de embriões [10]. Assim como no bovino, que até meados dos anos 70 a colheita cirúrgica de embriões também era um dos principais fatores limitantes, sendo esta técnica, substituída com sucesso pela colheita não cirúrgica [7].

**II. COLETA TRANSCERVICAL NA CABRA**

A coleta de embriões em cabras, que até recentemente era realizada predominantemente pelo método cirúrgico ou laparoscópico [9], limitando o número de vezes em que uma doadora pudesse ser utilizada, devido ao estresse e a formação de aderências, obteve um significativo avanço após a introdução da técnica não cirúrgica (transcervical). No Brasil, em nosso ponto de vista, os trabalhos desenvolvidos por Pereira *et al.* [25] e Suyadi *et al.* [36], que utilizaram cateter Nelaton - Robinson (Ruesch, Nº Ref. 220500) desprovido de balão com algumas adaptações, foram de fundamental importância para a popularização da TE em cabras. Atualmente, não se justifica mais a coleta de embriões em cabras por um método que não seja o transcervical.

**III. COLETA TRANSCERVICAL NA OVELHA**

Na ovelha, um fator que limita a utilização da TE em escala comercial, é a dificuldade de serem realizadas coletas pelo método transcervical, devido ao obstáculo representado pela grande dificuldade de transposição do canal cervical, já que este é longo, sinuoso, com abertura dos anéis excêntricos e com diâmetro reduzido. O orifício externo apresenta diferentes formatos em bico de pato, *flap*, roseta e espiral [8,15,33], criando um obstáculo à passagem de instrumentos que permitam o acesso ao útero pela via transcervical. Sendo assim, a utilização comercial destas biotécnicas fica limitada aos procedimentos cirúrgicos e laparoscópicos que trazem como grande desvantagem a predisposição a formação de aderências do sistema genital das doadoras, reduzindo o número de colheitas efetuadas em uma mesma fêmea, e em algumas vezes até comprometendo a vida reprodutiva futura do animal [1,11,12,15,16,20,23,24,34].

O sucesso na transposição da barreira cervical parece depender de vários fatores como a raça, o número de partos até o momento da coleta e fatores inerentes ao indivíduo [2,34].

O relaxamento do cérvix em ovelhas em cio foi descrito como sendo o resultado da ação pré-ovulatória dos hormônios progesterona, estradiol e oxitocina atuando sobre o cérvix. Foi possível detectar uma elevação da expressão de receptores para oxitocina nas células do epitélio luminal do cérvix durante o estro. Na vaca, o efeito potencial da oxitocina sobre o relaxamento cervical é mediado pela elevação local da ciclooxigenase-2(COX2), com subsequente elevação na síntese de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) [3,32].

O amolecimento natural do cérvix tem sido descrito como resultado de alterações intrínsecas dos componentes extracelulares do estroma. A mais marcante das mudanças é provocada por uma redução na concentração de colágeno e glicosaminoglicans (GAGS), associado a um significativa elevação de um dos GAGS primários, o ácido hialurônico (HA), que tem elevada afinidade por moléculas de água. O relaxamento do cérvix observado durante o estro está associado a um elevado conteúdo de HA e água [17,18,35,37,40].

Perry *et al.* [26] investigaram o efeito da aplicação local de HA sobre a profundidade de penetração da pipeta para inseminação no cérvix de ovelhas

em cio, e sugeriram que a aplicação de HA com baixo peso molecular é um passo adiante para tornar inseminação transcervical mais acessível na ovelha.

O influxo de neutrófilos no cérvix parece ser um importante componente para o amolecimento cervical. Postula-se que a collagenase liberada por neutrófilos recrutados para o interior do cérvix é muito importante para o rompimento das fibras colágenas que são os principais elementos estruturais do cérvix. Em cobaias, coelhos e humanos a interleucina 8 têm sido associada com o recrutamento de leucócitos e a elevação da collagenase cervical no final da gestação [28,29].

Alguns estudos testaram uma grande variedade de fármacos com o propósito de promover o relaxamento cervical em ovelhas, com o objetivo de ultrapassar a barreira do canal cervical. A administração de ocitocina isoladamente ou em combinação com estradiol produziu resultados incompatíveis com as necessidades para adoção do método em escala comercial [19,31,41]. Efeito semelhante foi descrito quando da utilização da interleucina 8, que produziu efeito insignificante sobre o relaxamento e abertura do cérvix [6]. Resultados promissores foram obtidos através da introdução vaginal de um dispositivo contendo prostaglandina E ( $PGE_2$ ), que possibilitou a penetração do cérvix 12 h após o tratamento [4,5,14, 22,30].

Leethongdee *et al.* [20], verificaram o efeito da administração do análogo da  $PGE_2$ , misoprostol e do hormônio folículo estimulante (FSH) sobre a penetrabilidade do cérvix de ovelhas durante o período peri-ovulatório e concluíram que FSH ou misoprostol foram capazes de aumentar o relaxamento natural do cérvix ao ponto de permitir uma efetiva penetração intra-uterina no momento da inseminação artificial.

Durante a prenhez, a  $PGE_2$  é liberada continuamente pela placenta e desempenha um importante papel nos eventos que conduzem ao parto. É conhecido que  $PGE_2$  estimula a produção de  $PGF_2\alpha$ , que por sua vez sensibiliza o miométrio à ocitocina endógena ou a administração exógena [26], entretanto, as evidências disponíveis indicam que a  $PGE_2$  desempenham seu principal papel, na preparação e amadurecimento do cérvix para o parto sem afetar a contratilidade uterina [4,25,26], promovendo um complexo conjunto de alterações estruturais e bioquímicas envolvidas no processo.

O amadurecimento e abertura do cérvix envolvem um marcado relaxamento das fibras da musculatura lisa cervical, que necessitam serem transformadas de uma estrutura rígida em uma estrutura amolecida, complacente e com configuração dilatada. Esse processo envolve a ativação da enzima collagenase que é responsável pela digestão de parte da cadeia estrutural de colágeno do cérvix [21,27]. Este mecanismo está associado a uma concomitante elevação nos níveis cervicais de glicosaminoglicans e ácido hialurônico [27]. Em pacientes humanos, o efeito local da administração da  $PGE_2$  é manifesto por mudanças na consistência, traduzido por um amolecimento e abertura do cérvix.

Com base nas informações acima descritas, estudos desenvolvidos por Gusmão *et al.* [13], obtiveram promissores resultados quando depositaram 200  $\mu$ g Misoprostol (Cytotec®) no fundo de saco vaginal de ovelhas Santa Inês e Dorper. Foi observado que a utilização do misoprostol cinco horas antes das coletas, associado à tração e dilatação mecânica do cérvix, foi efetiva, possibilitando a transposição cervical. Os autores relatam que, independente da utilização do Misoprostol, ovelhas da raça Santa Inês impuseram maior dificuldade para a transposição do cérvix, quando comparadas com ovelhas da raça Dorper.

Além de utilizar a  $PGE_2$ , a tração cervical com pinças de Pozzi e o emprego de velas tipo Hegar para promover a dilatação mecânica do canal cervical foram indispensáveis para a execução da técnica com sucesso. O calibre da vela (N° 2 ou 3) variou de acordo com o diâmetro do canal cervical do animal trabalhado. Outro fator importante na rotina de coleta transcervical, tanto em ovelhas quanto em cabras, é o tipo de cateter utilizado. Sondas nasoesofágicas utilizadas na medicina humana, com calibres que variam de oito a dez, podem ser utilizadas, entretanto, em função de sua consistência amolecida, frequentemente dobram no interior do útero inviabilizando a coleta após a injeção do meio coletor, uma vez que ocorrendo o dobramento, faz-se necessário a retirada completa da sonda e com isso ocorrerá o extravasamento do meio com perda de embriões. Apesar da dificuldade em se obter no mercado nacional, a sonda modelo Nelaton-Robinson (Ruschâref. 220500 n° 10) com via única fabricada pela Rusch produziu bons resultados e raros episódios de dobramento [13].

Transposta a barreira cervical, o prosseguimento da lavagem uterina pode ser executado em circuito fechado ou não. Importante salientar que, em função dos cateteres utilizados serem desprovidos de balão, uma vez que necessitam de manipulação durante a lavagem, o volume de meio a ser injetado no útero da doadora depende do seu porte. Em ovelhas é seguro utilizar-se porções de 20 mL, podendo chegar a 30 mL em ovelhas maiores, no final das lavagens [13].

#### IV. CONCLUSÕES

A evolução da coleta transcervical tanto na cabra quanto na ovelha, em escala comercial vai depender muito do mercado e da mentalidade dos criadores. Atualmente, a transferência de embriões em pequenos ruminantes é utilizada, menos como ferramenta de melhoramento genético e mais como

uma forma de multiplicação rápida do rebanho. Isso faz com que os criadores busquem a biotécnica para qualquer tipo de animal, não levando em consideração o método utilizado nem suas consequências. Acreditamos que no futuro, com um mercado mais exigente em qualidade, não será tolerado a adoção de métodos que coloquem em risco o futuro reprodutivo de doadoras com comprovada qualidade genética.

Outro ponto favorável à técnica transcervical, é a crescente conscientização da sociedade para o bem estar animal.

A utilização de HA, injetado no cérvix antes da coleta transcervical, no meu ponto de vista, representa uma nova alternativa a ser investigada com o objetivo de alcançar pleno sucesso na coleta transcervical na ovelha.

#### REFERÊNCIAS

- 1 Almeida V.M., Câmara D.R., Salles H.O., Oliveira D.P.F., Medeiros J.N. & Alves O.M.M. 2002. Colheita de embriões via transcervical em ovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* (Supl 5): 82-84.
- 2 Andrioli-Pinheiro A. 1993. Métodos de Colheita e de Inovação de Embriões Caprinos (*Capra hircus*, Linnaeus, 1758) e os Efeitos de Repetidas Colheitas na Vida Reprodutiva de Doadoras. São Paulo. 100f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- 3 Ayad V.J., Leung S.T., Parkinson T.J. & Wathes DC. 2004. Coincident increases in Oxytocin receptor expression and EMG responsiveness to Oxytocin in the ovine cervix at oestrus. *Animal Reproduction Science*. 80: 237-250.
- 4 Barry D.M., Van Niekerk C.H., Rust J. & Van Der Walt T. 1990. Cervical embryo collection in sheep after ripening of the cervix with prostaglandin E<sub>2</sub> and estradiol. *Theriogenology*. 33(1): 190.
- 5 Candappa I.B., Bainbridge H.C., Price N.T., Hourigan K.R. & Bartlewski P.M. 2009. A preliminary study on the suitability of Cervidil to induce cervical dilation for artificial insemination in ewes. *Research in Veterinary Science*. 87(2): 204-206.
- 6 Croy B., Prudencio J., Minhas K., Ashkar A., Galligan C., Foster R., Buckrell B. & Coomber B.A. 1999. A preliminary study on the usefulness of huil-8 in cervical relaxation of the ewe for artificial insemination and for embryo transfer. *Theriogenology*. 52(2): 271-287.
- 7 Elsdon R.P., Hasler J.F. & Seidel G.E. 1976. Nonsurgical recovery of bovine eggs. *Theriogenology*. 6(5): 523-532.
- 8 Evans G. & Maxwell W.M.C. 1987. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Sydney: Butterworths, 194p.
- 9 Flores-Foxworth G., Mac Bride B.M., Kraemer D.C. & Nuti L.C.A. 1992. Comparison between laparoscopic and transcervical collection and transfer in goats. In: *Theriogenology*. 37(1): 213. [Abstract].
- 10 Fonseca J.F., Souza J.M.G. & Camargo L.S.A. 2010. Produção de oócitos e embriões de pequenos ruminantes: passado, presente e futuro. *Acta Scientiae Veterinariae*. 38 (Supl 2): 337-369.
- 11 Gonzales C.I.M. & Oliveira V.S. 1991. Técnicas para incrementar a eficiência reprodutiva de caprinos e Ovinos. *Revista Sociedade Brasileira de Zootecnia*. 28: 71-102.
- 12 González-Bulnez A., Baird D.T., Campbell B.K., Cocero M.J., García-García R.M., Inskip E.K., López-Sebastián A., McNeilly A.S., Santiago-Moreno J., Souzac J.H. & Veiga-López A. 2004. Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. *Reproduction, Fertility and Development*. 16: 421-435.
- 13 Gusmão A.L., Silva J.C, Bittencourt T.C.C., Martins L.E.P., Gordiano H.D. & Barbosa L.P. 2009. Coleta transcervical de embriões em ovinos da raça Dorper no semiárido do Nordeste Brasileiro. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 61(2): 313-318.

- 14 Halbert G.W., Dobson H., Walton J.S. & Buckrell B.C. 1990. A technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. *Theriogenology*. 33(5): 993-1010.
- 15 Halbert G.W., Dobson H., Walton J.S. & Buckrell B.C. 1990. The structure of the cervical canal of the ewe. *Theriogenology*. 33(5): 977-992.
- 16 Ishwar A.K. & Memon M.A. 1996. Embryo Transfer in Sheep and Goats: a Review. *Small Ruminant Research*. 19(1): 35-43.
- 17 Kershaw C.M., Khalid M., McGowan M.R., Ingram K., Leethongdee S., Wax G. & Scaramuzzi R.J. 2005. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology*. 64(5): 1225-1235.
- 18 Kershaw C.M. 2006. Mechanisms of cervical relaxation in the ewe. Ph.D. thesis. University of London.
- 19 Khalifa R., Sayre B. & Lewis G. 1992. Exogenous oxytocin dilates the cervix in ewes. *Journal of Animal Science*. 70(1): 38.
- 20 Leethongdee S., Khalid M., Bhatti A., Ponglowhapan S., Kershaw C.M. & Scaramuzzi R.J. 2007. The effects of the prostaglandin E analogue Misoprostol and follicle-stimulating hormone on cervical penetrability in ewes during the peri-ovulatory period. *Theriogenology*. 67(4): 767-777.
- 21 MacLennan A.H., Katz M. & Creasey, R. 1985. The morphological characteristics of cervical ripening induced by the hormones relaxin and prostaglandins F<sub>2</sub> in a rabbit model. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 152: 91-96.
- 22 McKelvey W.A.C., McEvoy T.G., Dingwall W.S., Robinson J.J., Lindsay E., King M.E., Fitzsimons J. & Mylene M.J.A. 1997. The use of exogenous hormones to facilitate transcervical embryo recovery in sheep and their effect on embryo development. *Theriogenology*. 47(1): 369.
- 23 More J. 1984. Anatomy and histology of the cervix uteri of the ewe: new insights. *Acta Anatomica*. 120: 156-159.
- 24 Naqvi S.M., Pandey G.K., Gautam K.K., Geethalakshmi V. & Mittal J.P. 2005. Evaluation of gross anatomical features of cervix of tropical sheep using cervical silicone moulds. *Animal Reproduction Science*. 85(3-4): 337-344.
- 25 Pereira R.J.T.A., Sohrey B. & Holtz W. 1998. Nonsurgical embryo collection in goats treated with prostaglandin F<sub>2</sub>α and oxytocin. *Journal of Animal Science*. 76: 360-363.
- 26 Perry K., Haresign W., Wathes D.C. & Khalid M. 2010. Intracervical application of hyaluronan improves cervical relaxation in the ewe. *Theriogenology*. 74(9): 1685-1690.
- 27 Pritchard J.A., MacDonald P.C. & Gant N.F. 1985. Physiology of Labor. In: *Williams Obstetrics*. Apleton Century-Crofts, pp.295-321.
- 28 Rajabi M.R., Dean D.D., Beydoun S.N. & Woessner J.R. 1988. Elevated tissue levels of collagenase during dilation of the uterine cervix in human parturition. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 159: 971-976.
- 29 Rajabi M.R. 1991. Biochemical evidence of collagenase-mediated collagenolysis as a mechanism of cervical dilation at parturition in the guinea-pig. *Biology of Reproduction*. 45: 764-772.
- 30 Rickords L.F. & White KL. 1988. Dinoprostone induced cervical dilation in the ewe *Theriogenology*. 29(1): 296.
- 31 Sayre B. & Lewis G. 1996. Cervical dilation with exogenous oxytocin does not affect sperm movement into the oviducts in ewes. *Theriogenology*. 45(8): 1523-1533.
- 32 Shemesh M., Dombrowski L., Gurevich M., Shore L.S., Fuchs A.R. & Fields M.J. 1997. Regulation of bovine cervical secretion of prostaglandins and synthesis of cyclooxygenase by oxytocin. *Reproduction Fertility and Development*. 9: 525-530.
- 33 Silva J.C., Quintela A., Andrade Moura J.C., Resende J., Gordiano H.D., Martins L.E.P., Chalhoub M., Ribeiro Filho A.L. & Gusmão A.L. 2004. Avaliação da colheita transcervical de embriões ovinos da raça Santa Inês. *Acta Scientiae Veterinariae*. 32: 90.
- 34 Sousa J.H.M. 1999. Coleta de embriões e resposta superovulatória utilizando diferentes preparações de FSH em ovelhas deslanadas na região semi-árida da Paraíba. 57f. Paraíba. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Paraíba.
- 35 Stern R., Asari A. & Sugahara K.N. 2006. Hyaluronan fragments: an information-rich system. *European Journal of Cellular Biology*. 85(8): 699-715.
- 36 Suyadi B. Sohney & Holtz, W. 2000. Transcervical embryo collection in Boer goats. *Small Ruminant Research*. 36(2): 195-200.
- 37 Timmons B., Akins M. & Mahendroo M. 2010. Cervical remodeling during pregnancy and parturition. *Trends on Endocrinology and Metabolism*. 21(6): 353-361.

- 38 Tsiligianni T.H., Karagiannidis A., Brikas P. & Saratsis P.H. 2001.** Chemical properties of bovine cervical mucus during normal estrus and estrus induced by progesterone and/or PGF<sub>2</sub>alpha. *Theriogenology*. 56(1): 41-50.
- 39 Weiss G. 2000.** Endocrinology of parturition. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 85(12): 4421.
- 40 Wulster-Radcliffe M.C., Wang S. & Lewis G.S. 2004.** Transcervical artificial insemination in sheep: Effect of new transcervical artificial insemination instrument and traversing the cervix on pregnancy and lambing rate. *Theriogenology*. 62(6): 990-1002.
- 41 Wulster-Radcliffe M.C., Costine B.A. & Lewis G.S. 1999.** Estradiol-17 $\beta$ -oxytocin – induced cervical dilation in sheep: application to transcervical embryo transfer. *Journal Animal Science*. 77(10): 2587-2593.