

Evolução da biotecnologia da reprodução no Brasil e seu papel no melhoramento genético

José Luiz Rodrigues¹, Berenice de Ávila Rodrigues¹

RESUMO

A seleção animal é a modificação da frequência dos genes em determinada população. As biotécnicas de reprodução, como a inseminação artificial, a transferência de embriões e a produção *in vitro* de embriões, são empregadas no aumento da eficiência da seleção genética quantitativa e da seleção assistida por marcadores. Procedimentos utilizando análise da expressão de grande número de genes através de microarrays criaram novos cenários de utilização das biotécnicas de reprodução, que podem atuar na preservação, no resgate e na multiplicação de genomas considerados imprescindíveis aos esquemas de seleção e melhoramento animal. O objetivo deste artigo é traçar uma linha de tempo, descrevendo as biotécnicas de reprodução animal e ao mesmo tempo procurando caracterizar o seu desenvolvimento no Brasil como ferramenta de melhoramento animal.

Palavras-chave: Biotecnologia, reprodução, melhoramento animal.

ABSTRACT

Advancements in reproductive biotechnology in Brazil and its role in genetic improvement

Animal selection is the change in gene frequency in a given population. The reproductive biotechnologies such as artificial insemination, embryo transfer and in vitro embryo production, have the potential to increase the efficiency of quantitative genetic selection as well as marker-assisted selection. New gene expression analysis using microarray technology for studies of large-scale expression profiles has created new scenarios for the use of reproductive biotechnologies as a tool to improve animal selection. These technologies could be used to preserve, rescue and multiply superior genomes. This article aims to focus on the historic development of reproductive biotechnologies in Brazil, as well as its use as a tool for enhancing animal selection.

Key words: biotechnology, reproduction, animal selection.

Recebido para publicação em abril de 2009 e aprovado em junho de 2009

¹ Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução da Faculdade de Veterinária da UFRGS. Caixa Postal 15004. 91501-970 Porto Alegre, RS – Email: joseluiz.rodrigues@ufrgs.br

INTRODUÇÃO

A convivência entre os homens e os animais remonta há mais de 40.000 anos, e entre as testemunhas dessas relações estão as pinturas rupestres tão bem conservadas em diferentes sítios arqueológicos, como a caverna de Lascaux na França. Posteriormente, durante o neolítico (idade da pedra lascada – há 10.000), ocorreu a chamada revolução neolítica ou revolução agrária, período em que o homem se torna sedentário, dá início às atividades agrícolas e à domesticação dos animais, primeiro com os caprinos (7.000 anos) e depois continuando com os caninos, ovinos, bovinos e equinos. A partir desse momento da sua história, os homens que se dedicaram ao cuidado da terra e dos animais procuraram explicações de como as plantas e os animais se multiplicavam e como as características fenotípicas eram transmitidas de uma geração à seguinte.

O lento desenvolvimento e o acúmulo do conhecimento, produto do árduo trabalho de inúmeras gerações de cientistas, permitiram o esclarecimento dos fenômenos reprodutivos das plantas e dos animais, ao contrário do que muitos jovens acadêmicos têm ainda hoje como ideia, o conhecimento como uma obra acabada, que caiu pronta do céu.

Aristóteles (384 - 322 a.C.), filósofo, humanista, biólogo taxonomista, descreveu a reprodução das plantas e dos animais classificando-a em três diferentes grupos: a partir de um indivíduo a partir de dois indivíduos e a partir da matéria inanimada (geração espontânea). Ele também procurou esclarecer o que proporcionava a formação de um novo ser humano. Naquela época, as jovens após a menarca logo se casavam. Aristóteles observou que quando os ciclos menstruais eram interrompidos elas usualmente estavam grávidas, e concluiu que os fetos tinham origem no sangue menstrual.

A doutrina aristotélica, posteriormente incorporada aos escritos sagrados da Igreja Católica Apostólica Romana, constituiu-se em um dos entraves ao desenvolvimento das ciências, o que caracterizou a idade média como a idade das trevas. O conceito da geração espontânea só foi refutado de forma incontestável por Pasteur em meados do século XIX, portanto a verdade aristotélica vigiu durante mais de 22 séculos, o que faz refletir em termos da epistemologia: o que é a verdade científica? Eu costumo responder aos meus alunos o seguinte: a verdade científica usualmente é uma mentira que a maioria, em determinado momento, aceita como verdade.

Na renascença, a partir de meados do século XV criaram-se as condições para o florescimento das novas ideias e o desenvolvimento das ciências e das artes. A ciência moderna tem origem na matemática, astronomia e física, nascendo a partir daí os conceitos de que os fenômenos

naturais são regidos por leis universais. O desenvolvimento da filosofia da ciência criou um arcabouço de conceitos baseados nas ciências exatas, que em muitos dos cenários das ciências naturais não encontravam explicações adequadas. As ideias de Charles Darwin contidas em seu livro clássico “A origem das espécies”, de um ancestral comum e a seleção natural, criaram um novo cenário acadêmico, em que as ciências naturais, como a biologia, puderam desenvolver novos conceitos no âmbito da epistemologia, que caracterizam hoje uma filosofia da ciência mais abrangente (Mayr, 2008).

O objetivo deste artigo é traçar uma linha de tempo, descrevendo as técnicas de reprodução animal e ao mesmo tempo procurando caracterizar o seu desenvolvimento no Brasil como ferramenta de melhoramento animal.

HISTÓRICO

As concepções aristotélicas foram as primeiras que procuraram descrever conceitos de reprodução. Desde essa época os gregos acreditavam, por exemplo, que se antes do coito o homem amarrasse o testículo esquerdo o produto seria um varão, tinha-se a ideia de que direito é masculino e esquerdo feminino. Eles e, posteriormente, os romanos aceitavam que características adquiridas podiam ser transmitidas à prole (pangênia). Em 1673, Antoni van Leeuwenhoek (1632-1723), comerciante de tecidos em Delf na Holanda, construiu um instrumento, através da superposição de diferentes superfícies de vidro, que originou o microscópio. A exposição de objetos, como a água, às suas lentes, permitiu que seres vivos, não visíveis ao olho nu, fossem observados, criando uma nova disciplina, a microscopia. A observação do próprio esperma proporcionou a Leeuwenhoek, em 1677, a descrição dos espermatozoides. Nesse período já haviam sido realizados diferentes estudos anatômicos descrevendo aspectos dos órgãos reprodutivos, como o oviduto, por Falópio em 1562; o corpo-lúteo, por Coiter em 1573; e o folículo pré-ovulatório, por De Graaf em 1672.

A comunidade científica nesse período trocava suas ideias através de epístolas, e em 15 de julho de 1662 a fundação da Royal Society, em Londres, permitiu que esse acervo de cartas fosse arquivado, constituindo-se na origem da literatura científica e que hoje na forma de revistas divulga os fatos relevantes das ciências. Porém, longe ainda se estava de uma explicação plausível para a reprodução dos indivíduos.

Em 1651, o famoso médico inglês William Harvey destacou, em sua publicação *Exercitationes de generatione animalium*, que toda a vida tem origem no ovo (*Ex ovo omnia*). Os microscopistas ao observarem as pupas se transformarem em novos indivíduos, como as borboletas,

formularam os argumentos da pré-formação, permitindo que nas últimas décadas do século XVII se iniciasse um longo período de discussões que procuravam esclarecer a reprodução dos mamíferos. Um grupo de estudiosos defendia a tese de que a vida (pré-formada) tinha origem no ovário, ou no folículo, e foi denominado “ovistas”, o outro grupo defendia a ideia da vida contida no espermatozóide, os “espermistas” (Correia, 1997). Essas ideias somente foram rechaçadas durante o século XIX com os trabalhos de Prévost e Dumas em 1824 sobre a espermatogênese, seguida da descrição do oócito por Carl Ernst von Baer em 1826 e, posteriormente, com o trabalho de Oscar Hertwig, em 1876, que descreveu a participação dos dois gametas na fecundação do ouriço do mar, abrindo as portas para a epigênese.

Durante a segunda metade do século XIX, na Escola de Agricultura da Universidade de Cambridge, na Inglaterra, nasceu a moderna reprodução animal. A qualidade acadêmica fomentou o desenvolvimento de novas ideias que proporcionaram o desenvolvimento das biotécnicas da reprodução, como a inseminação artificial e a transferência de embriões, para serem utilizadas como ferramentas do melhoramento e da seleção animal.

INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL

No Brasil, de acordo com Mies Filho e Barreto (1949), o primeiro artigo sobre a inseminação artificial foi publicado pelo Médico Veterinário Epaminondas de Souza, em 1912, na Revista de Veterinária e Zootecnia. Deu-se posteriormente, em 17 de julho de 1914, o início oficial do ensino superior da Medicina Veterinária no Brasil, com a inauguração da Escola de Veterinária do Exército, por iniciativa do Tenente Coronel João Moniz Barreto de Aragão, médico do exército que criou as condições para a discussão e o emprego de novas tecnologias no âmbito da reprodução animal. Mais tarde o Prof. Guilherme Hermsdorff, da Escola Nacional de Veterinária, foi um defensor do emprego dessa biotécnica de reprodução de forma rotineira nos rebanhos nacionais. Durante os anos 1930, o Ministério da Agricultura, por meio do Departamento de Produção Animal, deu início a uma série de atividades, que proporcionaram as condições para o efetivo emprego da inseminação artificial em diferentes regiões brasileiras.

Após, em 1941, criou-se um grupo de estudos liderado pelos Médicos-Veterinários Antonio Mies Filho e João Ferreira Barreto, localizado na Seção de Biologia Animal Aplicada, do Instituto de Biologia Animal em Deodoro, DF.

Nessa oportunidade eram realizadas no laboratório de Deodoro atividades de coleta, diluição e remessa por transporte aéreo de doses de sêmen bovino, para serem empregadas na inseminação de fêmeas localizadas em Fortaleza,

Recife e Aracaju. Nos anos seguintes a infraestrutura para a prática da inseminação artificial foi ampliada com a criação das Estações de Fisiopatologia da Reprodução no Rio Grande do Sul, Minas Gerais (Uberaba), Estado do Rio, Pará e Bahia.

Além dessas instituições, foram também criados postos de inseminação artificial, o Central, no km 47 da Rodovia Presidente Dutra, hoje na área da Faculdade de Veterinária da UFRJ. No período entre 1942 e 1949 foram realizados 24 diferentes cursos de inseminação artificial, que atenderam 318 alunos, para a formação técnica de médicos veterinários, bem como de práticos. Com o objetivo de facilitar a difusão das informações técnicas, criou-se o Boletim de Inseminação Artificial, de excelente aceitação pela comunidade médica-veterinária.

Para a realização da inseminação artificial em bovinos existiam no Brasil sete postos localizados em Recife (PE), Pelotas (RS), Cachoeiro do Itapemirim (ES), Campo Grande (RJ), Leopoldina (MG), Belo Horizonte (MG) e Juiz de Fora (MG), número que cresceu rapidamente com a inauguração de novos postos e subpostos, que proporcionaram a inseminação de aproximadamente 7.500 fêmeas, principalmente de raças leiteiras no ano de 1948.

Em 1946 foi criado no Rio Grande do Sul o Serviço de Inseminação Artificial do Departamento de Produção Animal da Secretaria de Agricultura, sob a liderança do Prof. Ruben Rohe, órgão responsável pela disseminação da utilização da IA na bacia leiteira dos municípios da grande Porto Alegre.

A partir de 1943 também cresceu o número de fêmeas ovinas inseminadas no Estado do Rio Grande do Sul e através das atividades realizadas na Fazenda Experimental de Criação em Bagé, do Ministério da Agricultura. Em 1945 o trabalho estendeu-se às propriedades privadas da fronteira rio-grandense (62 em 1949). De 140 ovelhas (70% de prenhez) inseminadas em 1943 o número saltou para mais de 48.000 (55% de prenhez) fêmeas inseminadas na temporada reprodutiva de 1948, o que proporcionou aos ovinocultores a multiplicação do potencial reprodutivo de reprodutores considerados excepcionais na época.

Na espécie equina a utilização da técnica, principalmente no Posto de Inseminação Artificial de Desengano (RJ), proporcionou a inseminação artificial de aproximadamente mil éguas em 1948. As coudelarias do Exército Nacional também passaram a empregar com sucesso a técnica na rotina dos trabalhos de reprodução. De acordo com informações do Ministério da Agricultura, trabalhos incipientes de inseminação artificial eram realizados em aves, suínos e caprinos no final dos anos 1940.

Uma nova fronteira da inseminação artificial se abriu a partir de 1949, quando os pesquisadores da Unidade de Reprodução Animal do Instituto de Pesquisa Agrícola em

Cambridge relataram a crioconservação do sêmen de galo doméstico. A partir desse momento, um novo cenário permitiu que a inseminação artificial de bovinos tivesse enorme avanço na sua utilização ao redor do mundo. Novos instrumentos e equipamentos, desenvolvidos principalmente nos EUA e na França, possibilitaram o eficiente emprego da inseminação artificial com sêmen congelado nas propriedades rurais. No Brasil, a fundação de Centrais de Inseminação Artificial, públicas e privadas, bem como a constituição das Cooperativas de Inseminação Artificial, sendo a primeira a Copedia, fundada em 1959, no município gaúcho de Dom Pedrito, permitiu a organização da produção, do armazenamento e da distribuição do sêmen congelado aos mais distantes rincões do País. No início dos anos 1970, municípios gaúchos tradicionais na produção de bovinos de corte, como Uruguaiana, Alegrete, Santana do Livramento, Bagé e Dom Pedrito, chegaram a submeter à inseminação artificial 25% das fêmeas, que em números absolutos alcançavam mais de 500.000 animais por temporada reprodutiva.

As estatísticas do emprego da inseminação artificial no Brasil, de acordo com o Relatório Anual (2007) da Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA), revelam que houve lento aumento no número de doses de sêmen comercializado nos últimos 20 anos, das 1,65 milhão de doses comercializadas em 1988, alcançou-se em 2007 a venda de 7,5 milhões.

A análise dos números permite verificar que os rebanhos de raças leiteiras (50%) e de corte (50%) dividem o mercado, havendo uma estagnação no número de doses de sêmen comercializadas a partir de 2001, levando-se em consideração o efetivo bovino nacional, que hoje é em torno de 200 milhões de cabeças e que desses ao redor de 80 milhões são fêmeas em reprodução, das quais 20 milhões (10% do efetivo bovino – IBGE Produção da Pecuária Municipal 2007) são ordenhadas. O Brasil insemina 9% do rebanho (7,5/80 milhões) e desse total, de acordo com o relatório anual de 2007 da ASBIA, 50% é constituído por vacas produtoras de leite, o que perfaz 3,75 milhões de inseminações artificiais (em torno de 15% do rebanho de 20 milhões, pois um grupo de fêmeas é inseminado mais de uma vez). Por outro lado, o percentual das vacas das raças de corte submetidas à inseminação artificial é de 6% (3,75 milhões/60 milhões).

A análise dos números referentes ao emprego da inseminação artificial bovina no País recomenda cautela, pois além das vantagens inerentes à técnica, fatores indesejáveis podem se tornar de importância e restringir os resultados esperados. Nos EUA, após 1950, o crescimento do emprego da inseminação artificial foi extraordinário, o rebanho leiteiro terminou por alcançar na década de 1970, índices de fêmeas inseminadas superiores aos 90%.

A redução do número de propriedades e, ao mesmo tempo, a concentração dos animais, onde em um grupo de propriedades a ordenha é realizada durante as 24 horas do dia, fizeram com que a fertilidade do rebanho, bem como a sua longevidade, sofresse drástica redução. Hoje se estima que menos de 50% das fêmeas que produzem leite nos EUA sejam inseminadas, apesar dos avanços nas áreas do manejo, da sanidade e da reprodução animal.

Portanto, o índice de 15% de fêmeas leiteiras inseminadas atualmente no Brasil não pode ser considerado baixo, principalmente se levar em consideração as peculiaridades e grandes diferenças socioeconômicas e culturais do País. Os cenários são díspares; por exemplo, segundo o IBGE, em 2007 o Estado de Minas Gerais produziu 30% do leite brasileiro. A média de produção varia de 309 litros do rebanho do Estado de Roraima aos 2.320 do Estado de Santa Catarina, o que faz a média da produção nacional ficar em 1.237 litros/ano/vaca ordenhada. Nos estados com expressiva produção de leite (Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) existe um número de propriedades em que a média de produção é comparável à obtida pelos produtores mais eficientes do mundo desenvolvido, ultrapassando os 12.000 litros/ano/vaca. A inseminação artificial como ferramenta de melhoramento animal é eficiente na medida em que o sêmen de reprodutores provados é utilizado nos rebanhos.

Os produtos da atividade de produção primária não possuem preços estáveis no mercado, enquanto por outro lado os custos de produção em média aumentam mais que os índices inflacionários. Essa relação custo/benefício faz com que a atividade de produção leiteira se situe sempre no limite entre o lucro e o prejuízo, trazendo dificuldades ao produtor na avaliação das atividades realizadas, bem como no planejamento futuro da propriedade. Na opinião do autor, a estabilidade do mercado produtor de leite no Brasil passa pela participação majoritária dos produtores na indústria da transformação do leite, fazendo com que a remuneração final seja sobre os produtos lácteos e não sobre o leite *in natura*. A realidade é outra, e as demandas econômicas criaram um cenário de instabilidade, em que ora o preço é compatível com o lucro e em outras oportunidades o produtor tem prejuízo na produção.

Na produção de gado de corte o rebanho brasileiro caracteriza-se pela presença das raças zebuínas, com maior expressão da Nelore. As raças de origem europeia, criadas nos estados do sul do País, não alcançam 20% do efetivo nacional, constituindo um rebanho de aproximadamente 17 milhões de animais. Os 160 milhões de zebuínos são concentrados em sua maioria na área da Amazônia legal, que mantém 35% do efetivo nacional

(70 milhões de cabeças). A inseminação no gado de corte caracterizava-se por utilizar rebanhos de vacas solteiras (novilhas e vacas sem bezerro ao pé), praticamente não existindo a inseminação dos rodeios com cria ao pé em virtude das dificuldades de alimentação e manejo, para que as vacas em aleitamento pudessem voltar aos ciclos estrais ovulatórios. A realidade modificou-se de maneira drástica a partir da virada do século com o controle do ciclo estral bovino, que proporcionou incremento acelerado no número de inseminações artificiais realizadas em rebanhos de fêmeas com cria ao pé, sem o controle do estro, procedimento denominado IATF (inseminação artificial a tempo fixo). Esta ferramenta de trabalho permite aos médicos-veterinários organizarem programas de inseminação envolvendo grande número de animais, que pode ultrapassar as 300 fêmeas inseminadas por dia de trabalho. O procedimento possibilitou aumento significativo nos índices de prenhez obtidos nos rebanhos com cria ao pé, e a tendência atual é que a cada temporada de reprodução maior número de fêmeas seja submetido à inseminação artificial, principalmente nos rebanhos mantidos na Amazônia legal.

Esse novo cenário do emprego da inseminação artificial permitirá aumentar a velocidade do melhoramento genético animal por meio do emprego do sêmen de touros brasileiros com dados de avaliação dos programas nacionais. O caminho é longo e as metas são inúmeras, mas a demanda internacional pela carne brasileira é a alavanca, que permite aos produtores o emprego de novas tecnologias reprodutivas para o aumento da eficiência das propriedades.

A separação dos espermatozoides com o cromossomo X dos com o Y, com o auxílio de técnicas de citofluxometria, desenvolvidas ao final do século passado por colegas americanos do Departamento de Agricultura (USDA), liderados pelo Dr. Larry Johnson, possibilitou a crioconservação do sêmen, permitindo a escolha do sexo do futuro produto. Essa tecnologia já é hoje disponibilizada no mercado brasileiro por diferentes empresas de inseminação artificial, e ainda que os resultados obtidos em trabalhos de campo sejam modestos, ela é promissora, prevenindo-se um aumento da demanda, principalmente no âmbito da pecuária leiteira e em alguns segmentos da pecuária de corte, como na produção de embriões *in vitro*.

TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES

O primeiro experimento de coleta e transferência de embriões mamíferos foi realizado em coelhos por Walter Heape em Cambridge, quando em 1890 coletou embriões do útero de uma coelha e os transferiu para o útero de uma coelha receptora, que pariu os láparos. O objetivo do experimento era examinar a influência do ambiente uterino

sobre o fenótipo dos embriões. Em 1949 a organização de um grupo de trabalho na Unidade de Reprodução Animal do Instituto de Pesquisa Agrícola em Cambridge, na Inglaterra, com objetivo de estudar as possibilidades do emprego da transferência de embriões nos programas de seleção animal, acelerou o desenvolvimento do conhecimento na área. Em 1951, foi reportado nos EUA, por Willet e colegas, o nascimento do primeiro bezerro produto da transferência de embriões. As grandes barreiras para a disseminação do emprego da técnica eram procedimentos adequados de estimulação ovariana, de técnicas eficientes para a coleta, para a transferência e a manutenção dos embriões fora do ambiente uterino. Em meados dos anos 1970 iniciou-se, no Canadá e nos EUA, o emprego comercial dessa biotécnica de reprodução, sendo a Alberta Livestock Transplant a primeira companhia a oferecer serviços de transferência de embriões. Em 1974 foi fundada a International Embryo Transfer Society, que atualmente conta com aproximadamente 900 associados, que representam mais de 40 países.

No Brasil os primeiros experimentos envolvendo as técnicas de transferência de embriões bovinos foram realizados pelo Médico Veterinário João Carlos Giudice, em 1973, na Cabanha Azul, no município de Quaraí, no Rio Grande do Sul. Ao retornar de uma viagem científica à Europa, o Dr. Giudice organizou um programa de coletas cirúrgicas de embriões, com o objetivo de obter embriões viáveis, mas em virtude das dificuldades para execução dos procedimentos em uma propriedade rural, essa meta não pôde ser alcançada.

Passados alguns anos, em 1978 o desenvolvimento da técnica permitiu ao colega Jorge Nicolau realizar na Fazenda Experimental São Pedro, em Sorocaba, São Paulo, a primeira coleta de embriões por meio do cérvix das doadoras, seguida da transferência por laparotomia para as fêmeas receptoras. O experimento resultou no nascimento do primeiro bezerro brasileiro da raça holandesa (variedade vermelha), que recebeu o nome de Eureka. Em maio de 1979, o Dr. Aurelino Menarim Junior, associado aos colegas americanos da Universidade do Colorado, realizou coletas de embriões de vacas Nelore, na Fazenda Campo Verde, no município de Senhor do Bonfim, na Bahia, que, após a transferência para as receptoras, culminou com os primeiros cinco bezerras Nelore nascidos no mundo, por meio desta tecnologia.

Em 1985, foi fundada a Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (no início denominada Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões), que hoje congrega mais de 500 associados e proporciona o ambiente adequado para as discussões acadêmicas e técnicas sobre os diferentes aspectos das biotécnicas de reprodução.

A transferência de embriões como ferramenta de multiplicação do potencial reprodutivo das fêmeas teve grande incremento na sua utilização no Brasil durante os anos 1990, alcançando a expressiva cifra de 80 mil no ano 2000. A incorporação de procedimentos sofisticados na rotina da transferência de embriões nas propriedades rurais permitiu que eles fossem micromanipulados para a obtenção de gêmeos idênticos e a identificação do sexo (Lopes *et al.*, 2002). Apesar dos avanços tecnológicos, os antigos obstáculos ainda não foram removidos para o emprego eficiente dessa biotécnica.

Os tratamentos superovulatórios apresentam resultados extremamente variáveis, independentemente do preparado hormonal utilizado. Em média, são obtidas 12 estruturas por superovulação, das quais oito são embriões viáveis, que após a transferência para as fêmeas receptoras resultam em cinco prenheses. Levando-se em consideração que as fêmeas podem ser superovuladas em intervalos de dois meses, podem ser obtidas em um ano 30 descendentes de uma doadora. A crioconservação dos embriões oportunizou a organização de bancos de embriões congelados, que facilitam o manejo e a utilização das receptoras. O custo de manutenção de receptoras disponíveis em número suficiente para a realização de transferências é o maior do programa, quando os embriões são transferidos imediatamente após serem coletados. A congelamento dos embriões permite adequado planejamento das transferências, respeitando-se diferentes variáveis, como o custo de aquisição e manutenção das receptoras, a época do ano, a disponibilidade de alimentos no momento do parto e a escolha do número, bem como da idade dos bezerros para a venda. O somatório da economia que estas variáveis, controladas por meio de um eficiente planejamento, proporcionam ao criador é um lucro adicional substancial ao seu investimento.

PUNÇÃO FOLICULAR E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

Ao contrário do macho, a fêmea tem a sua capacidade de produção de gametas determinada durante a embriogênese, com a organização dos ovários. No sexto mês da prenhez o feto já possui em seus ovários o número de folículos primários da sua futura vida reprodutiva. Desde esse momento, pela influência de hormônios da mãe, os ovários fetais apresentam função com o desenvolvimento e atresia foliculares. No momento do nascimento é estimada em cada ovário a presença de 150 mil folículos, que após a puberdade serão utilizados na reprodução (Erickson, 1966). Uma fêmea bovina de vida reprodutiva longa dificilmente deixa uma descendência maior que oito bezerros, um reduzido número, levando-se em consideração a população de folículos primários presentes nos ovários.

Os experimentos realizados pelo grupo do Prof. Brackett no início da década de 1980, na Universidade da Geórgia, USA, proporcionaram avanços consideráveis às técnicas de produção de embriões bovinos no laboratório. No Brasil, em 1993 o grupo liderado pelo Prof. Enoch Borges de Oliveira, da Faculdade de Veterinária da UNESP – Campus de Jaboticabal, obteve o primeiro bezerro produto da transferência de um embrião produzido totalmente *in vitro*. Ovários coletados de fêmeas em matadouro eram a principal fonte de oócitos para a realização dos experimentos. De acordo com Gordon (2003), os fatores determinantes para o emprego adequado desta tecnologia são o conhecimento e domínio das diversas etapas realizadas *in vitro*: a maturação oocitária, a fecundação, onde são determinantes os procedimentos de capacitação dos espermatozoides, e o cultivo, onde as diferentes necessidades do embrião devem ser supridas para o seu desenvolvimento até o estágio de blastocisto.

Atualmente, os laboratórios considerados eficientes na utilização destas técnicas obtêm em torno de 40% de blastocistos, levando-se em consideração o número de oócitos colocados para maturar. Em meados dos anos 1980, um grupo de pesquisadores canadense relatou experimentos de colheita de ovócitos *in vivo* (imaturos ou já maturados), por meio de laparotomia e posteriormente, com o auxílio da laparoscopia. A procura por procedimentos de maior eficiência para a obtenção de oócitos diretamente dos ovários das fêmeas bovinas culminou em 1988 com a descrição pela equipe do Prof. Pieterse da Universidade de Utrecht, na Holanda, da punção ovariana através da vagina, com o auxílio de ultrassom. Esse procedimento seguro, eficiente e podendo ser repetido inúmeras vezes na mesma doadora, em até três sessões por semana, abriu as portas para o desenvolvimento de uma nova biotécnica de reprodução.

Uma abordagem original para explorar o potencial reprodutivo de fêmeas consideradas excepcionais estava à disposição e poderia, sem dúvidas, ser mais uma ferramenta para os programas de melhoramento animal. As fêmeas *Bos taurus taurus* revelaram uma performance na produção de oócitos semelhante ao observado após os tratamentos superovulatórios.

De um terço dos animais submetidos ao procedimento eram obtidos um número de oócitos superior a 12 e de outro terço o número de oócitos ficava entre 8 e 12, levando em consideração a média. Do último terço de doadoras, o número não passava de cinco, não adequado economicamente. Outro aspecto ressaltado pelos pesquisadores era a tendência de redução dos números médios obtidos por doadora na medida em que as sessões se sucediam. Com o passar do tempo, a técnica foi caindo em desuso, passando a ser utilizada somente em casos especiais. Por outro lado as fêmeas *Bos taurus indicus* revela-

ram comportamento totalmente diferente ao serem submetidas à punção ovariana. Além de alcançarem números médios expressivos, acima dos 15 oócitos por sessão, na maioria delas o número médio de oócitos não decrescia na medida em que as sessões de colheita se sucediam. A visão empresarial de um jovem médico-veterinário brasileiro, André Dayan, associado à bióloga Ieda Watanabe, levou à fundação, em novembro de 1999, da Vitrogen, empresa que alavancou o emprego da técnica no Brasil. Em curto período de tempo multiplicaram-se as empresas dedicadas à prestação de serviços, fazendo com que o Brasil se tornasse uma liderança mundial na produção *in vitro* de embriões de raças zebuínas. Os dados referentes ao ano de 2007, reportados pelo Comitê de Estatística da IETS (Thibier, 2008), revelam que o Brasil produziu *in vitro* 211 mil embriões bovinos, colocando-se junto à China e ao Japão como líderes mundiais no emprego dessa biotécnica de reprodução. Nesse período, o Canadá produziu mais de 300 mil embriões *in vitro*, que foram exportados para a China com o propósito de acelerar a seleção e o melhoramento animal da raça holandesa naquele país. Esse é um exemplo prático de como esta biotécnica de reprodução pode ser empregada como ferramenta para modificar, em curto espaço de tempo, o cenário da seleção animal.

As barreiras a serem transpostas ainda são numerosas, exemplo é a eficiência da produção *in vitro* de embriões, em que as médias de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto ainda não ultrapassaram os 50%. Outros entraves são as diferenças entre o embrião bovino produzido *in vitro* em relação ao obtido *in vivo*, o que não permite o emprego da crioconservação comercial. A logística das atividades desenvolvidas pelos colegas que prestam serviços técnicos nesta área será modificada de forma significativa no momento em que se puder crioconservar embriões *Bos taurus indicus* produzidos *in vitro*.

Atualmente um dos importantes objetivos da pesquisa na área é identificar sistemas eficientes de produção de embriões com potencial de sobrevivência próximo daquele observado com os embriões que se desenvolvem *in vivo*. Essas diferenças, além dos aspectos morfológicos, são caracterizadas por modificações na expressão gênica, que tem reflexo significativo na embriogênese, no desenvolvimento fetal e na saúde futura do indivíduo.

CLONAGEM E ANIMAIS TRANSGÊNICOS

Clone deriva do termo grego *klon*, que significa broto, e por definição é o produto da reprodução assexuada, a partir do genoma de células somáticas. Clones são indivíduos de genoma idêntico, que também podem ser obtidos

ao acaso, como gêmeos univitelinos. A bipartição de embriões, utilizada comercialmente associada a programas de transferência de embriões, é outro procedimento para a obtenção de gêmeos idênticos, que também podem ser denominados de clones. Steen Willadsen, pesquisador dinamarquês, que durante as décadas de 1970 e 1980 trabalhou na Unidade de Reprodução Animal do Instituto de Pesquisa Agrícola em Cambridge, na Inglaterra, conduziu elegantes experimentos de desagregação de embriões de ovinos (Willadsen, 1979 e 1981), que culminaram em 1986 com o relato dos primeiros cordeiros nascidos a partir da transferência de blastômeros de embriões ovinos desagregados no estágio 8-células para o citoplasma de oócitos enucleados (Willadsen, 1986). Os blastômeros isolados nesse estágio de desenvolvimento são células pluripotentes, e este trabalho provou que o núcleo podia ser reprogramado e assumir o desenvolvimento de um oócito enucleado. Uma década mais tarde em 1995 Campbell *et al.* (1995), obtiveram o nascimento de dois cordeiros, Megan e Morag, produzidos a partir de células embrionárias cultivadas e diferenciadas *in vitro*. Ou seja, células diferenciadas também podiam ser reprogramadas e assumir o desenvolvimento de um novo indivíduo. Nesse mesmo ano, a equipe do Prof. Wilmut obteve o nascimento de Polly, primeiro mamífero transgênico produzido por transferência nuclear. A ovelha Polly foi produzida a partir de fibroblastos fetais cultivados *in vitro* e transfectados com o gene do fator IX da coagulação humana. A partir desses experimentos, a clonagem por transferência nuclear também se tornou ferramenta hábil para a produção de animais transgênicos. Em 1997 o anúncio realizado pelo Prof. Wilmut do nascimento da Dolly, primeiro mamífero nascido a partir da transferência do núcleo de uma célula somática, revogando um dogma da biologia que dizia que uma célula somática só poderia originar duas iguais a ela e com a mesma função. A partir desse momento, o cenário das biotécnicas de reprodução foi modificado de forma radical, originando inúmeras possibilidades de utilização do conhecimento (Brem *et al.*, 2002; Campbell *et al.*, 2007). O emprego da técnica em diferentes experimentos possibilitou o nascimento de clones em muitas espécies domésticas e algumas selvagens, como bovinos, camundongos, caprinos, suínos, carneiro montês da Europa, bisão indiano, gato doméstico, coelho, equino, rato, mula, gato selvagem, boi de Java, cão, furão e lobo cinzento (Campbell *et al.*, 2007).

No Brasil, a equipe do Cenargen da Embrapa obteve, em 2001, o nascimento da bezerra Vitória, o primeiro clone bovino latinoamericano a partir da transferência de uma célula embrionária pluripotente (Rumpf *et al.*, 2001). Em abril de 2002, um grupo da Faculdade de Veterinária da USP, liderado pelo Prof. Visintin, noticiou o nascimento do bezerro Marcolino, primeiro clone latino-americano

obtido a partir da transferência nuclear de uma célula somática (Mello *et al.*, 2003). Mais tarde a associação do grupo da USP de Pirassununga, coordenado pelo Prof. Meirelles com a Vitrogen, criou as condições para a realização de rotina permanente na produção de clones, que começaram a nascer a partir de março de 2005. No Brasil já devem ter nascido uma centena de clones bovinos, que ainda aguardam a aprovação da legislação que lhes possibilite o registro nas associações de criadores.

A produção de animais transgênicos ainda é incipiente em nosso país, sendo realizada a partir de 1998, no Laboratório de Biologia Molecular Maury Miranda, da UFRJ, sob a liderança da Prof. Dra. Eliana Abdelhay, os experimentos pioneiros na espécie *Mus domesticus domesticus* (Pereira *et al.*, 1999). A UECE, por meio do Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução, em parceria com a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), obteve no ano passado os primeiros nascimentos de caprinos transgênicos, que possuem no genoma uma sequência do gene responsável pela produção da proteína hG-CSF (fator de estimulação de colônias de granulócitos humanos), (Jornal da Ciência, 2008). No caso de os animais expressarem o gene, será possível isolar a proteína a partir da caseína do leite, proporcionando a continuidade das pesquisas, para que, talvez, em futuro próximo, se tenha um fármaco brasileiro disponível no mercado, produzido a partir de animais transgênicos.

A reduzida eficiência da transferência de genes nas espécies domésticas é reflexo da falta de conhecimento e de domínio adequado das várias etapas do processo, como construções gênicas com promotores específicos, controle da expressão e os aspectos básicos da genética sobre interação e dominância dos genes.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conceituando seleção animal como a modificação da frequência dos genes em determinada população, hoje têm-se diferentes ferramentas no âmbito das biotécnicas de reprodução para auxiliar na realização dessa tarefa. Em um país de dimensões continentais como o Brasil, em que as diferenças socioculturais, econômicas e climáticas constroem um caleidoscópio de cenários de produção animal, pode-se em princípio, ordenar uma série de premissas para que objetivos e metas possam ser alcançados.

Nos esquemas tradicionais empregados na avaliação de touros para os programas de seleção animal, os objetivos das biotécnicas de reprodução são o aumento no número de descendentes das fêmeas consideradas excepcionais, denominadas “mães de touros”, e a redução no intervalo entre as gerações. O aumento no número de descendentes permite maior disponibilidade de genomas para

serem avaliados de forma simultânea. A redução do intervalo entre as gerações acelera a velocidade da obtenção de dados da descendência dos touros em teste, permitindo substancial diminuição na duração da avaliação. As provas de avaliação na aprovação de um touro para ser empregado em inseminação artificial duram, em média, seis anos e meio.

A utilização da transferência de embriões nos programas de ovulação múltipla (MOET), utilizando famílias de fêmeas meias irmãs, proporciona economia de tempo de até dois anos na duração dos testes, o que representa uma economia considerável de capital. Os índices de performance total (TPI) dos touros, calculados pela Associação Americana de Gado Holandês, divulgados em janeiro de 2009, revelam que 77% dos reprodutores com maior TPI no mundo são produtos gerados por meio da transferência de embriões.

Uma ideia clara é utilizar as biotécnicas de reprodução no aumento do mérito genético dos animais, sem comprometer a variância genética. A atividade com os gametas e embriões permite uma agregação de valor através, por exemplo, da seleção do sexo, do exame da herança de determinados genes (BLAD e DUMPS) e da criopreservação. A clonagem reprodutiva, mesmo se levando em consideração as dificuldades dessa biotécnica em produzir indivíduos sadios, pode ser empregada para multiplicar determinados genomas, como copiar um touro com provas de avaliação consideradas extraordinárias, para maior disponibilidade de sêmen no mercado em determinado momento.

As biotécnicas de reprodução já deram provas de que podem ser empregadas no aumento da eficiência da seleção genética quantitativa e da seleção assistida por marcadores. Novos procedimentos utilizando análise da expressão de grande número de genes, através de microarrays, devem criar novos cenários de utilização das biotécnicas de reprodução, atuando na preservação, no resgate e na multiplicação de genomas considerados imprescindíveis aos esquemas de seleção e melhoramento animal.

As necessidades de produção animal são crescentes e abrangem vários e diferentes aspectos. Os produtos animais devem ser elaborados respeitando-se, em primeiro lugar, o meio ambiente e o bem estar animal, além disso devem apresentar qualidade e possuir preço de consumo acessível às populações aos quais se destinam. No âmbito da população humana mundial, estimada hoje em cerca de 6,7 bilhões de indivíduos, ocorre anualmente cerca de 40 milhões de óbitos por carência absoluta de alimentos. A impossibilidade de frear o crescimento populacional torna inevitável a necessidade de aumentar a disponibilidade de alimentos. Este objetivo poderá ser preenchido em parte pelo aumento do efetivo animal, mas não como

ação de caráter permanente. Atualmente são mantidos no mundo para alimentação do homem cerca de 9 bilhões de animais, dos quais 3 bilhões de ruminantes (bovinos, ovinos e caprinos), 600 milhões de suínos e 5,5 bilhões de aves. Grande parte desse rebanho (70%) localiza-se nos países em desenvolvimento, que são responsáveis pela produção de somente 30% da carne e 21% do leite consumido no mundo.

As características da agricultura e da pecuária em países como o Brasil induzem à necessidade de desenvolver e adaptar tecnologias que proporcionem aumentos significativos da produtividade. A utilização de novas tecnologias na área rural se faz na medida em que o homem que as emprega também evolui culturalmente. Portanto, não se pode almejar que objetivos amplos e abrangentes sejam alcançados por populações rurais com escassos acessos ao que se denomina vida moderna.

REFERÊNCIAS

- ASBIA (2007) Relatório estatístico de produção, importação e comercialização de sêmen. Disponível em: <<http://www.asbia.org.br/?mercado/index>> Acessado em: 06 de dezembro 2008.
- Baer KE (1826). On the genesis of the ovum of mammals and of man. *Isis*, 47: 117-121, 121-153. versão: 1956 (Trans. by. C. D. O'Malley.) Orig.: Baer KE (1826) De ovi mammalium et hominis genesi. Epistola ad Academiam Imperialem Scientiarum Petropolitanam. Lipsiae: Voss, 40 p.
- Brackett, B.G., Bousquet, D., Boice, M.L., Donawick, W.J., Evans, J.F. and Dresssel, M.A. (1982) Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biology of Reproduction*, 27: 147-158.
- Brem G & Kühholzer B (2002) The recent history of somatic cloning in mammals. *Cloning and Stem Cells*, 4: 57-63.
- Campbell KH, Mcwhir J, Ritchie WA & Wilmut I. (1995) Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*, 380: 64-66.
- Campbell KHS, Fisher P, Chen WC, Choi I, Kelly RDW, Lee JH & Xhu J (2007) Somatic cell nuclear transfer: Past, present and future perspectives. *Theriogenology*, 68: S214-S231.
- Correia CP (1997) The ovary of eve. Ed. University of Chicago Ltd., USA, 396p.
- Erickson BH (1966) Development and Senescence of the Postnatal Bovine Ovary. *Journal of Animal Science*, 25: 800-805.
- Gordon IR (2003) Laboratory Production of Cattle Embryos, 2nd. edition, CABI Publishing, Cambridge, 548p.
- Harvey W (1651) Exercitationes de generatione animalium : quibus accedunt quaedam de partu: de membranis ac humoribus uteri: et de conceptione. Ed. Typis Du Garinis, London, 579p.
- Heape W (1890) Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within uterine foster mother. *Proceeding of the Royal Society*, 48: 457.
- Hertwig O (1876) Beitrage zur Kenntniss der Bildung, Befruchtung und Theilung des thierischen Eies. *Morphologisches Jahrbuch*, I: 347-452.
- IBGE (2007) Relatório da Pecuária Municipal. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2007/default.shtm>> Acessado em 06 de janeiro 2009.
- Johnson LA (2000) Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. *Animal Reproduction Science*, 60-61: 93-107.
- Jornal da Ciência (2008) Equipe da Uece produz três cabritos transgênicos e repete com sucesso experiência pioneira na ciência da América Latina. Disponível em: <<http://www.jornaldaciencia.org.br/Detalhe.jsp?id=55468>>. Acessado em 06 de março 2009.
- Lopes RF, Forell F, Oliveira AT & Rodrigues JL (2002) Splitting and biopsy for bovine embryo sexing under field conditions. *Theriogenology*, 56: 1383-1392.
- Mayr E (2008) Isto é biologia. Ed. Schwartz Ltda., Brasil, 428 p.
- Mello MRB, Caetano HVA, Marques MG, Padilha MS, Garcia JF, Garcia JF, Milazzotto MP, Assumpção, MEOA, Lima AS, Nicácio AC, Mendes CM, Oliveira VP & Visintin JA (2003) Production of cloned calf from fetal fibroblast cell line. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 36:1485-1489.
- Mies Filho A & Barreto JF (1949) Noções sobre reprodução dos animais e inseminação artificial. Ed. Serviço de Informação Agrícola do Ministério da Agricultura, 334p.
- Pieterse MC, Kappen KA, Kruij AM & Taverne MAM (1988) Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology*, 30: 751-762.
- Pereira MSO, Houzelstein D, Cohen A, Vinci G, Abdelhay E & Robert B (1999) Analysis Of The Mouse Msx1 Gene Promoter Using Embryonic Stem Cell-Mediated Transgenesis. *Transgenics*, 2: 403-416.
- Prevost JL & Dumas JB (1824) Deuxieme memoire sur la generation. *Annales des Sciences Naturelles*, 2: 129-149.
- Rumpf R, Iguma LT & Sousa RV (2001) Produção de clones pela transferência nuclear em bovinos. *Revista do Conselho Federal de Medicina Veterinária*, 22: 16-24.
- Thibier M (2008) The worldwide activity in farm animals embryo transfer. Data Retrieval Committee Statistics of Embryo Transfer- Year 2007. *Embryo Transfer Newsletter*, 26: 4-9.
- Willadsen SM (1979) A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. *Nature*, 277: 298-300.
- Willadsen SM (1981) The development capacity of blastomeres from 4- and 8-cell sheep embryos. *Journal of Embryology and Experimental Morphology*, 65: 165-172.
- Willadsen SM (1986) Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*, 320: 63-65.
- Willett EL, Black WG, Casida LE, Stone WH & Buckner PJ (1951) Successful transplantation of a bovine ovum. *Science*, 113: 247.
- Wilmut I, Schnieke AE, Mcwhir J, Kind AJ & Campbell KHS (1997) Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, 385: 810-813.