

Biotecnologia da reprodução na espécie caprina: perspectivas atuais¹

Reproductive biotechnology in goat: current status

Gustavo Ferrer Carneiro

Caroata Genética, CEP 50741-520, Recife, PE, Brasil.

Instituto Caroatá, CEP 55641-970, Gravatá, PE, Brasil.

Correspondência: gustavo@caroata.com.br

Resumo

A caprinocultura apresenta-se em franca expansão tecnológica, sobretudo nos países em desenvolvimento. O aumento da produtividade agregada ao melhoramento genético está atrelado ao uso das diversas biotecnologias de reprodução assistida. O objetivo desse trabalho foi rever as técnicas empregadas no dia a dia, relatando a produção de embriões *in vivo* e *in vitro* avaliando as limitações decorrentes dessas técnicas, tais como variabilidade de respostas ao tratamento superovulatório, falha na fertilização e importância da regressão do corpo lúteo, destacando possibilidades para melhoria desses protocolos. Revemos ainda os avanços da biotecnologia na manipulação do DNA para desenvolvimento de animais transgênicos que apesar da baixa eficiência já se vislumbra um futuro promissor. O uso e aprimoramento destas técnicas podem acelerar a produção e desenvolvimento tecnológico nessa espécie aumentando assim a eficiência produtiva e incrementando o desenvolvimento de regiões desfavorecidas.

Palavras-chave: caprino, IA, TE, transgênico.

Abstract

The goat business is in a high tech expansion, particularly in developing countries. The increase in productivity along with the genetic improvement is closely related to the use of assisted reproductive techniques. The objective of this work was to review the techniques used in practice, reporting the in vivo and in vitro embryo production, evaluating all the limitations of those techniques, such as response variability to superovulatory treatment, fertilization failure and the importance of corpus luteum regression suggesting some ways to overcome these problems. We also have reviewed the biotechnology advances in DNA manipulation to developing transgenic animals that despite the low efficiency it give us a promise of great future. The use and learning of those techniques can accelerate the production and technological advances in this specie increasing therefore the productivity and the development of unfavorable regions.

Keywords: caprine, AI, ET, transgenic.

Introdução

O desenvolvimento da caprino-ovinocultura vem apresentando um ciclo de crescimento mundial. Esse crescimento foi intensificado, sobretudo nos países em desenvolvimento nos últimos anos que são detentores dos maiores rebanhos. Projeta-se um crescimento da ordem de 5 vezes o rebanho atual nos próximos 20 anos multiplicando o rebanho atual em mais de 50 milhões de cabeças (Fonseca, 2006). Dentro dessa perspectiva, há uma necessidade da aplicação de técnicas de reprodução assistida com o objetivo de aumentar a eficiência reprodutiva e produtiva do rebanho para que possa haver um aproveitamento mais eficiente dos genótipos utilizados.

As técnicas de reprodução assistida como inseminação artificial (IA) e transferência de embriões foram introduzidas na indústria caprina e ovina com os objetivos principais de acelerar o ganho genético de animais superiores e de superar alguns obstáculos de eficiência reprodutiva (Smith, 1986).

A produção *in vitro* nos pequenos ruminantes tem uma importância fundamental principalmente devido a produção de material para pesquisa básica a um baixo custo. Estes estudos possibilitam a introdução comercial de biotecnologias de ponta como transferência nuclear e produção de transgênicos (Cognié *et al.*, 2003).

O objetivo deste trabalho foi realizar uma revisão das diversas técnicas de reprodução assistida na espécie caprina avaliando as perspectivas de futuro do uso da biotecnologia e seu impacto na indústria como um todo.

¹Palestra apresentada no XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 31 de maio a 02 de junho de 2007, Curitiba, PR.

Produção *in vivo*

A produção *in vivo* nos pequenos ruminantes tem apresentado um desenvolvimento considerável nos últimos anos. A transferência de embriões (TE) possibilita a multiplicação de indivíduos geneticamente superiores. Permite ainda a redução do intervalo entre gerações por possibilitar a colheita de embriões de fêmeas caprinas jovens e pré-púberes (Salles *et al.*, 2000). Uma das barreiras para a eficiência do tratamento superovulatório diz respeito à variabilidade individual da doadora em relação à eficiência das gonadotrofinas exógenas no recrutamento, crescimento, maturação e ovulação dos folículos (Cognié *et al.*, 2003). A variabilidade de resposta aos tratamentos hormonais ainda são questões a serem analisadas. A partir de estudos com ultra-sonografia (Gonzales-Bulnes *et al.*, 2002) e endoscopia (Brebion *et al.*, 1992) observou-se que a variabilidade de resposta está intimamente relacionada com a presença de folículos antrais (2-3 mm) nos ovários e que os resultados negativos no número de embriões transferíveis é diretamente afetado pela presença de grandes folículos (> 6 mm) quando do início do tratamento superovulatório (Cognié *et al.*, 2003). Cognié *et al.* (2003) destacam o uso de agonistas e antagonistas do hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH) associado ao progestágenos com o objetivo de suprimir a liberação endógena destas gonadotrofinas. Dessa maneira, esse grupo testou um pré-tratamento de 2 semanas com um agonista (Buserelina, 40 µg/dia, Receptal®) ou 10 dias com um antagonista (Antarelix, 0.5 mg/dia, Teverelix®). Os resultados demonstraram uma diminuição dos folículos maiores, um aumento no número dos folículos menores e um conseqüente aumento na resposta do FSH em até 50% (Brebion *et al.*, 1992; Cognié, 1999).

Um outro problema a ser transposto diz respeito a formação de anticorpos anti-FSH de origem suína após sucessivas administrações destas gonadotrofinas no protocolo de superovulação com conseqüente diminuição na resposta ovariana. Este problema pode ser minimizado utilizando-se FSH de origem caprina. Outro desafio é com relação a variabilidade individual entre as doadoras e a incidência de regressão luteínica precoce em cabras superovuladas na espécie caprina interferindo negativamente na taxa de recuperação embrionária e na qualidade e viabilidade dos embriões (Simplicio e Santos, 2000). Esta regressão precoce dos corpos lúteos pode ser prevenida com a utilização de inibidores da síntese de prostaglandina (Traldi *et al.*, 1995; Traldi *et al.*, 1995; Salles *et al.*, 1996). A utilização dessas drogas no dia da ovulação e no dia da recuperação embrionária permite uma redução considerável na regressão prematura de CL (Battye *et al.*, 1988) e um aumento no número de embriões transferíveis por fêmea tratada (Traldi, 1995).

Produção *in vitro*

A produção *in vitro* de embriões de pequenos ruminantes tem despertado um grande interesse científico em virtude da disponibilidade de material para pesquisa a um relativo baixo custo além destas espécies serem um excelente modelo para aplicação da transgênese. Os métodos de produção *in vitro* de embriões envolve:

1. Maturação de oócitos primários provenientes de folículos antrais.
2. Fertilização de oócitos maduros com espermatozóides capacitados.
3. Cultivo de embriões *in vitro* por até uma semana atingindo o estágio de blastocisto para posterior transferência para receptoras sincronizadas ou criopreservação para uso posterior.

Maturação *in vitro*

Maturação *in vitro* (MIV) e fertilização *in vitro* (FIV) tem sido rotineiramente utilizada na espécie humana e em várias outras espécies domésticas. Apesar da produção *in vitro* ser documentada em pequenos ruminantes (Chauan *et al.*, 1991; DeSmedt *et al.*, 1992; Hanada, 1985; Keskintepe *et al.*, 1994; Tervit *et al.*, 1972; Younis *et al.*, 1991), os resultados de cultivo *in vitro* apresentam um avanço limitado e esta técnica ainda não é utilizada como rotina nessa espécie. O sistema de maturação de oócitos mais utilizados nos ruminantes domésticos trata-se de meio de cultivo básico suplementado com FSH, LH, estradiol e 10% de soro fetal bovino. A adição de diferentes suplementos aos meios de cultivo tem sido largamente utilizado. Fluido folicular foi utilizado com relativa eficiência, com exceção de fluido folicular proveniente de folículos atrésicos. Os efeitos moleculares que mediam a influência positiva destes suplementos não estão completamente esclarecidos, mas dados recentes (Carneiro *et al.*, 2003) suportaram o possível envolvimento dos fatores de crescimento influenciando na MIV. Gonadotrofinas são reconhecidamente reguladores da maturação nuclear de oócitos em mamíferos. Outros fatores além das gonadotrofinas também estão envolvidos no processo de foliculogênese. Dentre estes, o insulin-like growth factor-I (IGF-I) demonstrou importante papel na maturação *in vivo* (Carneiro *et al.*, 2002) e efeito positivo na maturação nuclear e citoplasmática *in vitro* em diversas espécies (Carneiro *et al.*, 2001). Além disso, é reportado que o IGF-I aumenta os índices de formação de blastocisto obtidos através de FIV em bovinos (Herrler *et al.*, 1992; Lorenzo *et al.*, 1993) e em coelhos (Herrler *et al.*, 1998). Com base nesses estudos desenvolvemos um trabalho para estabelecer um sistema de maturação *in vitro* testando a influência da adição de IGF-I ao meio de cultivo. Como resultados, observamos diferença estatisticamente significativa nas

taxas de maturação nuclear em concentrações superiores a 100 ng/ml. Os resultados estão resumidos na Tabela 1. Estes resultados demonstram que O IGF-I em concentração superior a 100 ng/ml influencia positivamente a maturação *in vitro* de oócitos caprinos.

Tabela 1. Efeito de diferentes concentrações de IGF-1 na maturação nuclear de oócitos caprinos durante 28 horas.

Tratamento ng/ml	Número de Oócito	Metáfase-II
0	78	32 (41,02%) ^a
50	46	18 (39,13%) ^a
100	110	64 (58,18%) ^b
200	110	74 (67,27%) ^b
400	92	60 (65,21%) ^b

P < 0.05 para sobrescritos de letras diferentes na mesma coluna

Fertilização *in vitro*

Como protocolo básico utilizado em diversos laboratórios, após a maturação, as células do cumulus são removidas e espermatozóides capacitados são incubados juntamente com os óocitos maduros. O meio de capacitação definido modificado (Younis *et al.*, 1991) tem sido largamente utilizado com resultados satisfatórios. Neste, os espermatozóides com motilidade superior a 70% são centrifugado a 200G, e o pelet é suspenso em meio de capacitação suficiente que atinja uma concentração de 160×10^6 espermatozóide/mL. Um volume semelhante de solução de 100 µg/mL de heparina (Sigma, H-3329) diluída em meio de capacitação é adicionado a solução contendo espermatozóide, resultando em uma concentração final de 80×10^6 spz/mL e 50 µg/mL de heparina. A fertilização é realizada em gotas de 50 µL sob óleo mineral preparado com meio TALP-fert (Bavister e Yanagimachi, 1977) modificado (Parrish *et al.*, 1986), suplementado com hypotaurina (1 µg/mL, Sigma, H-1384). Oócitos maturados *in vitro* por 26 horas são selecionados, lavados com meio de TALP-fert e transferidos para as gotas de FIV. Uma alíquota de 5 µL de espermatozóides tratados com heparina é adicionada aos oócitos em cada gota dando uma concentração final de 3,5 a 4×10^6 spz/mL (Izquierdo *et al.*, 1999). Após inseminação *in vitro*, oócitos e espermatozóides são encubados a 38,5° C em 5% de CO₂.

Cultivo Embrionário

Após 24 horas de inseminação, espermatozóides e células do cúmulus são removidos mecanicamente dos oócitos. Supostos zigotos e embriões de 2-células são lavados por 4 vezes em meio de cultivo e colocados em microgotas de 100 µL sob óleo mineral, e cultivados a 38,5° C em 5% de CO₂ por 7 dias (8 dias pós-inseminação). Apesar de resultados positivos, após a transferência para receptoras sincronizadas a taxa de sobrevivência dos embriões produzidos *in vitro* é estatisticamente inferior aos produzidos *in vivo* (47% vs. 71% - Cognié *et al.*, 2003).

Coleta em animais pré-púberes

Ovários obtidos de abatedouros são fonte economicamente viável e abundante de oócitos. Recuperação oocitária *in vivo* é conseguida através de laparotomia ou através da técnica de laparoscopia guiada por ultrassom (LOPU - Tervit, 1996). Recuperação oocitária após LOPU em cabras (Kuhholzer *et al.*, 1997, Baldassarre *et al.*, 2002) tem resultado em bons números de oócitos por doadora (4-6 por sessão).

Progresso considerável tem sido adquirido em produção de embriões de animais jovens (5-9 semanas) após recuperação de um número considerável de oócitos e utilizados para MIV (Aguilar *et al.*, 2002, Baldassarre *et al.*, 2002). O tratamento de indução utilizado envolve uma aplicação de FSH + eCG 36 horas antes da coleta, sendo reportado ótimos resultados em caprinos com menos de 3 meses de idade (Baldassarre *et al.*, 2002). Apesar dos resultados positivos, há diferenças estatísticas de produção de blastocistos quando comparados com oócitos aspirados de animal adulto (19% vs. 65% - Baldassarre *et al.*, 2002) sugerindo que oócitos provenientes de animais pré-púberes não possuem um potencial de desenvolvimento como dos animais adultos havendo ainda altos índices de polispermia como possível consequência da dispersão dos grânulos corticais. Maiores estudos são necessários nessa área para propiciar produção de embriões provenientes de animais pré-púberes com um potencial de redução do intervalo de gerações.

Clonagem

A clonagem do primeiro mamífero a partir de uma célula somática retirada de um animal adulto representa uma das mais extraordinárias conquistas da pesquisa na área de biologia do desenvolvimento da última década (Wilmut *et al.*, 1997). Esta tecnologia teve uma rápida expansão sendo utilizada em diversos laboratórios para as mais diversas espécies. Apesar disto a taxa de sucesso na clonagem de animais, é na maioria das vezes não superior a 1% (Solter, 2000). A baixa viabilidade dos embriões clonados é principalmente expressa pela redução na taxa de implantação, pelo aumento na taxa de mortalidade fetal e perinatal, e pelas diversas anomalias observadas nos animais nascidos (Bordignon, 2003). Em contraste com as diversas espécies clonadas, na espécie caprina não foram observados problemas relacionados com placentação, peso ao nascer, distúrbios cardíaco-respiratórios, nem de mortalidade peri-natal, o que faz dessa espécie um ótimo modelo para a produção de animais transgênicos assim como para tentarmos entender o mecanismo destas síndromes nas demais espécies clonadas (Bordignon, 2003).

Produção de transgênicos

Transgênese é a modificação da informação genética de um organismo através de técnicas de recombinação de DNA. Um animal transgênico é aquele que adquiriu uma nova informação genética como resultado de manipulação do seu DNA (Nicolas e Delouis, 1993). O método original para produzir animais transgênicos consiste na microinjeção do gene isolado dentro do pró-núcleo de embriões de uma célula. Produção de proteínas de interesse farmacêutico no leite de animais transgênicos tem se tornado uma alternativa atrativa para bioreatores de células animais. O uso dos pequenos ruminantes, particularmente os caprinos de leite possibilita uma excelente alternativa econômica para a produção de animais transgênicos (Freitas, 2003). Vários autores já citaram a produção de caprinos transgênicos (Ebert *et al.*, 1991; Denman *et al.*, 1994; Gootwine *et al.*, 1997) bem como para produção de larga escala para sua aplicação industrial (Ebert *et al.*, 1994; Edmunds *et al.*, 1998). A tabela 2 apresenta as proteínas de uso terapêutico produzidas no leite de pequenos ruminantes com suas respectivas utilidades.

Tabela 2. Proteínas de uso terapêutico produzido no leite de animais transgênicos.

Proteína	Animal	Uso
Antitrombina III	Caprino	Anticoagulante
Fator VIII, Fator IX	Caprino, ovino	Tratamento da hemofilia
CFTR	Ovino	Tratamento da fibrose cística
Alfa-1-antitripsina	Ovino	Tratamento da fibrose cística e enfisema

Conclusões

Apesar dos avanços na produção embrionária e biotecnologias aplicadas aos pequenos ruminantes, as limitações são grandes, muitas vezes devido ao alto custo de equipamentos utilizados que reflete diretamente no custo benefício destas técnicas e na consequente aplicabilidade. A produção *in vitro*, particularmente envolvendo animais pré-púberes apresenta uma perspectiva promissora e maiores estudos serão necessários nesta área. No que diz respeito a produção de transgênicos, apesar da produção de vários animais em diversos laboratórios, a eficiência deste método ainda é um ponto crítico na aplicação da tecnologia para a produção de proteínas farmacêuticas. A otimização destas técnicas é um desafio para os cientistas envolvidos em biotecnologia da reprodução.

Referências

- Aguilar B, Roche A, Olivera J, Folch J, Alabart JL. Oocyte retrieval after repeated ovum pick-up in unstimulated sheep and goat. In: European Association of Embryo Transfer (EAET), 18, 2002, Kerkrade, The Netherlands. *Proceedings ...* Kerkrade: EAET, 2002. p.130. Resumo.
- Baldassarre H, Wang B, Kafidi N, Keefer C, Lazaris A, Karatzas CN. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and in vitro embryo production technologies. *Theriogenology*, v.57, p.275-284, 2002.
- Battye KM, Fairclough RJ, Cameron AWN, Trounson AO. Evidence for prostaglandin involvement in early luteal regression of the superovulated nanny goat (*capra hircus*). *J Reprod Fertil*, v.84, p.425-430, 1988.
- Bavister BD, Yanagimachi R. The effects of sperm extracts and energy sources on the motility and acrosome reactions of hamster spermatozoa *in vitro*. *Biol Reprod*, v.16, p.228-237, 1977.
- Bordignon, V. Clonagem de animais por transferência nuclear: avanços e desafios. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 17, 2003, Beberibe, CE. *Anais...* Beberibe, CE: SBTE, 2003. p.64-74

- Brebion P, Baril G, Cognié Y, Vallet JC.** Transfert d'embryons chez les ovins et les caprins. *Ann Zootech*, v.41, p.331-339, 1992.
- Carneiro GF, Lorenzo PL, Pimentel CA, Pegoraro LMC, Bertolini M, Ball BA, Anderson GB, Liu IKM.** Influence of insulin-like growth factor-I and its interaction with gonadotropins, estradiol, and fetal calf serum on in vitro maturation and parthenogenic development in equine oocytes. *Biol Reprod*, v.65, p.899-905, 2001.
- Carneiro GF, Munro CJ, Leutenegger CM, Lorenzo PL, Ball BA, Liu IKM.** Potential relevance of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) on in vivo maturation of equine oocytes during follicular growth. *Theriogenology*, v.58, p.685-688, 2002.
- Carneiro GF, Nakazawa M, Castro SBM, Gomes YM.** Efeito do IGF-I na maturação in vitro de oócitos caprinos. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 17, 2003, Beberibe, CE. *Anais ... Beberibe, CE: SBTE*, 2003. p.286. Resumo.
- Chauan MS, Anand SR.** In vitro maturation and fertilization of goat oocytes. *Indian J Exp Biol*, v.29, p.105-110, 1991.
- Cognié Y.** State of art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*, v.51, p.105-116, 1999.
- Cognié Y, Baril G, Poulin N, Mermillod P.** Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*, v.59, p.171-188, 2003.
- Denman J, Hayes M, O'day C.** Transgenic expression of human tissue-type plasminogen activation in goat milk: purification and characterization of the recombinant enzyme. *Biotechnology*, v.12, p.699-702, 1994.
- DeSmedt V, Crozet N, Ahmed-Ali M, Sevellec C.** In vitro maturation and fertilization of goat oocytes. *Theriogenology*, v.37, p.1049-1060, 1992.
- Ebert KM, Selgrath JP, Ditulio P.** Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milks: generation of transgenic goats and analysis of expression. *Biotechnology*, v.9, p.835-838, 1991.
- Ebert KM, Ditulio P, Barry P.** Induction of human tissue plasminogen activator in the mammary gland of transgenic goats. *Biotechnology*, v.12, p.699-702, 1994.
- Edmunds T, Van Patten SM, Pollock J.** Transgenically produced human antithrombin: structural and functional comparison to human plasma derived antithrombin. *Blood*, v.12, p.4561-4571, 1998.
- Fonseca, JF.** Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2005, Goiânia, GO. *Anais... Belo Horizonte, MG: CBRA*, 2005. CD-ROM
- Freitas VJF.** Transgênese na espécie caprina. *Rev Bras Reprod Anim*, v.27, p.109-114, 2003.
- Gonzales-Bulnes A, Santiago-Moreno J, Cocero MJ, Souza CJH, Groome NP, Garcia-Garcia RM.** Measurement of inhibin-A and follicular status predict the response of ewes to superovulatory FSH treatments. *Theriogenology* v.57, p.1263-1272, 2002.
- Gootwine E, Barash I, Bor A.** Factors affecting success of embryo collection and transfer in a transgenic goat program. *Theriogenology*, v.48, p.485-499, 1997.
- Hanada A.** In vitro fertilization in goats. *JPN J Anim Reprod*, v.31, p.21-26, 1985.
- Herrler A, Krusche CA, Beier HM.** Insulin and insulin-like growth factor-1 promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis. *Biol Reprod*, v.59, p.1302-1310, 1998.
- Herrler A, Lucas-Hann A, Niemann A.** Effects of insulin-like growth factor-I on in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*, v.37, p.1213-1224, 1992.
- Izquierdo D, Villamediana P, Paramio MT.** Effect of culture medium on embryo development on pre-pubertal goat IVM-IVF oocytes. *Theriogenology*, v.52, p.847-861, 1999.
- Keskintepe L, Darwish GM, Kenimer AT, Brackett BG.** Term development of caprine embryos derived from immature oocytes in vitro. *Theriogenology*, v.42, p.527-535, 1994.
- Kuhholzer B, Miller S, Treuer A, Seregi J, Besenfelder U, Brem G.** Repeated endoscopic ovum pick-up in hormonally untreated ewes: a new technique. *Theriogenology*, v.48, p.545-550, 1997.
- Lorenzo PL, Illera MJ, Sanchez J, Silvan G, Illera JC, Illera M.** Bovine oocyte maturation and fertilization in vitro with growth factors and estrous cow serum. *Theriogenology*, v.39, p.262, 1993. Resumo.
- Nicolas JF, Delouis C.** Transgenic animals: genetic manipulation of the germ line. In: Thibault C., Levasseur M.C., Hunter R.H.F. *Reproduction in mammals and man*. Paris: Ellipses, 1993. p.757-775.
- Parrish JJ, Sulko-Parrish JL, Leibfried-Rutledge ML, Cristser ES, Eyestone WH, First NL.** Bovine in vitro Fertilization with frozen thawed semen. *Theriogenology*, v.25, p.591-600, 1986.
- Salles HO, Santos DO, Simplício AA.** Superovulação em fêmeas caprinas pré-púberes e púberes da raça Anglo-Nubiana. *Ciência Animal*, v.10, Supl. 1, p.137-138, 2000.
- Salles HO, Soares AT, Moura Sobrinho PA, Moraes MAJ, Andrioli-Pinheiro A, Azevedo HC.** Redução do número de aplicações do flunixin meglumine no controle da regressão pré-matura de corpos lúteos em cabras superovuladas. In: Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária, 24, 1996, Goiânia, GO. *Anais ...Goiânia: Sociedade Goiana de Veterinária*, 1996. p.113-114.
- Simplício AA, Santos DO.** Transferência de embriões em caprinos no Brasil – Estádio atual e perspectivas. In: Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte, 1, 2000, João Pessoa, PB. *Anais ... João Pessoa, PB:*



EMEPA-PB, 2000. p.169-182.

Smith C. Use of embryo transfer in genetic improvements of sheep. *Anim Prod*, v.42, p.81-88, 1986.

Solter D. Mammalian cloning: advances and limitations. *Nat Rev Genet*, v.1, p.199-207, 2000.

Tervit HR. Laparoscopy/laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding. *Anim Reprod Sci*, v.42, p.227-238, 1996.

Tervit HR, Whittingham DG, Rowson LEA. Successful culture *in vitro* sheep and cattle ova. *J Reprod Fertil*, v.30, p.493-497, 1972.

Traldi AS. Superovulação com a gonadotrofina da menopausa humana (hMG) e prevenção da regressão pré-matura dos corpos lúteos em caprinos. 1995. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1995.

Traldi AS, Visintin JA, Gambarini ML. Avaliação do perfil de progesterona na regressão prematura de corpos lúteos em caprinos. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 11, Belo Horizonte, 1995. *Anais...* Belo Horizonte: CBRA, 1995a. p.243. Resumo.

Traldi AS, Visintin JÁ, Mizuta K, Dela Libera AMP. Utilização de antiprostaglandínico na prevenção da regressão prematura de corpos lúteos em caprinos. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 11, Belo Horizonte, 1995. *Anais...* Belo Horizonte: CBRA, 1995., 1995b. p.244. Resumo.

Wilmot I, Schnleke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, v.385, p.810-813, 1997.

Younis AI, Zuelke KA, Harper KM, Oliveira MAL, Brackett BF. *In vitro* fertilization of goat oocytes. *Biol Reprod*, v.44, p.1177-1182, 1991
