

Embriões caprinos produzidos *in vivo* ou *in vitro*: técnicas, problemas e perspectivas

Goats embryos in vivo or in vitro produced: techniques, problems and perspectives

Ney Rômulo de Oliveira Paula^{1,5}, Janaina de Fátima Saraiva Cardoso², Marcos Antônio Lemos de Oliveira³, Vicente José de Figueirêdo Freitas⁴

¹Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

²Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Núcleo de Pós-graduação, Fortaleza, CE, Brasil

³Laboratório de Reprodução Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

⁴Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

⁵Correspondência: neyromulo@hotmail.com

Resumo

Recentes avanços nas biotecnologias reprodutivas em caprinos incluem o incremento dos métodos de produção *in vivo* e *in vitro* de embriões. A produção *in vitro*, utilizando oócitos colhidos por laparoscopia a partir de doadoras valiosas, apresenta um potencial para a obtenção de melhores resultados quando comparados àqueles obtidos a partir da produção *in vivo* de embriões. Contudo, a produção *in vitro* de embriões ainda não é tão eficiente devido à interferência de fatores limitantes que afetam os resultados de cada etapa deste processo. Este artigo aborda diversos fatores que afetam a produção *in vivo* e *in vitro* de embriões caprinos.

Palavras-chave: caprinos, embrião, produção *in vivo* e *in vitro*.

Abstract

Recent advances in reproductive biotechnologies in goats include improvement of methods for *in vivo* and *in vitro* production of embryos. The *in vitro* embryo production using oocytes collected by laparoscopy from valuable donors has the potential to reach better results than those obtained from *in vivo* embryo production. However, *in vitro* embryo production still is not very efficient due to several limiting factors affecting the outcome of each step of the process. This paper discusses factors affecting *in vivo* and *in vitro* embryo production in goats.

Keywords: goat, embryo, *in vivo* and *in vitro* production.

Introdução

Os caprinos são uma espécie de elevada importância econômica pela sua contribuição na produção de carne, leite e pele em diversos países. Segundo o Food and Agriculture Organization - FAO (2003), existem aproximadamente 700 milhões de caprinos distribuídos mundialmente. Destes, cerca de 10,4 milhões compõem o rebanho nacional, e, deste total, 92,4% são explorados na região Nordeste brasileira (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2006).

O considerável crescimento da caprinocultura nacional está transformando o cenário de nossos sistemas produtivos e tem requerido novos conhecimentos técnicos e científicos, nos quais as instituições públicas e privadas vêm desempenhando um papel de fundamental importância. Avanços tecnológicos dirigidos aos diversos segmentos repercutem no aumento da produção animal, sendo que as biotecnologias reprodutivas têm uma atuação direta na obtenção de maior número de animais de elevada qualidade.

A aplicação de tecnologias de reprodução assistida possibilita o incremento do desempenho do melhoramento genético. Algumas dessas técnicas aumentam a seleção diferencial, como a inseminação artificial e a transferência de embriões, enquanto outras aceleram o progresso encurtando, o intervalo entre gerações, como a produção *in vitro* de embriões a partir de animais pré-púberes (Baldassarre e Karatzas, 2004). Estas biotecnologias permitem uma maior produção no número de descendentes daqueles animais de elevado mérito genético do que seria possível pela reprodução natural. Além disso, em combinação com a sincronização hormonal do estro e da ovulação, algumas dessas técnicas permitem a produção de crias e de leite em períodos do ano que não coincidem com a época da estação natural de cobrição de diversas espécies que possuam anestro estacional como a cabra (Corteel *et al.*, 1988).

Em caprinos, a transferência de embriões (TE) é uma técnica de manejo de reprodução que ainda está em fase de consolidação no Brasil, tendo como um dos seus objetivos maximizar o potencial reprodutivo da fêmea, explorando seu potencial biológico ao extrapolar suas possibilidades naturais. A extensão pela qual a transferência de embriões é utilizada em caprinos é, principalmente, limitada pelo pequeno porte do animal, tornando impossíveis as manipulações retais, pela complexidade anatômica da cérvix e pelo custo da técnica. Essa biotécnica envolve algumas etapas que englobam desde a seleção dos animais até a inovulação. O perfeito funcionamento de cada uma dessas etapas será responsável pelo sucesso final de todo o processo. Portanto, é

necessário dominar cada uma das etapas de acordo com as características e os problemas inerentes.

A presente revisão objetiva documentar os recentes avanços que tornam a produção *in vivo* e *in vitro* de embriões caprinos mais efetiva, bem como relatar as taxas de sucesso e os “gargalos” desses dois processos. Finalmente, serão apresentadas as perspectivas de uso dessas técnicas em programas de seleção e em práticas comerciais.

Produção *in vivo* de embriões

A produção *in vivo* de embriões consiste em se obter um elevado número de embriões a partir de uma única doadora após as etapas de estimulação ovariana, fecundação e colheita embrionária.

A superovulação seguida de transferência de embriões tem sido considerada como o procedimento mais frustrante dentre as tecnologias de reprodução assistida, uma vez que os resultados podem variar de um completo fracasso a um total sucesso sem variação alguma no padrão das metodologias utilizadas (Baldassarre e Karatzas, 2004). Os principais fatores que contribuem para a imprevisibilidade dessa técnica são variabilidade da resposta superovulatória, baixas taxas de fertilização associada a uma elevada resposta ovulatória e regressão prematura do corpo lúteo (Cognié *et al.*, 2003). Esses resultados imprevisíveis, associados a altos custos, e o uso de procedimentos cirúrgicos para colheita e transferência dos embriões têm impedido a utilização em larga escala da produção *in vivo* de embriões nos programas de melhoramento genético do rebanho caprino (Baldassarre e Karatzas, 2004).

A seguir serão abordadas as seguintes etapas: sincronização do estro, superovulação, fecundação e colheita embrionária das doadoras.

Sincronização do estro e superovulação de doadoras

Os tratamentos hormonais para sincronização e/ou indução do estro têm sido utilizados como auxílio para a inseminação artificial (IA) e para a redução dos efeitos estacionais na reprodução em caprinos. As duas possibilidades são: indução da luteólise em fêmeas cíclicas com prostaglandinas ou seus análogos e a administração de progesterona ou progestágeno com o objetivo de simular a fase luteal (Freitas *et al.*, 2004).

O método mais freqüente para sincronização do estro de cabras utiliza esponjas vaginais impregnadas com 45mg de acetato de fluorogestona (FGA), durante 11 dias, associadas à estimulação ovariana por 400 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG) e 50µg de cloprostenol por via intramuscular (Freitas *et al.*, 1997).

Outros progestágenos são utilizados para a sincronização do estro em cabras, como esponjas vaginais impregnadas com acetato de medroxiprogesterona (MAP) ou o dispositivo CIDR impregnado de progesterona (Greyling e Van Niekerk, 1991; Ritar *et al.*, 1990). Cabras aparentam responder similarmente ao tratamento com esponjas ou CIDR, mas a administração de gonadotrofinas é necessária para estimular a atividade ovulatória (Ritar, 1993).

A superovulação pode ser definida como o processo pelo qual é recrutado e selecionado, até chegar à ovulação, um número maior de folículos do que o número geneticamente estabelecido durante um ciclo sexual natural. Dois fatores são sugeridos como determinantes na resposta ovariana: (1) fatores exógenos, relacionados especificamente com o tipo e a forma de administração das gonadotrofinas; e (2) fatores endógenos, relacionados com o “status” ovariano do animal no início da superovulação que interfere no número de folículos responsíveles às gonadotrofinas (Cognié, 1999).

De acordo com Cognié (1999), a primeira gonadotrofina usada para superovulação foi a gonadotrofina coriônica equina, administrada por via intramuscular em única injeção de 1000 a 2000 UI, aplicada um ou dois dias antes do final do tratamento progestágeno. A ação prolongada desse hormônio pode resultar em uma alta incidência de folículos não ovulatórios junto com elevados níveis de estradiol produzidos por esses folículos, gerando modificações endócrinas desfavoráveis ao transporte dos gametas nas vias genitais. A gonadotrofina coriônica equina tem como vantagens a aplicação simplificada, o baixo custo e a facilidade de obtenção. As suas principais desvantagens são: resultados heterogêneos, variabilidade entre partidas, meia-vida longa, possibilidade de reações anafiláticas, maior incidência de cistos ovarianos, número significativo de embriões degenerados e formação de anticorpos antigonadotrofina coriônica equina (Baril *et al.*, 1993).

Atualmente, o principal hormônio utilizado em programas de superovulação em caprinos é o hormônio folículo estimulante (FSH), extraído da pituitária de suínos (pFSH) ou ovinos (oFSH). Para Cognié (1999), em revisão sobre o tema, o FSH tem se mostrado superior à gonadotrofina coriônica equina em termos de taxas de ovulação e fertilização e em produção de embriões de boa qualidade. O autor cita como tratamento padrão seis a oito injeções com 12 horas de intervalo, iniciadas dois ou três dias antes da remoção do progestágeno. A dose total irá depender da raça trabalhada (Gordon, 1997).

Extratos purificados de oFSH (Ovagen® - Immuno Chemical Products, Nova Zelândia) e de pFSH (Folltropin® - Vetrepharm, Canadá e Pluset®, Espanha) estão disponíveis no mercado. Em relação ao pFSH, este é administrado em doses decrescentes e também enriquecido em pLH (FSH/LH de 0,3:0,4) nas duas últimas injeções: ao final do tratamento com progestágeno e 12 h depois (Baril *et al.*, 1996).

Na cabra superovulada, as primeiras ovulações são observadas em média $62,4 \pm 6,0$ h após a retirada das esponjas, e observa-se um intervalo de 12 h entre a primeira e a última ovulação (Cognié e Baril, 2002). Segundo Brebion *et al.* (1992), após o tratamento com pFSH, somente 17 a 20% de fêmeas tratadas apresentam mais de 20 ovulações, no entanto 10% das cabras Alpinas e Saanen são eliminadas da colheita de embriões devido à baixa resposta superovulatória (média de cinco ovulações). Desta forma, a variabilidade na resposta ovulatória das doadoras tem dificultado a programação precisa do número de fêmeas receptoras, bem como limitado o desenvolvimento da transferência de embriões. A população folicular no momento ou início da estimulação ovariana é o principal fator de variação na resposta ao FSH (Cognié, 1999). Neste sentido, têm-se procurado diversas alternativas objetivando o controle dessa população folicular.

A primeira alternativa consiste em aumentar a concentração de gonadotrofinas endógenas das doadoras, limitando a retroalimentação negativa do ovário sobre o eixo hipotalâmico-hipofisário por imunização ativa contra a androstenediona ou contra a inibina. Essa alternativa, que permite aumentar o número de ovulações e a prolificidade das fêmeas imunizadas, não diminuiu a variabilidade na resposta ao tratamento superovulatório e foi abandonada (Cognié, 1999).

Uma outra estratégia consiste em estimular a síntese de fator de crescimento da insulina - 1 (IGF-1), a fim de aumentar a população de folículos recrutáveis pela administração de somatotrofina (hormônio do crescimento - GH) na semana que antecede a estimulação gonadotrófica. Porém, as cabras que foram tratadas nessas condições com hormônio do crescimento não tiveram a resposta ovariana melhorada (Cognié e Baril, 2002).

Finalmente, uma outra possibilidade consiste em aumentar o número de folículos com tamanho de um a dois milímetros (mm) de diâmetro, os quais ainda não dependem de gonadotrofinas, enquanto se inibe as secreções endógenas de LH e FSH. É possível bloquear de maneira reversível a secreção de gonadotrofinas, seja por uma dessensibilização hipofisária ao GnRH com um agonista (40µg/dia de buserelina – Receptal[®], Intervet) administrada durante duas semanas, ou mais diretamente por um antagonista (0,5mg/dia de antarelix, Teverelix[®], Europeptides) administrado durante 10 dias antes do início da estimulação gonadotrófica. Após esse tratamento, o número de folículos de 1 a 2mm é dobrado, a taxa de atresia folicular é reduzida significativamente nessa classe, e a resposta ao tratamento de superovulação aumenta em 50% (Brebion *et al.*, 1992).

A formação de anticorpos anti-FSH poderia ser a causa da redução na resposta ovulatória como demonstrado em cabras tratadas repetidamente com pFSH. Nestes animais foi observada uma forte correlação negativa entre o título de anticorpos e o número de ovulações (Remy *et al.*, 1991). Porém, repetidos tratamentos com oFSH não provocam redução do número de ovulações em cabras doadoras (Fig.1; Baril *et al.*, 1995).

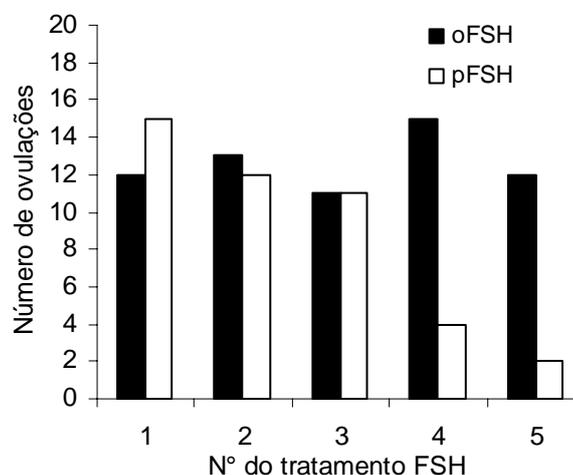


Figura 1. Número de ovulações em cabras superovuladas com oFSH ou pFSH.

Fonte: (Baril *et al.*, 1995).

A regressão prematura do corpo lúteo é um dos mais relevantes problemas verificados em cabras superovuladas. Esse fenômeno parece estar ligado à ação da cicloxigenase e posterior atividade de prostaglandinas sobre o corpo lúteo, como sugerido por Gilbert *et al.* (1990). Com o intuito de prevenir a ação da cicloxigenase e conseqüentemente de uma luteólise prematura, Lopes Jr *et al.* (2004) sugerem a utilização do flunixin-meglumine, um potente inibidor dessa enzima, após o tratamento superovulatório em caprinos, a fim de se obterem melhores resultados nos programas de transferência de embriões. Também com o intuito de prevenir a regressão lútea precoce em cabras superovuladas, Soares (1996), ao testar três doses de flunixin-meglumine, a fim de avaliar sua real eficácia, bem como a dose de custo mais efetiva, relata que a dose de 1,1 mg/kg de peso vivo apresenta os melhores resultados.

Fecundação das doadoras

Basicamente, doadoras caprinas de embriões têm sido fecundadas por três métodos: monta natural, IA transcervical e IA intra-uterina guiada por laparoscopia.

Nas cabras superovuladas, a baixa taxa de fertilização pode, em parte, ser devido a um transporte inadequado dos espermatozoides após sincronização do estro, bem como à inadequada sincronia entre o momento da inseminação e das ovulações. O primeiro desses problemas pode ser evitado pela utilização da inseminação intra-uterina. Um controle mais preciso do momento da ovulação é possível bloqueando a descarrega endógena de LH por antagonistas de GnRH, administrados 12 a 24 horas após a retirada do progestágeno. No dia seguinte, a injeção de pLH mimetiza o pico pré-ovulatório e permite uma inseminação programada 16 horas mais tarde (Baril *et al.*, 1996).

A taxa de fertilização é frequentemente inferior nas fêmeas que apresentam uma resposta ovulatória elevada, exceto no caso de uso de sêmen fresco por via intra-uterina (Tab. 1; Cognié e Baril, 2002).

Tabela 1. Taxa de fecundação de oócitos (%) em função do método de fecundação e da resposta superovulatória em cabras Alpinas e Saanen.

Método de fecundação das cabras doadoras	Número de ovulações		Total
	< 15	≥ 15	
Monta natural (2 coberturas/cabra)	82 ^a (335/44)	72 ^a (889/65)	75 (1224/109)
IA cervical (2 IA – 400x10 ⁶ spz/cabra)	66 ^a (371/59)	47 ^b (487/39)	55 (858/98)
IA intra-uterina / endoscópica Sêmen congelado: 1 IA – 200x10 ⁶ spz/cabra	63 ^a (467/74)	52 ^a (1031/79)	55 (1498/153)
Sêmen fresco: 1 IA – 200x10 ⁶ spz/cabra	68 (431/69)	65 (712/57)	66 (1143/126)

Estruturas colhidas / cabras doadoras. a vs b: p <0,001.

Fonte: Cognié e Baril, 2002.

Colheita de embriões

A colheita de embriões em caprinos é realizada entre o sexto e sétimo dia pós-estro, sendo que os procedimentos de colheita utilizados nessa espécie têm sido pouco aperfeiçoados quando comparados àqueles descritos por Hunter *et al.* (1955). A colheita de embriões pode ser realizada pelos métodos cirúrgico (laparotomia), semicirúrgico (laparoscopia) ou não-cirúrgico (transcervical).

Laparotomia

Em caprinos, devido à impossibilidade de se manusear os cornos uterinos e a cérvix por palpação retal, o método de colheita mais utilizado ainda é a laparotomia (Tervit *et al.*, 1983; Kraemer, 1989; Ishwar e Memon, 1996). Essa técnica consiste em um método cirúrgico e apresenta alguns entraves como consequência do seu uso sucessivo, quais sejam: desenvolvimento de aderências de ovários, trompas e cornos uterinos entre si e com órgãos adjacentes ao sistema genital (Andrioli-Pinheiro, 1993), estresse da anestesia e da cirurgia, alto custo e uso limitado da doadora por apenas duas a quatro vezes. Esta última característica inviabiliza o termo “doadora permanente”.

A técnica consiste em anestésiar o animal e realizar uma incisão na linha alba para posterior exteriorização dos cornos uterinos. A lavagem deve ser realizada com 40 mL de tampão salino fosfatado (PBS) para cada corno uterino, na temperatura de 37°C e no sentido da bifurcação uterina em direção à junção útero-tubárica, onde se encontra um cateter para colheita do lavado. Senlis (1990) observou taxas de recuperação por essa técnica de 71%, 65% e 42%, para a primeira, segunda e terceira ordem de repetição, ressaltando, dessa forma, os efeitos deletérios pela execução continuada da técnica.

Laparoscopia

A colheita de embriões por laparoscopia possibilitou a ampliação do uso da transferência de embriões em caprinos, tornando a laparotomia uma técnica imprópria para uso, a médio e longo prazo, em especial nas doadoras de alto valor genético. Também chamada de semicirúrgica, essa técnica consiste em realizar três pequenas punções na cavidade abdominal próximo ao úbere, onde são introduzidos a pinça atraumática, o endoscópio e a sonda de lavagem.

Apesar de a taxa de colheita ser menor que pelo método cirúrgico convencional (10 a 15% a menos), a

eficácia da colheita de embriões por laparoscopia não é diminuída entre ordens de colheita. Taxas de recuperação de 63,2%, 62,3% e 60,7% para a primeira, segunda e da terceira à sétima colheita, nesta ordem, têm sido descritas ao se realizar a colheita de embriões caprinos por laparoscopia (Vallet *et al.*, 1987). Contudo, apesar da menor taxa de colheita obtida por laparoscopia e dessa técnica necessitar de pessoal capacitado, cada doadora pode ser submetida à colheita por mais de sete vezes sem graves problemas de aderência.

Andrioli-Pinheiro (1993), comparando os métodos de colheita por via transcervical, laparoscopia e laparotomia, observou maior taxa de recuperação embrionária obtida por laparoscopia (81,1% em relação ao número de corpos lúteos normais). Contudo, as taxas de recuperação de embriões sofreram influência de diversos fatores, como presença de corpos lúteos regredidos, taxa de ovulação e presença de aderências no sistema genital; esta última mais evidente quando do uso da colheita por laparotomia.

Transcervical

Visando minimizar os traumas e diminuir os custos decorrentes da técnica cirúrgica, além de assegurar a colheita de embriões em uma mesma doadora por várias vezes, procurou-se adaptar ao caprino a técnica de colheita pela via cervical (Flores-Foxworth *et al.*, 1992; Paula *et al.*, 2003), utilizada com êxito nos bovinos. Todavia, uma das dificuldades do uso dessa técnica é o diâmetro estreito do canal cervical da cabra, restringindo a passagem do cateter. Várias técnicas vêm sendo usadas com o objetivo de facilitar esse processo.

Para a realização dessa técnica, os animais devem ser anestesiados pela via epidural e contidos em brete de contenção apropriado. Por meio de um espéculo com fonte luminosa, visualiza-se a cérvix e, após o tracionamento e a fixação desta, introduz-se uma sonda de três vias guiada por um cateter de aço inoxidável, infla-se o balão, inicia-se a lavagem uterina com PBS por uma das vias e o seu recolhimento em filtro de colheita.

Bondurant *et al.* (1984) divulgaram a primeira colheita de embriões em cabras leiteiras pela via transcervical. Goel *et al.* (1995) descreveram a colheita de embriões pela via transcervical em 15 cabras e, em 14 delas (93,3%), a cérvix foi permeável ao cateter, apresentando 70% de taxa de recuperação da solução de lavagem. Sohnrey e Holtz (2000) obtiveram 95% de permeabilidade ao cateter em cabras Boer submetidas a essa técnica. Já com cabras da raça Saanen, Lima-Verde *et al.* (2003) obtiveram 61,5% de taxa de sucesso na passagem do cateter pela cérvix. A utilização das prostaglandinas (E_1 , E_2 e $F_{2\alpha}$) isoladamente ou associada ao cipionato de estradiol algumas horas antes da colheita tem favorecido a permeabilidade da cérvix ao cateter ou sonda de colheita (Van Niekerk *et al.*, 1990; Pereira *et al.*, 1998), além de não afetar a viabilidade embrionária.

Lima *et al.* (1996), trabalhando com cabras sem raça definida (SRD), descreveram taxas de colheita pela via transcervical de 48,2% e 46,8% com as fêmeas em estação e em decúbito dorsal, respectivamente. Lima-Verde *et al.* (2003) obtiveram, com cabras Saanen, uma taxa de colheita de 53,2%. Em cabras Boer, Sohnrey e Holtz (2000) obtiveram 79% de taxa de recuperação com aplicação de prostaglandina $F_{2\alpha}$ (PGF $_{2\alpha}$) oito horas antes das lavagens. Uma taxa de recuperação de 89,5% e um número médio de 3,6 embriões colhidos por fêmea submetida à colheita transcervical em cabras Shiba pluríparas foram descritos por Nagashima *et al.* (1987). Utilizando o mesmo protocolo descrito por Sohnrey e Holtz (2000), Pereira *et al.* (1998) obtiveram taxas de recuperação embrionária de 91%, tanto para 16 quanto para oito horas antes das colheitas pela técnica transcervical. Os mesmos autores descrevem como desvantagem desse método o tempo requerido para as lavagens, o qual foi de aproximadamente 45 minutos para cada fêmea. Parece óbvio o efeito da raça sobre o sucesso dessa técnica, indicando que diferenças anatômicas da cérvix podem dificultar a execução da mesma.

Produção *in vitro* de embriões

A produção *in vitro* de embriões envolve as etapas de colheita, maturação e fecundação de oócitos, bem como cultivo ou co-cultivo de zigotos e estruturas embrionárias. É uma biotécnica utilizada, alternativamente, para acelerar a produção de animais geneticamente superiores e impedir, pela aspiração *in vivo* de folículos, o descarte precoce de fêmeas geneticamente privilegiadas portadoras de alterações adquiridas que impedem que a reprodução ocorra de forma natural ou até mesmo pela transferência de embriões (Gonçalves *et al.*, 2002).

Recentes avanços na maturação oocitária e no desenvolvimento embrionário têm conduzido a um progresso substancial dos sistemas de produção *in vitro* de embriões caprinos (Cognié *et al.*, 2004).

Fontes de oócitos

Ovários oriundos de abatedouro constituem uma abundante fonte de oócitos para a colheita do conteúdo folicular por aspiração, permitindo a obtenção média de um a dois complexos *cumulus*-oócito (CCO) utilizáveis por ovário (Cognié, 1999). Um incremento de quatro a cinco oócitos pode ser obtido após fatiamento do ovário com auxílio de uma lâmina de navalha, mas esses oócitos são oriundos de pequenos folículos que são menos aptos a se desenvolver após a fertilização *in vitro* (Cognié e Baril, 2002). Essa fonte de oócitos é bastante apropriada para pesquisas científicas, porém é inadequada para a utilização em animais de elevado valor genético, bem como devido ao desconhecimento das condições sanitárias dos animais utilizados (Cognié *et al.*,

2004) que pode ter como consequência o aumento da incidência de diversas doenças no rebanho receptor dos embriões produzidos a partir dessa fonte de oócitos.

A recuperação de oócitos de animais vivos pode ser realizada por laparotomia ou laparoscopia. A colheita de oócitos guiada por laparoscopia em cabras (Aguilar *et al.*, 2002) resulta na recuperação de quatro a seis oócitos por fêmea em cada sessão.

Ao contrário da espécie bovina em que a punção folicular é praticada rotineiramente, poucas equipes no mundo utilizam esse método em caprinos.

Para cabras pré-púberes estimuladas por uma combinação de FSH e gonadotrofina coriônica eqüina 36 horas antes da colheita laparoscópica, o número mais elevado de oócitos colhidos em relação ao de cabras adultas doadoras (Tab. 2; Baldassarre *et al.*, 2002) compensa, em parte, a baixa viabilidade de embriões oriundos dessas fêmeas obtidos após fertilização *in vitro* (Baldassarre *et al.*, 2002). Apesar disso, foi observado um desenvolvimento a termo aceitável de embriões produzidos *in vitro* e transferidos, utilizando oócitos colhidos a partir de cabras pré-púberes (Tab. 3; Baldassarre e Karatzas).

Tabela 2. Número (média \pm desvio padrão) de folículos puncionados e de oócitos colhidos por laparoscopia após estimulação gonadotrófica* de cabras Alpinas e Saanen em diferentes idades.

Parâmetro	Idade		
	2 - 3 meses	3 - 5 meses	Adulta
Número de fêmeas	20	36	21
Número de folículos puncionados por fêmea	59 \pm 6 ^a	34 \pm 3 ^b	19 \pm 1 ^c
Número de oócitos colhidos por fêmea	50 \pm 5 ^a	27 \pm 2 ^a	16 \pm 2 ^c
Taxa de colheita (%)	84	80	84

* 80mg pFSH + 300 IU eCG em única aplicação 36 ou 48 h antes da colheita por laparoscopia.

a vs b: $p < 0,001$; b vs c: $p < 0,01$.

Fonte: Baldassarre *et al.*, 2002.

Tabela 3. Propagação precoce de cabras de elevado valor genético: efeito da idade da doadora na época da colheita por laparoscopia sobre a eficiência da fertilização *in vitro*.

Variável / Idade no momento da colheita	<100 dias	>180 dias	Valor de p
Número de doadoras	5	5	n/a
Folículos aspirados (média \pm desvio padrão)	57,0 \pm 16	28,0 \pm 5	<0,05
Oócitos recuperados (média \pm desvio padrão)	41,0 \pm 9	25,8 \pm 6	<0,05
Embriões transferidos	139	105	n/a
Embriões transferidos/oócitos recuperados (%)	67,8 %	81,4 %	<0,01

n/a: não analisado.

Fonte: Baldassarre e Karatzas, 2004.

Utilizando o mesmo protocolo anteriormente descrito, porém sem a necessidade de sincronizar os ciclos estrais com progestágenos, cabras pré-púberes são capazes de produzir, em média, quase duas vezes mais oócitos por sessão de colheita laparoscópica do que cabras adultas (Tab. 4; Koeman *et al.*, 2003). Estudos anteriores revelaram que a resposta folicular é maximizada em cabras pré-púberes com idade superior a três meses (Tab. 5; Baldassarre *et al.*, 2002).

Tabela 4. Número médio (\pm desvio padrão) de folículos puncionados e oócitos colhidos por laparoscopia em cabras doadoras adultas e pré-púberes (3-5 meses de idade).

Tipo da doadora	Nº de fêmeas	Folículos	Oócitos	Taxa de colheita (%)
Pré-púberes	23	39 \pm 4,5 ^a	28,4 \pm 3,5 ^a	73
Adultas	21	19 \pm 1,4 ^b	15,9 \pm 1,5 ^b	84

a vs. b: $p < 0,01$.

Fonte: Koeman *et al.*, 2003.

Tabela 5. Número médio (\pm desvio padrão) de folículos puncionados e oócitos colhidos por laparoscopia na primeira colheita em cabras doadoras pré-púberes em duas diferentes faixas etárias.

Idade (dias)	Nº de fêmeas	Folículos	Oócitos	Taxa de colheita (%)
60-90	20	59,3 \pm 28 ^a	49,7 \pm 24 ^a	84
90-150	36	34,4 \pm 20 ^b	27,4 \pm 14 ^b	80

a vs. b: $p < 0,001$.

Fonte: Baldassarre *et al.*, 2002.

Repetidas colheitas laparoscópicas de oócitos seguidas de fertilização *in vitro* e cultivo dos zigotos até o estágio de blastocisto possibilitam a obtenção de um grande número de embriões e conseqüente aumento na progênie de fêmeas de elite, quando comparado à produção de embriões *in vivo*. Essas técnicas permitem produzir, em tempo relativamente curto, mais embriões a partir de uma mesma fêmea. A punção folicular também é menos invasiva e mais simples que a colheita de embriões dos cornos uterinos, pode ser repetida em um número maior de vezes sem a necessidade de um tratamento hormonal (Besenfelder *et al.*, 1999) e é eficiente em diferentes estádios fisiológicos (pré-puberdade ou início da gestação) em que a produção *in vivo* de embriões é impossível. Em especial na espécie caprina, essa abordagem permite a eliminação do problema da regressão prematura dos corpos lúteos encontrada em uma porcentagem elevada das fêmeas superovuladas (Cognié e Baril, 2002).

Outra possibilidade de fonte oocitária de caprinos é a punção *in vivo* de folículos, por meio de uma agulha acoplada a uma bomba de vácuo, guiada por ultra-sonografia transvaginal (Fig. 2; Graff *et al.*, 1999). Pelo uso desse método, Graff *et al.* (1999) obtiveram entre 60 e 78% da taxa de colheita oocitária. No entanto, esse método ainda é pouco utilizado em caprinos e vem sendo alvo de estudos para seu aprimoramento e futura utilização em larga escala.

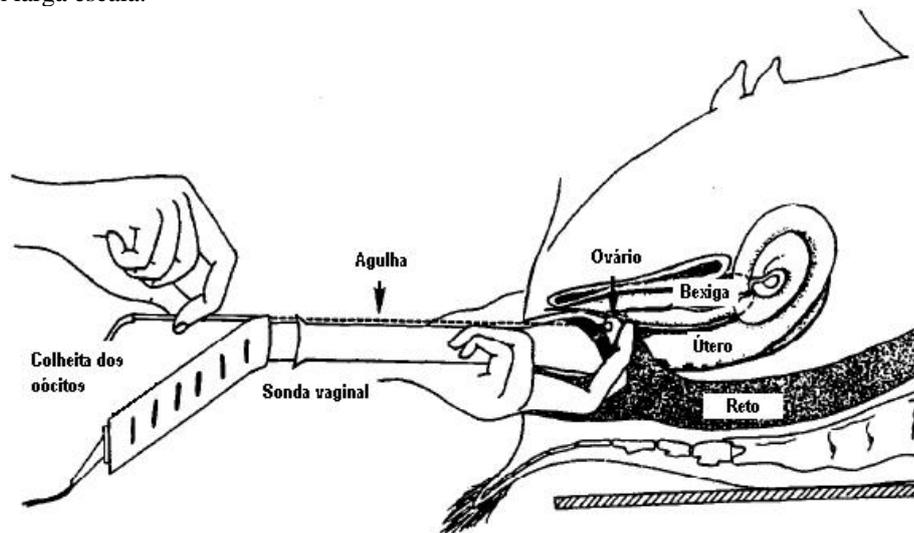


Figura 2. Punção folicular guiada por ultra-sonografia em cabras.
Fonte: GRAFF *et al.*, 1999.

Maturação *in vitro* (MIV)

Para melhorar o rendimento da maturação *in vitro* dos oócitos, são desenvolvidas duas estratégias. A primeira consiste na tentativa de selecionar oócitos que tenham adquirido a aptidão ao desenvolvimento, e a segunda consiste em adaptar melhor o meio de maturação às necessidades dos oócitos.

Após fertilização *in vitro* e cultivo durante uma semana, 60 a 70% dos oócitos ovulados (maturação *in vivo*) se desenvolvem até o estágio de blastocisto, enquanto a taxa de desenvolvimento é de apenas 35 a 50% para os oócitos maturados *in vitro* (Cognié e Baril, 2002).

A competência do oócito em retomar a meiose espontaneamente (maturação nuclear) fora do folículo é adquirida quando este é oriundo de folículo de diâmetro superior a dois milímetros. Então, a aquisição da competência para o desenvolvimento (maturação citoplasmática) aumenta progressivamente com o tamanho do folículo ovariano do qual o oócito é obtido (Fig. 3; Cognié e Baril, 2002). *In vivo*, a competência para o desenvolvimento oocitário é influenciada por seu ambiente folicular (Mermillod *et al.*, 1999), sendo este regulado pelo nível pulsátil de LH durante a fase folicular (Oussaid *et al.*, 1999). Na cabra, os oócitos de folículos maiores que cinco milímetros de diâmetro têm maior competência para o desenvolvimento após fertilização na estação sexual do que no período de anestro estacional ou do que aqueles oriundos de folículos de menor tamanho (Fig. 3; Cognié e Baril, 2002).

Para melhorar o meio de maturação, a identificação precisa de fatores foliculares que regulam a aquisição da competência para o desenvolvimento oocitário permanece ainda pouco conhecida, embora exista uma possível lista de candidatos, tais como fatores de crescimento, hormônios ou peptídeos intra-ovarianos (Bevers *et al.*, 1997).

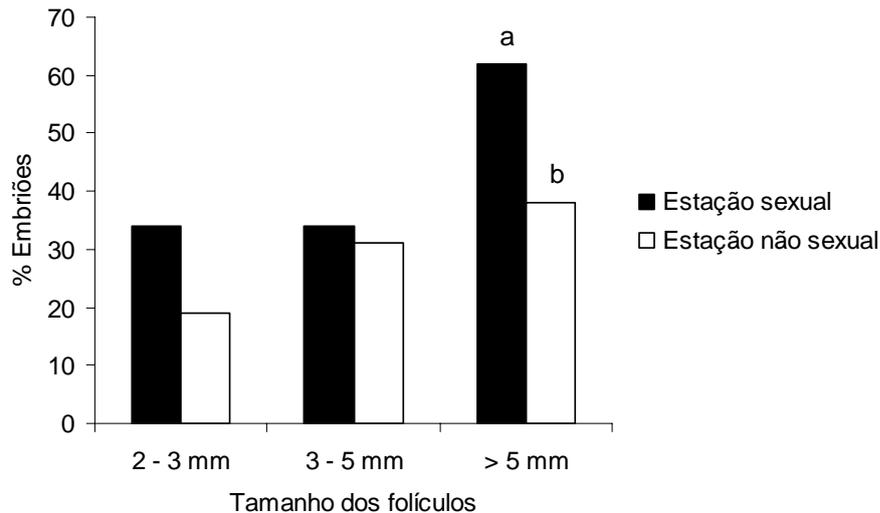


Figura 3. Influência do tamanho do folículo puncionado e da estação sobre o desenvolvimento embrionário *in vitro* de caprinos. a vs. b: $p < 0,05$.

Fonte: Cognié e Baril, 2002.

O modelo inicialmente proposto para a maturação oocitária consiste em co-cultivar durante 24 horas os complexos *cumulus*-oócito com as células da granulosa em um meio suplementado com FSH, LH, estradiol e soro fetal bovino em condições não estáticas. O sistema foi simplificado em meio suplementado somente com 10% de fluido folicular e 100 ng/mL de oFSH. Estudos conduzidos em alguns laboratórios parecem indicar que o fluido folicular pode ser substituído com sucesso por um meio definido contendo 10 ng/mL de fator de crescimento epidermal (EGF) e 100 μ M de cisteamina que estimula a síntese da glutatona implicada, após a fertilização, na descondensação da cabeça do espermatozóide e formação do pronúcleo masculino. Nessas condições de maturação, após a fertilização *in vitro* e sete dias de cultivo, em média 50% dos oócitos caprinos se desenvolvem até blastocisto (Fig. 4; Cognié e Baril, 2002).

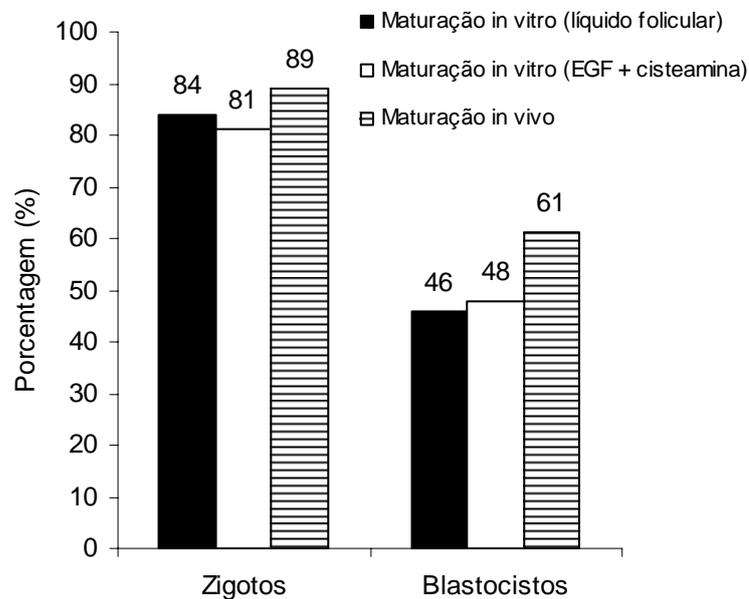


Figura 4. Percentagem média de zigotos e blastocistos após maturação de oócitos *in vitro*, em líquido folicular ou na presença de EGF com Cisteamina, ou *in vivo*.

Fonte: Cognié e Baril, 2002.

A adição de cisteamina ao meio de maturação *in vitro* aumenta os níveis intracelulares de glutatona de oócitos oriundos de cabras pré-púberes e eleva significativamente sua competência de desenvolvimento *in vitro* (Rodriguez-Gonzalez *et al.*, 2003). Durante a maturação oocitária, a taxa de embriões clivados 17 h pós-IA é menor quando a cisteamina está presente (12% vs. 18%: $p < 0,02$), e esses embriões que clivam muito

precocemente apresentam menores taxas de blastocistos iniciais do que aqueles embriões que clivaram entre 18 e 24 horas pós-IA (Tab. 6; Cognié *et al.*, 2004).

Tabela 6. Efeito do intervalo da inseminação à primeira clivagem na habilidade de desenvolvimento *in vitro* no dia 9 pós-IA de oócitos caprinos maturados com (+) ou sem (-) 100 µM de cisteamina.

Intervalo IA-clivagem (h)	Cisteamina	% Clivados (n)	Blastocistos (n)	Eclodidos (%)
< 17	+	12 ^c (51)	35	33
	-	18 ^d (76)	18	14
	Total	15 (127)	25 ^a	25 ^a
18-24	+	52 (221)	60	76
	-	46 (192)	37	54
	Total	49 (413)	49 ^b	69 ^b
25-40	+	36 (154)	55	38
	-	36 (151)	31	35
	Total	36 (305)	43 ^b	37 ^a

a vs. b: p<0,001; c vs. d: p<0,02.

Fonte: Cognié *et al.*, 2004.

A maturação oocitária permanece ainda como o principal entrave para produção *in vitro* de embriões, no entanto o desenvolvimento de novas metodologias que promovam adequadas maturações citoplasmática e nuclear é de fundamental importância para o sucesso da produção *in vitro* de embriões caprinos.

Capacitação espermática e fecundação *in vitro* (FIV)

Atualmente existem três diferentes métodos de seleção espermática: (1) gradiente de Percoll, que consiste na centrifugação do sêmen através da passagem por diferentes gradientes para permitir a separação dos espermatozoides potencialmente férteis dos demais constituintes do sêmen, baseado na diferença de densidade (Gonçalves *et al.*, 2002); (2) *swim-up*, onde os espermatozoides potencialmente férteis são separados dos potencialmente inférteis, do plasma seminal e dos componentes dos diluidores pela motilidade ascendente (Gonçalves *et al.*, 2002) e (3) *glass-wool*, onde os espermatozoides são selecionados por filtração, semelhante à utilizada para fertilização *in vitro* em humanos (Rho *et al.*, 2001).

Em caprinos, a centrifugação em gradiente de Percoll resultou em melhores taxas de clivagem, formação de blastocistos, bem como em um maior número de células de blastocistos quando comparado aos demais métodos (Tab. 7; Rho *et al.*, 2001).

Tabela 8. Efeito da heparina (5 µg/mL) na fertilização *in vitro* caprina (clivagem e taxa de blastocisto a partir do total de oócitos) utilizando diferentes partidas de soro de ovelha em estro para a capacitação espermática.

Grupo de soro	Heparina	Nº oócitos	% clivagem 24 h pós-IA	% clivagem 40 h pós-IA	Blastocistos
1	-	31	10 ^c	39 ^a	7
	+	39	31 ^d	74 ^b	23
2	-	32	6 ^a	53 ^c	13
	+	34	35 ^b	79 ^d	27
3	-	33	36	85	30
	+	38	45	89	34

a vs. b: p<0,01; c vs. d: p<0,05.

Fonte: Cognié *et al.*, 2004.

O protocolo que vem sendo mais utilizado atualmente é a indução da capacitação espermática, após descongelamento e centrifugação em gradiente de Percoll, pela incubação durante uma hora em meio suplementado com 10% de soro de ovelha em estro (Cognié *et al.*, 2003).

Segundo Cognié *et al.* (2004), quando uma boa partida de soro de ovelha em estro não estiver disponível para a capacitação espermática do sêmen congelado de bode (grupos 1 e 2 da Tab. 8; Cognié *et al.*, 2004), a penetração do espermatozoide no oócito tem sido melhorada pela suplementação do meio de capacitação com 5 µg/mL de heparina (Tab. 8; Cognié *et al.*, 2004). Uma alternativa para o sêmen fresco é a incubação por 15 min em meio de capacitação contendo 0,5 mM de 8-bromo-AMPC, 10 µg/mL de heparina e 100 nM de

ionomicina (Wang *et al.*, 2002).

Tabela 9. Taxa de gestação e sobrevivência embrionária (crias nascidas/embriões transferidos) após transferência de embriões caprinos frescos produzidos *in vivo* ou *in vitro*.

Método de produção dos embriões	Receptoras			Gestação		Sobrevivência embrionária	
	Nº	embriões	%	Nº	%	Nº	
<i>In vitro</i>	18	36	61 ^a	11	47 ^c	17	
<i>In vivo</i>	19	38	89 ^a	17	71 ^d	27	

a vs b; c vs d: $p < 0,05$.

Fonte: COGNIÉ *et al.*, 2001.

Em determinados laboratórios, os oócitos maduros são colocados em contato durante 17 horas com os espermatozoides ($10^6/\text{mL}$) em meio Fluido Sintético de Oviduto (SOF), sob óleo mineral e em uma atmosfera a 5% de CO_2 mantido a $38,5^\circ\text{C}$, e em média 75 a 80% de zigotos normalmente fecundados são obtidos na rotina (Cognié *et al.*, 2004).

Esse período de 17 horas de incubação dos oócitos com os espermatozoides foi originalmente estabelecido por questões práticas. Contudo, após quatro horas de co-incubação dos oócitos caprinos com os espermatozoides capacitados, a taxa de clivagem e a de blastocistos são similares às 17 h de co-incubação (Cognié *et al.*, 2003). Nesse contexto, estudos são necessários para determinar se a redução do período de interação espermatozoide-oócito e, conseqüentemente, a remoção dos potenciais danos oriundos dos produtos provenientes do metabolismo espermático (como os radicais livres) e soro, afetam o desenvolvimento embrionário e melhoram as taxas de implantação após transferência embrionária nos animais domésticos, como tem sido observado para fertilização *in vitro* humana (Gianaroli *et al.*, 1996).

Na fertilização *in vitro* caprina, tem-se observado que muitos embriões que clivam precocemente apresentaram baixas taxas de desenvolvimento (Cognié *et al.*, 2004).

Dessa forma, um maior conhecimento dos mecanismos de interação entre os gametas faz-se necessário para incremento na produção e sobrevivência dos embriões caprinos produzidos *in vitro*.

Cultivo *in vitro* (CIV)

Três sistemas de cultivo são rotineiramente utilizados para produção *in vitro*: (1) co-cultivo com células somáticas; (2) condições semidefinidas no meio proposto para suprir os requerimentos embrionários; ou (3) desenvolvimento *in vivo* em oviduto. O co-cultivo de embriões caprinos é geralmente realizado em meio TCM199 ou B2, usualmente suplementado com soro fetal bovino (SFB) (Cognié *et al.*, 2004).

Izquierdo *et al.* (2002) mostraram que o tipo de sistema de cultivo *in vivo* ou *in vitro* não influenciou as taxas de desenvolvimento de maturação *in vitro* / fertilização *in vitro* de oócitos caprinos.

Cognié *et al.* (2003) indicam que, no dia seguinte à inseminação, os presumíveis zigotos devem ser cultivados em microgotas de fluido sintético de oviduto e, assim, mantidos durante sete dias em uma atmosfera contendo 5% de CO_2 , 5% de O_2 , e 90% de N_2 .

Em caprinos, foi estabelecido que a adição de soro fetal bovino (F2442; Sigma) ao meio de cultivo nos dias dois ou três promove maior viabilidade após transferência de embriões (Cognié, 1999) e nunca esteve associada com o desenvolvimento anormal desses embriões.

Criopreservação de embriões

Embriões transferidos nos estádios de mórula ou blastocisto são beneficiados por uma proteção natural contra agentes infecciosos constituída pela zona pelúcida. Portanto, são normalmente esses estádios que devem ser utilizados para criopreservação. Além disso, as lavagens sucessivas de acordo com recomendações da International Embryo Transfer Society - IETS (Stringfellow e Seidel, 1998) permitem grandemente reduzir o risco de transmissão de agentes infecciosos.

O interesse da conservação de embriões está baseado na possibilidade de dissociar, no espaço e tempo, as operações de produção e transferência. Duas formas são possíveis: uma conservação de curta duração por resfriamento ou de longa duração por criopreservação e estocagem no nitrogênio líquido (Freitas e Simplício, 2002).

A congelação do embrião não é sempre realizável e, em certas circunstâncias, pode interessar a inovação 24 a 48 horas após a colheita. É possível diminuir o metabolismo do embrião de maneira temporária pela diminuição da temperatura. Bilton e Moore (1976) mostraram que o resfriamento do embrião a 4°C permite, em ausência de crioprotetor, conservar este por um período de até 48 horas.

No que se refere à congelação clássica, atualmente, o etilenoglicol tem sido o crioprotetor de eleição, com elevados índices de sobrevivência embrionária, aproximando-se daqueles obtidos com embriões frescos (BREBION *et al.*, 1992). As técnicas de congelação, hoje disponíveis para embriões caprinos, são aplicadas, preferencialmente, aos estádios de mórula compacta até blastocisto expandido de graus I ou II e com zona pelúcida intacta, segundo recomendações da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (Stringfellow e Seidel, 1998). Nesse processo se faz necessária a utilização de aparelhos de congelação programáveis para uma correta diminuição da temperatura. Nesse sentido, o Brasil já possui a sua disposição diversas marcas de aparelhos que podem ser perfeitamente utilizados na criopreservação de embriões de diversas espécies, dentre as quais a caprina.

Outro recente método para a criopreservação de embriões caprinos é a vitrificação. Essa técnica consiste em submeter os embriões a concentrações muito elevadas de crioprotetores e aumentar a viscosidade dos meios intra e extra-celulares. Nessa situação, é possível resfriar rapidamente os embriões com a passagem do estado líquido ao estado vítreo sem a formação de cristais. A técnica de vitrificação é uma prática recente, de aplicação rápida, e demonstra ser mais simples e menos onerosa que a congelação clássica (Traldi *et al.*, 1999).

Inovulação e fertilidade das receptoras

Inovulação é um termo técnico proposto por Beatty (1951) e consiste na deposição do embrião no útero da receptora, quer seja pelo ato cirúrgico (laparotomia), semicirúrgico (laparoscopia) ou por via transcervical. A inovulação deve ser feita no corno uterino ipsilateral ao ovário portador de, pelo menos, um corpo lúteo funcional.

Na laparotomia, a receptora é anestesiada e faz-se uma incisão na linha alba. Os cornos uterinos são expostos, puncionados para a introdução de um cateter (*tom-cat* ou Unopette) e feita a deposição dos embriões no útero, próximo à junção úterotubárica, com cuidado para não lesionar a mucosa uterina (Freitas e Simplício, 2002).

Na inovulação por laparoscopia, a receptora é anestesiada e colocada em decúbito dorsal em maca ou mesa própria. Segundo Baril *et al.* (1995), pratica-se uma punção no abdômen para colocar a cânula do laparoscópio por onde se produz um pneumoperitônio para facilitar a visualização do trato genital na cavidade abdominal; uma segunda cânula é colocada no lado oposto da primeira, para se introduzir uma pinça atraumática, que permite manipular o ovário e avaliar a resposta ovulatória dessa fêmea. Em uma terceira incisão, introduz-se a agulha ou a sonda (*tom-cat*) para perfurar o corno uterino e introduzir o embrião próximo à junção útero-tubárica. O mesmo autor relata ainda a possibilidade de se trazer com uma pinça atraumática os cornos uterinos para fora e, então, fazer-se a punção (semilaparoscopia), evitando-se uma terceira punção.

O método de inovulação pela via transcervical consiste no tracionamento da cérvix para a porção anterior da vagina. A receptora é preparada como para uma colheita e um cateter com os embriões é colocado, no óstio cervical, ultrapassando os anéis cervicais (Holtz, 1996).

Os resultados de fertilidade de receptoras de embriões caprinos variam bastante conforme a origem desses embriões: frescos ou criopreservados e produzidos *in vivo* ou *in vitro*.

Assim, a viabilidade após transferência dos embriões obtidos *in vitro* na fêmea adulta é aceitável, visto que próximo a metade dos embriões transferidos evoluem normalmente da gestação a termo. Contudo, esses embriões apresentam menor viabilidade que os embriões produzidos *in vivo* (Tab. 9; Cognié *et al.*, 2001).

Existem diferenças fundamentais na estrutura celular e bioquímica entre os embriões produzidos *in vivo* e *in vitro* que afetam significativamente sua sensibilidade à congelação (Massip, 2001). Resultados encorajadores em termos de taxas de sobrevivência após transferência de embriões caprinos vitrificados/desvitrificados têm sido relatados (Traldi *et al.*, 1999).

Tabela 10. Taxa de gestação e sobrevivência embrionária após transferência de embriões caprinos vitrificados produzidos *in vivo* ou *in vitro* (2 embriões/receptora).

Parâmetro	Origem dos embriões	
	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
Número de receptoras	27	20
Gestação (%)	52	45
Sobrevivência embrionária (%)	37	30

Fonte: Traldi *et al.*, 1998.

Na cabra, a capacidade dos embriões obtidos *in vitro* suportar a vitrificação não difere significativamente daqueles embriões produzidos *in vivo* (Tab. 10; Traldi *et al.*, 1998). Essa condição pode levar ao uso mais rotineiro dessa técnica de criopreservação de embriões.

Tabela 10. Taxa de gestação e sobrevivência embrionária após transferência de embriões caprinos vitrificados produzidos *in vivo* ou *in vitro* (2 embriões/receptora).

Parâmetro	Origem dos embriões	
	<i>In vivo</i>	<i>In vitro</i>
Número de receptoras	27	20
Gestação (%)	52	45
Sobrevivência embrionária (%)	37	30

 Fonte: Traldi *et al.*, 1998.

Segundo Cognié e Baril (2002), após a transferência para receptoras, 47% dos blastocistos produzidos *in vitro* resultam no nascimento de crias. Já para os embriões obtidos a partir de oócitos de cabras pré-púberes, as taxas de clivagem, produção de blastocistos e de sobrevivência pós-transferência são ainda significativamente inferiores do que para os oócitos oriundos de cabras adultas (Tab. 11; Cognié *et al.*, 2003).

 Tabela 11. Produção *in vitro* de embriões a partir de oócitos oriundos de cabras adultas e pré-púberes e a sobrevivência embrionária após transferência.

Idade	Nº. de oócitos	Clivagem (%)	Blastocistos (%)	Sobrevivência embrionária (%)
2 meses	249	51 ^a	11 ^a	2/14 (14 ^c)
Adulta	51	78 ^b	51 ^b	7/14 (50 ^d)

 a vs. b: $p < 0,001$; c vs. d: $p < 0,05$.

 Fonte: Cognié *et al.*, 2003.

Os blastocistos obtidos após uma semana de cultivo na presença de soro fetal bovino (35 a 50% dos oócitos submetidos à fertilização *in vitro* resultam numa taxa de desenvolvimento, após transferência para receptoras, muito próxima a daqueles embriões produzidos *in vivo* com nascimento de crias normais. Porém, em alguns laboratórios, foi observado que o cultivo de embriões na presença de soro pode induzir a pesos ao nascimento anormalmente elevados (Holm *et al.*, 1996) e que essa anomalia não existiu quando o cultivo foi realizado em fluido sintético de oviduto destituído de soro, suplementado com a albumina bovina e diferentes aminoácidos (Thompson *et al.*, 1995).

Considerações finais

Atualmente, o método de eleição para a produção de embriões em caprinos é a produção *in vivo*, a qual resulta em embriões com elevada capacidade de desenvolvimento, porém caracteriza-se por um elevado grau de variabilidade da resposta das doadoras e dos estádios embrionários. Em adição, devido à formação de aderências da realização de repetidas laparotomias, o procedimento resulta no uso limitado de fêmeas doadoras.

Nesse sentido, a produção *in vitro* de embriões caprinos vem avançando rapidamente. A aplicação de técnicas *in vitro* (maturação, fertilização e cultivo) para a espécie caprina pode facilitar a produção de um grande número de embriões a partir de uma única fêmea doadora. Somando-se a essa situação, a utilização de animais pré-púberes, em que a colheita de oócitos é realizada em idade precoce, pode reduzir o intervalo de gerações e, conseqüentemente, acelerar a propagação de animais valiosos. Contudo, é evidente que a inadequada maturação oocitária *in vitro* é a etapa limitante para a utilização dos embriões produzidos por esse método.

Portanto, um melhor conhecimento dos mecanismos de interação entre oócitos e espermatozóides faz-se necessário para a resolução de diversos entraves na produção *in vitro* de embriões.

Diante dos recentes avanços científicos na produção *in vivo* e *in vitro* de embriões caprinos, faz-se necessária uma análise criteriosa dos custos/benefícios, visando auxiliar na escolha da técnica mais apropriada para cada situação. E, ainda, quando os métodos de congelamento de embriões produzidos *in vitro* forem melhorados, a punção folicular associada à fertilização *in vitro* serão técnicas que poderão beneficiar, por um lado, os programas de melhoramento genético e, por outro, tecnologias que modificam as características genéticas de embriões, tais como a transgênese e a clonagem.

Referências

- Aguilar B, Roche A, Oliveira J, Folch J, Alabart JL.** Oocyte retrieval after repeated *ovum pick-up* in unstimulated sheep and goat. *In: Meeting Association Européenne de Transfert Embryonnaire (AETE)*, 18, 2002, Nouzilly, France. *Proceedings ... Nouzilly: INRA*, 2002. p.130.
- Andrioli-Pinheiro A.** *Métodos de colheita e de inovulação de embriões caprinos (Capra hircus, Linnaeus, 1758) e os efeitos de repetidas colheitas na vida reprodutiva de doadoras.* 1993. 100f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 1993.



- Baldassarre H, Karatzas CN.** Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. *Anim Reprod Sci*, v.82/83, p.255-266, 2004.
- Baldassarre H, Wang B, Kafidi N, Keefer CL, 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.
- Baril G, Brebion P, Chesné P.** *Manual de formación práctica para el trasplante de embriones en ovejas y cabras*. FAO, Rome, 1995, 182 p.
- Baril G, Leboeuf B, Saumande J.** Synchronization of estrus in goats: the relationship between time of occurrence of estrus and fertility following artificial-insemination. *Theriogenology*, v.40, p.621-628, 1993.
- Baril G, Pognard JL, Freitas VJF, Leboeuf B, Saumande J.** A new method for controlling the precise time of the occurrence preovulatory gonadotropin surge in superovulated goats. *Theriogenology*, v.45, p.697-706, 1996.
- Beatty RA.** Transplantation of mouse eggs. *Nature*, v.168, p.995, 1951.
- Besenfelder U, Möblaher G, Brem G.** Oocyte collection. *Reprod Domest Anim Suppl*, v.6, p.38-44, 1999.
- Bevers MM, Dieleman SJ, Van Der Hurk R, Izadyar F.** Regulation and modulation of oocyte maturation in the bovine. *Theriogenology*, v.47, p.17-22, 1997.
- Bilton RJ, Moore NW.** *In vitro* culture, storage and transfer of goat embryos. *Aust J Biol Sci*, v.29, p.125-129, 1976.
- Bondurant RH, Skirrow S, Anderson GB, Hanson F, Rogers WH.** Non-surgical collection of blastocysts from dairy goats. *Theriogenology*, v.22, p.423-431, 1984.
- Brebion P, Baril G, Cognié Y.** Embryo transfer in sheep and goat. *Ann Zootec*, v.41, p.331-339, 1992.
- Cognié Y.** State of art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*, v.51, p.105-116, 1999.
- Cognié Y, Baril G.** Le point sur la production et le transfert d'embryons obtenus *in vivo* e *in vitro* chez la bebris e la chèvre. *Prod Anim*, v.15, p.199-207, 2002.
- Cognié Y, Baril G, Poulin N, Mermillod P.** Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*, v.59, p.171-188, 2003.
- Cognié Y, Poulin N, Baril G, Guignot F, Beckers JF, Mermillod P.** Embryo survival after transfer of *in vitro* and *in vivo* produced goat embryos. In: Scientific Meeting of European Embryo Transfer Association, 17, 2001, Lyon, 2001. Lyon: EETA, 2001. p.110. (Abstract).
- Cognié Y, Poulin N, Locatelli Y, Mermillod P.** State-of-the-art production, conservation and transfer of *in vitro*-produced embryos in small ruminants. *Reprod Fertil Dev*, v.16, p.437-445, 2004.
- Corteel JM, Leboeuf B, Baril G.** Artificial breeding of adult goats and kids induced with hormones to ovulate outside the breeding season. *Small Rum Res*, v.1, p.19-35, 1988.
- Flores-Foxworth G, McBride BM, Kraemer DC, Nuti LCA.** comparison between laparoscopic and transcervical embryo collection and transfer in goats. *Theriogenology*, v.37, p.213, 1992. (Abstract).
- Food And Agriculture Organization (FAO).** *Production yearbook*. Roma: FAO, 2003. v.57.
- Freitas VJF, Baril G, Martin GB, Saumande J.** Physiological limits to further improvement in the efficiency of oestrous synchronization in goats. *Reprod Fertil Dev*, v.9, p.551-556, 1997.
- Freitas VJF, Rondina D, Lopes Junior ES, Teixeira DIA, Paula NRO.** Hormonal treatments for the synchronisation of oestrus in dairy goats raised in the tropics. *Reprod Fertil Dev*, v.16, p.415-420, 2004.
- Freitas VJF, Simplicio AA.** Transferência de embriões em caprinos. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF (Ed.). *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Varela, 2002. p.179-194.
- Gianaroli MC, Magli MC, Ferrareti AP, Fiorentino A, Tosti E, Panzella S.** Reducing the time of sperm-oocyte interaction in human *in vitro* fertilization improves the implantation rate. *Human Reprod*, v.11, p.166-171, 1996.
- Gilbert DE, Coonrod SA, Writing CJ, Pashen RL.** Comparison progesterone intravaginal device(CIDR™) with flunixin meglumine (finadine™) for reducing the effects of corpora lutea regression in the goat. *Theriogenology*, v.33, p.230, 1990.
- Goel AK, Tyagi S, Agrawal KP.** Non-surgical collection of embryos from goats. *Indian J Anim Sci*, v.65, p.293-296, 1995.
- Gonçalves PBD, Vizintin JA, Oliveira MAL, Montagner MM, Costa LFS.** Produção *in vitro* de embriões. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Varela, 2002. p.195-226.
- Gordon I.** *Controlled reproduction in sheep and goats*. Wallingford, UK: CAB International, 1997.
- Graff KJ, Meintjes M, Dyer VW, Paul JB, Denniston RS, Ziomek C, Godke RA.** Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval following FSH stimulation of domestic goats. *Theriogenology*, v.51, p.1099-1119, 1999.
- Greyling JPC, Van Niekerk CH.** Different synchronization techniques in Boer goat does outside the normal breeding season. *Small Rum Res*, v.5, p.233-243, 1991.
- Holm P, Walker SK, Seamark RF.** Embryo viability, duration of gestation and birth weight in sheep after transfer of *in vitro* matured and *in vitro* fertilized zygotes cultured *in vitro* ou *in vivo*. *J Reprod Fertil*, v.107, p.175-181, 1996.



- Holtz W. Embryo transfer in goats: a review. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, v.103, p.293-297, 1996.
- Hunter GL, Adams CE, Rowson LE. Inter-bred ovum transfer in sheep. *J Agric Sci*, v.46, p.143-149, 1955.
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). *Produção pecuária municipal*. Rio de Janeiro: IBGE, 2006. v.48, p.62.
- Ishwar AK, Memon MA. Embryo transfer in sheep and goats: a review. *Small Rum Res*, v.19, p.35-46, 1996.
- Izquierdo D, Villamediana P, Lopez-Bejar M, Paramio MT. Effect of *in vitro* and *in vivo* culture on embryo development form prepubertal goat IVM/IVP oocytes. *Theriogenology*, v.57, p.1431-1441, 2002.
- Koeman J, Keefer CL, Baldassarre H, Downey BR. Developmental competence of prepubertal and adult goat oocytes cultured in semi-defined media following laparoscopic recovery. *Theriogenology*, v.60, p.879-889, 2003.
- Kraemer DC. Embryo collection and transfer in small ruminants. *Theriogenology*, v.31, p.141-148, 1989.
- Lima PF, Oliveira MAL, Guerra MMP, Alves JDRF, Neto JE, Rabelo MC. Eficiência de diferentes métodos de colheita embrionária em caprinos (resultados preliminares). *Rev Bras Reprod Anim*, v.20, p.63-68, 1996.
- Lima Verde JB, Lopes Jr ES, Teixeira DIA, Paula NRO, Medeiros AA, Rondina D, Freitas VJF. Transcervical embryo recovery in Saanen goats. *S Afr J Anim Sci*, v.33, p.127-131, 2003.
- Lopes Jr ES, Teixeira DIA, Lima-Verde JB, Cordeiro MF, Paula NRO, Arruda IJ, Rondina D, Freitas VJF. Uso do flunixin meglumine na prevenção da regressão lútea prematura em cabras submetidas a tratamento superovulatório. *Vet News*, v.68, p.7-8, 2004.
- Massip A. Cryopreservation of embryos of farm animals. *Reprod Domest Anim*, v.36, p.49-55, 2001.
- Mermillod P, Oussaid B, Cognié Y. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *J Reprod Fertil Suppl*, n.54, p.449-460, 1999.
- Nagashima H, Matsui K, Sawasaki T, Kano Y. Nonsurgical collection of embryos in Shiba goats. *Exp Anim*, v.36, p.51-56, 1987.
- Oussaid B, Mariana JC, Poulin N, Fontaine J, Lonergan P, Beckers JF, Cognié Y. Reduction of the developmental competence of sheep oocytes by inhibition of LH pulses during the follicular phase with a GnRH antagonist. *J Reprod Fertil*, v.117, p.71-77, 1999.
- Paula NRO, Lopes Jr ES, Teixeira DIA, Lima Verde JB, Arruda IJ, Rondina D, Freitas VJF. Producción y transferencia de embriones en caprinos Boer criados en el Nordeste del Brasil. In: 3^{er} Congreso de la ALEPRYCS, 3, 2003, Viña del Mar. Anales ... Viña del Mar, Chile: ALEPRYCS, 2003. p.82. (Abstract).
- Pereira RJTA, Sohnrey B, Holtz W. Nonsurgical embryo collection in goats treated with prostaglandin F_{2α} and oxytocin. *J Anim Sci*, v.76, p.360-363, 1998.
- Remy B, Baril G, Vallet JC, Dufour R, Chouvet C, Saumade J, Chupin D, Beckers JF. Are antibodies responsible for a decreased superovulatory response in goats which have been treated repeatedly with porcine follicle-stimulating hormone? *Theriogenology*, v.36, p.389-399, 1991.
- Rho GJ, Hahnel AC, Betteridge KJ. Comparisons of oocyte maturation times and of three methods of sperm preparation for their effects on the production of goat embryos *in vitro*. *Theriogenology*, v.56, p.503-516, 2001.
- Ritar AJ, Ball PD, O'May PJ. Artificial insemination of Cashmere goats: effects on fertility and fecundity of intravaginal treatment, method and time of insemination, semen freezing process, number of motile spermatozoa and age of females. *Reprod Fertil Dev*, v.2, p.377-384, 1990.
- Ritar AJ. Control of ovulation, storage of semen, and artificial insemination of fibre-producing goats in Australia: a review. *Aust J Exp Agric*, v.33, p.807-820, 1993.
- Rodriguez-Gonzalez E, Lopes-Bejar M, Mertens MJ, Paramio MT. Effects on *in vitro* embryo development and intracellular glutathione content of the presence of thiol compounds during maturation of prepubertal goats oocytes. *Mol Reprod Dev*, v.65, p.446-453, 2003.
- Senlis Y. Fécondation *in vitro* chez les caprins: effect de la race et de la saison. 1990. 35f. Mémoire (Fin d'Etudes) – ENSAIA, Nancy, France, 1990.
- Soares AT. *Diferentes doses de flunixin meglumine na prevenção da regressão lútea em cabras superovuladas*. 1996. 64f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, 1996. 64p.
- Sohnrey SB, Holtz W. Transcervical embryo collection in Boer goats. *Small Rum Res*, v.36, p.195-200, 2000.
- Tervit HR, Gould PG, McKenzie RD, Clarkson DJ. Techniques and success of embryo transfers in Angora goats. *N Z Vet J*, v.31, p.67-70, 1983.
- Stringfellow DA, Seidel SM. *Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões*. 3 ed. Local, IL: IETS, 1998. 180p.
- Thompson JG, Gardner DK, Pugh PA, Mcmillan WT, Tervit HR. Lamb birth weight is affected by cultured system utilized during *in vitro* pre-elongation development of ovine embryos. *Biol Reprod*, v.53, p.1385-1391, 1995.
- Traldi AS, Leboeuf B, Cognié Y, Poulin N, Evans G, Mermillod P. Comparative results after transfer of vitrified *in vitro* produced goat and sheep embryos. In: Scientific Meeting of the European Embryo Transfer Association, 14, 1998, Veneza. Veneza: EETA, 1998. p. 258. (Abstract).
- Traldi AS, Leboeuf B, Cognié Y, Poulin N, Mermillod P. Comparative results of *in vitro* and *in vivo* survival



of vitrified *in vitro* produced goat and sheep embryos. *Theriogenology*, v.51, p.175. (Abstract). 1999.

Vallet JC, Baril G, Rougier F, Chupin D, Procureur R, Corteel JM. Feasibility and repeatability of embryos recoveries from dairy goats under laparoscopy. *In: Reunion Association Europeense de Transfert Embryonnaire* 3, 1987, Lyon. Lyon: AETE, 1987. p.159. (Resumé).

Van Niekerk CH, Barry DM, Rust JM, Van Der Walt T, Langenhoven J. Cervical softening with prostaglandin E₂ and estradiol cypionate for embryo collection in goats. *Theriogenology*, v.33, p.348. (Abstract), 1990.

Wang B, Baldassarre H, Tao T, Gauthier M, Neveu N. Transgenic goats produced by DNA pronuclear microinjection of *in vitro* derived zygotes. *Mol Reprod Dev*, v.63, p.437-443, 2002.
