



Estado da arte e perspectivas da produção *in vitro* de embriões em caprinos

State of art and prospects of in vitro embryo production in goats

Vicente José Figueirêdo Freitas^{1,5}, Joanna Maria Gonçalves Souza-Fabjan^{2,3}, Pascal Mermillod⁴, Luciana Magalhães Melo¹, Dárcio Ítalo Alves Teixeira¹

¹Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

²Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil.

³Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade do Grande Rio, BIOTRANS, Duque de Caxias, RJ, Brasil.

⁴Unité Physiologie de la Reproduction et des Comportements, INRA, Nouzilly, França.

⁵Correspondência: vicente.freitas@uece.br

Resumo

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotecnologia reprodutiva com diferentes etapas: colheita e maturação *in vitro* (MIV) de oócitos, fecundação *in vitro* (FIV) ou coincubação de espermatozoides capacitados *in vitro* com oócitos maturados e cultivo *in vitro* (CIV) de zigotos até ao estágio de blastocisto. A PIVE, em conjunto com a criopreservação de embriões, pode permitir a comercialização de embriões em larga escala, o transporte de embriões livres de patógenos e transações comerciais de germoplasma mais fáceis e baratas. No entanto, ainda são poucas as pesquisas sobre a PIVE em caprinos em comparação com outras espécies de produção. O objetivo desta revisão é fornecer uma visão geral do estado da arte da PIVE em caprinos com ênfase na descrição das principais metodologias atualmente utilizadas para colheita de oócitos, MIV, FIV e CIV de embriões e apresentar as perspectivas da pesquisa nesta biotécnica.

Palavras-chave: embrião, FIV, biotecnologia.

Abstract

In vitro embryo production (IVEP) is a reproductive biotechnique with a multi-step methodology comprising: in vitro maturation (IVM) of oocytes, in vitro fertilization (IVF) or co-incubation of capacitated spermatozoa with in vitro matured oocytes and in vitro culture (IVC) of zygotes up to the blastocyst stage. The IVEP together with embryo cryoconservation would allow large-scale embryo marketing, a pathogen-free genetic movement and easier and cheaper germplasm commercial transactions. There is less IVEP research in goats compared to other farm animals. The aim of this review is to provide an overview of the state of art of IVEP in goats with an emphasis on description of the main methodologies currently used for oocyte recovery, IVM, IVF and IVC of embryos and the future research perspectives of this biotechnique.

Keywords: embryo, IVF, biotechnology.

Introdução

A importância da espécie caprina como provedora de proteínas, na carne e leite, tem sido comprovada mundialmente. Além das ferramentas tradicionais de seleção, a eficiência reprodutiva é um dos fatores mais importantes no incremento da produtividade desta espécie. Após a inseminação artificial (IA) e a múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE), a produção *in vitro* de embriões (PIVE) representa a terceira geração de técnicas que buscam um melhor controle da reprodução animal, inclusive em caprinos (Freitas e Melo, 2010). Esta técnica compreende quatro etapas principais: i) colheita de oócitos competentes; ii) maturação *in vitro* (MIV) destes oócitos; iii) fecundação *in vitro* (FIV) dos oócitos maturados e iv) o cultivo *in vitro* (CIV) dos embriões resultantes até o estágio de blastocisto, os quais podem ser eficientemente criopreservados ou transferidos para o útero de cabras receptoras previamente preparadas. A PIVE é uma biotécnica extremamente versátil e que tem sido estudada intensivamente nos últimos trinta anos. Todavia, apesar dos esforços realizados, as taxas de sucesso são ainda inferiores àquelas obtidas com embriões produzidos *in vivo* (Paramio, 2010). O objetivo desta revisão é apresentar o estado da arte da PIVE em caprinos com ênfase na descrição dos principais métodos atualmente usados nas diferentes etapas, bem como descrever as perspectivas de pesquisa desta biotécnica.

Colheita de oócitos

A primeira etapa da PIVE é a colheita de oócitos competentes ao desenvolvimento, os quais podem ser definidos como aqueles hábeis a retomar e alcançar a meiose, ser fecundado, se desenvolver e, após transferência para receptora, resultar em crias normais (Souza-Fabjan et al., 2014a).

Em caprinos, oócitos imaturos podem ser colhidos de ovários oriundos de abatedouro ou de animais vivos. Os ovários de abatedouro são uma fonte barata de oócitos que podem ser colhidos por punção folicular, *slicing* ou dissecação folicular. Esta condição tem sido útil para pesquisas na área e o consequente desenvolvimento da técnica. Todavia, para o uso da PIVE como método de difusão ou melhoramento genético é necessária a colheita de oócitos repetidamente em fêmeas de alto valor genético e com controle sanitário e nutricional (Cognié et al., 2004; Paramio, 2010). Este objetivo pode ser alcançado através da punção folicular por laparotomia, porém este método apresenta como desvantagem a formação de aderências pós-cirúrgicas resultante da repetição dos procedimentos, impossibilitando o conceito de “doadora permanente de oócitos”. A fim de suplantar estas dificuldades, foi desenvolvida a técnica de colheita de oócitos por laparoscopia (COL), a qual é menos estressante, menos invasiva, de menor duração e que pode ser repetida várias vezes sem afetar a qualidade oocitária (Baldassarre e Karatzas, 2004). Adicionado a estas características, vale a pena salientar que a COL pode ser realizada em animais pré-púberes, senis ou mesmo prenhes (Koeman et al., 2003). Nos últimos 10 anos, nosso grupo trabalha no desenvolvimento de um protocolo de COL em caprinos (Fig. 1), o qual é precedido de um tratamento hormonal de estimulação ovariana e que vem produzindo, consistentemente, sete a oito complexos *cumulus*-oócito (CCOs) maturáveis (grau I e II) por cabra doadora e com uma taxa de colheita entre 70-75% (Souza-Fabjan et al., 2013; Sanchez et al., 2014).

Na espécie caprina, as taxas de maturação, clivagem e de blastocisto são positivamente correlacionadas com o tamanho do folículo. Consequentemente, folículos antrais de 3-5 mm devem ser preferencialmente puncionados para as etapas subsequentes da PIVE (Cognié et al., 2004). Adicionalmente, alguns estudos demonstraram um efeito da idade da doadora sobre a produção oocitária e posterior competência ao desenvolvimento. Assim, animais pré-púberes apresentam uma boa resposta quantitativa, porém esses oócitos são menos competentes ao desenvolvimento que aqueles colhidos de fêmeas adultas (Leoni et al., 2009).

Quanto ao tratamento hormonal que precede a COL, diferentes esquemas já foram testados com o objetivo de aumentar a quantidade, qualidade e competência ao desenvolvimento (Baldassarre e Karatzas, 2004; Gibbons et al., 2007; Avelar et al., 2012). Progestágenos são utilizados por 10-11 dias para promover a sincronização do ciclo estral. Uma injeção de luteolítico é realizada às 72 h antes do final do tratamento para a destruição de algum corpo lúteo presente. Finalmente, o estímulo ovariano é obtido pela aplicação de cinco injeções de FSH em doses decrescentes e intervaladas por 12 h (Avelar et al., 2012).



Figura 1. Diferentes etapas da colheita oocitária por laparoscopia (COL) em caprinos. A: campo mostrando os diferentes locais de punção. B: momento da punção do folículo observada em monitor conectado ao laparoscópio. C: complexos *cumulus*-oócito colhidos e observados sob microscópio invertido (aumento de 400x).

Maturação *in vitro*

A MIV envolve o cultivo dos oócitos imaturos para que estes atinjam o estágio de metáfase II da meiose e completem a maturação citoplasmática, quando então estarão prontos para serem fecundados (Cognié et al., 2004). É unânime na literatura que esta é a etapa mais crítica de todo o processo de PIVE e já foi demonstrado que oócitos oriundos de MIV apresentam sua capacidade de desenvolvimento comprometida em relação aos maturados *in vivo*. Isto provavelmente ocorre em função da heterogeneidade dos oócitos obtida, em termos de estágio de diferenciação, fazendo com que sua resposta às condições encontradas seja imprevisível (Paramio, 2010).

A maturação do oócito inclui a retomada da meiose e progressão até a metáfase II da meiose, quando este atinge o estágio no qual é capaz de ser fecundado, após a extrusão do primeiro corpúsculo polar e eventos relacionados ao citoplasma do oócito e células do *cumulus*. Desta forma, os resultados da MIV dependem da qualidade intrínseca dos oócitos imaturos, mas as condições da maturação também podem modular a competência final ao desenvolvimento dos mesmos (revisado por Souza-Fabjan et al., 2014a).

Existem evidências de que o processo inteiro de diferenciação do oócito e maturação é coordenado pelas células do *cumulus*, através de um diálogo constante mediado pelo fluido folicular e por junções GAP mantidas entre estes compartimentos (Eppig, 1982). Embora alguns estudos visem encontrar marcadores de

qualidade de oócitos em células foliculares ou no oócito propriamente dito, a avaliação morfológica dos CCOs permanece como a única forma não invasiva de seleção de CCOs após a colheita. Em razão disso, uma classificação por graus levando em consideração o número de camadas de células do *cumulus* e homogeneidade do ooplasma, é atualmente utilizada em diversos laboratórios (graus I a IV). Os oócitos que apresentam grau III ou IV são considerados não adequados e são rotineiramente descartados (Souza-Fabjan et al., 2014a). Contudo, estes parâmetros morfológicos podem não ser suficientes para prever a competência do oócito em se desenvolver após a fecundação. Oócitos imaturos de caprinos podem ser também corados por azul cresil brilhante (ACB) para a seleção dos mais aptos ao desenvolvimento. Apesar de apresentar resultados contraditórios na literatura entre espécies, um levantamento realizado utilizando CCOs de pequenos ruminantes sugeriu que esta estratégia é eficiente (Opiela e Katska-Ksiazkiewicz, 2013).

Em função do número de oócitos de animais valiosos colhidos por COL que deveriam ser descartados por estarem desnudos, nosso laboratório realizou um estudo a fim de estabelecer um protocolo *in vitro* eficiente para o uso de oócitos grau III que apresentassem ooplasma homogêneo. De forma geral, não foram obtidas diferenças na produção de blastocistos após o uso de sistemas de MIV mais complexos ou mais simples. Entretanto, houve um efeito benéfico na taxa de desenvolvimento dos oócitos desnudos, quando foi realizado seu cocultivo com CCOs intactos durante a MIV, sem afetar a qualidade dos mesmos. Desta forma, a utilização de oócitos desnudos pode representar uma estratégia para o incremento no número de embriões produzidos ao fim do processo (Souza-Fabjan et al., 2016).

Nas diferentes etapas da PIVE, o sistema de cultivo pode ser classificado de acordo com a sua formulação em: meio indefinido (soro e/ou células somáticas são adicionados), semi-definido (estes constituintes são substituídos por albumina) e meio definido (albumina é substituída por macromoléculas, como o álcool polivinílico-PVA ou polivinil pirrolidona-PVP) (Paramio e Izquiero, 2014). A MIV de oócitos caprinos é normalmente realizada de forma similar às demais espécies, utilizando meio de cultivo enriquecido com aminoácidos e glicose, suplementado com hormônios e soro inativado de cabra em estro. Em geral, o sistema mais utilizado em caprinos é o TCM 199 suplementado com FSH, LH, estradiol e soro fetal bovino (SFB). Entretanto, vale a pena ressaltar que todas as substâncias indefinidas podem apresentar grandes diferenças entre as partidas, afetando a repetibilidade do protocolo, além dos riscos sanitários. Por essa razão, existe uma tendência mundial de se evitar fontes indefinidas nas diferentes etapas de produção de embriões (Souza-Fabjan et al., 2014a).

Nosso laboratório propôs a utilização de meio de maturação composto por TCM199, suplementado com fator de crescimento epidermal (EGF) e cisteamina, e obteve bons resultados de desenvolvimento embrionário a partir de oócitos colhidos de ovários de cabras adultas em abatedouro (Souza et al., 2013). Todavia, quando este mesmo meio foi utilizado em oócitos oriundos de COL, as taxas de clivagem e produção de embriões foram significativamente inferiores, em comparação aos oócitos de abatedouro (Souza-Fabjan et al., 2014b). Apesar disso, quando estes oócitos obtidos após COL foram submetidos à ativação partenogenética ao invés de FIV, a taxa de blastocistos foi elevada e similar àquela de oócitos de abatedouro, indicando que a competência intrínseca ao desenvolvimento era similar nas diferentes fontes de oócitos. Estes dados indicam que os CCOs possivelmente apresentam requerimentos distintos durante a MIV/FIV e meios mais complexos são necessários para alcançar altas taxas na PIVE quando oócitos de COL são a escolha. Quando um meio complexo (SFB, EGF, entre outros) foi utilizado para a MIV de oócitos obtidos por COL, obteve-se uma taxa de blastocisto de 51%, possibilitando publicar o primeiro relato de PIVE com produção de blastocistos na raça caprina Canindé, ameaçada de extinção (Souza-Fabjan et al., 2013).

Com relação às condições físicas, a MIV é comumente realizada em placas contendo 500 μ L de meio e cerca de 50 CCOs, em incubadora contendo 5% CO_2 em ar atmosférico, com temperatura variando entre 38 a 39°C, por 22 a 27 h. Nosso grupo comparou a cinética da MIV em oócitos oriundos de COL ou de abatedouro, avaliando a estágio da meiose às 18, 22 e 26 h de MIV, em sistema simplificado (EGF) ou semi-definido (albumina sérica bovina-BSA). Os oócitos de ambas as fontes apresentam a cinética ao desenvolvimento diferente, com aqueles derivados de COL necessitando mais tempo para atingir a metáfase II da meiose. Para simplificar, a sugestão é que 22 h de MIV é um tempo ótimo para ambas as fontes, independentemente do sistema utilizado (Souza-Fabjan et al., 2014b).

Fecundação *in vitro*

O sêmen utilizado para a FIV pode ser fresco ou congelado e precisa ser capaz de fecundar os oócitos. Para isso, antes da FIV propriamente dita, o sêmen deve passar por um processo de preparação espermática para seleção dos espermatozoides de melhor qualidade (Paramio e Izquierdo, 2014). Essa preparação inclui métodos de seleção que elevam a motilidade espermática, qualidade do espermatozoide e removem o plasma seminal e/ou extensores, assim como células indesejadas provenientes do ejaculado ou do sêmen descongelado. Apesar de existirem várias técnicas, atualmente são utilizadas principalmente duas para a seleção espermática em caprinos: *swim-up* ou gradiente de *Percoll*. Olivares et al. (2015) demonstraram que o mini-*Percoll* (gradiente com volume reduzido) foi aproximadamente 12 vezes mais eficiente que o *swim-up* em recuperar os espermatozoides



oriundos de sêmen congelado/descongelado de bodes.

A capacitação espermática é um evento essencial para que o espermatozoide seja capaz de fecundar os oócitos maturados. *In vivo*, alguns glicosaminoglicanos presentes no trato genital feminino são responsabilizados por induzirem a capacitação espermática. Nos processos *in vitro*, o glicosaminoglicano mais utilizado para induzir essa reação é a heparina e já foram relatados resultados confirmando sua eficiência em caprinos (Souza et al., 2013), com grandes variações nas doses utilizadas. Em caprinos, nosso grupo demonstrou que a presença de heparina no meio FIV, associada às células do *cumulus*, foi capaz de elevar significativamente a taxa de blastocisto na presença de soro de ovelha em estro (Souza et al., 2013).

Comumente, são preparadas microgotas de meio nas placas, para onde são transferidos grupos de 15-30 oócitos e onde serão inseminados com os espermatozoides selecionados. A concentração espermática final que é utilizada para a inseminação varia de 1 a $3,5 \times 10^6$ espermatozoides/mL. Os gametas são coincubados por 16-20 h a 38-39°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ (Souza et al., 2013; Souza-Fabjan et al., 2014a; Souza-Fabjan et al., 2014b).

Cultivo *in vitro*

O CIV em caprinos pode ser realizado em cocultivo com células somáticas, em meio definido ou indefinido. O uso de meios definidos supera muitas desvantagens que o uso de meios biológicos indefinidos apresenta, como riscos sanitários, síndrome da cria gigante e problemas no metabolismo embrionário. Porém, ainda assim, o uso de meios biológicos indefinidos apresenta melhores resultados quanto à produção de blastocistos (Souza-Fabjan et al., 2014a). O meio mais utilizado em caprinos é o fluido sintético de oviduto (SOF), suplementado com aminoácidos, BSA e/ou soro (Souza-Fabjan et al., 2014b; Souza-Fabjan et al., 2016). A omissão do soro e células somáticas no cultivo embrionário é uma alternativa ao sistema de cocultivo, mas, em geral, requer um ambiente atmosférico com menor tensão de O₂ do que aquele utilizado em cultivos com células e soro.

O sucesso do CIV depende de vários fatores como a osmolaridade do meio, temperatura, pH, tensão de oxigênio e concentração dos diversos componentes (carboidratos, aminoácidos, lipídeos, ácidos graxos, proteínas, fatores de crescimento e citocinas). Atualmente, o CIV dos embriões caprinos é realizado em incubadora a 38-39°C em mistura de três gases (5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂). A fim de garantir o confinamento ideal dos embriões, a ação de fatores autócrinos e parácrinos, um melhor desenvolvimento até o estágio de blastocisto, os embriões usualmente são colocados em grupos em gotas de 1 µL de meio de cultivo cobertas por óleo mineral (Paramio, 2010).

A melhor forma de acessar a qualidade ou viabilidade embrionária é de checar a sua capacidade de estabelecer prenhez após a transferência para receptoras e, conseqüentemente, de resultar em crias saudáveis. Um indicador proposto para avaliar esta qualidade é a avaliação de expressão de genes específicos para o metabolismo embrionário e resistência à criopreservação, dentre outros. Contudo, raros são os estudos avaliando o efeito do cultivo sobre a expressão gênica em embriões caprinos (Fonseca et al., 2010).

Na espécie caprina, as diferentes etapas de PIVE estão em constante aprimoramento com o objetivo de melhorar os índices de sucesso desta biotécnica. A Tab. 1 apresenta estudos recentes com oócitos obtidos por COL ou de ovários de abatedouro e as taxas verificadas durante as várias etapas do processo.

Tabela 1. Resultados recentes de produção *in vitro* de embriões a partir de complexos *cumulus*-oócito (CCOs) colhidos por laparoscopia (COL) ou de ovários de abatedouro (ABA) e submetidos à maturação (MIV), fecundação (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) em caprinos.

Perspectivas inovadoras

Esta revisão apresenta resultados bastante variáveis encontrados na PIVE caprina. Assim, faz-se necessário estudos mais aprofundados sobre a fisiologia oocitária e sua interação com o fluido folicular. Este conhecimento poderá servir para o desenvolvimento de meios de cultivo mais adequados para a PIVE em caprinos. Vários estudos em humanos e animais de produção já foram realizados a fim de encontrar biomarcadores de competência oocitária (revisado por Benkhalifa et al., 2015).

Em um estudo original com caprinos, Paula Júnior (2015) estudou a composição proteica do fluido de folículos pequenos, médios e grandes em cabras da raça Canindé. O estudo verificou que, quanto à concentração total de proteínas, não existiu diferença entre os diferentes folículos. No entanto, a serotransferrina teve uma maior expressão nos folículos médios em relação aos pequenos. A zinco-alfa2glicoproteína-like, a proteína do complemento C3 e o fator B do complemento apresentaram uma expressão aumentada nos folículos grandes em comparação com os médios. Este estudo representou a primeira descrição das proteínas diferencialmente expressas no fluido folicular de cabras Canindé. Estudos similares também devem ser realizados utilizando o fluido do oviduto, bem como na interação entre o zigoto recém-fecundado e o ambiente ovidutário.



Origem dos CCOs	MIV		FIV		Meio CIV	Taxa de clivagem**		Referência
	Meio*	Duração (h)	Meio*	Duração (h)		clivagem**	blastocisto	
COL	10% SFB	24	10% SCE	18	2% SFB	59	51	Souza-Fabjan et al. (2013)
COL	10% SFB, 10% SCE	22-24	10% SCE	20	10% SFB	67-69	28-34	Sanchez et al. (2014)
COL	-	22	10% SOE	18	10% SFB	39	28	Souza-Fabjan et al. (2014b)
ABA	-	22	10% SOE	18	10% SFB	68	47	Souza-Fabjan et al. (2014b)
ABA	-	24	2% SOE	18	10% SFB	56-68	14	Veshkini et al. (2015)
ABA	-	22	10% SOE	18	10% SFB	67	45	Souza-Fabjan et al. (2016)

*Somente fluidos biológicos são indicados. SCE: soro de cabra em estro; SOE: soro de ovelha em estro; SFB: Soro fetal bovino.

**Taxa de clivagem representa o número de estruturas clivadas em relação ao número de oócitos entrando na MIV.



Considerações finais

Indubitavelmente, a PIVE caprina tem um grande potencial para a propagação do material biológico de fêmeas de elevado valor genético. No entanto, verifica-se que ainda existem grandes variações nas taxas de sucesso, indicando que progressos ainda devem ser alcançados.

Pesquisas na área de proteômica poderão contribuir para o sucesso de programas de PIVE em caprinos e, em particular, na preservação da raça Canindé ou demais raças ameaçadas de extinção. Além disso, o melhor conhecimento sobre as interações oócito-oviduto podem também fornecer informações cruciais para o desenvolvimento de novos meios de cultivo dos embriões.

Agradecimentos

Os resultados dos autores que são apresentados neste artigo obtidos através de apoio financeiro do CNPq, CAPES/COFECUB e FUNCAP. Vicente J. F. Freitas é bolsista do nível 1C do CNPq e Joanna M.G. Souza-Fabjan é bolsista de pós-doutorado da CAPES.

Referências

- Avelar SRG, Moura RR, Sousa FC, Pereira AF, Almeida KC, Melo CHS, Teles-Filho ACA, Baril G, Melo LM, Teixeira DIA, Freitas VJF.** Oocyte production and in vitro maturation in Canindé goats following hormonal ovarian stimulation. *Anim Reprod*, v.9, p.27-32, 2012.
- Baldassarre H, Karatzas CN.** Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. *Anim Reprod Sci*, v. 82-83, p.255-266, 2004.
- Benkhalifa M, Madkour A, Louanjli N, Bouamoud N, Saadani B, Kaarouch I, Chahine H, Sefrioui O, Merviel P, Copin H.** From global proteome profiling to single targeted molecules of follicular fluid and oocyte: contribution to embryo development and IVF outcome. *Expert Rev Proteomics*, v.12, p.407-423, 2015.
- 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.
- Eppig JJ.** The relationship between cumulus cell-oocyte coupling, oocyte meiotic maturation, and cumulus expansion. *Dev Biol*, v.89, p.268-272, 1982.
- Fonseca JF, Souza JMG, Camargo LSA.** Estado da arte de ovócitos e embriões de caprinos e ovinos: passado, presente, futuro. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 38, p. 353-369, 2010.
- Freitas VJF, Melo LM.** In vitro embryo production in small ruminants. *R Bras Zootec*, v. 39, p. 409-413, 2010.
- Gibbons A, Pereyra Bonnet F, Cueto MI, Catala M, Salamone DF, Gonzalez-Bulnes A.** Procedure for maximizing oocyte harvest for in vitro embryo production in small ruminants. *Reprod Domest Anim*, v.42, p.423-426, 2007.
- 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.
- Leoni GG, Succu S, Satta V, Paolo M, Bogliolo L, Bebbere D, Spezzigu A, Madeddu M, Berlinguer F, Ledda F, Naitana S.** In vitro production and cryotolerance of prepubertal and adult goat blastocysts obtained from oocytes collected by laparoscopic oocyte-pick-up (LOPU) after FSH treatment. *Reprod Fertil Dev*, v.21, p.901-908, 2009.
- Olivares CCS, Fonseca JF, Camargo LSA, Souza-Fabjan JMG, Rodrigues ALR, Brandão FZ.** Comparison of different methods of goat sperm selection and capacitation for optimization of assisted reproductive technologies. *Small Rumin Res*, v.127, p.44-49, 2015.
- Opiela J, Katska-Ksiazkiewicz L.** The utility of Brilliant Cresyl Blue (BCB) staining of mammalian oocytes used for in vitro embryo production (IVP). *Reprod Biol*, v.13, p.177-183, 2013.
- Paramio MT.** In vivo and in vitro embryo production in goats. *Small Rumin Res*, v.89, p.144-148, 2010.
- Paramio MT, Izquierdo D.** Current status of in vitro embryo production in sheep and goats. *Reprod Domest Anim*, v.49, p.37-48, 2014.
- Paula Junior AR.** *Análise proteômica do fluido folicular ovariano de caprinos da raça Canindé submetidos à estimulação hormonal ovariana.* 2015. 58f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2015.
- Sanchez DJD, Melo CHS, Souza-Fabjan JMG, Sousa FC, Rocha, AA, Campelo IS, Teixeira DIA, Pereira AF, Melo LM, Freitas VJF.** Repeated hormonal treatment and laparoscopic ovum pick-up followed by in vitro embryo production in goats raised in the tropics. *Livest Sci*, v.165, p.217-222, 2014.
- Souza JMG, Duffard N, Bertoldo MJ, Locatelli Y, Corbin E, Fatet A, Freitas VJF, Mermillod P.** Influence of heparin or the presence of cumulus cells during fertilization on the in vitro production of goat embryos. *Anim Reprod Sci*, v.138, p.82-89, 2013.
- Souza-Fabjan JMG, Pereira, AF, Melo, CHS, Sanchez, DJD, Oba E, Mermillod, P, Melo, LM, Teixeira,**



- DIA, Freitas, VJF.** Assessment of the reproductive parameters, laparoscopic oocyte recovery and the first embryos produced in vitro from endangered Canindé goats (*Capra hircus*). *Reprod Biol*, v. 13, p. 325-332, 2013.
- Souza-Fabjan JMG, Panneau B, Duffard N, Locatelli Y, Figueiredo JR, Freitas VJF, Mermillod P.** In vitro production of small ruminant embryos: late improvements and further research. *Theriogenology*, v.81, p.1149-1162, 2014a.
- Souza-Fabjan JMG, Locatelli Y, Duffard N, Corbin E, Touzé JL, Perreau C, Beckers JF, Freitas VJF, Mermillod P.** In vitro embryo production in goats: slaughterhouse and laparoscopic ovum pick up-derived oocytes have different kinetics and requirements regarding maturation media. *Theriogenology*, v.81, p.1021-1031, 2014b.
- Souza-Fabjan JMG, Locatelli Y, Duffard N, Corbin E, Batista RITP, Freitas VJF, Beckers JF, Mermillod P.** Intrinsic quality of goat oocytes already found denuded at collection for in vitro embryo production. *Theriogenology*, v.86, p.1989-1998, 2016.
- Veshkini A, Khadem AA, Mohammadi-Sangcheshmeh A, Alamouti AA, Soleimani M.** Linolenic acid improves oocyte developmental competence and decreases apoptosis of in vitro-produced blastocysts in goat. *Zygote*, v.24, p.537-548, 2015.
-