

Workshop 3: Reprodução em pequenos ruminantes

Reproduction in small ruminants



INTERFACES ENTRE NUTRIÇÃO E REPRODUÇÃO DOS PEQUENOS RUMINANTES DOMÉSTICOS E SUA IMPORTÂNCIA PARA O SUCESSO NO USO DAS BIOTECNOLOGIAS DA REPRODUÇÃO

Davide Rondina ¹ & Giovanna Galeati ²

ABSTRACT

Background: A better comprehension of the relationship between nutrition and ovarian function is a fundamental key to optimize the reproductive parameters. In ruminants it is well known and recognized that nutrition is a very important mediator at the ovary level. Thus, nutritional balancing is a critical essential condition in assisted reproduction technologies when used to support improves reproductive efficiency. In many regions of Brazil, the main drawback of ovine and caprine husbandry continues to be how to sustain the nutritional status during the prolonged seasonal food shortage. In these areas the use of hormonal treatment for both estrus and ovulation synchronization is subordinate to supplementation availability or the body condition of females. Changes of nutrient intake before mating can significantly increase in the superovulatory response and modify the number and quality of embryo produced in vivo. The objective of this paper is to review the effects of nutrition on some parameters, as follicular development, oocyte quality and embryo production with particular emphasis on effects in small ruminants.

Review: It was discussed the most recent available model in ewes for nutritional stimulations of folliculogenesis and regulation of metabolic factors such as insulin-glucose, leptin and IGF. Also it was introduced a novel scheme of nutritional action (acute, dynamic and static effects). Regarding the recent progress of follicular development was illustrated the effect of nutritional restriction in utero on fetal early folliculogenesis. In goats findings showed that the initial steps of follicular growth are very sensible to the food restriction applied for short period. It has been shown that energy balance is a crucial condition for assisted reproductive tools as hormone treatments for the synchronization of estrus. Hence, using several experimental data of relationships between anoestrus and body mass reduction, it was estimated a values of body condition score between 2 and 2,5 as a crucial point for the onset of nutritional anoestrus in goats and sheep. Current researches have been demonstrated in sheep that unbalanced diet, excess or restriction of feeding, interferes in the process of oocyte capacitation and its gene expression. Specifically, such short-term nutrient restriction reduced expression of glucose transporter in oocytes, and increases the leptin receptor in granulosa cells. Reduced expression of glucose transporter is essential for post-implantation embryonic development. Extra-ovarian factors, such as nutritionally mediated changes in metabolic hormones, also directly affect follicle development and oocyte quality. Therefore it is important differentiate diets optimal for follicle growth or oocyte quality and optimal for embryo survival, because these nutritional conditions may be opposite. The current trend to increase the productive levels and to develop the husbandry production is fix the nutritional management at key stages in the reproductive process, provides an effective way to develop long term feeding strategies which enable animals to maximize their fertility.

Conclusion: An expressive advance of research provide in these years useful information about the nutritional effort on reproductions in small ruminants and suggest practical aspects to be considered as fundamental prerequisite to the reproduction control in goats and sheep herd.

Keywords: nutrition, reproduction, small ruminants, biotechnologies

¹ Laboratório de Nutrição e Produção de Ruminantes (LANUPRUMI), Faculdade de Veterinária (FAVET) – Universidade Estadual do Ceará (UECE). Av. Paranjana, 1700. Campus do Itaperi, 60740-000, Fortaleza, Ceará, Brazil. Tel: +55-85-31019858 Fax: +55-85-31019840. E-mail: davide@pq.cnpq.br; davide@uece.br

² Dipartimento di Morfologia Veterinaria e Produzioni Animali (DIMORFIPA), Faculdade de Veterinária – Universidade de Bologna (UNIBO). Via Tolara de Sopra, 50. 40064, Ozzano Emilia, Bologna, Itália. Tel: +33-51-2097993 Fax +33-51-20997899. E-mail: Giovanna.galeati@unibo.it

Financial support: Davide Rondina is senior investigator of CNPq/Brazil (Proc. n. 301803/2008-0).

I. INTRODUÇÃO

II. SÍNTESE DA AÇÃO NUTRICIONAL SOBRE A ATIVIDADE OVARIANA

III. CONTROLE NUTRICIONAL NA FOLICULOGÊNESE

IV. NUTRIÇÃO E TRATAMENTOS HORMONAIS DE SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO

V. EFEITO DA NUTRIÇÃO SOBRE O OÓCITO E EMBRIÃO

VI. CONCLUSÕES

I. INTRODUÇÃO

A nutrição representa o fator crítico para a sobrevivência nos ruminantes assim como para todas as outras espécies animais. Em função deste papel crucial, numerosas pesquisas têm sido conduzidas nestes últimos anos, sobretudo em bovinos e ovinos, contribuindo na documentação dos principais mecanismos regulatórios da interface entre nutrição e reprodução.

A disponibilidade de nutrientes tem sido correlacionada com a melhoria dos índices reprodutivos e produtivos em ruminantes, sendo fundamental no controle da eficiência de tecnologias voltadas para a reprodução. Atualmente uma nova dimensão da pesquisa sobre nutrição e reprodução esta tentando estabelecer estratégias alimentares para maximizar a resposta superovulatória, e a produção de embriões.

O controle nutricional é condição fundamental na utilização de biotecnologias, quando estas são usadas para o controle reprodutivo do rebanho ou em programas de melhoramento e/ou conservação animal. Entretanto em muitas áreas do Brasil ainda o principal entrave da difusão de muitas técnicas de reprodução assistida nos rebanhos caprinos e ovinos, permanece a disponibilidade alimentar durante grande parte do ano e a dificuldade de manter um adequado status nutricional do animal.

A presente revisão tem como objetivo apresentar e discutir os mais recentes resultados sobre os efeitos que a nutrição exerce no desempenho reprodutivo em pequenos ruminantes bem como no uso de biotecnologias reprodutivas.

II. SÍNTESE DA AÇÃO NUTRICIONAL SOBRE A ATIVIDADE OVARIANA

A nutrição pode ser definida em múltiplos parâmetros como aporte energético, protéico ou de outros componentes específicos da dieta, tais como os minerais ou as vitaminas cada um capaz de expressar uma complexa trama de interações no organismo animal. Por esta razão uma das maiores dificuldades no estudo da interface entre reprodução e nutrição é sem duvida, construir a partir dos resultados experimentais ou de literatura modelos interpretativos. Entre os numerosos modelos propostos nos últimos anos, ressalta-se aquele apresentado recentemente por [30], para ser fundamentado nas espécies ovinas e para introduzir novas informações na regulação metabólica sobre a atividade ovariana.

Analisando um conjunto de resultados experimentais os autores inicialmente classificam três tipos de atuação do fator nutricional sobre a foliculogênese e a taxa de ovulação. O efeito “acudo”, no qual é ausente uma detectável mudança no peso dos animais, o efeito “dinâmico” onde a nutrição induz a uma variação da massa corpórea e o efeito “estático” no qual o efeito nutricional é associado a um elevado peso vivo. O sinal nutricional é mediado através três sistemas metabólicos: insulina-glicose, leptina e IGF, que atuam principalmente na inibição a produção de estradiol da parte do foliculo (Figura 1). A menor produção de estradiol tem como efeito principal a redução do feedback negativo sobre o hipotálamo seguido de um estímulo da secreção de gonadotrofinas e portanto da foliculogênese e da taxa de ovulação.

Uma das vantagens deste modelo certamente e que permitiu superar a utilização da escala temporal (ação a curto, médio e longo prazo) utilizada nas décadas passadas, e que nos últimos anos expressou algumas limitações [18,19,39], entretanto é necessário que seja em futuro validado também na espécie caprina.

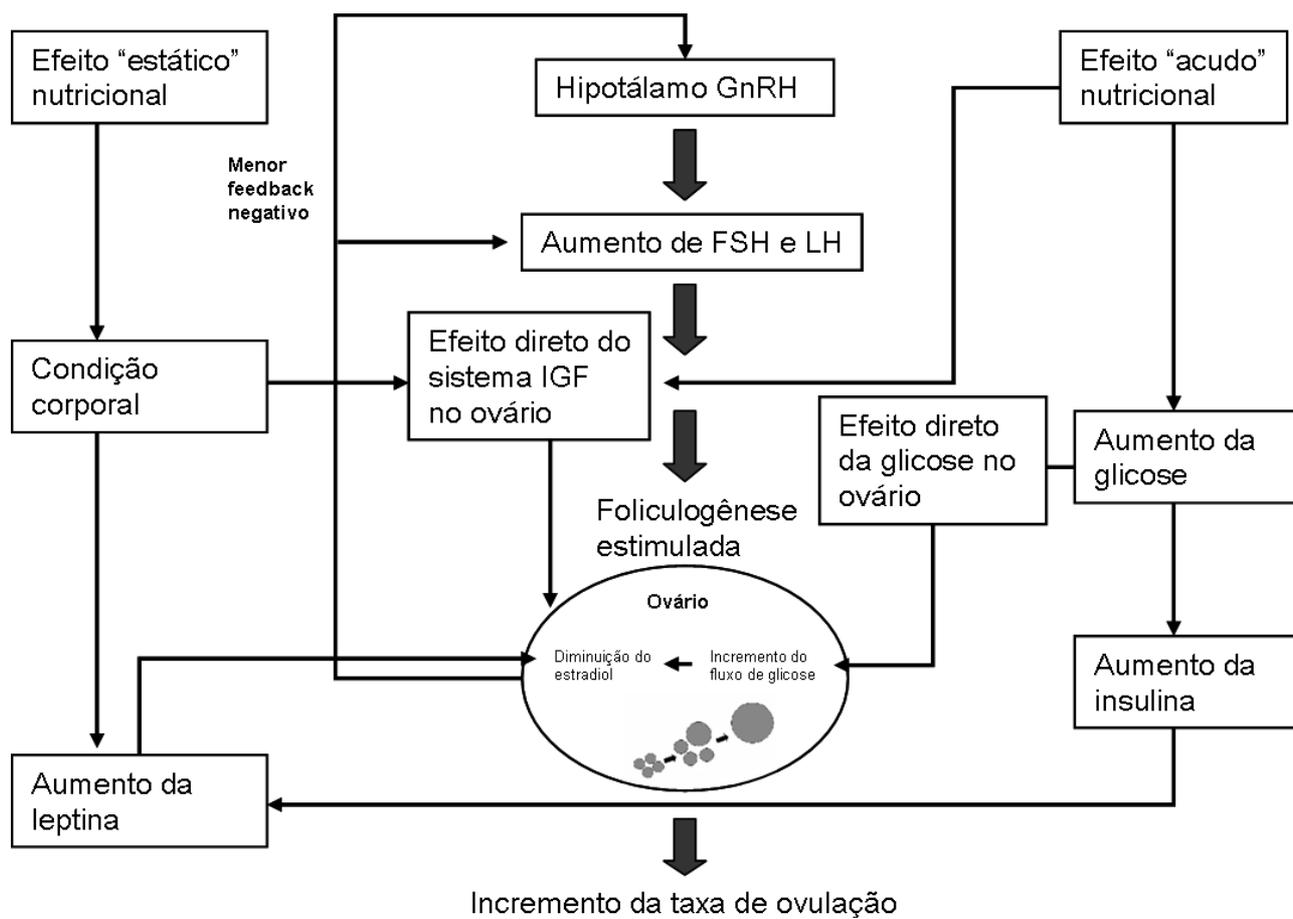


Figura 1. Modelo de regulação nutricional no desenvolvimento folicular e ovulação em ovinos [30]

III. CONTROLE NUTRICIONAL NA FOLICULOGÊNESE

Embora seja reconhecido que a resposta reprodutiva é subordinada a satisfação das exigências nutricionais do animal, esta demanda se diversifica em função do evento reprodutivo e por esta razão não é sempre de fácil quantificação. O requerimento nutricional, por exemplo, da lactação ou do desenvolvimento fetal é bem conhecido também em face do marcado investimento nutricional, enquanto para processos como a foliculogênese o empenho é bem pouco significativo e, portanto ainda não totalmente esclarecido [40]. Esta realidade de fato torna difícil ainda entender completamente as funções específicas e os mecanismos pelos quais a nutrição controla o desenvolvimento folicular ovariano.

Nas décadas de 70 e 80 foi verificado o envolvimento da nutrição como regulador ou moderador no processo de foliculogênese terminal. O efeito da nutrição sobre o desenvolvimento folicular a partir dos 0,5 mm de diâmetro foi observado por [10,16,27], que relataram uma redução na taxa de ovulação em ovelhas expostas a desnutrição. [6], em um estudo sobre a raça ovina Scottish Blackface, demonstraram como a taxa de ovulação é diretamente ligada às condições corpóreas e ao peso vivo, mesmo se em uma menor proporção. A partir da década de 90, utilizando as novas metodologias de cultivo folicular *in vitro*, numerosas pesquisas se focalizaram na descoberta e estudo de várias famílias de fatores intra-ovarianos envolvidos em todas as etapas da foliculogênese (para uma revisão, consultar [38,40]). A partir destes estudos se demonstrou como os fatores extra-ovarianos (hormônios metabólicos como o GH, Insulina, Leptina e o IGF), agem em sinergia com os fatores de crescimento locais intra-ovarianos mediando assim o efeito nutricional sobre a dinâmica folicular e o desenvolvimento do oócito.

Na última década uma forte atenção também foi dada a definição do papel da dieta materna. Em ovelhas, vários estudos de subnutrição durante a vida fetal evidenciaram os efeitos negativos sobre as células germinativas e a população folicular primordial do feto [4], assim como na expressão do potencial reprodutivo no recém nascido [25,26]. Com relação às fases iniciais da foliculogênese, estudos específicos em cabras revelaram como alterações

nutricionais aplicadas durante algumas semanas modificam quantitativamente e qualitativamente a população folicular pré-antral [28], e inferior a 1 mm de diâmetro (Rondina D., dados não publicado, 2004). Estes folículos são caracterizados para uma taxa de crescimento reduzida e uma menor dependência as gonadotrofinas respeito aos folículos da foliculogênese terminal [38]. Nos ovinos, o processo de desenvolvimento folicular, desde o momento de ativação e crescimento do folículo primordial até a ovulação, ocorre em um período médio de 6 meses [5]. Entretanto os últimos estágios de crescimento são muito rápidos; os folículos em crescimento com cerca de 0,5 mm de diâmetro atingem 4 ou 5 mm de diâmetro em apenas 8 a 9 dias [37]. Em ovinos adultos [5] e em cabras adultas (Rondina D., dados não publicados, 2004), estimam através da taxa mitótica das células da granulosa, em 70-80 dias como sendo o tempo necessário ao desenvolvimento do folículo secundário até o seu recrutamento nas ondas do ciclo sexual.

A partir também destas evidências é possível definir de forma mais acurada os intervalos de ação da nutrição sobre a dinâmica folicular em função do tempo de crescimento médio folicular de pequenos ruminantes, assim como ilustrado na Figura n 2. Estas informações representam sugestões para o manejo nutricional aplicado a reprodução e nas praticas de utilização das técnicas de reprodução assistida.

IV. NUTRIÇÃO E TRATAMENTOS HORMONAIS DE SINCRONIZAÇÃO DO ESTRO

O sucesso na aplicação de um protocolo de sincronização do estro em um rebanho passa sem duvida do controle alimentar e de um adequado estado nutricional dos animais utilizados. As informações a tal respeito são mais importantes se referentes aos pequenos ruminantes, que são criados nos sistemas tradicionais mais difundidos no mundo, que antevêm longos períodos do ano em condições pobres de pasto e de limitada oferta nutricional. [8], indicaram o baixo estado nutricional como a principal restrição na difusão desta técnica em caprinos criados ao tropico. Uma condição corporal reduzida aumenta a probabilidade de apresentar ou prolongar o período de anestro [9], comprometendo a resposta ao tratamento hormonal.

Em caprinos uma relação positiva entre redução do peso vivo e a quiescência ovariana (anestro + anovulação) induzida pela restrição alimentar tem sido demonstrada para [34]. Estes autores conforme precedentes observações

Intervalo de sensibilidade nutricional

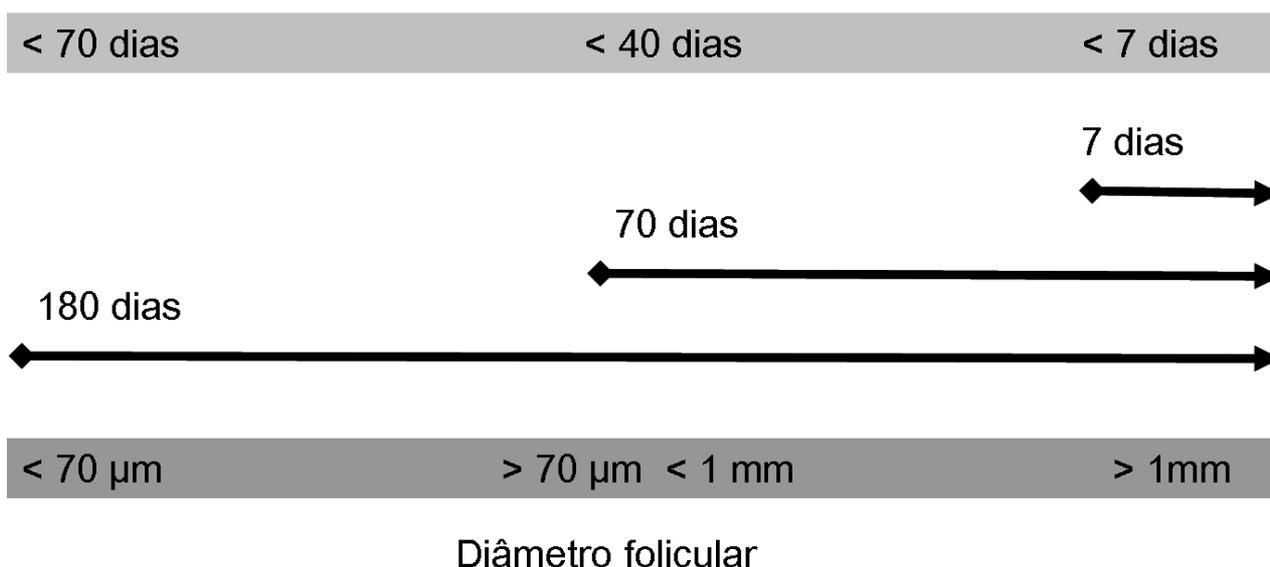


Figura 2. Intervalos em dias de sensibilidade nutricional em função do diâmetro folicular. Elaboração a partir dos resultados de [28,30] e Rondina (dados não publicados, 2004). Os valores acima das setas representam o tempo médio de crescimento folicular. Os dados foram elaborados a partir de [5,37] para os ovinos e Rondina (dados não publicados, 2004) em caprinos.

[36] sugerem que o momento de supressão da pulsatilidade do LH e conseqüente falha na ovulação ocorram com 25% de massa corpórea perdida. Algumas experiências conduzidas no Nordeste do Brasil com caprinos de tipo genético e planos nutricionais diversos [22,28], indicam que a indução do anestro e da quiescência ovariana ocorra respectivamente com 13% e 18% de perda de peso vivo inicial (Figura 3). Entretanto, ao passo que muitos dos componentes dos processos reprodutivos na fêmea (ovulação, fecundação e implantação) demandam períodos relativamente breves, a utilização de parâmetros como o peso vivo aparece muito imprecisa, pois acompanha as variações do estado nutricional apenas nas mudanças durante períodos prolongados.

A partir da análise dos resultados citados precedentemente é possível atribuir notas de escore da condição corporal [17] entre 2 e 2,5 como limite para a utilização dos protocolos hormonais de sincronização do estro em rebanho caprinos. Nestes animais notas consideradas ideais, variam entre 3 e 3,5 [7] e a redução de um ponto na escala equivale em média a uma perda de 6 kg de massa corpórea [7], valor este próximo a média da literatura citada precedentemente (5,3 kg PV).

Embora a eficiência dos tratamentos de sincronização seja subordinada ao status energético do animal, os resultados experimentais evidenciam uma interação entre tipo de protocolo hormonal e restrição nutricional. Cabras da raça Shiba submetidas a 30% das exigências energéticas durante 30 dias, não responderam ao tratamento mediante aplicação de CIDR + PGF_{2α} [35]. Os autores concluíram que a utilização do CIDR não apresentava benefícios na indução da ovulação em cabras após restrição nutricional. [32] em cabras Anglonubianas com condição corporal abaixo de 2,0, após o tratamento de sincronização aos 50 dias pós-parto com dispositivo CIDR seguido de uma administração de PGF_{2α}, verificou 100% de animais marcados pelo reprodutor durante a monta natural e uma taxa de gestação inferior nos animais com condição corporal muito reduzida.

[12], relataram em cabras Mashona submetidas a 27% e 53% das exigências nutricionais 60 dias antes da sincronização com duas doses de PGF 2 á intervaladas de 11 dias, uma redução de animais cobertos durante a monta e da sucessiva taxa de gestação. [13], usando animais do mesmo tipo genético com escore da condição corporal entre 2,2 e 2,0, encontraram uma taxa de cobrição similar, comparando diferentes protocolos de sincronização.

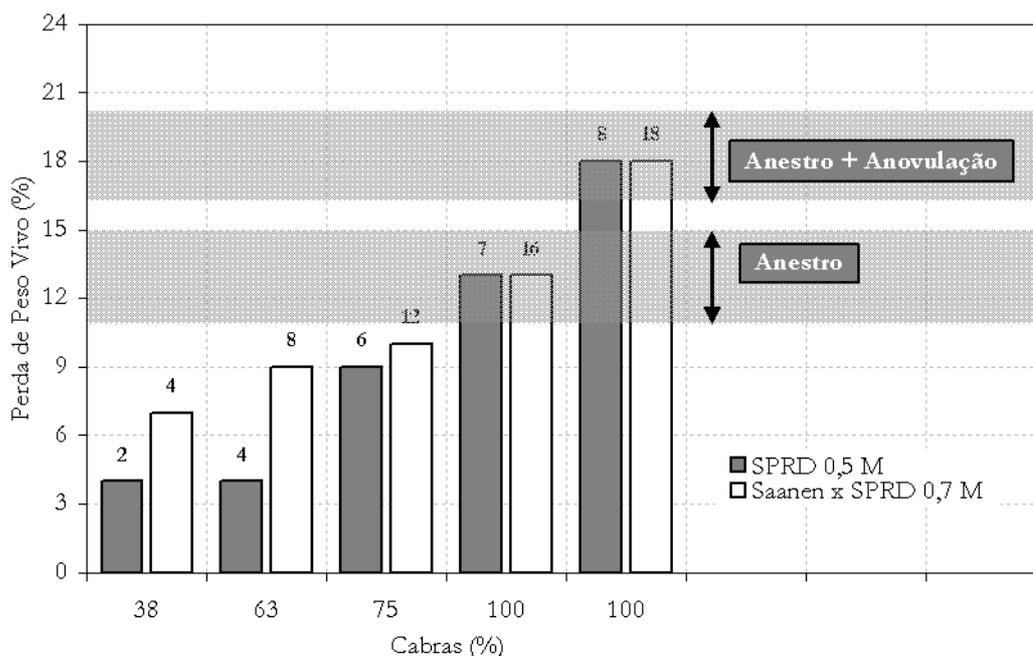


Figura 3. Anestro e anestro + anovulação induzidos pela perda de massa corpórea em cabras SPRD submetida a 50% das exigências energéticas [28] e Saanen x SPRD submetidas a 70% das exigências energéticas [22]. Os valores acima de cada coluna representam as semanas de restrição nutricional

Em cabras Moxotó submetidas à leve subnutrição (70% das exigências energéticas) durante seis meses [22], a administração de gonadotrofinas (300IU de ECG) durante o tratamento de sincronização com esponjas com FGA e uma injeção de cloprostenol, induziu o estro e ovulação em 50% dos animais. No mesmo experimento após seis semanas de realimentação a 150% das exigências energéticas se restabeleceu totalmente a resposta ao protocolo hormonal, dobrando a taxa de ovulação em relação ao grupo subnutrido. A associação positiva do uso de gonadotrofinas é bem documentado por [20] que em ovelhas mestiças superovuladas, submetidas a 50%, 100% e 200% das exigências nutricionais relataram um significativo incremento dos folículos e” a 3 mm dos animais não estimulados hormonalmente.

Nos últimos anos diversos estudos preconizaram a utilização de hormônios metabólicos como a insulina ou a somatotrofina em auxílio ao desempenho no período pós-parto, na indução do estro em cabras acíclica [29], ou na produção de embriões in vivo [31,33]. Em relação aos tratamentos de sincronização e superovulação, diversas experiências conduzidas no Brasil (Tabela 1) utilizando insulina ou somatotrofina exógena em cabras com um adequado estado nutricional, não relataram efeitos significativos sobre a manifestação do estro, embora ocasionalmente fosse observado um incremento do desenvolvimento folicular e da taxa de ovulação [1,2,23,31].

Tabela 1: resposta ao tratamento de sincronização do estro/superovulação em cabras tratadas com insulina ou somatotrofina bovina recombinante

Parâmetros	[31]	[1]	[2]	[23]
Tipo genético	Mestiças	Moxotó	Toggenburg	Anglonubiana
Tratamento Hormonal	Superovulação	Superovulação	Sincronização	Sincronização
Protocolo Hormonal	hCG + Estradiol + ovFSH + PGF2 α	MPA + pFSH + Cloprostenol	CIDR + PGF2 α	MPA + Cloprostenol
Tratamento utilizado	Insulina 0,2 UI/kg PV	Insulina 0,2 UI/kg PV; Propilenoglicol 80 mL/dia	r-bst 250 mg	Insulina 0,14 ou 0,20 UI/Kg PV:
Resposta ao estro	=	=	=	=
Duração do estro	=	N/D	=	=
Intervalo FT-IE*	=	=	=	=
Numero de folículos	+	=	=	N/D
Taxa de ovulação	=	=	=	+

* Intervalo final tratamento inicio do estro. = nenhum efeito; + efeito positivo; N/D não determinado

V. EFEITO DA NUTRIÇÃO SOBRE O OÓCITO E EMBRIÃO

Em pequenos ruminantes um planejamento nutricional de tipo convencional que tenha como objetivo maximizar o desempenho reprodutivo dedica pelo menos entre três as quatro semanas ou mais antes da monta. Este tipo de manejo é tradicionalmente utilizado para aumentar a taxa de ovulação ou a reposta superovulatória na produção de embriões in vivo, mas freqüentemente é associada a ovulações não fecundadas ou embriões que interrompem o próprio desenvolvimento [11].

Atualmente é amplamente reconhecido pelos especialistas da área, que as condições nutricionais exigidas no desenvolvimento folicular e ovulação diferem do sucessivo desenvolvimento embrionário, entretanto estes dois eventos são profundamente interligados. Recentes experiências com administração de insulina exógena antes e após a monta em cabras Moxotó superovuladas [33], elevaram a qualidade dos embriões coletados, o que não ocorreu quando a estimulação da insulinemia foi constante mediante doses diárias de propilenoglicol. Em cabras Anglonubianas a repetida administração de insulina após a monta natural afeta a taxa de gestação e o crescimento fetal [14].

Dietas não balanceadas fornecidas no período precedente a fecundação influenciam negativamente a qualidade do oócito e o desenvolvimento embrionário. Estudos têm relatado uma redução da taxa de oócitos clivados em ovelhas alimentadas com dietas a baixa ou elevada disponibilidade energética [3,15,21].

A capacidade de um oócito de se desenvolver com sucesso em um embrião é adquirida durante o processo de capacitação que precede a ovulação, no qual oócito acumula um conjunto de informações que serão utilizadas nos sucessivos estádios de desenvolvimento. Durante o intervalo entre fecundação e o estágio de transição materno-embrionária, quando a atividade transcricional é iniciada, a função embrionária é suportada do RNA materno e as proteínas sintetizadas durante a maturação do oócito. Resultados recentes [24] demonstraram como em ovelhas subalimentadas durante duas semanas com 50% das exigências energéticas, ocorreu uma redução da expressão no oócito do transportador de glicose 3, do co-transportador 1 sódio/glicose e da Na⁺/K⁺-ATPase, enquanto a expressão da leptina nas células da granulosa se elevou. É importante ressaltar que o transportador de glicose é essencial para o desenvolvimento embrionário após a implantação [24]. Isso significa que o manejo nutricional errado pode alterar RNA e proteínas sintetizadas diversas semanas antes de serem utilizadas. Esta hipótese tem suporte em outros estudos com ovinos que relatam como o fornecimento de dieta à vontade antes da ovulação tem efeitos adversos sobre a qualidade do oócito, mas também do mesmo embrião [15].

Sendo assim, novas perspectivas de pesquisa tornam-se de fundamental importância para um melhor conhecimento das relações entre nutrição e maturação do oócito, fertilidade e desenvolvimento embrionário, visando aperfeiçoar a resposta aos tratamentos de superovulação e assim, viabilizar a utilização de biotecnologias reprodutivas. As utilizações de novas técnicas de biologia molecular e de manipulação embrionária são ferramentas indispensáveis no estudo investigativo moderno. Se antigamente a medição de desempenho da qualidade do oócito estava na sua habilidade a formar um blastocisto ou uma cria, hoje mais parâmetros estão sendo usados incluindo a cultura *in vitro* e a expressão de genes chaves.

VI. CONCLUSÕES

O conhecimento da relação entre nutrição e reprodução em pequenos ruminantes está sendo adquirido essencialmente nos últimos anos, embora as contribuições nas décadas de 70 e 90 ainda sejam válidas. Entretanto, nem sempre no âmbito produtivo, tais conhecimentos encontraram uma completa aplicação. A tendência atual para aumentar os níveis produtivos e incrementar a produção pecuária fixa-se com maior vigor na necessidade de dar suporte com pesquisas específicas. Em ruminantes, a nutrição influencia diretamente a taxa de fertilidade através do fornecimento de nutrientes específicos requeridos para os processos de desenvolvimento oocitário, ovulação, fecundação e sobrevivência embrionária. O desempenho reprodutivo sofre ainda, efeitos nutricionais indiretos por meio do impacto dos nutrientes sobre as concentrações de hormônios e metabólitos circulantes, fundamentais para o sucesso destes processos bem como da aplicação de biotecnologias reprodutivas nos rebanhos. A nutrição exerce o seu efeito precocemente antes da formação do embrião ou da mesma fecundação, alterando a expressão de cópias de genes envolvidos no desenvolvimento folicular, no processo de capacitação do oócito ou no posterior desenvolvimento do embrião. Dietas de elevada densidade energética, assim como restrições alimentares causam detrimento na qualidade embrionária. Todas estas informações parecem sugerir o mesmo conceito de balanceamento nutricional como ponto crucial para obter um elevado desempenho. Não existem soluções milagrosas na nutrição, aumentar a eficiência reprodutiva é o resultado de um manejo alimentar racional juntamente a completa satisfação das exigências nutricionais dos animais.

REFERENCIAS

- 1 - Almeida A.P., 2006. Efeito de diferentes protocolos de estimulação energética na resposta superovulatória em cabras Moxotó. 84f. Fortaleza, CE. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará.
- 2 - Amorim E.A.M., Torres C.A.A., Amorim L.S., Fonseca J.F., Bruschi J.H., Guimarães J.D., Carvalho G.R., Alves N.G., & Cecon P.R. 2007. Dinâmica folicular em cabras da raça Toggenburg em lactação tratadas ou não com somatotropina bovina recombinante, *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia*. 59(6): 1500-1508.

- 3 - Borowczyk E., Caton J.S., Redmer D.A., Bilski J.J., Weigl R.M., Vonnahme K.A., Borowicz P.P., Kirsch J.D., Kraft K.C., Reynolds L.P. & Grazul-Bilska A.T. 2006. Effects of plane of nutrition on in vitro fertilization and early embryonic development in sheep. *Journal of Animal Science*. 84: 1593–1599.
- 4 - Borwick S.C., Rhind S.M., McMillen S.R. & Racey P.A., 1997. Effect of undernutrition of ewes from the time of mating on fetal ovarian development in mid gestation. *Reproduction Fertility and Development*. 9: 711-715.
- 5 - Cahill L.P. & Mauléon P. 1980. Influence of season, cycle and breed on follicular growth rates in sheep. *Journal of Reproduction and Fertility*. 58: 321-328.
- 6 - Doney J.M., Gunn R.G. & Horak F. 1982. Reproduction. In: *Sheep and Goat Production*. Amsterdam: Elsevier, pp. 57-80.
- 7 - Freer M. 2007. *Nutrient Requirements of Domesticated Ruminants*. Collingwood: CSIRO, 270
- 8 - Freitas V. J. F., Rondina D., Lopes Júnior E. S., Teixeira D. I. A. & Paula N. R. O. 2004. Hormonal treatments for the synchronization of oestrus in dairy goats raised in the tropics. *Reproduction, Fertility and Development*. 16(4): 415-420.
- 9 - Freitas V.J.F., Rondina D., Nogueira D.M. & Simplicio A.A. 2004. Post-Partum anoestrus in Anglo-Nubian and Saanen goats raised in semi-arid of North-eastern of Brazil. *Livestock Production Science*. 90: 219 -226.
- 10 - Haresign W. 1981. The influence of nutrition on reproduction in the ewe. 1. Effects on ovulation rate, follicle development and luteinizing hormone release. *Animal Production*. 32: 197-202.
- 11 - Kakar M.A., Maddocks S., Lorimer M.F., Kleemann D.O., Rudiger S.R., Hartwich K.M. & Walker S.K. 2005. The effect of peri-conception nutrition on embryo quality in the superovulated ewe *Theriogenology*. 64: 1090 -1103.
- 12 - Kusina N. T., Chinuwo T., Hamudikuwanda H., Ndlovu L. R. & Muzanhenhamo S. 2001. Effect of different dietary energy level intakes on efficiency of estrus synchronization fertility in Mashona goat does. *Small Ruminant Research*. 39: 283-288.
- 13 - Kusina N.T., Tarwirei H., Hamudikuwanda H., Agumba G. & Mukwena J. 2000. A comparison of the effects of progesterone sponges and ear implants, PGF2a, and their combination on efficacy of estrus synchronization and fertility of Mashona goat does. *Theriogenology*. 53: 1567–1580.
- 14 - Lima I.M.T., 2008. Resposta reprodutiva de cabras da raça Anglo-nubiana submetidas à administração de insulina antes e após a monta natural 100f. Fortaleza, CE. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará.
- 15 - Lozano J.M., Lonergan P., Boland M.P. & O’Callaghan D. 2003. Influence of nutrition on the effectiveness of superovulation programmes in ewes: effect on oocyte quality and postfertilization development. *Reproduction*. 125: 543–553.
- 16 - McNeilly A.S., Jonasson J.A. & Rhind S.M. 1987. Reduced ovarian follicular development as a consequence of low body condition in ewes. *Acta Endocrinology*. 115: 75 - 83.
- 17 - Morand-Fehr P. & Hervieu J. 1999. Apprécier l’état corporel des chèvres: Intérêt et méthod. *Reussir La Chevre*, (231): 22-34.
- 18 - Muñoz-Gutiérrez M., Blache D., Martin G.B. & Scaramuzzi R.J. 2004. Ovarian follicular expression of mRNA encoding the type I insulin like growth factor receptor (IGF-IR) and insulin like growth factor binding protein 2 (IGFBP2) in anoestrous sheep after 5 days of glucose or glucosamine or supplementary feeding with lupin grain. *Reproduction*. 28: 1–11.
- 19 - Muñoz-Gutiérrez M., Blache D., Martin G.B. & Scaramuzzi R.J. 2002. Folliculogenesis and ovarian expression of mRNA encoding aromatase in anoestrous sheep after 5 days of glucose or glucosamine infusion or supplementary lupin feeding. *Reproduction*. 124: 721– 731.
- 20 - O’Callaghan D., Yaakub H., Hyttel P., Spicer L.J. & Boland M.P. 2000. Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. *Journal Reproduction and Fertility*. 118: 303-313.
- 21 - Papadopoulos S, Lonergan P, Gath V, Quinn KM, Evans AC, O’Callaghan D & Bolan MP 2001. Effect of diet quantity and urea supplementation on oocyte and embryo quality in sheep. *Theriogenology*. 55: 1059–1069.
- 22 - Paula N. R. O., Galeati G., Teixeira D. I. A., Lopes Júnior E. S., Freitas V. J. F. & Rondina D. 2005. Responsiveness to progestagen-eCG-cloprostenol treatment in goat food restricted for long period and refed. *Reproduction Domestic Animals*. 40: 108-110.
- 23 - Pinheiro E.S.P., 2008. Influência da insulina exógena em doses diferentes sobre os parâmetros reprodutivos de cabras nulíparas da raça Anglo-nubiana 89f. Fortaleza, CE. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará.
- 24 - Pisani L.F., Antonini S., Pocar P., Ferrari S., Brevini T.A., Rhind, S.M. & Gandolfi F. 2008. Effects of pre-mating nutrition on mRNA levels of developmentally relevant genes in sheep oocytes and granulosa cells. *Reproduction*. 136: 303–312.
- 25 - Rae M. T., Rhind S. M., Fowler P. A., Miller D. W., Kyle, C. E. & Brooks, A. N. 2002. Effect of maternal undernutrition on fetal testicular steroidogenesis during the CNS androgen-responsive period in male sheep fetuses. *Reproduction*. 124: 33–39.
- 26 - Rae M.T., Palassio S., Kyle C. E., Brooks A.N., Lea R.G., Miller D. W. & Rhind, S. M. 2001. Effect of maternal undernutrition during pregnancy on early ovarian development and subsequent follicular development in sheep fetuses. *Reproduction*. 122: 915–922.
- 27 - Rhind S.M. & McNeilly A.S. 1986. Follicle populations, ovulation rates and plasma profiles of LH, FSH and prolactin in Scottish blackface ewes in high and low levels of body condition. *Animal Reproduction Science*. 10: 105-115.
- 28 - Rondina D., Freitas V.J.F., Spinaci M. & Galeati G. 2005. Effect of nutrition on plasma progesterone levels, metabolic parameters and small follicles development in unstimulated goats reared under constant photoperiod regimen. *Reproduction Domestic Animals*. 40: 548-552.

- 29 - Sarath T., Mehrotra S., Agarwal S.K., Varshney V.P., Hoque M., Shankar U. & Singh S.K., 2008. Effect of insulin administration on ovarian function and estrus induction in acyclic goats. *Animal Reproduction Science*. 108: 216-225.
- 30 - Scaramuzzi R.J., Campbell B.K., Downing J.A., Kendall N.R., Khalid M., Muñoz-Gutiérrez M. & Somchit A. 2006. A review of the affects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reproduction Nutrition Development*. 46: 339-354.
- 31 - Selvaraju S., Agarwal S.K., Karche S.D. & Majumdar A.C., 2003. Ovarian response, embryo production and hormonal profile in superovulated goats treated with insulin. *Theriogenology*. 59: 1459-1468.
- 32 - Silva L.M., 2009. Influência do estado nutricional sobre o desempenho reprodutivo pós-parto de cabras Anglo-nubiana criadas extensivamente no Nordeste do Brasil 59f. Fortaleza, CE. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará.
- 33 - Souza A.L., Galeati G., Almeida A.P., Arruda I.J., Govoni N., Freitas V.J.F., & Rondina D., 2008. Embryo production in superovulated goats treated with insulin before or after mating or by continuous propylene glycol supplementation. *Reproduction Domestic Animal*. 43: 218–221.
- 34 - Tanaka T., Akaboshi N., Inoue Y., Kamomae H. & Kaneda Y. 2002. Fasting-induced suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion is related to body energy status in ovariectomized goats. *Animal Reproduction Science*. 72: 185-196.
- 35 - Tanaka T., Fujiwara K.I., Kim S., Kamomae H. & Kaneda Y. 2004. Ovarian and hormonal responses to a progesterone-releasing controlled internal drug releasing treatment in dietary-restricted goats. *Animal Reproduction Science*. 84: 135–146.
- 36 - Tanaka T., Yamaguchi T., Kamomae H. & Kaneda Y. 2003. Nutritionally induced body weight loss and ovarian quiescence in Shiba goats. *Journal of Reproduction and Development*. 49: 113-119.
- 37 - Turnbull K.E., Braden A.W.H. & Mattner P.E. 1977. The pattern of follicular growth and atresia in the ovine ovary. *Australian Journal of Biological Science*. 30: 229 - 241.
- 38 - Van den Hurk R. & Zhao J. 2005. Formation of ovarian follicles and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*. 63: 1717-1751.
- 39 - Viñoles GC. 2003. Effect of nutrition on follicle development and ovulation rate in the ewe. PhD thesis - Swedish University of Agricultural Sciences.
- 40 - Webb R., Garnsworthy P.C., Gong J.G., & Armstrong D.G. 2004. Control of follicular growth: Local interactions and nutritional influences. *Journal of Animal Science*. 82(Suppl. E.): 63–74.

Doppler Ultrasonography in Small Ruminants Reproduction

José Carlos de Andrade Moura¹

Background: Real-time ultrasonography (US) has been developed as a research and practical tool in small ruminants reproduction. Practical applications of US include early diagnosis of pregnancy, identification of twin fetuses, detection of ovarian and uterine pathologies and determination of fetal sex. Now the emerging technology is color “ power Doppler ultrasonography.

Review: Doppler US is a diagnostic procedure that uses an ultrasound scanner to convert sound waves into imagens of blood flow in body tissues and organs. In color Doppler imaging, blood flow is displayed in colour on a two dimensional B-mode image of the tissue structure or organ. Doppler imaging provides real-time blood flow visualization, ranging from high velocity flow in large vessels to minimal flow through terminal vessels. For exemplar, local blood flow has been analysed in individual ovarian follicles and corpus luteum. From these observations, it has been found that (1) the blood supply to follicles is closely related to follicular growth, atresia and ovulation, (2) the blood flow to the corpus luteum increases in parallel with its growth, and (3) images of blood flow can be used to assess the thickness of the follicular wall and provide a differential diagnosis of follicular and luteal cysts.

Conclusion: Doppler US is a useful, non-invasive technique for evaluating ovarian vascular function, uterine and fetal blood flow. In the male for evaluation of the testis, epididymis, spermatic cord and accessory sex glands. Widespread commercial uptake of Doppler US awaits further development of the technology and demonstration of its performance, its ease-of-use and its cost-effectiveness.

Keywords: Doppler, ultrasonography, blood flow, small ruminants.

¹Escola de Medicina Veterinária da UFBA. CORRESPONDENCE [jcamoura@ufba.com]



Alternatives to estrus synchronization and superovulation in ewes in the tropics

Jairo Pereira Neves¹, Alexandre Floriani Ramos² & Bianca Damiani Marques Silva¹

ABSTRACT

Background: With expansion of the market, sheep rearing has increased in Brazil, which means there an increase in the use of economically viable biotechnologies to increase production indices. The objective of this study is to show alternative protocols of oestrus synchronization and superovulation with the aim of increasing reproductive indices of sheep herds in the tropics. An alternative to the traditional protocol of MPA with eCG is the use of PGF2 α .

Review: Synchronization rate, hours between the end of protocol to estrus, size of largest and second largest ovarian follicles and ovulation rate did not differ between protocols (100.0%; 66.0 \pm 2.5; 3.5 \pm 0.2; 2.4 \pm 0.2; 1.5 \pm 0.1 and 100.0%; 67.3 \pm 2.8; 3.1 \pm 0.2; 2.2 \pm 0.2; 1.7 \pm 0.2 for PGF2 α and MPA + eCG, respectively, P > 0.05). Ewes synchronized with MPA + eCG had higher serum P4 concentrations than ewes synchronized with PGF2 α (3.9 and 2.8 ng/mL, MPA+ eCG and P4, respectively, P < 0.05). Based on these results, it may be concluded that the PGF2 α was equivalent to traditional protocol in terms of estrus synchronization. Another alternative is the use of GnRH to induce ovulation. The use of GnRH associated with long (12 days) and short (7 days) protocol compared to no use showed efficient ovulation induction. Animals on the long + GnRH (36.4%) and short + GnRH (30%) showed lower estrus manifestation than long (80%) and short (90%), possibly due to induction of LH peak before estrus manifestation. In protocols that had GnRH injection, 100% of ewes ovulated, while 70% and 80% ovulated in long and short protocol without use of GnRH, proving that GnRH was efficient in inducing ovulation in these protocols. The interval between sponge withdrawal and estrus manifestation was the same (P > 0.05) among groups (37.0 \pm 7.0; 44.2 \pm 6.2; 42.0 \pm 6.0; 45.6 \pm 11.6 hours; for long + GnRH, long, short + GnRH and short, respectively). GnRH brought forward (P < 0.05) ovulation in relation to sponge withdrawal, in long and short protocol (54.5 \pm 2.7^B; 71.4 \pm 4.1^A; 57.0 \pm 6.7^B; 71.5 \pm 5.0^A hours, to long + GnRH, long, short + GnRH and short respectively). The groups that received GnRH injection ovulated about 28 hours after this injection. GnRH was efficient in inducing and bringing forward ovulation using long and short protocols. Among the protocols for superovulation in ewes, the major concern has been obtaining high superovulatory response and number of viable embryos recovered. When comparing the traditional protocol with Day 0 protocol, the number of corpora lutea and ova/embryos recovered did not differ (9.8 \pm 5.3; 4.5 \pm 4.6; 10.0 \pm 6.0; 3.5 \pm 4.3, traditional and Day 0, respectively, P > 0.05). Similarly, no difference in number of viable embryos was observed between treatments (1.6 \pm 2.0 e 1.7 \pm 2.4 traditional and Day 0, respectively). Within viable embryos, the traditional protocol (0.4 \pm 1.0) resulted in a higher (P < 0.05) number of morulae than that of the Day 0 protocol (0.1 \pm 0.3).

Conclusion: In summary, no difference in parameters evaluated was observed between both protocols. Considering the experiments all the alternatives protocols had the same efficiency that the traditional ones, could be alternatives to increase the reproduction in ewes.

Keywords: protocol, MAP, eCG, PGF2 α , GnRH, Day 0.

¹Faculdade de Agronomia e Veterinária, Universidade de Brasília, Campus Universitário "Darcy Ribeiro", 70910-900, Brasília, DF, Brasil.

²Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 70.770-900 Brasília – DF, Brasil. CORRESPONDENCE: J.P. Neves [jpneves@unb.br, biancadamiani@yahoo.com.br].

I. INTRODUCTION

II. ESTRUS SYNCHRONIZATION WITH PROSTAGLANDIN F2 α COMPARED TO PROGESTAGEN FOLLOWED BY EQUINE CHORIONIC GONADOTROPHIN (ECG) IN SANTA INÊS EWES IN THE FEDERAL DISTRICT, BRAZIL

III. INDUCTION OF OVULATION WITH GnRH ASSOCIATED WITH LONG AND SHORT ESTRUS SYNCHRONIZATION PROTOCOL IN EWES

IV. EFFECT OF SUPEROVULATION INITIATED AT FOLLICULAR WAVE EMERGENCE IN SANTA INÊS EWES

V. CONCLUSION

I. INTRODUCTION

There are 16.5 million head of sheep in Brazil [2]. The potential for this enterprise is seen by the increase in slaughter numbers, the importation of sheep meat and the number of sale points for the product [1]. With the increase in the market, there is interest in intensifying economic exploration of the species, using reproductive biotechnologies to increase production indices. Artificial insemination and embryo transfer together with estrus synchronization and superovulation are used in sheep breeding.

The use of synchronization protocols with two doses of prostaglandin F2 α is an alternative to reduce costs without affecting the results obtained. The induction of ovulation with GnRH may also improve ovulation rates and thereby increase the use of animals in artificial insemination programs. Superovulation treatments which use the emergence of the first follicular wave of the oestral cycle, such as the so called Day 0 protocol, may be alternatives for embryo collection in breeds adapted to tropical conditions, increasing the contribution of the maternal line in animal breeding programs.

The objective of this study was to show alternative protocols for the synchronization of oestrus and superovulation to increase reproductive indices in sheep in the tropics.

II. ESTRUS SYNCHRONIZATION WITH PROSTAGLANDIN F2 α COMPARED TO PROGESTAGEN FOLLOWED BY EQUINE CHORIONIC GONADOTROPHIN (ECG) IN SANTA INÊS EWES IN THE FEDERAL DISTRICT, BRAZIL

The aim of this study was to compare two protocols of estrus synchronization in Santa Inês ewes. A randomized crossover design was used, where thirty-eight ewes were treated with two protocols of estrus synchronization: PGF2 α (two doses of 0.530 mg of PGF2 α ¹, nine days apart) and MPA²+eCG³ (intravaginal sponge impregnated with medroxyprogesterone acetate, for 12 days and then an injection of 250 IU of eCG). On the final day of the protocols a transrectal ultrasound⁴ examination was carried out to measure the size of the largest and second largest ovarian follicles and, on day 7 of the estrous cycle, blood was collected to measure serum P4 concentration. Laparoscopy⁵ was carried out on day 11 after the end of protocols to count corpora lutea.

The variables were tested for normality and homocedasticity using the Lilliefors and Cochran tests, respectively. The variable which was normal and homoscedastic (serum concentration of P4) was analyzed using a paired t test. The variables that were not normal were analyzed using Wilcoxon non-parametric test. Binomial variables were tested using Chi-squared test. Significance level was considered at 5% (P < 0.05).

Synchronization rate, size of largest and second largest ovarian follicles, hours between the end of the protocol to estrus and ovulation rate did not differ between protocols (Table 1). Ewes synchronized with MPA+eCG had higher serum P4 concentrations than ewes synchronized with PGF2 α (3.9 and 2.8 ng/mL, respectively, P < 0.05,

Table 1). The results in table 2 showed a higher number of female in estrus during the evening (intervals 37-48 and 61-72 hours). These indicate a possible effect of circadian rhythm on estrus behavior which has been little discussed in scientific papers to date.

Based on the results, it may be concluded that although the MPA+eCG protocol was superior in inducing higher P4 serum concentrations, the PGF2 α protocol was equivalent in terms of estrus synchronization. This creates a perspective of use of PGF2 α protocol because it is cheaper (30 to 60% less than MPA+eCG).

Table 1. Synchronization rate, hours between the end of the protocol to estrus, size of largest and second largest ovarian follicles, ewes with corpora lutea at the end of protocol, ovulation rate and serum P4 concentrations on Day 7 of estrus cycle on synchronization protocols PGF2 α (two doses of 0.530 mg of PGF2 α , nine days apart) and protocol MPA+eCG (intravaginal sponge impregnated with medroxyprogesterone acetate, for 12 days and then an injection of 250 IU of eCG) in Santa Inês ewes (percentage or average \pm SE).

	PGF2 α	MPA+eCG
Synchronization rate; % (n/n)	100.0 (38/38)	100.0 (38/38)
Hours between the end of protocol to estrus; h	66.0 \pm 2.5	67.3 \pm 2.8
Largest follicle diameter; mm	3.5 \pm 0.2	3.1 \pm 0.2
Second largest follicle diameter; mm	2.4 \pm 0.2	2.2 \pm 0.2
Ewes with corpora lutea at the end of protocol, %	79.0 ^a	7.9 ^b
Ovulation rate; n	1.5 \pm 0.1	1.7 \pm 0.2
Serum P4 concentrations, n	2.8 \pm 0.1 ^a	3.9 \pm 0.1 ^b

^{a,b} Diference among lines (P < 0.05).

III. INDUCTION OF OVULATION WITH GnRH ASSOCIATED WITH LONG AND SHORT ESTRUS SYNCHRONIZATION PROTOCOL IN EWES.

The use of GnRH in synchronization protocols has the objective of inducing and synchronizing the ovulation during FTAI. Shortening the time from AI to ovulation could improve fertility, especially when using frozen/thawed semen. Rubianes et al. (1997) showed the LH peak in all ewes from 1 to 2 hours after GnRH injection and these all ovulated within 48 hours. GnRH injection with FSH or eCG synchronizes the moment of ovulation. Protocols with GnRH show high synchronization of the time of ovulation, which can contribute to the success of FTAI programs [4]. The aim of this work was verify the use of GnRH to synchronize the ovulation of Santa Inês ewes using long and short protocols using MPA and eCG.

Table 2. Occurrence of estrus with PGF2 α (two doses of 0.530 mg of PGF2 α , nine days apart) and MPA+eCG (intravaginal sponge impregnated with medroxyprogesterone acetate, for 12 days and then an injection of 250 IU of eCG) protocols at intervals of estrus observation every 12 hours from the end of protocols .

	Intervals of estrus observation (h)						
	0-24	25-36	37-48	49-60	61-72	73-84	85-96
PGF2α; % (n/n)	0 (0/38)	0 (0/38)	34,2 (13/38)	10,5 (4/38)	31,6 (12/38)	18,4 (7/38)	5,3 (2/38)
MPA+eCG; % (n/n)	2,6 (1/38)	0 (0/38)	31,6 (12/38)	2,6(1/38)	31,6 (12/38)	26,3 (10/38)	5,3 (2/38)

Forty one ewes were randomly distributed into 4 protocols. The long protocols consisted of intravaginal sponge impregnated with medroxyprogesterone acetate (MPA²), for 12 days and then an injection of 300 IU of eCG³, with a single 25 µg GnRH⁶ injection 27 hours after the sponge withdrawal. The short protocols used the sponge for 7 days, with an injection of 37.5 µg D-cloprostenol⁷ at day 5, 300 UI of eCG on day 7; and a single injection of 25 µg of GnRH, 27 hours after sponge withdrawal. Animals were observed for estrus every 2 hours between 12 and 66 hours after sponge withdrawal. The ovulation was evaluated by laparoscopy 52, 56, 60, 66, 72 and 76 hours after the end of the protocol. A chisquared test and analysis of variance with mean comparison using Duncan test ($P < 0.05$) was carried out using the SAEG program.

The groups with GnRH injection showed lower estrus occurrence than the groups that did not receive GnRH, possibly due to the induction of LH peak, by the injection of GnRH, before estrus manifestation. All protocols (long and short) that used GnRH were efficient in inducing ovulation, since all ewes ovulated (Table 3). The interval between sponge withdrawal and estrus manifestation were not significantly different ($P > 0.05$) between groups (Table 3). The GnRH brought forward ($P < 0.05$) the ovulation in relation to sponge withdrawal, in both long and short protocols (Table 3). The groups that received GnRH injection ovulated about 28 hours after this injection (Table 3). The injection of GnRH was 27 hours after sponge withdrawal with the aim to shorten the time between ovulation and insemination and improve fertility rate. GnRH was efficient in inducing and bringing forward ovulation using long and short protocols.

IV. EFFECT OF SUPEROVULATION INITIATED AT FOLLICULAR WAVE EMERGENCE IN SANTA INÊS EWES

Superovulation in ewes has been a source of many studies aimed at obtaining high superovulatory response and number of viable embryos recovered. In a protocol called Day 0, a superovulatory treatment was initiated at the time of wave emergence in the absence of a dominant follicle [3]. The aim of this study was to compare ovarian response and number of embryos recovered after treatment in ewes treated with a Day 0 protocol and those treated with a traditional protocol. Santa Inês ewes ($n = 18$) were randomly distributed into two superovulation treatment groups: traditional protocol and Day 0 protocol. Each treatment was repeated twice in a crossover model. The traditional protocol consisted of intravaginal insertion of a sponge containing 60 mg medroxyprogesterone acetate (MAP²) for 14 days, which was replaced on Day 7, followed by 150 µg of cloprostenol. On Day 12, FSH⁸ treatment was initiated using a total dose of 200 mg, given in twice-daily injections that decreased in dose over 4 days. A dose of 200 IU of eCG³ was given at the time of sponge withdrawal. Artificial insemination was carried out by laparoscopy at 48 and 55 hours after sponge withdrawal using fresh semen.

Table 3. Manifestation of estrus and time of ovulation related to sponge withdrawal and injection of GnRH using long (12 days) and short (7 days) protocols associated with 300 UI of eCG and injection of 25 µg of GnRH in ewes.

	Long + GnRH	Long	Short + GnRH	Short
Estrus manifestation	36.4% (4/11)	80% (8/10)	30% (3/10)	90% (9/10)
Ewes ovulated	100% (11/11)	70% (7/10)	100% (10/10)	80% (8/10)
Time of sponge withdrawal to estrus manifestation (h)	37.0±7.0	44.2±6.2	42.0±6.0	45.6±11.6
Time of sponge withdrawal to ovulation (h)	54.5±2.7 ^B	71.4±4.1 ^A	57.0±6.7 ^B	71.5±5.0 ^A
Time of estrus to ovulation (h)	19.0±9.6 ^b	28.9±2.3 ^a	26.0±9.2 ^{ab}	29.3±4.3 ^a
Time of GnRH injection to ovulation (h)	27.5±2.7	—	30.0±6.7	—

Values followed by capital letters in the same line are significant different (Kruskal-Wallis; $P < 0.05$). Values followed by lowercase letters in the same line are significant different (Duncan; $P < 0.05$).

The Day 0 protocol consisted of a previous 9-day synchronization treatment with a sponge containing 60 mg of MPA², followed by 150 µg of cloprostenol⁷ and 200 IU of eCG³ given on Day 7. A dose of 50 µg of GnRH⁶ was given 16 hours after sponge withdrawal. Forty eight hours after sponge removal was considered as Day 0 and FSH treatment was initiated at that time, with a total dose of 200 mg of FSH⁸, given in 6, twice-daily, decreasing doses. Two doses of cloprostenol⁷ (150 µg) were given concurrent with the fifth and sixth FSH treatments. GnRH (50 µg⁶) was given 12 hours after the last FSH treatment. Artificial insemination with fresh semen was carried out by laparoscopy 16 and 26 hours after GnRH treatment. Five days after AI, embryos were recovered surgically. Results were evaluated using a paired t test. The number of corpora lutea and ova/embryos recovered did not differ ($P > 0.05$) between the traditional and Day 0 protocols (Table 4). Similarly, no difference in the number of viable embryos was observed between treatments (Table 4). Within viable embryos, the traditional protocol resulted in a higher ($P < 0.05$) number of morulae than that of the Day 0 protocol (Table 4). The ewes that had no superovulatory response did not differ ($P > 0.05$) between the traditional (11.11%) and Day 0 (5.56%) protocols. There was no significant difference between protocols for parameters evaluated. The results between protocols was the same possibly because the existence of follicular dominance in the ewe is not clear, Tossi et al., (2010) showed that a creation of two distinct peaks in serum FSH concentrations by giving oFSH during an inter-wave interval induce emergence of additional follicular waves. In summary, there was no difference in the parameters evaluated between both protocols.

Table 4. The number of corpora lutea, ova/embryos recovered and viable embryos when comparing D0 and traditional protocols in Santa Inês ewes.

	D0	TRADITIONAL
Corpora lutea (left ovary)	4.8 ± 3.1	5.3 ± 3.5
Corpora lutea (right ovary)	5.1 ± 3.2	4.8 ± 3.1
Corpora lutea (total)	9.8 ± 5.3	10.0 ± 6.0
Ova/Embryos recovered	4.5 ± 4.6	3.5 ± 4.3
Viable embryos	1.6 ± 2.0	1.7 ± 2.4
Morulae	0.1 ± 0.3 ^A	0.4 ± 1.0 ^B
Blastocist	1.5 ± 1.9	1.3 ± 2.2
Degenerated embryos	1.5 ± 2.7	0.8 ± 2.2

^{A,B} Values followed by capital letters in the same line are significant different by paired t test ($P < 0.05$)

V. CONCLUSION

Alternatives protocols for estrus synchronization such as two doses of PGF2 α could be an alternative to reduce costs without affecting the results obtained, like induce ovulation with GnRH could improve ovulated rates and develop the FTAI programs, and superovulation such as Day 0 protocol, has the same efficiency for productive parameters as traditional protocols, confirming that there are possible alternatives to those commonly used to increase reproductive efficiency in sheep.

Acknowledgments. Financial support: FAPDF, CNPq. For the animals: FAL-UnB, Embrapa, Haras Rancho Tokarski, Agrotorres.

REFERENCES

- 1 **Anuário da Pecuária Brasileira (ANUALPEC). 2008.** São Paulo. FNP Consultoria & Comércio, 376 p.
- 2 **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). 2008.** Pesquisa Pecuária Municipal. Disponível em: <<http://www.ibge.org.br>>. Acessado em 04/2010.
- 3 **Menchaca A., Pinczak A. & Rubianes E. 2002.** Follicular recruitment and ovulatory response to FSH treatment initiated on Day 0 or Day 3 postovulation in goats. *Theriogenology*. 58: 1713-1721.
- 4 **Menchaca A. & Rubianes E. 2004.** New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*. 16: 403-413.
- 5 **Rubianes E., Beard A., Dierschke P., Bartlewski P., Adams G.P. & Rawlings N.C. 1997.** Endocrine and ultrasound evaluation of the response to PGF2a and GnRH given at different stages of the luteal phase in cyclic ewes. *Theriogenology*. 48(7): 1093-1104.
- 6 **Tossi B., Davies K.L., Seekallu S.V., Ziegler A.C., Barrett D.M.W., Duggavathi R. & Rawlings N. 2010.** Ovarian Follicular Dominance and the induction of daily follicular waves in the ewe. *Biology of Reproduction*. [in press].

Sources and Manufacturers

- 1 – Ciosin, Intervet Shering-Plough, São Paulo, Brazil.
- 2 – BIOREP, UFSM, RS, Brazil.
- 3 – Novormon, Intervet Shering-Plough, São Paulo, Brazil.
- 4 – Falco 100, Pie Medical, Nutricell, São Paulo, Brazil.
- 5 – Storz, Alemanha.
- 6 – Gestran Plus, Tecnopec, São Paulo, Brazil.
- 7 – Prolise, Tecnopec, São Paulo, Brazil.
- 8 – Folltropin- V, Bioniche, Belleville, Ontario, Canada.



Produção de Oócitos e Embriões de Pequenos Ruminantes: Passado, Presente e Futuro

Jeferson Ferreira da Fonseca¹, Joanna Maria Gonçalves de Souza² & Luiz Sérgio de Almeida Camargo³

RESUMO

A movimentação mundial na área de tecnologia de embriões de pequenos ruminantes é bastante instável. A produção de embriões *in vivo* ainda carece de maiores informações que possibilitem maior difusão da técnica. O mesmo parece acontecer com a produção *in vitro* de embriões. Ambas as vias de produção de embriões dependem da demanda de mercado para alavancar seu crescimento e estabilização. A recuperação no crescimento do rebanho ovino e a manutenção das taxas de crescimento do rebanho caprino serão decisivas neste cenário. Esta revisão abordará a produção de embriões *in vivo* e *in vitro* em ovinos e caprinos.

Palavras-Chave: embriões, FIV, ovino, caprino.

ABSTRACT

The world activity in small ruminant embryo technology is instable. *In vivo* embryo production needs more information to support the diffusion of the technique. The same phenomenon appears to happen in the *in vitro* embryo production. Both embryo productions forms depend of market demands to grow and establish. Restoration of the sheep herd growing and maintenance of rates of growing of goat herds will be decisive in this scenario. This review emphasized *in vivo* and *in vitro* production of sheep and goat embryos.

Keywords: embryos, IVF, sheep, goat.

¹Embrapa Caprinos e Ovinos, Núcleo Regional Sudeste, CECP-Embrapa Gado de Leite, Rodovia MG133, km42, Cep 36.155-000, Coronel Pacheco-MG, Brasil. ²Universidade Estadual do Ceará, Avenida Dedé Brasil, 1700, Cep 60.740-903, Fortaleza – CE, Brasil. ³Embrapa Gado de Leite, Rua Eugênio do Nascimento, 610, Dom Bosco, Juiz de Fora – MG, Brasil Cep 36.038-330, Brasil. Correspondência: J.F.Fonseca [jeferson@cnpq.embrapa.br – TEL: +55 (32) 32494900].

I. INTRODUÇÃO

II. PRODUÇÃO DE EMBRIÕES *IN VIVO*

Histórico

Atividade na área de tecnologia de embriões em pequenos ruminantes no mundo

Superovulação

Coleta de embriões

Inovulação de embriões

III. PRODUÇÃO DE EMBRIÕES *IN VITRO*

Histórico

Coleta de oócitos para PIVE e procedimentos hormonais

Cultivo *in vitro* de oócitos e embriões

Maturação e fecundação *in vitro* (MIV e FIV)

IV. CONCLUSÕES

I. INTRODUÇÃO

A transferência de embriões (TE) apresenta-se como uma biotecnologia de reprodução assistida atual e em plena atividade e crescimento no aprimoramento de execução em todas as suas etapas no Brasil. Representa uma capacidade exequível na rápida multiplicação de animais portadores de características zootécnicas desejáveis, por meio do incremento de aproveitamento de uma fêmea durante a sua vida reprodutiva.

A múltipla ovulação seguida de transferência de embriões é uma técnica considerada tão importante para as fêmeas, quanto a inseminação artificial é para os machos. Esta biotécnica reprodutiva permite que uma fêmea de elevado mérito genético seja capaz de produzir mais filhos ao longo de sua vida reprodutiva. Além disso, pode possibilitar ainda a conservação e multiplicação de animais ou raças ameaçadas de extinção. Todavia, esta técnica apresenta alguns entraves que limitam sua difusão no mundo para caprinos e ovinos, como: dificuldade relativa da técnica (impossibilidade de manipulação retal), alto custo relativo do procedimento, eficiência variável e pouco previsível [7,94].

Conceitualmente, essa tecnologia tem duas etapas que, por sua vez, possuem diferentes graus de sucesso e dificuldade para poder melhorarem seus resultados: a primeira é a que envolve a fêmea doadora e inclui o tratamento hormonal superovulatório; a segunda é com relação à receptora. Enquanto a etapa da receptora pode ser muito eficiente, o mesmo sucesso não é freqüentemente obtido na etapa doadora, o que representa um grande entrave na maior difusão desta biotecnologia [5].

Diversos embriões de caprinos e ovinos produzidos *in vivo* são transferidos anualmente dentro dos próprios países ou mesmo são encaminhados para o comércio internacional. As tecnologias utilizadas para superovulação, colheita e transferência desses embriões estão bem desenvolvidas atualmente e alcançam taxas de gestação superiores a 60%. Esta biotécnica gera uma oportunidade para garantir o status sanitário de alguns rebanhos mesmo quando os embriões são originados de países possuindo status sanitário distinto. Diversas doenças virais e bacterianas

já foram avaliadas quanto ao seu risco de transmissão por embriões, contudo, quando os procedimentos sanitários recomendados pela IETS são criteriosamente seguidos, os riscos são mínimos [112].

O conhecimento das peculiaridades comportamentais, reprodutivas e anatômicas é imprescindível para obtenção de sucesso na atividade [31]. A principal limitação da TE em pequenos ruminantes está relacionada a dois fatores: os custos e a metodologia cirúrgica de colheita de embriões [42]. Na ovelha, o principal fator que limita a utilização da TE em escala comercial é a dificuldade de se realizar colheita pelo método transcervical, tornando o método cirúrgico e o laparoscópico, as opções de escolha para esta etapa. Contudo, seqüelas cirúrgicas limitam a utilização de sucessivas das fêmeas. O Brasil é a maior referência na obtenção não cirúrgica de embriões de pequenos ruminantes. Atualmente, próximo de 100% das coletas em cabras são feitas pela via cervical. Todavia, nas ovelhas a proporção se inverte, com coletas cirúrgicas respondendo por quase 100% da atividade.

A atividade na área de transferência de embriões produzidos *in vivo* em pequenos ruminantes ainda é discreta no mundo. A produção *in vitro* sequer é citada no ranking da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS). Isto parece ser lógico considerando que a produção de embriões *in vitro* não apenas sucedeu, mas também derivou da demanda por embriões em países onde a produção *in vivo* não mais conseguia atender adequadamente o mercado. Superada a questão de demanda pouco expressiva, a exemplo da coleta cirúrgica para embriões produzidos *in vivo*, a obtenção de oócitos segue sendo talvez o principal entrave para produção de embriões *in vitro*.

Esta revisão abordará a produção de embriões *in vivo* e *in vitro* em pequenos ruminantes.

II. PRODUÇÃO DE EMBRIÕES *IN VIVO*

Histórico

A primeira bem-sucedida transferência de embriões da história foi em 1890, quando Heape coletou embriões de coelhos. Desde então, todas as espécies domésticas foram submetidas à transferência de embriões (TE) com sucesso. Em 1934, Warwick et al. [120] foram os responsáveis pelo nascimento da primeira cria caprina utilizando esta biotécnica. A comercialização desta biotecnologia teve início na América do Norte, na década de 1970 [51]. No Brasil, o primeiro relato de produto caprino nascido oriundo desta biotécnica foi em 1985 por Jaume e Bruschi [52]. Atualmente, a transferência de embriões em cabras é uma realidade no país. A simplificação da técnica, bem como o aumento no número de técnicos capacitados, pode acelerar ainda mais este desenvolvimento [31].

Atividade na área de tecnologia de embriões em pequenos ruminantes no mundo

A movimentação mundial na área de transferência de embriões em pequenos ruminantes pode ser vista na Tabela 1. Apesar de, na última década, o Brasil ter sido importante destino de embriões de raças como Bôer e Dorper, em nenhum momento o país é citado. África do Sul, Austrália e Nova Zelândia lideram este ranking e, por vezes, países com atividade inferior a 100 inovulações por ano são citados. Isto pode ser resultado de duas condições básicas. Falta ou equívoco no lançamento ou recepção de dados ou falta de comunicação entre associações de registro genealógico com associações de especialistas como a IETS e SBTE. Desta forma, há que se repensar as formas de comunicação com as associações e com a SBTE. Centenas, talvez milhares de coletas, congelação e inovulações são efetuadas anualmente por técnicos brasileiros. Se devidamente comunicadas, não somente poderiam colocar o Brasil entre os primeiros postos neste cenário, a exemplo do que ocorre com bovinos, mas também servir de parâmetro para pesquisadores e técnicos para prospecção de projetos e expansão de mercado. Outra contribuição relevante destes dados nacionais seria a identificação da evolução da técnica tanto no quantitativo, quanto no qualitativo, importante orientador da atividade.

Tabela 1. Atividade anual na área de produção de embriões *in vivo* em pequenos ruminantes.

Ano	Coletas	Viáveis	Fresco	Congelado	Armazenado	Exportado
1997						
Ovino	283	1.226	704	548	345	316
Caprino	912	7.801	8.011	1.608	315	–
Cervídeo	90	495	419	51	–	–
1998						
Ovino	2.288	17.091	11.365	5.478	261	4.890
Caprino	1.534	16.363	1.729	822	425	311
Cervídeo	236	1.281	551	573	77	–
2001						
Ovino	941	6.853	3.598	3.375	847	300
Caprino	259	372	171	42	88	–
Cervídeo	81	338	284	38	–	–
2002						
Ovino	–	100.496	83.453	52.433	21.457	19.214
Caprino	–	17.921	7.004	9.234	7.843	6.784
Cervídeo	–	1.032	179	590	269	–
2003						
Ovino	–	7.648	6.674	2.907	–	–
Caprino	–	4.533	3.997	757	–	–
Cervídeo	–	696	632	34	–	–
2004						
Ovino	–	84.943	62.088	6.006	–	–
Caprino	–	1.755	422	315	–	–
Cervídeo	–	322	220	62	–	–
2005						
Ovino	–	34.458	13.745	11.408	–	–
Caprino	–	5.135	3.439	3.897	–	–
Cervídeo	–	492	321	9	–	–
2006						
Ovino	–	56.519	24.293	18.966	–	–
Caprino	–	23.826	7.966	16.423	–	–
Cervídeo	–	791	493	203	–	–

Tabela 1. Atividade anual na área de produção de embriões *in vivo* em pequenos ruminantes. (*continuação*)

Ano	Coletas	Viáveis	Fresco	Congelado	Armazenado	Exportado
2007						
Ovino	–	25.421	9.769	2.365	–	–
Caprino	–	2.434	1.110	113	–	–
Cervídeo	–	566	601	89	–	–
2008						
Ovino	–	18.828	4.793	433	–	–
Caprino	–	3.141	824	278	–	–
Cervídeo	–	980	840	0	–	–

Adaptado de Thibier [101-111].

De acordo com dados da Tabela 1, os maiores registros de produção de embriões ovinos foram feitos nos anos de 2002 e 2004. Em caprinos, os anos de 2002 e 2006 foram os mais representativos. Para ambas as espécies, o ano de 2002 foi um marco em termos de atividade, sobretudo no tocante às exportações, impulsionadas por África do Sul e Oceania. Já 2008, tanto para caprinos quanto para ovinos, representou uma das maiores reduções. Razões econômicas ou falta de comunicação são apontadas como possíveis causas desta redução [111]. Outra possibilidade é a associação das duas causas citadas, algo que parecer ser mais provável. Estas oscilações drásticas apontam para um cenário instável para pequenos ruminantes, uma realidade preocupante que, inclusive, pode dificultar a consolidação do mesmo. Adicionalmente, conforme comentado anteriormente, este panorama pode dificultar ou mesmo inviabilizar a implantação de programas de produção de embriões *in vitro*, atividade que parece ser bastante incipiente mundialmente. De fato, a produção de embriões *in vitro* de pequenos ruminantes parece ainda não ter deixado seus domínios laboratoriais e estar ainda distante de uma viabilidade comercial.

Superovulação

Com os procedimentos atuais de coleta, a superovulação aumenta a produção de embriões normais em cerca de cinco [51] até oito vezes em caprinos e ovinos [23]. Dentre os fatores responsáveis pela variabilidade desta técnica, certamente a variabilidade da resposta superovulatória é a mais importantes [22]. Alguns cuidados devem ser tomados para diminuir a chance de insucessos no processo como um todo, com relação: sanidade (calendário sanitário atualizado), nutrição (qualquer alteração no manejo no mínimo duas semanas antes do protocolo), escore da condição corporal (não devem se apresentar magras ou excessivamente gordas), instalações (promovendo bem-estar) e exame ginecológico completo (vaginoscopia, ultrassonografia e histórico reprodutivo) [32]. Além disso, é preferível que já tenham parido anteriormente, em vista que as borregas, em geral, não são boas doadoras [5].

As doadoras devem ser escolhidas com base em seus antecedentes produtivos, demonstrando produção de lã, carne ou leite (conforme a espécie/raça) significativamente superior à média da população do rebanho de que provêm. Às vezes, também, podem ser animais que tiveram uma alta produção em seu passado, que seus filhos mostraram-se excelentes, mas que na atualidade não podem gestar e/ou criar. As fêmeas doadoras podem ser superovuladas com base na observação de estro, sem utilizar progestágenos (durante a estação de acasalamento), ou então, após indução/sincronização de estro [5].

Muitas combinações de tratamentos para o propósito de coleta e transferência de embriões estão disponíveis. O estro pode ser induzido/sincronizado pela administração de progestágenos, como implantes de progesterona ou por progestágenos sintéticos. O tratamento mais tradicional é a utilização de um progestágeno por 12 a 18 dias; todavia, protocolos recentes utilizam protocolo mais curto de cinco a nove dias, acompanhado de um análogo de prostaglandina (PGF) [30]. De acordo com Baldassarre [5], o mais comum é que em ovelhas o progestágeno permaneça

por 14 dias (período de duração da fase lútea) e, em cabras, por 10 dias associado a um análogo de PGF2 α na estação de acasalamento. Entretanto, relata-se também que o protocolo de sincronização de estro pode ser o mesmo para cabras e ovelhas doadoras ou receptoras [30].

A superovulação é o evento menos previsível, podendo ser o mais frustrante, no processo de produção de embriões em caprinos e ovinos. O principal e ainda não solucionado problema é a alta variabilidade na resposta superovulatória em cabras e ovelhas doadoras. Sabe-se que, em bovinos, tanto os fatores intrínsecos como os extrínsecos influenciam a variabilidade da resposta superovulatória [53]. Dentre os fatores fisiológicos, o folículo dominante funcional, pode exercer um efeito negativo na resposta superovulatória e diminuir o número de embriões recuperados. Dos fatores extrínsecos, subnutrição e lactação podem exercer um efeito prejudicial no desenvolvimento folicular e na secreção pulsátil de LH [51]. Além disso, em cabras e ovelhas um fator importante a ser considerado é a estacionalidade reprodutiva, que também pode afetar fortemente a resposta superovulatória. Ressalta-se que em cabras é comum encontrar altas porcentagens, como 30% de fêmeas tratadas que não deveriam ser utilizadas no dia da transferência, por razões como, falha na ovulação ou regressão luteal precoce [30,76].

Durante muitos anos, sobretudo na década de 80, investiu-se grande esforço e tempo em pesquisas hipotetizando que essa variabilidade na resposta poderia ser em decorrência da dose total de FSH, da origem do FSH (hipofisária vs recombinante), do número de doses (múltiplas ou única aplicação), da contaminação de LH que poderia ter no produto, etc. Todos esses trabalhos produziram, no melhor dos casos, apenas melhoras sutis [5]. Sabe-se hoje que a eficiência de protocolos superovulatórios varia em função do estágio de crescimento folicular presente no ovário por ocasião do início da administração do FSH. Tratamentos iniciados com maior proximidade da emergência folicular alcançam melhores resultados que aqueles iniciados na presença de folículos grandes (>5-6mm) [39]. Resultados recentes comprovam este fenômeno, sugerindo iniciar a superovulação no momento estimado da ovulação [84].

Em um ciclo normal, a fisiologia básica nos indica que um grupo de folículos inicia o seu desenvolvimento até que um deles (i.e., o dominante) “bloqueia” o desenvolvimento dos demais folículos da onda. Como consequência, o dominante continua seu desenvolvimento até a ovulação, enquanto os demais folículos começam sua regressão até entrarem em atresia. O folículo maior exerce sua dominância por meio da supressão da síntese e liberação de FSH pela hipófise, por diferentes maneiras, sendo a mais importante pelo estrógeno e inibina secretados por ele [5].

A superovulação, dessa maneira, consiste basicamente em permitir o desenvolvimento até a ovulação de todos os folículos da onda, ao substituir o FSH hipofisário pelo exógeno. Todavia, existem duas limitações na aplicação do FSH exógeno: a primeira é que a quantidade de folículos que serão estimulados pelo FSH depende da quantidade de “recrutados” presentes no ovário no momento do início do tratamento, já que o FSH atua somente em folículos antrais (>2mm de diâmetro) e, não em folículos primordiais; a segunda é que o FSH não seleciona os folículos, estimulando tanto folículos saudáveis como os que estão em regressão. Caso este folículo em regressão sofra ação do FSH, ele irá reiniciar seu crescimento e chegar à ovulação, porém, seu oócito entrará em apoptose (mudanças no DNA que programam a célula para a morte). Neste caso, após a ovulação, esse oócito não será fertilizado ou poderá sofrer uma degeneração prematura [5].

Em seguida do FSH, a gonadotropina coriônica eqüina (eCG) é a gonadotropina mais utilizada para a indução de superovulação em cabras doadoras. Diversos protocolos podem ser utilizados com este propósito, sendo o mais comum a administração de doses múltiplas de FSH nos últimos três a quatro dias do tratamento com progestágeno. Devido à meia vida curta do FSH, ele geralmente é feito com intervalo de 12 h. O eCG possui uma meia vida de aproximadamente 72 h e, quando utilizado sozinho, é fornecido 48 a 72 h antes da retirada do progestágeno e em dose que varia de 1000 a 1500 UI. Uma combinação de FSH e eCG tem sido utilizada em programas de superovulação, onde uma dose única (150 a 250 UI) de eCG é administrada simultaneamente à primeira ou segunda dose de FSH [90].

Uma prática habitual é a de promover a ovulação pelo uso de LH, GnRH ou hCG, administrado no momento em que a fêmea apresenta o estro. Desta forma, há um aumento da sincronia ovulação-inseminação e fundamentalmente diminui a incidência de folículos anovulatórios (císticos). De acordo com Baldassarre [5], administrando 100 mg GnRH ou 1000 UI hCG no dia inicial do estro da doadora, não somente há diminuição da incidência de anovulação, mas também há diminuição da incidência de regressão prematura de corpos lúteos (RPCL). Outra possibilidade para diminuir a RPCL inclui o uso de anti-luteolíticos (flunixin meglunine) [114] ou, ainda, a suplementação exógena de progesterona entre a ovulação e a coleta de embriões. Uma das justificativas mais prováveis para a ocorrência da

RPCL é que a luteólise seja iniciada pelas altas concentrações de estradiol encontradas em cabras superovuladas que apresentem folículos anovulatórios/císticos [3]. A consequência prática é que das doadoras que apresentam RPCL não é recuperado nenhum embrião viável já que as condições uterinas não são favoráveis para o seu desenvolvimento na ausência de progesterona [5].

Recentemente o uso de estrógenos no momento da colocação do dispositivo de progesterona e em sua retirada tem melhorado a resposta superovulatória [30]. Em bovinos, os estrógenos têm induzido a regressão de folículos dominantes, que geralmente estão imaturos ou em processo de atresia, seguido de uma nova onda folicular quatro a cinco dias após sua administração. Essa onda geralmente coincide com o começo do tratamento com FSH. Desta forma, no momento das injeções de FSH, uma população uniforme de folículos é recrutada e não há a presença de folículos dominantes.

Pesquisadores compararam a utilização de 75mg (T1), 145 mg (T2) ou 215 mg (T3) de pFSH em sete doses decrescentes do dia 9 ao 12 (sendo considerado o dia da colocação da esponja = D0) em cabras (n=21) Alpinas e Saanen. O intervalo da retirada da esponja ao início do estro não diferiu entre os tratamentos, com média de 25,1 h. Diferença significativa foi reportada quando foi utilizado 215 mg de FSH (T3) na taxa de embriões coletados (9,6) e transferíveis (6,9), quando comparada com T1 (1,4) ou T2 (1,3). Ainda, o número de corpos lúteos também foi superior para T3 (13,7), do que em T1 (3,9) ou T2 (5,3) ($P < 0,05$). Os autores concluíram que para se obter número satisfatório de embriões a serem coletados, é necessário utilizar mais de 200 mg de FSH no momento da superovulação nestas raças [87].

Souza et al. [96] objetivaram avaliar em cabras da raça Moxotó superovuladas o efeito da insulina antes ou após o acasalamento na produção de embriões e relataram que o seu aumento foi associado à alta proporção de embriões viáveis. Ainda permanece como foco principal de pesquisas alternativas com o intuito de se diminuir esta variabilidade na resposta superovulatória, bem como elevar o número e a qualidade dos embriões produzidos *in vivo*.

Coleta de embriões

A colheita dos embriões é feita por meio de lavagem dos cornos uterinos entre o 6° e o 8° dia após o início do estro e pode ser realizada basicamente por três métodos: laparotomia, laparoscopia e pela via transcervical [37,49,65,71]. O procedimento cirúrgico é uma técnica mais invasiva, limitando a possibilidade de repetidas colheitas em uma doadora em virtude da ocorrência de aderências entre o sistema genital e tecidos circunvizinhos [2] e infundíbulo, ovários e órgãos anexos [100]. Adicionalmente, a colheita por laparotomia prejudicou a fertilidade de ovelhas em estações de monta subseqüentes, sendo que as fêmeas receberam maior número de coberturas e apresentaram menores percentuais de fertilidade [99]. Os diferentes métodos de colheita dos embriões, bem como as variações dentre eles, acarretam em diferentes resultados quanto ao número de embriões recuperados [88].

Visando minimizar os traumas e diminuir a relação custo-benefício da técnica cirúrgica, procurou-se adaptar aos pequenos ruminantes a técnica de colheita pela via transcervical, utilizada com êxito nos bovinos. Várias técnicas vêm sendo utilizadas com o objetivo de facilitar este processo [71]. Todavia, a via transcervical constitui-se em um entrave, especialmente em ovelhas, o que tornou por muito tempo o método cirúrgico e o laparoscópico, as únicas opções para esta etapa.

Uma alternativa indicada para superar esta grande barreira e viabilizar a colheita transcervical foi proposta por Silva et al. [92,93], que relataram que a colocação no fundo de saco vaginal de 200 µg Misoprostol (Cytotec®) três a cinco horas antes da colheita e ovelhas facilitou a passagem do cateter. Agentes dilatadores cervicais distintos já foram utilizados e considerados eficientes em promover o relaxamento cervical em ovelhas da raça Santa Inês [45].

A capacidade da prostaglandina E₂ de promover o relaxamento cervical foi bem caracterizada em ovelhas [56] e tem apresentado resultados bastante animadores [44].

A coleta não cirúrgica em circuito fechado foi descrita por Salles [85] e Gusmão et al. [43]. Uma alternativa ao cateter Nelaton – Robinson, utilizado neste procedimento, com custo mais baixo e acesso mais fácil, seria as sondas naso-gástricas nº10 ou 12, utilizadas em medicina humana. Entretanto, estas possuem uma entrada que só permite a utilização de seringas, além de serem muito moles e flexíveis, dificultando a manipulação e possibilitando que se dobrem no interior do útero. O lavado é recolhido e mantido em temperatura ambiente (25 a 30 °C), até o momento da transferência. A classificação dos embriões de caprinos e ovinos segue o mesmo padrão descrito para bovinos baseado nas normas da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS). Gonzalez et al. [37] adotando o método do circuito fechado para a lavagem de três cabras da raça Boer, recuperaram 32 estruturas, com

média de 10,6 por animal. A colheita pela via transcervical com o animal em decúbito e em estação proporcionou taxas de recuperação embrionária respectivas de 86,5 e 89,7% [65]. Pereira et al. [74] descreveram a técnica transcervical para a recuperação de embriões em caprinos, com a fêmea em estação, sem administração de medicamentos anestésicos e aplicação de prostaglandina 16 h antes e oxitocina no momento do início da colheita, com o objetivo de facilitar a penetração da entrada da cérvix e deslize do cateter ao longo dos cornos uterino. A taxa de recuperação embrionária foi de 91,0%. Esta técnica foi posteriormente aprimorada por Holtz et al. [48], sendo a aplicação da prostaglandina realizada 20 h antes da lavagem.

Inovulação de embriões

A inovulação embrionária em cabras e ovelhas pode ser feita pelo método cirúrgico, laparoscópico, semi-laparoscópico ou transcervical, sendo a última pouco relatada [31].

O método mais utilizado é o cirúrgico, com exposição dos cornos para transferências dos embriões no ovário ipsilateral ao corpo-lúteo. O semi-cirúrgico é igualmente utilizado, porém inicialmente é feita uma observação através de laparoscopia, para verificar se a receptora realmente ovulou e em qual ovário, ou se apresenta regressão dos corpos lúteos, pois nesse caso, a receptora é descartada do programa; neste método, uma pequena abertura é feita na linha média e apenas o corno uterino é exposto, para que seja feita a inovulação dos embriões. A transferência pode ainda ser feita exclusivamente via laparoscópica, com a inconveniência do custo do aparelho e da maior habilidade manual exigida para tal procedimento [114].

Atualmente, a inovulação é mais usualmente executada por laparoscopia. Este método possibilita a avaliação dos ovários, a exposição da junção útero-tubárica ipsilateral ao ovário com o maior número de corpos lúteos funcionais e a transferência para este corno dos embriões, normalmente aos pares. A transferência de um embrião para cada corno uterino também é reportada com sucesso. Este procedimento minimiza a ocorrência de aderências pela manipulação excessiva do sistema genital quando a deposição dos embriões é feita por laparotomia. Salles et al. [86], descreveram a semi-laparoscopia como técnica alternativa e segura para a inovulação em caprinos.

Normalmente, observam-se taxas de gestação que variam de 40 a 80 %. Os mesmos fatores que interferem na taxa de gestação em bovinos também atuam em caprinos e ovinos. Todavia, métodos que possibilitam a observação e caracterização precisa do corpo lúteo têm expectativas de taxas de gestação superiores, uma vez que receptoras com regressão luteal ou corpos lúteos de baixa qualidade morfológica podem ser eliminadas [31].

A inovulação transcervical não-cirúrgica, executada de forma semelhante à colheita é uma tendência futura, a exemplo do que ocorreu em bovinos. Neste caso, o corpo lúteo deve ser localizado por ultra-sonografia para determinação de qual corno receberá o embrião. Todavia, o diâmetro do inovulador, a idade e a ordem de parição poderão conferir maior ou menor facilidade à técnica [31], o que permanece como objeto de estudo.

III. PRODUÇÃO DE EMRIÕES *IN VITRO*

Histórico

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) envolve a coleta seguida da maturação e fecundação *in vitro* dos oócitos, com o subsequente cultivo *in vitro* dos embriões gerados. Apesar do primeiro relato de nascimento de caprino após a fecundação *in vitro* ter ocorrido em 1985 [124], somente em 1994 relatou-se estudo com a produção dos embriões totalmente *in vitro*, isto é, após maturação, fecundação e cultivo *in vitro* [57]. Embora esforços para a fertilização *in vitro* em ovinos tenham ocorridos desde a década de 60 (Thibault e Dautzier, 1961 apud Bondioli e Wrigth Jr, 1983) [15], somente em 1987 relatou-se o nascimento de cordeiro de fecundação *in vitro* mas de um oócito maturado *in vivo* [25]. Em 1991 nasceram cordeiros de oócitos maturados e fertilizados *in vitro* seguido do co-cultivo embrionário [26] enquanto o primeiro relato de nascimento a partir de oócitos de ovelhas impúberes ocorreu em 1994 [4]. Curiosamente, o primeiro nascimento de clone de animal doméstico ocorreu com ovelhas antes dos eventos acima [121], porém sem o uso dos cultivos *in vitro*.

Coleta de oócitos para PIVE e procedimentos hormonais

A coleta dos oócitos (ovum pick-up: OPU) pode ser realizada após o abate das doadoras com a remoção dos ovários ou através de laparotomia abdominal ou laparoscopia. A laparotomia para a exposição dos ovários é uma técnica invasiva que favorece a ocorrência de infecções e de aderências e acabou se tornando obsoleta com o aprimoramento e demonstração de que a laparoscopia permite o uso de coletas repetidas em ovelhas e cabras com menos riscos aos animais [6,60,97]. A OPU realizada por meio de laparoscopia (LOPU) tem sido preferencialmente aplicada após o emprego de estímulos hormonais que favoreçam a obtenção de um maior número de oócitos por sessão de punção [97] sem afetar a competência de desenvolvimento do oócito [70].

As superestimulações são em geral realizadas com FSH associado com sincronização de estro com progestágenos. Implantes de progesterona podem permanecer por 9-11 dias com a realização da LOPU no dia da remoção dos mesmos. Múltiplas aplicações de FSH ocorrem duas vezes ao dia, iniciando-se 48h antes da laparoscopia [7] enquanto a aplicação de prostaglandinas 48-36h antes da LOPU também pode ser realizadas [7,75]. Uma alternativa para múltiplas aplicações é o uso de dose única de FSH em associação à eCG, denominada de "Oneshot". Neste procedimento, as doadoras recebem menos FSH e uma dose de eCG, aplicados somente uma vez, 36 h antes da laparoscopia. Comparações entre estes procedimentos não mostraram diferenças na produção e na taxa de recuperação de oócitos, porém por ser mais simples, o protocolo com única injeção de FSH e eCG pode ser a melhor alternativa. Utilizando este protocolo, Baldassarre & Karatzas [7] obtiveram uma média de 13,4 oócitos por cabra em mais de 1.500 laparoscopias. Em estudo preliminar conduzido com cabras **observou-se que a utilização de múltiplas doses de FSH e eCG aumentou o número de folículos disponíveis para a punção folicular sem interferir na taxa de recuperação e a na qualidade dos oócitos, quando comparado com o regime "Oneshot" [67]. Outro estudo** avaliou protocolo visando aumentar a produção de oócitos em cabras e ovelhas em um curto espaço de tempo, utilizando o regime "Oneshot". Gibbons et al. [35] utilizaram implantes de progesterona, com aplicação de FSH e eCG em dose única, 48h após a inserção do implante, seguida de laparoscopia 24h após. Avaliaram quatro sessões de colheita de oócitos por doadora ovina e três por doadora caprina, em intervalos de quatro dias, com remoção do implante de progesterona somente após a última sessão de laparoscopia. Em ambas as espécies, o protocolo adotado permitiu maximizar a coleta de oócitos após LOPU repetidas, sem afetar a qualidade dos oócitos. Deste modo, a produção de oócitos em cabras e ovelhas pode ser maximizada utilizando intervalos curtos de colheita associados a estímulos hormonais.

A presença de um corpo lúteo (CL) no início do tratamento com FSH com sincronização com progestágenos pode favorecer a competência do oócito ovino com melhores taxas de fertilização e de blastocistos [38]. Os autores argumentam que a presença do CL ativo reforça o efeito supressivo da progesterona exógena sobre o LH, evitando a ovulação e prevenindo alterações no crescimento folicular, principalmente um efeito do folículo dominante sobre a competência do oócito. Apesar de progestágenos serem comumente utilizados na sincronização de estro, o seu efeito sobre a qualidade de oócitos e embriões tem sido questionado. Em estudo com embriões ovinos produzidos *in vivo*, porém sem superovulação, Gonzalez-Bulnes et al. [40] sugeriram que o uso de progestágenos diminuía a viabilidade embrionária quando comparada com a sincronização de estro somente com prostaglandinas. Posteriormente, Berlinguer et al. [11] observaram que ovelhas tratadas com FSH na ausência de progestágenos, mas após sincronização de estro com prostaglandinas, produziram maior taxa de recuperação de oócitos, bem como oócitos com maior competência em clivar após a fertilização *in vitro* e alcançar estágio de blastocisto. Observou-se também que o uso de antagonista de GnRH antes do tratamento com superestimulatório, objetivando o aumento de folículos responsivos ao FSH e redução do efeito de dominância, estimula o crescimento folicular mas afeta a competência do oócito em se desenvolver após fertilização e cultivo *in vitro* [12]. A se confirmar os efeitos do CL, progestágenos e GnRH sobre a viabilidade do oócito, protocolos alternativos devem ser desenvolvidos visando a obtenção de gametas de melhor qualidade para a produção *in vitro* de embriões.

O uso de superestimulação com FSH tem sido também avaliado durante o anestro estacional em ovelhas, quando favorece a obtenção de número maior de oócitos por animal, contudo, não melhora a competência dos gametas quando comparado com aqueles obtidos na estação de acasalamento natural [98]. Porém, estudos recentes

mostram que o potencial do oócito ovino fertilizado alcançar estágio de blastocisto após cultivo *in vitro* pode ser melhorado com implantes de melatonina [115,118]. A melatonina pode ter efeito semelhante sobre a produção de embriões na estação de acasalamento de cabras [13].

Cultivo *in vitro* de oócitos e embriões

Maturação e fecundação *in vitro* (MIV e FIV)

A maturação *in vitro* envolve o cultivo dos oócitos imaturos para que estes atinjam estágio de metáfase II da meiose e completem a maturação citoplasmática, quando então estarão prontos para serem fecundados. A maturação é comumente realizada com meios de cultivos complexos, enriquecidos com aminoácidos e glicose, suplementados com hormônios e soro sanguíneo inativado. Estudos têm realizado a maturação *in vitro* de oócitos caprinos e ovinos na presença de soro fetal bovino [11,24,77] ou de soro de cabra ou ovelha em estro [50,118]. Contudo, estudo de Herrick et al. [46] sugere que o soro pode ser substituído por albumina sérica bovina ou álcool polivinil sem afetar o potencial de desenvolvimento do oócito caprino.

Além da proteína sérica, diversas outras substâncias adicionadas na maturação *in vitro* podem interferir na competência do oócito. A cisteamina tem sido adicionada na maturação *in vitro* por melhorar as taxas de produção de embriões [82,116]. Durante a maturação a cisteamina pode aumentar a concentração intracelular de glutathione, que possui importante papel contra o estresse oxidativo, e assim aumentar a competência do oócito [29]. Fatores de crescimento (IGF-1 e EGF) adicionados na MIV também contribuem para aumentar a porcentagem de oócitos maturados *in vitro* de caprinos e ovinos [19,41,89]. Estudo de Shabankareh et al. [89] reportou que a maturação *in vitro* de oócitos de ovelhas em meio com ausência de soro obtêm mais sucesso quando EGF, IGF1 e cisteamina são adicionados em conjunto do que quando sozinhos, porém verificou que com o uso de soro fetal bovino, o potencial de desenvolver a blastocistos é aumentado. O efeito do GH na maturação de oócitos ovinos também foi avaliado recentemente e verificou-se que na presença de soro fetal bovino esse hormônio alcança taxas de blastocistos semelhantes à maturação com FSH, porém a combinação de FSH e GH reduz o potencial de desenvolvimento do oócito [91]. Um argumento é que ambos os hormônios estejam competindo pelo mesmo segundo mensageiro nas células do *cumulus* (AMPc). Esses resultados mostram que podem existir diferentes interações entre substâncias avaliadas na maturação *in vitro* e que estudos ainda são necessários para se estabelecer quais moléculas e combinações são necessárias para se obter um oócito em seu maior potencial.

Para a fecundação *in vitro* (FIV) é necessária a separação dos espermatozoides vivos dos mortos e do plasma seminal e/ou do diluente usado para a congelamento. Para isso são usadas técnicas como o “swim-up” e gradiente de concentração como Ficoll® e Percoll®. Palomo et al. [72] observaram que para sêmen fresco o método de “swim-up” foi mais adequado que o Ficoll® e a lavagem por centrifugação em obter espermatozoides caprinos com maior motilidade, viabilidade e acrossoma intactos, porém foi semelhante ao método com Percoll®. Comparando o uso de gradiente de Percoll® com “swim-up” em sêmen descongelado, Rho et al. [77] observaram que o gradiente de Percoll® recuperou maior porcentagem de espermatozoides (33,9%) do que “swim-up” (7,7%), porém sem diferença na taxa de espermatozoides viáveis e na porcentagem de blastocistos. Com espermatozoide ovinos Marti et al. [68] observaram que o “swim-up” realizado com dextran obteve maior viabilidade espermática, assim como maior taxa de espermatozoides não capacitados e com menor nível de marcadores para apoptose do que Percoll®.

A capacitação espermática pode ser obtida com o uso de heparina. Keskinetepe et al. [58] observaram maior taxa de blastocistos com 200 µg/mL de heparina do que na ausência da mesma enquanto Katska-Ksiazkiewicz et al. [55] obtiveram sucesso com 50 µg/mL. Outras concentrações menores têm sido utilizadas (1-10 µg/mL) associadas à 10% de soro [24], porém não foram comparadas. Em sêmen ovino, estudos em geral usam 2% de soro de ovelha em cio no meio de fertilização como agente capacitante [11,89], embora existam poucos estudos com heparina. Li et al. [64] observaram que adição de 5% a 10% de soro de ovelha em estro no meio de fecundação *in vitro* aumenta a taxa de clivagem e de blastocisto, mas a adição de 5 UI de heparina concomitante com soro de ovelha em cio não tem efeito positivo. Apesar dos estudos acima evidenciarem um efeito benéfico da heparina na capacitação espermática em caprinos e do soro em ovinos, não está claro o efeito de diferentes concentrações de ambos e a possível interação da heparina e soro sobre o potencial fecundante do sêmen dessas espécies. Além disso, há poucos estudos sobre outros possíveis agentes capacitantes e mecanismos de reação acrossômica. A progesterona pode induzir a reação acrossômica em espermatozoides caprinos por meio de receptores não genômicos [95] e pode ter papel também na capacitação espermática e hiperativação nas espécies em geral [9]. Mais recentemente

observou-se que a melatonina em baixas concentrações (100 pM) na fecundação *in vitro* em ovinos pode atuar como capacitante e aumentar a taxa de clivagem ao contrário de doses mais elevadas [20].

A concentração de espermatozoides usada tem variado de 1 a $3,5 \times 10^6$ células/mL em caprinos e ovinos [7,11,24], com a preocupação de se evitar um alto índice de polispermia, que compromete a produção de embriões com qualidade. Contudo, para oócitos de cabritas pré-púberes, Palomo et al. [73] conseguiram elevada taxa de penetração espermática com 4×10^6 espermatozoides/mL, sem elevar a polispermia. A baixa concentração espermática na fecundação *in vitro* torna viável o uso do sêmen sexado. Não existem estudos sobre o efeito do uso de sêmen sexado por citometria de fluxo na FIV em caprinos, mas alguns foram conduzidos em ovinos. Morton et al. [69], utilizando concentrações de 0,5 a $1,0 \times 10^6$ espermatozoides/mL de sêmen sexado e não sexado para a FIV de oócitos de fêmeas ovinas impúberes, observaram maior porcentagem de produção de blastocistos com sêmen não sexado (26,5%) do que sêmen com espermatozoides com o cromossomo Y (15,8%) e X (15,2%). Em estudo posterior o mesmo grupo obteve taxas de clivagem blastocisto semelhantes entre sêmen sexado e não sexado usando concentrações de $0,5 \times 10^6$ /mL durante 2-3h ou 18-20h de incubação como oócitos de ovelhas adultas não estimuladas [70]. Contudo, o mesmo não ocorreu quando utilizaram oócitos de ovelhas impúberes e concentração espermática de 1×10^6 /mL. De Graaf et al. [28] também relataram taxas de blastocistos semelhantes entre sêmen sexado e não sexado. Os resultados com sêmen sexado de carneiros em oócitos de ovelhas adultas, quando comparado com o sêmen sexado bovino que geralmente resulta em taxas menores de blastocistos após a FIV, pode estar relacionado à melhor qualidade em termos de motilidade, viabilidade e integridade do acrossoma do sêmen sexado dessa espécie após a separação pelo citômetro de fluxo [28]. É possível que a aplicação do sêmen sexado na PIVE em ovinos possa ter mais sucesso do que em outras espécies. Todavia, salienta-se que o sêmen sexado de pequenos ruminantes ainda não está disponível comercialmente, além de carecer de estudos mais detalhados deste sêmen em oócitos ovinos e caprinos.

Durante o cultivo embrionário são utilizados meios com componentes que permitam ao zigoto sofrer a transição materno-zigótica e desenvolver-se até o estágio de blastocisto. Existem diferentes sistemas de cultivo embrionário *in vitro*. O sistema mais antigo envolve o uso de soro e co-cultura com células somáticas [18]. Observou-se inicialmente que a co-cultura com células epiteliais aumentava a taxa de produção de embriões caprinos após a FIV [122]. Um motivo para se usar a co-cultura é a possível redução de fatores potencialmente tóxicos, como os radicais livres, e a secreção de moléculas estimulantes, como fatores de crescimento. Contudo, em caprinos existe risco sanitário ao se trabalhar com células somáticas. Estudos têm verificado que células do oviduto de caprinos permitem a replicação do vírus da artrite-encefalite caprina [61] e, caso os embriões estejam com as zonas pelúcidas rompidas, os vírus podem também contaminar os embriões [1]. O soro utilizado no cultivo embrionário também pode ter efeitos benéficos e maléficos aos embriões. Verificou-se em outras espécies que o soro acelera o desenvolvimento embrionário após as primeiras clivagens além de possuir efeito anti-oxidante [10]. Entretanto, seu uso está associado a alterações no crescimento fetal ovino [83,113], bem como em outras espécies [63].

A omissão do soro e células somáticas no cultivo embrionário é uma alternativa ao sistema de co-cultivo, mas, em geral, requer um ambiente atmosférico com menor tensão de O_2 do que aquele utilizado em cultivos com células e soro. Em bovinos já se verificou que embriões fertilizados *in vitro* desenvolvem de modo semelhante ou superior na ausência de soro e células no cultivo embrionário, mas em meio enriquecido com outras moléculas [47], o que permite maior viabilidade após criopreservação dos embriões [36,80]. Estudo inicial com embriões ovinos observou que 5% O_2 favorece o desenvolvimento embrionário em meio SOF (fluido sintético do oviduto) sem co-cultura [14]. De fato, o uso de meios sem soro e co-cultura em baixa tensão de O_2 para cultivo de embriões ovinos tem sido comum entre estudos [12,23,27], com algumas variações com soro fetal bovino (66,119). Em caprinos, alguns laboratórios ainda optam por transferir embriões após curto período de cultivo *in vitro* [7,8] ou ainda o cultivo na presença de células somáticas [54]. Em estudo com estas células, Rodriguez-Dorta et al. [81] observaram que a co-cultura com embriões caprinos diminuiu a taxa de blastocistos, mas aumentou a taxa de gestação e nascimento dos embriões vitrificados quando comparado com meio SOF sem a co-cultura.

A melhoria das condições de cultivo em ambas as espécies depende da avaliação dos efeitos de diversos componentes prováveis de terem ação benéfica, não somente na taxa de embriões, como na qualidade e sobrevivência pós-descongelamento, mas com menos distúrbios moleculares e celulares possíveis. Contudo, ao contrário de bovinos, o estudo com meios de cultivo em ovinos e caprinos ainda é restrito. A adição de hialuronan em meio SOF com BSA não aumenta a taxa de embriões ou de gestação em ovinos, mas aumenta a viabilidade embrionária pós-vitrificação,

representada pela maior taxa de nascimentos [27]. Outro estudo observou que a ação de retinóides no estímulo para o desenvolvimento embrionário pode ser por meio das células somáticas na co-cultura de embriões caprinos [21]. Meios de cultivo seqüenciais têm sido amplamente usados em humanos [34, 117] e em bovinos é uma opção viável [62]. Em ovinos observou-se que o uso de um meio seqüencia comercial (G1.1/G2.2) aumentou a taxa de desenvolvimento, mas prejudicou a qualidade dos embriões, avaliada após criopreservação [33]. Meio semelhante foi usado em embriões caprinos fecundados *in vitro* produzindo taxas de blastocistos abaixo de 17%, porém não houve uma comparação com meios não-sequenciais [16,59].

Uma influência importante do cultivo é no padrão da expressão gênica. O cultivo *in vitro* causa alterações na expressão gênica não somente em embriões bovinos [17] como em ovinos [123] que podem comprometer a qualidade. Contudo, raros são os estudos avaliando o efeito do cultivo sobre a expressão gênica de embriões ovinos. Rizos et al. [79] observaram que embriões ovinos cultivados *in vitro* possuem diferenças na quantidade de transcritos específicos quando comparados com embriões bovinos. Esse mesmo grupo havia observado anteriormente diferenças nas taxas de embriões produzidos *in vitro* e sobrevivência pós-vitrificação entre embriões ovinos e bovinos [78], com maior sucesso na vitrificação de embriões ovinos. Em outro estudo, obteve-se resultados expressivos na vitrificação com embriões ovinos produzidos *in vitro*, alcançando, de acordo com o tratamento, taxas de gestação de 78,2% e de nascimento de 46,9% [27]. Estes resultados sugerem que demandas entre embriões ovinos e bovinos possam ser diferentes, requerendo estudos específicos para identificá-las e atendê-las. O mesmo raciocínio é válido para a PIVE em caprinos, onde a escassez de estudos é ainda maior.

IV. CONCLUSÕES

A movimentação mundial na área de tecnologia de embriões de pequenos ruminantes é pequena e bastante instável. A produção de embriões *in vivo* ainda carece de maiores informações que possibilitem maior difusão da técnica. É inegável que os avanços na compreensão e manipulação dos fenômenos ovarianos derivados do conhecimento advindo da ultra-sonografia contribuirão bastante para elevar a eficiência e padronizar a técnica. Quanto ao sucesso da PIVE, este dependerá da eficiência de todas as etapas do processo, desde a obtenção de oócitos até métodos de criopreservação dos embriões produzidos *in vitro* com subsequente transferência para receptoras. Os dados disponíveis já permitem afirmar a viabilidade da técnica para ovinos e caprinos, contudo, existe ainda um número limitado de estudos abordando seus vários aspectos quando se compara com bovinos. Observa-se nesta revisão que os procedimentos hormonais alternativos para obtenção de oócitos mais competentes ainda precisam ser desenvolvidos, levando-se em consideração a estacionalidade reprodutiva destas espécies. Avaliação dos efeitos de diferentes moléculas na maturação do oócito, capacitação espermática e cultivo embrionário ainda se fazem necessários, bem como a identificação das alterações celulares e moleculares envolvendo gametas e embriões dessas espécies induzidas pelas diferentes condições impostas pelo ambiente *in vitro*. Com o avanço das pesquisas e o estabelecimento de procedimentos de manipulação *in vitro*, a técnica teria potencial de atender um mercado com infra-estrutura estabelecida pela demanda, conforme acontece com o de embriões bovinos.

REFERÊNCIAS

- 1 Ali Al Ahmad M.Z., Fieni F., Guiguen F., Larrat M., Pellerin J.L., Roux C. & Chebloune Y. 2006. Cultured early goat embryos and cells are susceptible to infection with caprine encephalitis virus. *Virology*. 353(2): 307-315.
- 2 Andrioli-Pinheiro A. 1993. Métodos de colheita e de inovulação de embriões caprinos (*Capra hircus*, LINNAEUS, 1758) e os efeitos de repetidas colheitas na vida reprodutiva de doadoras. 100f. São Paulo, SP. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- 3 Armstrong D.T. & Evans G. 1983. Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. *Theriogenology*. 19: 31-42.
- 4 Armstrong D.T., Irvine B.J. & Earl C.R. 1994. *In vitro* fertilization of follicular oocytes from juvenile lambs and their developmental competence *in vitro* and *in vivo*. *Biology of Reproduction*. 50: 189 (Supl.).
- 5 Baldassarre H. 2008. Coleta, Conservação e Transferência de Embrião. In: Aisen, E.G. *Reprodução ovina e caprina*. 1ª Ed. São Paulo-SP: MedVet. pp.143-152.
- 6 Baldassarre H., De Matos D.G., Furnus C.C., Castro T.E. & Fischer E.I.C. 1994. Technique for efficient recovery of sheep oocytes by laparoscopic folliculocentesis. *Animal Reproduction Science*. 35: 145-150.
- 7 Baldassarre H. & Karatzas C.N. 2004. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. *Animal Reproduction Science*. 82–

83: 255-266.

- 8 Baldassarre H, Rao K.M., Neveu N., Brochu E., Begin I., Behboodi E. & Hockley D.K. 2007. Laparoscopic ovum pick-up followed by *in vitro* embryo production for the reproductive rescue of aged goats of high genetic value. *Reproduction of Fertility and Development*. 19: 612-616.
- 9 Baldi E., Luconi M., Muratori M., Marchiani S., Tamburrino L. & Forti G. 2009. Nongenomic activation of spermatozoa by steroid hormones: facts and fictions. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 308: 39-46.
- 10 Bavister B.D. 1995. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Human Reproduction Update*. 1: 91-148.
- 11 Berlinguer F., Gonzalez-Bulnes A., Succu S., Leoni G., Mossa F., Bebbere D., Ariznavarreta C., Tresguerres J.A., Veiga-Lopez A. & Naitana S. 2007. Effects of progestagens on follicular growth and oocyte developmental competence in FSH-treated ewes. *Domestic Animal Endocrinology*. 32: 303-314.
- 12 Berlinguer F., Gonzalez-Bulnes A., Succu S., Leoni G.G., Veiga-Lopez A., Mossa F., Garcia-Garcia R.M., Bebbere D., Galioto M., Cocero M.J. & Naitana S. 2006. GnRH antagonist enhance follicular growth in FSH-treated sheep but affect developmental competence of oocytes collected by ovum pick-up. *Theriogenology*. 65: 1099-1109.
- 13 Berlinguer F., Leoni G.G., Succu S., Spezzigu A., Madeddu M., Satta V., Bebbere D., Contreras-Solis I., Gonzalez-Bulnes A. & Naitana S. 2009. Exogenous melatonin positively influences follicular dynamics, oocyte developmental competence and blastocyst output in a goat model. *Journal of Pineal Research*. 46: 383-391.
- 14 Bernardi M.L., Fléchon J.E. & Delouis C. 1996. Influence of culture system and oxygen tension on the development of ovine zygotes matured and fertilized *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*. 106: 161-167.
- 15 Bondioli K.R. & Wright R.W. Jr. 1983. In vitro fertilization of ovulated and ovarian ovine oocytes. *Journal of Animal Science*. 57: 1006-1012.
- 16 Bormann C.L., Ongeri E.M. & Krisher R.L. 2003. The effect of vitamins during maturation of caprine oocytes on subsequent developmental potential *in vitro*. *Theriogenology*. 59: 1373-1380.
- 17 Camargo L.S.A., Powell A.M., do Vale Filho V.R. & Wall R.J. 2005. Comparison of gene expression in individual preimplantation bovine embryos produced by *in vitro* fertilisation or somatic cell nuclear transfer. *Reproduction of Fertility and Development*. 17: 487-496.
- 18 Camargo L.S.A., Viana J.H.M., Sá W.F., Ferreira A.M., Ramos A.A. & Vale Filho V.R. 2006. Factors influencing *in vitro* embryo production. *Animal Reproduction*. 3(1): 19-28.
- 19 Carneiro G.F., Nakazawa M., Castro S.B.M. & Gomes Y.M. 2003. Efeito do IGF-1 na maturação *in vitro* de óocitos caprinos. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 17 (Beberibe, CE, Brasil). *Acta Scientiae Veterinariae*. 31 (Supl.): 286.
- 20 Casao A., Mendoza N., Pérez-Pé R., Grasa P., Abecia J.A., Forcada F., Cebrián-Pérez J.A. & Muino-Blanco T. 2010. Melatonin prevents capacitation and apoptotic-like changes of ram spermatozoa and increases fertility rate. *Journal of Pineal Research*. 48: 39-46.
- 21 Chiamenti A., Aguiar Filho C., Freitas Neto L.M., Chaves R.M., Paula-Lopes F.F., Lima P.F., Gonçalves P.B., Oliveira M.A. 2009. Effects of retinoids on the *in vitro* development of *Capra hircus* embryos to blastocysts in two different culture systems. *Reproduction in Domestic Animals*. (Supl. 29) 1439-1531.
- 22 Cognié Y. 1999. State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*. 51: 105-116.
- 23 Cognié Y., Baril G., Poulin N. & Mermillod P. 2003. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*. 59(1): 171-188.
- 24 Cox J.F. & Alfaro V. 2007. In vitro fertilization and development of OPU derived goat and sheep oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*. 42(1): 83-87.
- 25 Crozet N., Huneau D., Desmedt V., Théron M.C., Szöllösi D., Torrès S. & Sévellec C. 1987. In vitro fertilization with normal development in the sheep. *Gamete Research*. 16: 159-170.
- 26 Czlonkowska M., Eysymont U., Guskiewicz A., Kossakowski M. & Dziak J. 1991. Birth of lambs after *in vitro* maturation, fertilization, and coculture with oviductal cells. *Molecular Reproduction & Development*. 30: 34-38.
- 27 Dattena M., Mara L., Bin T.A.A. & Cappai P. 2007. Lambing rate using vitrified blastocysts is improved by culture with BSA and hyaluronan. *Molecular Reproduction & Development*. 74: 42-47.
- 28 De Graaf S.P., Beilby K.H., Underwood S.L., Evans G. & Maxwell W.M. 2009. Sperm sexing in sheep and cattle: the exception and the rule. *Theriogenology*. 71: 89-97.
- 29 Deleuze S. & Goudet G. 2010. Cysteamine Supplementation of *In vitro* Maturation Media: A Review. *Reproduction in Domestic Animals*. [in press].
- 30 Flores-Foxworth G. 2007. Reproductive Biotechnologies in the Goat. In: Youngquist R.S., Threlfall W.R. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. 2nd Ed. St. Louis – Missouri: Saunders Elsevier, pp. 603-614.
- 31 Fonseca J.F. 2006. Alguns aspectos da transferência de embriões em caprinos. *Acta Scientiae Veterinariae*. 34 (Supl 1): 65-70.
- 32 Fonseca J.F., Souza J.M.G. & Bruschi J.H. 2007. Sincronização de estro e Superovulação em Caprinos e Ovinos. In: Anais do 2º Simpósio de Caprinos e Ovinos, (Belo Horizonte, MG) – Universidade Federal de Minas Gerais. pp. 167-195.
- 33 Garcia-Garcia R.M., Ward F., Fair S., O'Meara C.M., Wade M., Duffy P. & Lonergan P. 2007. Development and quality of sheep embryos cultured in commercial G1.3/G2.3 sequential media. *Animal Reproduction Science*. 98: 233-240.
- 34 Gardner D.K. & Lane M. 2003. Towards a single embryo transfer. *Reproductive Bio Medicine Online*. 6: 470-481.

- 35 Gibbons A., Pereyra Bonnet F., Cueto M.I., Catala M., Salamone D.F. & Gonzalez-Bulnes A. 2007. Procedure for maximizing oocyte harvest for *in vitro* embryo production in small ruminants. *Reproduction in Domestic Animals*. 42(4): 423-426.
- 36 Gómez E., Rodríguez A., Muñoz M., Caamaño J.N., Hidalgo C.O., Morán E., Facal N. & Díez C. 2008. Serum free embryo culture medium improves *in vitro* survival of bovine blastocysts to vitrification. *Theriogenology*. 69: 1013-1021.
- 37 Gonzalez C.I.M., Andrioli-Pinheiro A. & Cunha M. das G.G. 2003. Avanços na transferência de embriões em caprinos e ovinos de corte no Brasil. Resumos do Simpósio Internacional Sobre Caprinos e Ovinos de Corte (João Pessoa, PB, Brasil). p.331-352.
- 38 Gonzalez-Bulnes A., Berlinguer F., Cocero M.J., Garcia-Garcia R.M., Leoni G., Naitana S., Rosati I., Succu S. & Veiga-Lopez A. 2005a. Induction of the presence of corpus luteum during superovulatory treatments enhances *in vivo* and *in vitro* blastocysts output in sheep. *Theriogenology*. 64: 1392-1403.
- 39 Gonzalez-Bulnes A., Garcia-Garcia R.M., Santiago-Moreno J., Lopez-Sebastian A. & Cocero M.J. 2002. Effect of follicular status on superovulatory response in ewes is influenced by the presence of corpus luteum at first FSH dose. *Theriogenology*. 58: 1607-1614.
- 40 Gonzalez-Bulnes A., Veiga-Lopez A., Garcia P., Garcia-Garcia R.M., Ariznavarreta C., Sanchez M.A., Tresguerres J.A., Cocero M.J. & Flores J.M. 2005b. Effects of progestagens and prostaglandin analogues on ovarian function and embryo viability in sheep. *Theriogenology*. 63(9): 2523-2534.
- 41 Grazul-Bilska A.T., Choi J.T., Bilski J.J., Weigl R.M., Kirsch J.D., Kraft K.C., Reynolds L.P. & Redmer D.A. 2003. Effects of epidermal growth factor on early embryonic development after *in vitro* fertilization of oocytes collected from ewes treated with follicle stimulating hormone. *Theriogenology*. 59(5-6): 1449-1457.
- 42 Gusmão A.L. & Andrade Moura J.C. 2005. Transferência de embriões em caprinos e ovinos. *Acta Scientiae Veterinariae*. 33 (Supl 1): 29-33.
- 43 Gusmão A.L., Resende J., Oliveira J.V.L., Ribeiro Filho A.L., Andrade Moura J.C., Silva J.C. & Braga W. 2002. Modificação da técnica de colheita transcervical de embriões de cabras com um cateter desprovido de balão. In: Anais do 1º Congresso Norte/Nordeste de Reprodução Animal. pp.101-103.
- 44 Gusmão A.L., Silva J.C., Bittencourt T.C.C., Martins L.E.P., Gordiano H.D. & Barbosa L.P. 2009. Coleta transcervical de embriões em ovinos da raça Dorper no semiárido do Nordeste Brasileiro. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 61(2): 313-318.
- 45 Gusmão A.L., Silva J.C., Quintela A., Moura J.C.A., Resende J., Gordiano H., Chalhoub M., Ribeiro Filho A.L., Bittencourt T.C.B.S.C. & Barbosa L.P. 2007. Colheita Transcervical de Embriões Ovinos da Raça Santa Inês no Semi-árido Nordestino. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*. 8(1): 01-10.
- 46 Herrick J.R., Behboodi E., Memili E., Blash S., Echelard Y. & Krisner R.L. 2004. Effect of macromolecule supplementation during *in vitro* maturation of goat oocytes on developmental potential. *Molecular Reproduction & Development*. 69(3): 338-346.
- 47 Holm P., Booth P.J., Schmidt M.H., Greve T. & Callesen H. 1999. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology*. 52(4): 683-700.
- 48 Holtz W. 2000. Embryo Transfer in Goats in Europe: State of the Art and Future Perspectives. Resumos do Simpósio Internacional Sobre Caprinos e Ovinos de Corte, 1 (João Pessoa, PB, Brasil). p.265.
- 49 Ishwar A.K & Memon M.A. 1996. Embryo transfer in sheep and goats: a review. *Small Ruminant Research*. 19(1): 35-43.
- 50 Izquierdo D., Villamediana P., López-Bejar M. & Paramio M.T. 2002. Effect of *in vitro* and *in vivo* culture on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. *Theriogenology*. 57(5): 1431-1441.
- 51 Jainudeen M.R., Wahid H. & Hafez E.S.E. 2004. Indução da ovulação, Produção e Transferência de Embriões. In: Hafez E.S.E., Hafez B. *Reprodução Animal*. 7ª Ed. Barueri – SP: Ed. Manole, pp. 409-434.
- 52 Jaime C.M. & Bruschi J.H. 1985. Cabras sem limites. In: *Jornal "O Estado de Minas"*, Outubro. 6-7.
- 53 Kafi M. & McGowan M.R. 1997. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. *Animal Reproduction Science*, 48(2-4): 137-157.
- 54 Katska-Ksiazkiewicz L., Opiela J. & Ryńska B. 2007. Effects of oocyte quality, semen donor and embryo co-culture system on the efficiency of blastocyst production in goats. *Theriogenology*. 68(5): 736-744.
- 55 Katska-Ksiazkiewicz L., Ryńska B., Gajda B. & Smorag Z. 2004. Effect of donor stimulation, frozen semen and heparin treatment on the efficiency of *in vitro* embryo production in goats. *Theriogenology*. 62(3): 576-586.
- 56 Kershaw-Young C.M., Khalid M., McGowan M.R., Pitsillides A.A. & Scaramuzzi R.J. 2009. The mRNA expression of prostaglandin E receptors EP2 and EP4 and the changes in glycosaminoglycans in the sheep cervix during the estrous cycle. *Theriogenology*. 72(2): 251-261
- 57 Keskintepe L., Darwish G.M., Kenimer A.T. & Brackett B.G. 1994. Term development of caprine embryos derived from immature oocytes *in vitro*. *Theriogenology*. 42(3): 527-535.
- 58 Keskintepe L., Simplício A.A. & Brackett B.G. 1998. Caprine blastocyst development after *in vitro* fertilization with spermatozoa frozen in different extenders. *Theriogenology*. 49(7): 1265-1274.
- 59 Koeman J., Keefer C.L., Baldassarre H. & Downey B.R. 2003. Developmental competence of prepubertal and adult goat oocytes cultured in semi-defined media following laparoscopic recovery. *Theriogenology*. 60: 879-889.
- 60 Kühholzer B., Müller S., Treuer A., Seregi J., Besenfelder U. & Brem G. 1997. Repeated endoscopic ovum pick-up in hormonally untreated ewes: a new technique. *Theriogenology*. 48(4): 545-550.
- 61 Lamara A., Fieni F., Mselli-Lakhall L., Tainturier D. & Chebloune Y. 2002. Epithelial cells from goat oviduct are highly permissive for

- productive infection with caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV). *Virus Research*. 87(1): 69-77.
- 62 Lane M., Gardner D.K., Hasler M.J. & Hasler J.F. 2003. Use of G1.2/G2.2 media for commercial bovine embryo culture: equivalent development and pregnancy rates compared to co-culture. *Theriogenology*. 60(3): 407-419.
- 63 Lazzari G., Wrenzycki C., Herrmann D., Duchi R., Kruij T., Niemann H. & Galli C. 2002. Cellular and molecular deviations in bovine *in vitro*-produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biology of Reproduction*. 67(3): 767-775.
- 64 Li F., Pi W.H., Zhu H.Z., Zhang S.S., Liu S.R. & Xue J.L. 2006. The effect of estrous ewe serum and heparin on *in vitro* fertilization and subsequent embryonic development in sheep. *Small Ruminant Research*. 63(3): 226-232.
- 65 Lima P.F., Oliveira M.A.L., Guerra M.M.P., Alves J.D.R.F., Neto J.E. & Rabelo M.C. 1996. Eficiência de diferentes métodos de colheita embrionária em caprinos (resultados preliminares). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 20: 63-68.
- 66 Maalouf W.E., Lee J.H. & Campbell K.H. 2009. Effects of caffeine, cumulus cell removal and aging on polyspermy and embryo development on *in vitro* matured and fertilized ovine oocytes. *Theriogenology*. 71(7): 1083-1092.
- 67 Magalhães D.M., Pereira A.F., Andrade M.L.L., Cajazeiras J.B., Lopes Júnior E.S. & Freitas V.J.F. 2006. Effect of gonadotrophin treatment on the efficiency of laparoscopic ovum pick-up in goats: preliminary results. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 20 (Araxá, MG, Brasil). *Acta Scientiae Veterinariae*. 34 (Supl.): 453.
- 68 Martí E., Pérez-Pé R., Muiño-Blanco T. & Cebrián-Pérez J.A. 2006. Comparative study of four different sperm washing methods using apoptotic markers in ram spermatozoa. *Journal of Andrology*. 27(6): 746-753.
- 69 Morton K.M., Catt S.L., Hollinshead F.K., Maxwell W.M.C. & Evans G. 2004. Production of lambs after the transfer of fresh and cryopreserved *in vitro* produced embryos from prepubertal lamb oocytes and unsorted and sex sorted frozen-thawed spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*. 39(6): 454-461.
- 70 Morton K.M., Catt S.L., Hollinshead F.K., Maxwell W.M. & Evans G. 2005a. The effect of gamete co-incubation time during *in vitro* fertilization with frozen-thawed unsorted and sex-sorted ram spermatozoa on the development of *in vitro* matured adult and prepubertal ewe oocytes. *Theriogenology*. 64(2): 363-377.
- 70 Morton K.M., de Graaf S.P., Campbell A., Tomkins L.M., Maxwell W.M. & Evans G. 2005b. Repeat ovum pick-up and *in vitro* embryo production from adult ewes with and without FSH treatment. *Reproduction in Domestic Animals*. 40(5): 422-428.
- 71 Oliveira V.S. 1992. Efeitos do hormônio foliculo estimulante (FSH) e da gonadotrofina da menopausa humana (hMG) como agentes superovulantes em cabras (*Capra hircus*, Linnaeus, 1758) utilizadas em Transferência de Embriões. 97f. São Paulo, SP. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- 72 Palomo M.J., Izquierdo D., Mogas T. & Paramio M.T. 1999. Effect of semen preparation on IVF of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology*. 51(5): 927-940.
- 73 Palomo M.J., Mogas T., Izquierdo D. & Paramio M.T. 2010. The influence of sperm concentration, length of the gamete co-culture and the evolution of different sperm parameters on the *in vitro* fertilization of prepubertal goat oocytes. *Zygote*. 25: 1-11.
- 74 Pereira R.J.T.A., Sohnrey B. & Holtz W. 1998. Nonsurgical embryo collection in goats treated with prostaglandin F2-alpha and oxytocin. *Journal of Animal Science*. 76(2): 360-363.
- 75 Pierson J., Wang B., Neveu N., Sneek L., Côté F., Karatzas C.N. & Baldassarre H. 2004. Effects of repetition, interval between treatments and season on the results from laparoscopic ovum pick-up in goats. *Reproduction of Fertility and Development*. 16(8): 795-799.
- 76 Pintado B., Gutiérrez-Adán A. & Llano B.P. 1998. Superovulatory response of Murciana goats to treatments based on PMSG/anti-PMSG or combined FSH/PMSG administration. *Theriogenology*. 50(3): 357-364.
- 77 Rho G.J., Hahnel A.C. & Betteridge K.J. 2001. Comparisons of oocyte maturation times and of three methods of sperm preparation for their effects on the production of goat embryos *in vitro*. *Theriogenology*. 56(3): 503-516.
- 78 Rizos D., Fair T., Papadopoulos S., Boland M.P. & Lonergan P. 2002. Developmental, qualitative, and ultrastructural differences between ovine and bovine embryos produced *in vivo* or *in vitro*. *Molecular Reproduction and Development*. 62(3): 320-327.
- 79 Rizos D., Gutierrez-Adan A., Moreira P., O'Meara C., Fair T., Evans A.C., Boland M.P. & Lonergan P. 2004. Species-related differences in blastocyst quality are associated with differences in relative mRNA transcription. *Molecular Reproduction and Development*. 69(4): 381-386.
- 80 Rizos D., Gutiérrez-Adán A., Pérez-Garnelo S., De La Fuente J., Boland M.P. & Lonergan P. 2003. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biology of Reproduction*. 68(1): 236-243.
- 81 Rodríguez-Dorta N., Cognié Y., González F., Poulin N., Guignot F., Touzé J.L., Baril G., Cabrera F., Alamo D., Batista M., Gracia A. & Mermillod P. 2007. Effect of coculture with oviduct epithelial cells on viability after transfer of vitrified *in vitro* produced goat embryos. *Theriogenology*. 68(6): 908-913.
- 82 Rodríguez-González E., López-Bejar M., Izquierdo D. & Paramio M.T. 2003. Developmental competence of prepubertal goat oocytes selected with brilliant cresyl blue and matured with cysteamine supplementation. *Reproduction, Nutrition, Development*. 43(2): 179-187.
- 83 Rooke J.A., McEvoy T.G., Ashworth C.J., Robinson J.J., Wilmut I., Young L.E. & Sinclair K.D. 2007. Ovine fetal development is more sensitive to perturbation by the presence of serum in embryo culture before rather than after compaction. *Theriogenology*. 67(3): 639-647.
- 84 Rubianes E. & Menchaca A. 2006. Dinâmica folicular, sincronização de estro e superovulação em ovinos. *Acta Veterinariae Scientiae*,

34: 251-261.

- 85 Salles H.O. 2002. *Circuito fechado para colheita de embriões em caprinos*. [Fonte: <<http://www.cnpc.embrapa.br/embrioes.htm>>].
- 86 Salles H.O., Andrioli-Pinheiro A., Soares A.T., Moura Sobrinho P.A., Marques M.A.J. & Moraes J.B. 1996. Utilização da semi-laparoscopia na transferência de embriões em caprinos. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 11 (Canela, RS, Brasil). *Acta Scientiae Veterinariae*. (Supl.): 215.
- 87 Santos Garza R., Sánchez Davila F., Villarreal Arredondo J.F., Ledezma R., Romero Juarez P.G. & Hernandez B.E. 2008. Effect of different levels of FSH on the response to ovulation and quality of embryo transfer in goats, during the breeding season. In: Proceedings of 9^o International Conference on Goats, (Queretaro, MX). p.455.
- 88 Scudamore C.L., Robinson J.J., Aitken R.P., Kennedy D.J., Ireland S. & Robertson I.S. 1991. Laparoscopy for intrauterine insemination and embryo recovery in superovulated ewes at a commercial embryo transfer unit. *Theriogenology*. 35(2): 329-37.
- 89 Shabankareh H.K. & Zandi M. 2009. Developmental potential of sheep oocytes cultured in different maturation media: effects of epidermal growth factor, insulin-like growth factor I, and cysteamine. *Fertility and Sterility*. doi:10.1016/j.fertnstert.2009.01.160
- 90 Shipley C.F.B., Buckrell B.C., Mylene M.J.A., Pollard J. & Hunton J.R. 2007. Artificial Insemination and Embryo Transfer in Sheep. In: Youngquist R.S., Threlfall W.R. *Current Therapy in Large Animal Theriogenology*. 2nd Ed. St. Louis – Missouri: Saunders Elsevier, pp. 629-641.
- 91 Shirazi A., Shams-Esfandabadi N., Ahmadi E. & Heidari B. 2010. Effects of growth hormone on nuclear maturation of ovine oocytes and subsequent embryo development. *Reproduction in Domestic Animals*. 45: 530-536.
- 92 Silva J.C., Mello A., Resende J., Oliveira J.V.L., Andrade Moura J.C., Ribeiro Filho A.L., Coelho Lima M.C., Bonina G. & Gusmão A.L. 2001. Superovulação de ovelhas Santa Inês através de uma única injeção subcutânea de FSH dissolvido em polivinilpirrolidona. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 24 (Belo Horizonte, MG, Brasil). p.500.
- 93 Silva J.C., Quintela A., Andrade Moura J.C., Resende J., Gordiano H.D., Martins L.P., Chalhoub M., Ribeiro Filho A.L. & Gusmão A.L. 2004. Avaliação da Colheita Transcervical de Embriões Ovinos da Raça Santa Inês. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 18, (Barra Bonita, SP, Brasil). *Acta Scientiae Veterinariae*. 32: 90.
- 94 Simplício A.A., Freitas V.J.F. & Santos D.O. 2005. Biotécnicas da reprodução em caprinos. *Revista Ciências Agrárias*. Belém. 43: 1-20.
- 95 Somanath P.R. & Gandhi K.K. 2002. Expression of membrane associated non-genomic progesterone receptor(s) in caprine spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 74(3-4): 195-205.
- 96 Souza A.L., Galeati G., Almeida A.P., Arruda I.J., Govoni N., Freitas V.J.F. & Rondina, D. 2008. Embryo Production in Superovulated Goats Treated with Insulin Before or After Mating or By Continuous Propylene Glycol Supplementation. *Reproduction in Domestic Animals*. 43: 218-221.
- 97 Stangl M., Kühholzer B., Besenfelder U. & Brem G. 1999. Repeated endoscopic ovum pick-up in sheep. *Theriogenology*. 52(4): 709-716.
- 98 Stenbak T.K., Redmer D.A., Berginski H.R., Erickson A.S., Navanukraw C., Toutges M.J., Bilski J.J., Kirsch J.D., Kraft K.C., Reynolds L.P. & Grazul-Bilska A.T. 2001. Effects of follicle stimulating hormone (FSH) on follicular development, oocyte retrieval, and *in vitro* fertilization (IVF) in ewes during breeding season and seasonal anestrus. *Theriogenology*. 56(1): 51-64.
- 99 Steyn M.C., Morgenthal J.C. & Barry D.M. 1993. The effect of embryo collection technique on subsequent fertility in SA Mutton Merino ewes. *Theriogenology*. 39(1): 317.
- 100 Tervit H.R., Goold P.G., McKenzie R.D. & Clarkson D.T. 1983. Techniques and success of embryo transfer in Angora goats. *New Zealand Veterinary Journal*. 31: 67-70.
- 101 Thibier M. 1998. The 1997 embryo transfer statistics from around the world: a data retrieval committee report. *Embryo Transfer Newsletter*. 16(4): 1-11.
- 102 Thibier M. 1999. The 1998 statistical figures for the worldwide embryo transfer industry: a data retrieval committee report. *Embryo Transfer Newsletter*. 17(4): 25-31.
- 103 Thibier M. 2001. The animal embryo transfer industry in figures: a report from the IETS data retrieval committee. *Embryo Transfer Newsletter*. 19(4): 16-22.
- 104 Thibier M. 2002. A contrasted year for the world activity of the animal embryo transfer industry -a report from the iets data retrieval committee. *Embryo Transfer Newsletter*. 20(4): 13-19.
- 105 Thibier M. 2003. Data retrieval committee statistics of embryo transfer- year 2002. More than half a million bovine embryos transferred in 2002. *Embryo Transfer Newsletter*. 21(4): 12-19.
- 106 Thibier M. 2004. Data retrieval committee statistics of embryo transfer- year 2003. Stabilization of numbers of *in vivo* collected embryos in cattle but significant increases of *in vitro* bovine produced embryos in some parts of the world. *Embryo Transfer Newsletter*. 22(4): 12-19.
- 107 Thibier M. 2005. Data retrieval committee statistics of embryo transfer- year 2004. Significant increases in transfers of both *in vivo* derived and *in vitro* produced embryos in cattle and contrasted trends in other species in 2004. *Embryo Transfer Newsletter*. 23(4): 11-17.
- 108 Thibier M. 2006. Data retrieval committee statistics of embryo transfer- year 2005. Transfers of both *in vivo* derived and *in vitro* produced embryos in cattle still on the rise and contrasted trends in other species in 2005. *Embryo Transfer Newsletter*. 24(4): 12-18.
- 109 Thibier M. 2007a. Data retrieval committee statistics of embryo transfer- year 2006. New records in the numbers of both *in vivo*-derived

- and in vitro-produced bovine embryos around the world in 2006. *Embryo Transfer Newsletter*. 25(4): 15-20.
- 110 Thibier M. 2007b. Data retrieval committee statistics of embryo transfer- year 2007. The worldwide activity in farm animals embryo transfer. *Embryo Transfer Newsletter*. 26(4): 4-9.
- 111 Thibier M. 2009. Data retrieval committee statistics of embryo transfer- year 2008. The worldwide statistics of embryo transfers in farm animals. *Embryo Transfer Newsletter*. 27(4): 13-19.
- 112 Thibier M. & Guérin B. 2000. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*. 62(1-3): 233-251.
- 113 Thompson J.G., Gardner D.K., Pugh P.A., McMillan W.H. & Tervit H.R. 1995. Lamb birth weight is affected by culture system utilized during in vitro pre-elongation development of ovine embryos. *Biology of Reproduction*. 53(6): 1385-1391.
- 114 Traldi A.S. 1995. Superovulação com a gonadotrofina da menopausa humana (hMG) e prevenção da regressão prematura dos corpos lúteos em caprinos. 154f. São Paulo, SP. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- 115 Tsiligianni T., Valasi I., Cseh S., Vainas E., Faigl V., Samartzi F., Papanikolaou T., Dovolou E. & Amiridis G.S. 2009. Effects of melatonin treatment on follicular development and oocyte quality in Chios ewes. *Acta Veterinaria Hungarica*. 57: 331-335.
- 116 Urdaneta A., Jiménez A.R., Paramio M.T. & Izquierdo D. 2004. Cysteamine, glutathione and ionomycin treatments improve *in vitro* fertilization of prepubertal goat oocytes. *Zygote*. 12(4): 277-284.
- 117 Urman B. & Balaban B. 2005. Is there still a place for co-cultures in the era of sequential media? *Reproductive BioMedicine Online*. 10(4): 492-496.
- 118 Vázquez M., Forcada F., Casao A., Abecia J., Sosa C. & Palacín I. 2009. Undernutrition and exogenous melatonin can affect the *in vitro* developmental competence of ovine oocytes on a seasonal basis. *Reproduction in Domestic Animals*. 10. 1439-0531.
- 119 Wan P.C., Hao Z.D., Zhou P., Wu Y., Yang L., Cui M.S., Liu S.R. & Zeng S.M. 2009. Effects of SOF and CR1 media on developmental competence and cell apoptosis of ovine *in vitro* fertilization embryos. *Animal Reproduction Science*. 114: 279-288.
- 120 Warwick B.L., Berry R.O. & Horlacher W.R. 1934. Results of mating rams to Angora female goats. *Proceedings of the American Society of Animal Production*. p.225.
- 121 Willadsen S.M. 1986. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*. 320(6057): 63-65.
- 122 Yadav P.S., Saini A., Kumar A. & Jain G.C. Effect of oviductal cell co-culture on cleavage and development of goat IVF embryos. 1998. *Animal Reproduction Science*. 51(4): 301-306
- 123 Young L.E., Fernandes K., McEvoy T.G., Butterwith S.C., Gutierrez C.G., Carolan C., Broadbent P.J., Robinson J.J., Wilmot I. & Sinclair K.D. 2001. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nature Genetics*. 27: 53-154.
- 124 Younis A.I., Zuelke K.A., Harper K.M., Oliveira M.A.L. & Brackett B.F. 1991. *In vitro* fertilization of goat oocytes. *Biology of Reproduction*. 44: 1177-1182.

