

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Gado de Leite  
Embrapa Caprinos e Ovinos  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

# **Bioteχνologias Aplicadas à Reprodução de Ovinos e Caprinos**

**Autores**

*Jeferson Ferreira da Fonseca  
Renata do Carmo Cruz  
Maria Emilia Franco Oliveira  
Joanna Maria Gonçalves de Souza-Fabjan  
João Henrique Moreira Viana*

*Embrapa  
Brasília, DF  
2014*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Gado de Leite**

Rua Eugênio do Nascimento 610  
Bairro Dom Bosco  
36038-330 - Juiz de Fora, MG  
Telefone: (32) 3311-7400  
Fax: (32) 3311-7401  
www.embrapa.br  
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

**Embrapa Caprinos e Ovinos**

Fazenda Três Lagoas  
Estrada Sobral-Groaíras km 4  
Caixa Postal 145  
62011-970 - Sobral, CE  
Telefone: (88) 3112-7400  
Fax: (88) 3112-7455

**Unidade Responsável pela Edição**

Embrapa Gado de Leite

**Unidade Responsável pelo Conteúdo**

Embrapa Caprinos e Ovinos

Supervisão editorial *Alexandre César Silva Marinho*

**Comitê de Publicação da Unidade**

Presidente *Francisco Selmo Fernandes Alves*

Revisão de texto *Carlos José Mendes Vasconcelos*

Secretária executiva *Ana Maria Bezerra Oliveira Lôbo*

Normalização bibliográfica *Tânia Maria Chaves Campelo*

Membros *Alexandre César Silva Marinho, Carlos José Mendes Vasconcelos, Diônes Oliveira Santos, Maíra Vergne Dias, Manoel Everardo Pereira Mendes, Patrícia Yoshida Faccioli Martins, Tânia Maria Chaves Campelo, Alexandre Weick Uchoa Monteiro, Viviane de Souza (suplente)*

Editoração eletrônica e tratamento das ilustrações *Carlos Alberto Medeiros de Moura*  
Arte da capa *Paula Ambrosio Carvalho (estagiária)*  
Fotos da capa *Jeferson Ferreira da Fonseca, Maria Izabel Carneiro Ferreira e Pixabay*

**1ª edição**

1ª impressão (2014): 500 exemplares

**Todos os direitos reservados**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na publicação (CIP)**

Embrapa Gado de Leite

---

Biotechnologias aplicadas à reprodução de ovinos e caprinos / Jeferson Ferreira da Fonseca ... [et al.] - Brasília, DF : Embrapa, 2014.  
108 p. : il color, ; 21,0 cm x 15,0 cm.

ISBN 978-85-7035-416-7

1. Biotecnologia. 2. Reprodução animal. 3. Caprino - Biotecnologia da reprodução. 4. Ovinos - Biotecnologia da reprodução. I. Título. II. Embrapa Caprinos e Ovinos. III. Embrapa Gado de Leite.

CDD 636.08926 (21. Ed)

---

© Embrapa 2014

# **Autores**

## **Jeferson Ferreira da Fonseca**

Médico-veterinário – Doutor em Zootecnia – Pesquisador da Embrapa Caprinos e Ovinos, Núcleo Regional Sudeste, Coronel Pacheco, MG

## **Renata do Carmo Cruz**

Médica-veterinária – Mestre em Zootecnia – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG

## **Maria Emilia Franco Oliveira**

Médica-veterinária – Mestre em Medicina Veterinária – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP

## **Joanna Maria Gonçalves de Souza-Fabjan**

Médica-veterinária – Mestre em Ciências Veterinárias – Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ

## **João Henrique Moreira Viana**

Médico-veterinário – Doutor em Ciência Animal – Pesquisador da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG



# Agradecimentos

*Esta obra tentou sumarizar o conhecimento disponível sobre o tema abordado. Em parte, este conhecimento derivou de resultados de projetos desenvolvidos de 2003 à 2013. Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq Processo 559151/2010 – 1; 500111/2012-0 e 310316/2012-8), à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Projetos 03.09.06.021.00, 03.10.00.069.00.00 e 02.08.02.005.00.04) à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo nº 2008/01665-8) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig Projetos CVZ-APQ 01367/09 e CVZ PPM 00042/14) pelo aporte financeiro, que resultou em importantes avanços na fronteira do conhecimento associados à biotecnologia da reprodução em pequenos ruminantes apresentados neste livro.*



# Apresentação

A criação de caprinos e ovinos é uma atividade agropecuária de elevada importância social, econômica e consolidada em determinadas regiões do Brasil, enquanto em outras, mostra-se em fase emergente. Diversos aspectos apontam para o desenvolvimento desta cadeia produtiva no país. Dentre eles, a produção nacional, especialmente de carne e leite, sequer abastece o mercado interno, mesmo considerando que o consumo ainda é reduzido em relação a outros países. Em função da qualidade e diferencial dos produtos de origem caprina e ovina, acredita-se que em pouco tempo a demanda aumentará expressivamente, requerendo sistemas de criação focados na produtividade. Assim, torna-se fundamental desenvolver e adequar tecnologias voltadas ao incremento produtivo. Para tanto, recursos humanos, meio ambiente, nutrição, sanidade, bem-estar animal, genética e reprodução devem estar e operar concomitantemente. Dentre eles, a eficiência reprodutiva desempenha papel de destaque.

A reprodução animal é uma área de intensos estudos, avanços e que vem sendo cada vez mais explorada em seu aspecto aplicado. Neste cenário, as biotécnicas oferecem benefícios singulares ao incremento reprodutivo. Todavia, o sucesso apenas é alcançado quando são empregadas diante do conhecimento holístico da área. Esta obra poderá auxiliar na consolidação e domínio de estudantes, profissionais e técnicos acerca das biotecnologias aplicadas à reprodução em ovinos e caprinos. O material apresenta inicialmente informações de aspectos fisiológicos que possibilitam ao leitor o entendimento das biotécnicas aplicadas detalhadamente abordadas em sequência. São apresentados os métodos de sincronização e indução de estro e ovulação; inseminação artificial; múltipla ovulação e transferência de embriões; e tecnologia reprodutivas avançadas como a produção *in vitro* de embriões, transgênese e clonagem.

**Paulo do Carmo Martins**

*Chefe-Geral Embrapa Gado de Leite*

**Evando Vasconcelos Holanda Jr.**

*Chefe-Geral Embrapa Caprinos e Ovinos*



# Sumário

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS .....	11
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. ASPECTOS GERAIS DA REPRODUÇÃO DE CAPRINOS E OVINOS ...	14
2.1. Estacionalidade reprodutiva .....	14
2.2. Ciclo estral .....	16
2.3. Duração do estro e ovulação.....	17
3. MÉTODOS DE SINCRONIZAÇÃO E INDUÇÃO DE ESTRO E OVULAÇÃO EM PEQUENOS RUMINANTES .....	17
3.1. Tratamentos hormonais.....	18
3.1.1. Prostaglandinas.....	18
3.1.2. Progestágenos .....	20
3.1.3. Gonadotrofinas .....	22
3.2. Efeito macho .....	24
3.3. Fotoperíodo artificial .....	26
3.4. Melatonina .....	27
3.5. Pontos essenciais para a inseminação artificial em caprinos e ovinos .....	29
3.6. Implicações e perspectivas da indução e sincronização do estro e da ovulação em pequenos ruminantes .....	32
4. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL .....	32
4.1. Técnicas de inseminação artificial.....	33
4.2. Fatores que interferem na eficiência da inseminação artificial....	35
4.2.1. Local de deposição do sêmen .....	35
4.2.2. Tempo de execução e número de inseminações .....	37
4.2.3. Tipo de sêmen, muco e horário da inseminação.....	38
4.2.4. Aspectos gerais .....	42

4.3. Pontos essenciais para a inseminação artificial em caprinos e ovinos .....	42
4.4. Implicações e perspectivas .....	44
5. MÚLTIPLA OVULAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES.....	44
5.1. Seleção de doadoras.....	46
5.2. Protocolos de superovulação.....	49
5.3. Métodos de acasalamento .....	57
5.4. Coleta e avaliação dos embriões.....	58
5.5. Inovulação dos embriões .....	60
5.6. Criopreservação .....	62
5.7. Implicações e perspectivas .....	64
6. TECNOLOGIAS REPRODUTIVAS AVANÇADAS.....	65
6.1. Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE) .....	65
6.1.1. Coleta de oócitos .....	66
6.1.2. Maturação <i>in vitro</i> (MIV) .....	68
6.1.3. Fecundação <i>in vitro</i> (FIV) .....	69
6.1.4. Desenvolvimento <i>in vitro</i> (DIV).....	70
6.2. Transgênese.....	71
6.2.1. Definição, técnica e aplicações .....	71
6.2.2. Transgênicos no mundo e no Brasil.....	74
6.3. Clonagem ou transferência nuclear de células somáticas (TNCS) .....	76
6.3.1. Definição, técnica e aplicações .....	76
6.3.2. Clonagem no mundo e no Brasil .....	77
6.4. Implicações e perspectivas .....	78
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	78
8. REFERÊNCIAS.....	79
ANOTAÇÕES.....	108

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABCC – Associação Brasileira de Criadores de Caprinos  
CIDR – *Controlled Internal Drug Release*  
CL – Corpo Lúteo  
CTNBio – Comissão Técnica Nacional de Biossegurança  
DIV – Desenvolvimento *in vitro*  
eCG – Gonadotrofina Coriônica Equina  
FIV – Fecundação *in vitro*  
FGA – Acetato de Fluorogestona  
FSH – Hormônio Folículo Estimulante  
GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofinas  
GSH – Glutathiona  
hG-CSF – Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos humano  
IA – Inseminação Artificial  
IATF – Inseminação Artificial em Tempo Fixo  
LFCR – Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução  
LH – Hormônio Luteinizante  
MAP – Acetato de Medroxiprogesterona  
MIV – Maturação *in vitro*  
MOTE – Múltipla Ovulação e Transferência de Embriões  
OPS – Open Pulled Straw  
PGF 2 $\alpha$  – Prostaglandina F 2 alfa  
PIVE – Produção *in vitro* de embriões  
PVP – Polivinilpirrolidina  
SP – São Paulo  
TNCS – Transferência Nuclear de Células Somáticas  
UECE – Universidade Estadual do Ceará  
UI – Unidades Internacionais  
hMG – Gonadotrofina Menopausal Humana  
cm – Centímetros  
 $\mu$ g – Microgramas  
mg – Miligramas  
mL – Mililitros



# 1. INTRODUÇÃO

A criação de caprinos e ovinos foi provavelmente a primeira atividade zootécnica desenvolvida pelo homem, uma vez que essas espécies foram as primeiras domesticadas. Os primeiros registros em pinturas rupestres dão testemunho desse princípio, há cerca de dez mil anos atrás (ZEDER; HESSE, 2000; ZEUNER, 1963). Desde então, esses pequenos e notáveis ruminantes estiveram presentes nos momentos mais marcantes da história e da evolução da humanidade. Como fonte permanente de alimento (carne e leite) e proteção (peles), eles deixaram suas origens africanas e acompanharam o homem nas conquistas da Europa, Ásia e depois, das Américas e Oceania (FONSECA; BRUSCHI, 2009b). No Brasil, os primeiros relatos dão testemunho de que foi a cabra o primeiro e mais chamativo animal a despertar a atenção dos índios por ocasião do descobrimento. No contexto de exploração animal, a caprinocultura, sobretudo leiteira, intensificou-se a partir da década de 1970 com a criação da Associação Brasileira de Criadores de Caprinos (ABCC) (FONSECA; BRUSCHI, 2009a).

No Brasil, caprinos e ovinos são explorados em regimes familiares e extensivos ou empresariais e intensivos. Em todos os cenários, sua função social e no agronegócio é muito importante. Os sistemas de produção poderiam ser estudados e implementados regionalmente, levando-se em

conta as particularidades e experiências locais. Dessa forma, modelos economicamente viáveis e sustentáveis poderiam ser desenvolvidos e aplicados. Esses modelos, obviamente teriam sua eficiência limitada pelos índices reprodutivos, uma vez que condições sanitárias, nutricionais e de bem-estar animal, adequadas ao sistema de produção estejam sendo aplicadas. Dessa forma, a otimização do sistema produtivo terá como principal limitante a eficiência reprodutiva do rebanho. Essa eficiência pode ser incrementada com a adequação e emprego de biotécnicas de reprodução assistida (FONSECA, 2006a). Neste contexto, o objetivo deste livro foi apresentar as técnicas aplicadas à reprodução assistida em caprinos e ovinos.

## **2. ASPECTOS GERAIS DA REPRODUÇÃO DE CAPRINOS E OVINOS**

### **2.1. Estacionalidade reprodutiva**

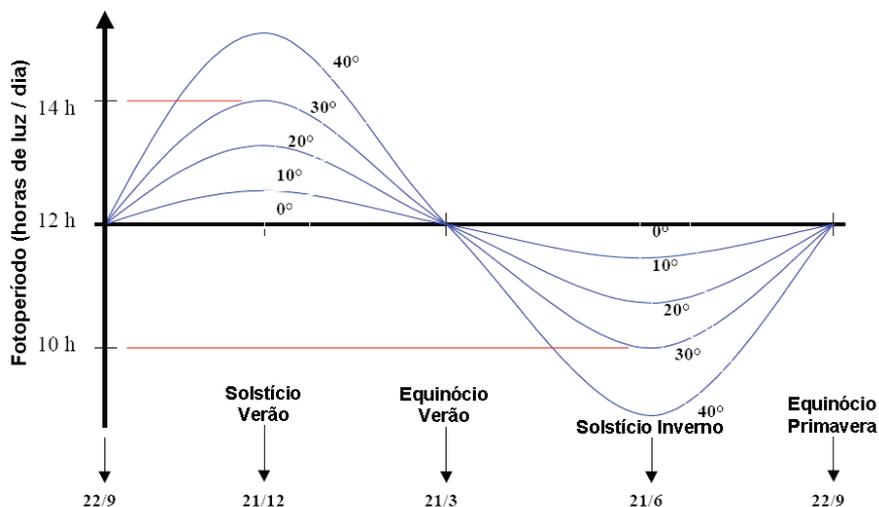
Os ovinos e caprinos são considerados animais poliéstricos estacionais de dias curtos, tornando-se sexualmente ativos em resposta à diminuição do comprimento do dia que ocorre no final do verão e início do outono (ROSA; BRYANT, 2003).

A estacionalidade reprodutiva tem no fotoperíodo seu principal orientador, e será mais expressiva quanto maior for a latitude, diminuindo e tendendo a cessar à medida que se aproxima da linha do equador (FONSECA et al., 2009), conforme demonstrado na Figura 1.

Nas zonas tropicais e principalmente em regiões próximas ao equador, como por exemplo, no Nordeste e Norte brasileiros, a variação de luminosidade é muito pequena, assim, essa estacionalidade pode não ocorrer, permitindo a ciclicidade o ano todo (FONSECA, 2006a). Nessas regiões, a estacionalidade do ciclo estral pode estar mais relacionada com a disponibilidade e a qualidade dos alimentos (ROSA; BRYANT, 2003).

O período de anestro estacional (ausência de manifestações de estros) varia de intensidade e duração não só em função da latitude,

mas também da raça, linhagem dentro de uma mesma raça, fatores climáticos, genéticos, sociais, estágio da lactação e manejo nutricional (ESPESCHIT, 1998).



**Figura 1.** Variação estacional do fotoperíodo em diferentes latitudes do Hemisfério Sul.  
Fonte: Adaptado de Bergamaschi (2009).

Segundo Espeschit (1998), em caprinos de raças leiteiras especializadas (Saanen, Alpina e Toggenburg) na região Sudeste do Brasil, têm-se observado estros principalmente do verão ao inverno (fevereiro a julho), com maior incidência no mês de abril. Já em cabras naturalizadas do Nordeste brasileiro, como a Canindé e Moxotó, não é observada qualquer variação na manifestação dos estros, os quais ocorrem durante todo o ano. O mesmo ocorre com ovelhas deslançadas brasileiras, Morada Nova e Santa Inês, diferentemente das raças lanadas - Ille de France, Suffolk, Merino (FONSECA, 2005).

A atividade reprodutiva desses animais, portanto, é dividida em estações de anestro (início do inverno ao início do verão), de transição (verão), e de acasalamento (final do verão, ao início do inverno), com a maior concentração de estros ocorrendo no outono (FONSECA, 2005), conforme Figura 2.

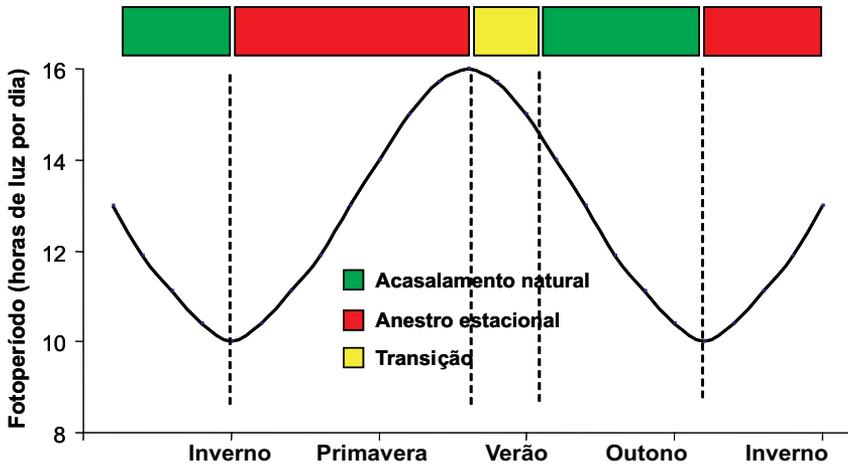


Figura 2. Variação anual no fotoperíodo, estações do ano e efeito sobre a reprodução de caprinos e ovinos.

Fonte: Adaptado de Bruchi e Fonseca (2011).

## 2.2. Ciclo estral

A duração do ciclo estral é em média de 17 dias para ovelhas e 21 dias para cabras. A sequência de eventos hormonais durante o ciclo estral é similar em ambas as espécies, sendo que as cabras apresentam naturalmente uma fase progesterônica mais longa do que as ovelhas (JAINUDEEN et al., 2004), 17 e 13 dias respectivamente, e uma fase folicular semelhante de 4 dias, como apresentado na Figura 3 (FONSECA, 2006a).

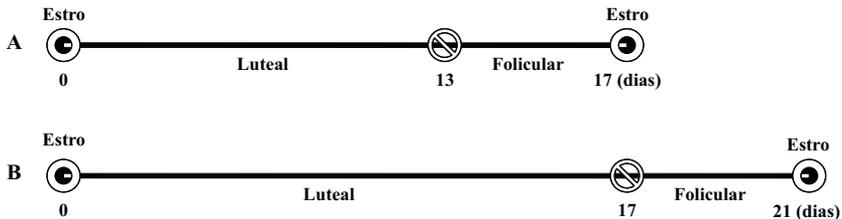


Figura 3. Ciclo estral na ovelha (A) e na cabra (B).

Fonte: Adaptado de Fonseca (2005).

Variações na duração do ciclo estral ocorrem devido a diferenças raciais, condições fisiológicas, sociais e estresse ambiental em ambas as espécies. Os ciclos anormalmente curtos, observados na ovelha e na cabra, que ocorrem na transição das estações, podem estar associados com

o corpo lúteo (CL) em regressão prematura (6 a 7 dias) ou anovulação (JAINUDEEN et al., 2004). Esse fenômeno parece ser mais frequente na cabra do que na ovelha (PINTADO et al., 1998).

Durante o ciclo estral, duas a quatro ondas foliculares podem estar presentes, sendo mais comum a ocorrência de quatro ondas na cabra e três na ovelha (EVANS, 2003; GINTHER; KOT, 1994). Da última onda folicular deriva o folículo ovulatório que alcança maturação final e ovulação em ambiente hormonal com predomínio de atividade estrogênica. Ondas iniciais ou intermediárias que emergem em ambiente hormonal com predomínio de progesterona (fase luteal) acabam por regredirem e não geram folículos ovulatórios, a menos que o corpo lúteo seja inativado (aplicação de prostaglandinas), conforme Fonseca (2006a).

### **2.3. Duração do estro e ovulação**

O estro dura de 24 a 36 horas nas ovelhas e de 24 a 48 horas nas cabras, sendo que a raça, a idade, a estação e a presença do macho influenciam na sua duração. O estro pode ser de duração mais curta no início e no final da estação de acasalamento, na presença do macho, e na primeira estação de acasalamento de fêmeas jovens (JAINUDEEN et al., 2004).

Ambas as espécies apresentam ovulação espontânea, podendo ser única ou múltipla, que ocorrem próximo ao final do estro ou após o seu final (GORDON, 1997). As ovelhas ovulam normalmente 24 a 27 horas após o seu início (JAINUDEEN et al., 2004), e as cabras após 30 a 36 horas (GONZÁLEZ et al., 2008).

## **3. MÉTODOS DE SINCRONIZAÇÃO E INDUÇÃO DE ESTRO E OVULAÇÃO EM PEQUENOS RUMINANTES**

Conceitualmente, a sincronização de estro pressupõe que vários animais estejam apresentando estro em um período relativamente curto (24 a 72 horas). Isso pode ser obtido, por exemplo, encurtando-se a fase luteal por meio da administração de prostaglandinas durante a estação de

acasalamento natural, utilizando-se progestágenos ou efeito macho. Já a indução de estro é conceitualmente definida quando o estro ocorre em condições em que normalmente não seria possível (estação de anestro estacional). O uso de um programa de luz ou administração exógena de melatonina é capaz de induzir o estro, mas não de forma sincronizada. A indução de estro sincronizado é aquela obtida por meio de coquetéis hormonais que empregam gonadotrofinas em associação com progestágenos e prostaglandinas. Nesse caso, há também a perspectiva de sincronia ovulatória que pode ainda ser melhorada por meio da associação com outros hormônios, ditos indutores de ovulação.

### **3.1. Tratamentos hormonais**

Dois tipos de drogas são frequentemente utilizados para sincronizar o estro, agentes luteolíticos e progestágenos. Além disso, a combinação desses e a associação com gonadotrofinas podem ser eficientes na indução do estro e ovulação nas fêmeas durante o anestro estacional (ABECIA, 2011).

#### **3.1.1. Prostaglandinas**

Para a sincronização do estro, a prostaglandina  $F_{2\alpha}$  ( $PGF_{2\alpha}$ ) e seus análogos sintéticos, cloprostenol, dinaprost, e delprostenato (FREITAS; RUBIANES, 2004) são tratamentos muito utilizados. Seus mecanismos de ação consistem em induzir a regressão do corpo lúteo, interrompendo a fase progesterônica do ciclo estral e permitindo o início de um novo ciclo, ou seja, retorno a fase folicular do ciclo estral (GONZÁLEZ et al., 2008). No entanto, os corpos lúteos são responsivos às prostaglandinas apenas após o terceiro dia da ovulação (MENCHACA; RUBIANES, 2004). Com base no conceito de não responsividade dos corpos lúteos ao tratamento, os protocolos tradicionais consistem na aplicação de duas doses intervaladas por 11 a 14 dias em caprinos e 11 a 12 dias em ovinos (FREITAS; RUBIANES, 2004). Após a segunda administração, há alta proporção de fêmeas que manifestam estro dentro de dois a quatro dias (OLIVEIRA et al., 2013c). Entretanto, o uso da  $PGF_{2\alpha}$  ou de seus análogos não tem sido recomendado para programas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), devido à alta variabilidade observada para o início do estro e da ovulação após o fim do tratamento entre fêmeas (ROMANO, 1998). Essa

variabilidade tem como causa os diferentes estádios de desenvolvimento folicular quando a luteólise é induzida (WILDEUS, 2000). Visando aumentar a eficiência dos tratamentos com  $\text{PGF}_2\alpha$ , o encurtamento do intervalo para sete dias foi proposto e tem apresentado melhores resultados, sobretudo por permitir maior sincronia de ovulações (MENCHACA; RUBIANES, 2004). Segundo esses autores, isso foi possível porque a segunda dose de  $\text{PGF}_2\alpha$  é administrada entre o terceiro e quinto dia do ciclo estral e nesse período, os folículos dominantes da primeira onda folicular ainda estão em fase de crescimento, ao passo que os corpos lúteos da ovulação prévia já estão responsivos à ação da prostaglandina.

Durante a estação reprodutiva, a sincronização do estro em cabras pode ser efetuada com 5 a 10 mg de prostaglandina natural ou 50 a 100  $\mu\text{g}$  de prostaglandina sintética (TRALDI et al., 2007a). Segundo Romano (1998), as células luteais das cabras possuem uma maior sensibilidade do que a das ovelhas, sendo necessária uma menor dose para sincronização do estro. Para ovelhas, utilizam-se doses do análogo sintético acima de 125  $\mu\text{g}$ , podendo alcançar índices de 100% de sincronização com 250  $\mu\text{g}$  (GORDON, 1997). A dose de prostaglandina natural varia de 15 mg, com eficiência de 70% de sincronização, a 20 mg, com eficiência de 100% de sincronização (GONZÁLEZ et al., 2008; GORDON, 1997).

A via intravulvosubmucosal foi reportada como mais eficiente. Nesse caso, sugeriu-se que a prostaglandina chegue ao seu local de ação, o ovário, mais rapidamente, reduzindo a taxa de metabolização sistêmica (MELLADO et al., 1994). Por essa via, a dose de 22,5  $\mu\text{g}$  d-cloprostenol para cabras leiteiras obteve eficiência de 89,5% em sincronização (FONSECA, 2002). Todavia, há riscos e dificuldades inerentes à introdução de agulhas nesse ponto, e a aplicação de  $\text{PGF}_2\alpha$  laterovulvar (ao lado da comissura labial) torna-se uma alternativa de se atingir a submucosa vulvar ou vaginal (Figura 4). Logo, o medicamento pode ser depositado no mesmo ponto, mas com perfuração através da pele. Comparada com a via intramuscular, a laterovulvar é de higienização mais eficiente, sobretudo em raças lanadas ou de pelos longos.



Figura 4. Administração de  $PGF_{2\alpha}$  pela via laterovulvar em ovinos.

Entre as vantagens de se utilizar o tratamento com prostaglandinas, estão: a facilidade de administração; a ausência de problemas com os dispositivos vaginais; o rápido metabolismo, evitando-se resíduos químicos nos produtos de origem animal (VÁZQUEZ et al., 2010); e os bons resultados de sincronização (GONZÁLEZ et al., 2008). Mesmo que, por vezes, inferiores aos tratamentos com progestágenos (VÁZQUEZ et al., 2010). Contudo, a principal desvantagem é que não podem ser utilizadas nas fêmeas que não estão ciclando de forma natural, pois estas não possuem um CL funcional (FREITAS; RUBIANES, 2004). Além disso, González et al. (2008) ressaltaram que é possível induzir o aborto se as fêmeas estiverem gestantes e receberam diagnóstico falso-negativo.

### 3.1.2. Progestágenos

A utilização da progesterona, natural ou sintética, na sincronização do estro tem sobre as prostaglandinas, as vantagens de poderem ser utilizadas em qualquer fase do ciclo estral e de induzir a manifestação do estro

no período de menor atividade reprodutiva, ou seja, na contra-estação (ESPESCHIT, 1986).

A progesterona exógena exerce ação de bloqueio temporário do ovário, pois inibe a secreção pulsátil do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) pelo hipotálamo (LEBOEUF et al., 1998), o que impede o desenvolvimento de folículos a estádios em que seja possível a manifestação do estro e a ovulação. Essa ação é semelhante a da progesterona endógena e termina, uma vez retirada sua fonte, induzindo o estro em poucos dias (ESPESCHIT, 1986).

A utilização desse hormônio por um período menor que a fase luteal, 9 a 12 dias, pode levar ao atraso ou inibição do estro e da ovulação pela presença do CL funcional remanescente no final do tratamento. Assim, a luteólise deve ser induzida com a aplicação de  $PGF_2\alpha$  durante a permanência do progestágeno, ou ao final do tratamento (LEBOEUF et al., 1998).

Diante do avanço e do domínio do conhecimento científico a respeito do padrão da emergência da onda folicular, que ocorre a cada 5 a 7 dias em pequenos ruminantes, surgiu a possibilidade de se reduzir o período de exposição das fêmeas aos progestágenos, de 9 a 12 dias para 5 a 7 dias (RUBIANES MENCHACA, 2003). Adicionalmente, protocolos com 12 dias de permanência do dispositivo geram um excessivo período de crescimento do folículo e envelhecimento do oócito e embora apresentem altas taxas de indução de estro, resultam em fertilidade diminuída em comparação a protocolos de curta duração (VIÑALES et al., 2001).

O encurtamento do tempo de permanência dos dispositivos pode ainda facilitar o manejo e minimizar as descargas vaginais e infecções. Esses protocolos têm apresentado resultados semelhantes aos protocolos de duração média (9 dias) e longa (12 dias; NASCIMENTO et al., 2008) em cabras, e superiores aos protocolos de longa duração em ovelhas (12 dias) conforme Viñales et al. (2001). Um protocolo curto de 6 dias foi utilizado com resultados de 95% de apresentação de estro e ovulação em fêmeas caprinas (SOUZA et al., 2011).

Há no mercado: esponjas para uso intravaginal (45 mg acetato de fluoregestona – FGA; ou 50 a 60 mg de acetato de medroxiprogesterona – MAP); dispositivos de liberação lenta de progesterona natural (*Controlled Internal Drug Release* – CIDR) e implantes auriculares (ESPESCHIT, 1998). Maiores concentrações de progesterona plasmáticas foram detectadas em cabras que receberam CIDR quando comparadas às que receberam esponjas intravaginais. Essa diferença pode ter sido ocasionada pelo acréscimo na concentração de progesterona provocado pela liberação do CIDR, pois esse produto, ao contrário das esponjas, apresenta progesterona natural, detectável ao radioimunoensaio (MAFFILI et al., 2005). Todavia, a eficiência na sincronização e a taxa de fertilidade de animais tratados com CIDR foram semelhantes aos tratamentos com MAP e FGA (ROMANO, 2004). Ressalta-se que já foi demonstrado ser possível a reutilização de CIDR autoclavados, promovendo taxas similares de apresentação de estro e gestação em caprinos. Isso proporciona risco mínimo do ponto de vista sanitário ao rebanho, podendo ser amplamente recomendado a produtores de caprinos leiteiros para minimizar os custos (SOUZA et al., 2011).

### 3.1.3. Gonadotrofinas

Quando se suprime o tratamento com progestágenos em animais cíclicos, a hipófise incrementa a liberação de gonadotrofinas, o que estimula o crescimento folicular final e subsequente ovulação (GONZÁLEZ et al., 2008). Entretanto, o aparecimento do estro e a ovulação podem ocorrer em menor número (RODRIGUES et al., 2004) e de forma dispersa.

Animais em anestro estacional apresentam o eixo hipotalâmico hipofisário gonadal bloqueado e não há secreção apropriada de gonadotrofinas. Nesses animais, mesmo com o estímulo da supressão do tratamento, são evidenciados baixos índices de indução de estro e prenhez (DIAS et al., 2001). Assim, há a necessidade de se administrar gonadotrofina exógena, sendo mais utilizada a gonadotrofina coriônica equina (eCG) (GONZÁLEZ et al., 2008).

Nesses tratamentos, os progestágenos também possuem a função de sensibilizar o hipotálamo à ação dos estrógenos para que haja manifes-

tação do comportamento de estro (GONZÁLEZ et al., 2008). A eCG, por possuir a atividade predominante de FSH (hormônio folículo estimulante) e também de LH (hormônio luteinizante), ativa os ovários, promovendo o desenvolvimento dos folículos (ESPESCHIT, 1986), podendo encurtar o intervalo do aparecimento do estro, a sua duração e aumentar a taxa ovulatória (FREITAS; RUBIANES, 2004).

As dosagens de eCG utilizadas em climas temperados, tanto para cabras quanto para ovelhas, são de 400 a 700 UI (ESPESCHIT, 1998; RODRIGUES et al., 2004). Porém, doses maiores ou iguais a 400 UI de eCG em condições brasileiras, podem resultar em estimulação excessiva dos ovários e induzir múltiplas ovulações, gerando um excesso de crias que leva a mortalidade embrionária e fetal (ESPESCHIT, 1986). De modo geral, os protocolos para ovinos e caprinos no Brasil utilizam doses de 200 a 300 UI de eCG (ESPESCHIT, 1998).

Em resumo, a administração de eCG, 24 a 48 horas antes, ou no momento da remoção da fonte de progesterona ou progestágeno estimula o crescimento folicular. No mesmo momento, a aplicação de um análogo à prostaglandina causa luteólise em fêmeas que apresentam corpos lúteos funcionais ao final do tratamento. Isso permite, finalmente, o retorno do eixo hipotálamo hipófise gonadotrófico, reassumindo os eventos endócrinos que induzem o estro e ovulação.

A eficiência na indução e sincronização do estro e ovulação em ovinos e caprinos depende de vários fatores, incluindo período de exposição aos progestágenos, dose e momento da aplicação de eCG e  $\text{PGF}_2\alpha$ , estação do ano, entre outros (FONSECA, 2005).

A taxa de fertilidade também pode variar conforme o aparecimento do estro após a remoção da fonte de progesterona ou progestágeno. Alguns autores relatam que o atraso no aparecimento do estro pode estar relacionado com a presença de anticorpos anti-eCG, que possuem ação biológica de inibir a atividade estimulatória da gonadotrofina administrada, levando a um atraso ou ausência da ovulação, observado em cabras que receberam repetidas administrações de eCG (BARIL et al., 1996). Esse

fenômeno parece ser muito mais marcante na cabra do que na ovelha (FREITAS; RUBIANES, 2004). Em alguns animais tratados com eCG pela primeira vez, uma grande variação no tempo de início do estro também foi observada (BARIL et al., 1996), sugerindo que outros fatores, além da presença de anticorpos anti-eCG, podem estar relacionados com a resposta aos tratamentos de sincronização (FREITAS et al., 1997).

Nesse contexto, surgiu a necessidade de se pesquisar alternativas para o uso da eCG. A gonadotrofina coriônica humana (hCG), na dose de 250 UI, se mostrou eficiente na indução do estro em cabras (FONSECA et al., 2005b).

### 3.2. Efeito macho

Apesar de a atividade reprodutiva nos mamíferos ser dependente de fatores hormonais, que por sua vez dependem do ambiente físico, em vários casos o ambiente social pode exercer alguma ação moduladora (VÉLIZ et al., 2002). Nesse contexto, a indução e a sincronização do estro e, conseqüentemente, da ovulação em fêmeas podem ser realizadas pelo contato com o macho após um período relativamente longo de separação, método denominado efeito macho (OTT et al., 1980).

O efeito macho foi primeiramente reportado há 60 anos em ovinos, sendo denominado “efeito carneiro” (DELGADILLO et al., 2009). Nos caprinos, esse fenômeno foi descoberto mais tarde. Recentemente o número de artigos científicos publicados a respeito do efeito macho (carneiro ou bode) tem ressurgido, o que provavelmente foi provocado pelo potencial desse método de controle reprodutivo em ser um fenômeno “*clean, green and ethical*”, ou seja, “limpo, verde e ético” (DELGADILLO et al., 2009). Em termos de produção caprina e ovina está associado à adoção de práticas que minimizem ou que evitem completamente a utilização de tratamentos químicos e hormonais e que não comprometam o bem estar animal (MARTIN et al., 2004). Além disso, outro fator que torna esse método vantajoso seria o custo reduzido de sua aplicação (MELLADO; HERNÁNDEZ, 1996; SAMPAIO, 2008).

O principal fator para o sucesso da indução e sincronização do estro é a intensidade da estimulação do macho (MELLADO; HERNÁNDEZ, 1996; VÉLIZ et al., 2002), ou seja, a intensidade na qual se manifestam os comportamentos de cortejo. A libido, responsável por essa manifestação, pode afetar tanto a habilidade em detectar o estro, quanto interferir na sua ocorrência (SHELTON, 1978).

A administração de andrógenos às fêmeas e aos machos castrados faz com que esses animais também manifestem comportamentos sexuais semelhantes aos machos inteiros sexualmente ativos, sendo uma alternativa para indução do estro em pequenos ruminantes (MELLADO; HERNÁNDEZ, 1996; NASCIMENTO et al., 2008).

Além da intensidade da manifestação de comportamentos sexuais, para que o efeito macho seja eficiente pode ser necessário que o macho permaneça separado das fêmeas por um período determinado, de modo que a sua reintrodução promova estímulos à ovulação (GONZÁLEZ et al., 2008). O período comumente utilizado de separação é de 60 dias e uma melhor eficiência é encontrada quando os machos são reintroduzidos no período de transição (FONSECA, 2005). Porém, alguns autores relatam que esse período de separação pode se tornar dispensável quando o procedimento é feito com machos novos, que nunca tiveram contato prévio com as fêmeas do rebanho (DELGADILLO et al., 2009).

Um alto percentual de cabras em estro é observado em torno de 72 horas após a introdução de um macho sexualmente ativo no rebanho (VÉLIZ et al., 2002). Isso ocorre pelo aumento do LH plasmático nas fêmeas culminando em um pico pré-ovulatório e ovulação. Foi recentemente demonstrado que fêmeas caprinas recebendo melatonina associado ao efeito macho apresentaram 92% de gestação, em comparação a apenas 60% quando receberam apenas melatonina para sincronizar o estro (CELI et al., 2013). Porém, a primeira ovulação pode ainda não ser acompanhada de manifestação do estro (DELGADILLO et al., 2006), ou resulta em ciclo de curta duração como consequência da regressão pre-

matura do CL (VÉLIZ et al., 2002). Por essas razões, recomenda-se que os animais sejam acasalados ou inseminados a partir da manifestação do segundo estro (TRALDI et al., 2007a).

Ainda um pouco menos conhecido que o efeito macho, é o efeito fêmea. Fêmeas podem ter um efeito estimulante sobre outras fêmeas em muitas espécies (POINDRON et al., 1980). Estudos demonstraram o “efeito fêmea-fêmea”, ou seja, que o estro de fêmeas pode influenciar na ovulação de outras, em ovelhas (ZARCO et al., 1995) e cabras (RESTALL et al., 1995). A primeira ovulação não é sincronizada, a menos que a fêmea esteja em condições de estro induzido.

### **3.3. Fotoperíodo artificial**

O controle da atividade reprodutiva por meio da introdução de luz artificial tem sido realizado para os dois sexos das espécies ovina e caprina e se baseia no princípio da mudança de dias longos para dias curtos (CHEMINEAU et al., 1988).

As fêmeas são submetidas a tratamentos de dias longos (16 horas de luz e 8 horas de escuro) por 60 dias com o auxílio de lâmpadas fluorescentes instaladas no galpão, que seriam ativadas diariamente por meio de um “timer” cerca de 3 horas antes do alvorecer e automaticamente desligadas 3 horas após o entardecer, alongando o fotoperíodo natural e permitindo uma luminosidade de 200 lux dentro do galpão. Vale ressaltar que a instalação de luzes, incandescentes ou fluorescentes, deve ser feita de forma criteriosa, visto que a luminosidade tal em decorrência do número de luxes que culminará no estímulo necessário para a indução do estro. A adaptação de um galpão a fim de se trabalhar com indução por luz, além de estimativas do consumo de energia elétrica da propriedade são descritos por Cordeiro (1991). Terminado o tratamento com dias longos, que bloqueia a atividade ovulatória, os animais passam a fazer uma interpretação de “dias curtos”, uma vez que a luminosidade ambiente é inferior àquela imposta durante o tratamento fotoluminoso. Dessa forma, a melatonina secretada durante a noite, no período de menor luminosidade ambiente, é capaz de desencadear a atividade sexual de machos e fêmeas em plena contraestação fisiológica da espécie caprina (TRALDI et al., 2007a).

No Brasil, o tratamento fotoluminoso vem sendo usado por técnicos e criadores desde 1991 (CORDEIRO, 1991). Um exemplo seria a introdução da luz no outono e inverno, que associado ao efeito macho no início da primavera, permite que cerca de 70% a 80% das fêmeas tratadas apresentem estros férteis durante a primavera e parições durante o outono do ano subsequente (TRALDI et al., 2007a).

O aparecimento do estro ocorre cerca de 60 dias após o final do programa de iluminação artificial e não promove sincronia entre as fêmeas em estro (FONSECA, 2006a). Por isso, é desejável a associação com outras biotecnologias que promovam essa sincronia, como por exemplo, o efeito macho, ou a administração de prostaglandina, que é eficiente na sincronização do estro quando os animais estão ciclando.

Como vantagens da utilização do fotoperíodo artificial, citam-se: a possibilidade de repetição do método em um mesmo animal sem diminuição da fertilidade; ausência de sequelas e efeitos colaterais; prolificidade normal; além da possibilidade de tornar os machos sexualmente ativos durante a contra estação, quando não há possibilidade da IA ser adotada na propriedade (ESPESCHIT, 1998).

O fotoperíodo artificial tem como entrave a impossibilidade de ser aplicado em rebanhos de criação extensiva (DEVESON et al., 1992), e talvez este seja o motivo deste método ser pouco utilizado na indução do estro em ovinos.

### **3.4. Melatonina**

Nos mamíferos, todas as alterações fotoperiódicas são percebidas exclusivamente pelos olhos (retina) e em seguida são transmitidas por meio de sinapses para a glândula pineal (CHEMINEAU et al., 2008). Essa glândula, durante o período noturno, sintetiza melatonina a partir do triptofano e da serotonina (TRALDI et al., 2007a). Acredita-se que esta alcance o cérebro pelo líquido cefalorraquidiano e os tecidos periféricos pela circulação geral (CHEMINEAU et al., 2008).

Como a melatonina é produzida somente no período noturno, sua secreção varia com a duração do dia e da noite, sendo que a duração dessa secreção é processada para regular a atividade do eixo hipotalâmico hipofisário gonadal. A principal influência da melatonina no eixo reprodutivo é exercida na secreção pulsátil de Hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRH) e este efeito pode ser suficiente para explicar a regulação da sazonalidade. O GnRH estimula a secreção de gonadotrofinas na hipófise que são fundamentais para o desenvolvimento dos folículos, ovulação e formação do corpo lúteo nos ovários (GONZÁLEZ et al., 2008).

Com a descoberta da relação hipotálamo-pineal, tornou-se possível “diminuir o comprimento do dia” farmacologicamente, por meio da aplicação de melatonina exógena (CHEMINEAU et al., 1988). Os primeiros estudos realizados com ovinos ocorreram na década de 80, e a partir daí diversas vias de aplicação foram testadas, como por exemplo: injeções intramusculares, adição na alimentação, implantes intraruminais (*bolus*), doses orais, implantes vaginais, infusões e implantes subcutâneos (LOUREIRO, 2003). Entre essas, os implantes subcutâneos de liberação lenta se mostraram eficientes e práticos na utilização a campo.

Os implantes contêm 18 mg de melatonina revestido de uma fina camada de polímeros e normalmente são mantidos nos animais por 30 a 40 dias antes do acasalamento (ESPESCHIT, 1998; LOUREIRO, 2003). O tratamento com melatonina permite antecipar a atividade cíclica de fêmeas ovinas (LOUREIRO, 2003) e caprinas (TRALDI et al., 2007a). A utilização de uma única injeção subcutânea de 20 ou 40 mg de melatonina, dissolvida em solução de vitamina A, D e E, mostrou ser eficiente ao antecipar a atividade cíclica de cabras em 1 a 2 meses (KUMAR; PUROHIT, 2009).

Para melhorar a eficiência, a melatonina pode ser associada ao fotoperíodo artificial (CHEMINEAU et al., 1988), e ao efeito macho (CELLI et al., 2013; LOUREIRO, 2003). Contudo, apesar de ser uma técnica eficiente, a melatonina não está disponível comercialmente no Brasil.

### 3.5. Pontos essenciais para a inseminação artificial em caprinos e ovinos

A manipulação do ciclo estral em caprinos e ovinos deve estar fundamentada no conhecimento do comportamento reprodutivo desses animais nas condições onde vivem e produzem. Há uma série de possibilidades para se controlar ou manejar a reprodução. As técnicas variam das mais simples às mais complexas, das mais sincrônicas às menos sincrônicas, das mais onerosas às menos onerosas. Todavia, suas eficiências devem ser medidas em função do objetivo em questão. Portanto, orientações fisiológicas, técnicas e econômicas devem ser conjuntamente consideradas antes da escolha por este ou aquele método. Lembre-se que nenhuma boa tecnologia suporta uma má implantação e condução. Antes de iniciar qualquer programa de controle reprodutivo, manipulação de utensílios ou hormônios é preciso ficar atento a 10 passos básicos:

*1. Higiene pessoal:* esteja com unhas devidamente aparadas e mão limpas e higienizadas, livre de anéis ou relógios e SEMPRE com luvas. Unhas protuberantes, anéis e relógios podem reter sujidades, machucar os animais ou perfurar as luvas. Isso estará impondo a riscos desnecessários tanto aos animais quando ao homem;

*2. Manipulação de hormônios femininos:* os hormônios utilizados podem ter efeitos em humanos. Progesterona e progestágenos, contidos nos implantes vaginais ou auriculares, são feminilizantes e podem induzir ginecomastia (crescimento das mamas). Fique atento ao uso indispensável de luvas no tamanho adequado às dimensões das mãos. Elas devem estar íntegras (sem furos), limpas e ser descartáveis. Pode-se lavar as mãos enluvadas com água e sabão de um animal para o outro. Aliás, isso é recomendável, mas ao menor sinal de risco de qualquer natureza, SUBSTITUA-AS;

*3. Prostaglandinas:* recomenda-se extremo cuidado na administração desses hormônios. A autoinoculação via seringas, ou mesmo gotas em contato com a pele e mucosas humanas implicam em absorção imediata. Cólicas em mulheres já foram reportadas em função do manuseio inadequado. Trabalhe em SILÊNCIO e com concentração máxima;

*4. Utensílios não descartáveis (plástico ou metal):* são os aplicadores de implantes vaginais ou subcutâneos (auriculares), além de espéculos vaginais e pinças. Sempre tenha mais que um exemplar. Entre um animal

e outro, lave-os com sabão e água corrente atentando para a remoção completa de sujidades e muco vaginal. Coloque-os em seguida em água fervente, onde deverão permanecer por pelo menos um minuto. Retire-os e passe-os para outro recipiente contendo água filtrada adicionada de 2% (20 mL para cada litro de água) de uma solução higienizante (Kilol<sup>®</sup>, Amônio quaternário<sup>®</sup>). Essa solução garantirá o resfriamento do aplicador. Esse procedimento pode implicar em alguma perda de tempo (minutos), mas inviabilizará a transmissão de doenças entre os animais. Em hipótese alguma abra mão disso. Aplicadores de implantes subcutâneos devem ter atenção redobrada. Nesse caso, o risco de transmissão de enfermidades é substancialmente maior. Esses implantes e aplicadores não foram feitos para cabras e ovelhas. EVITE-OS;

*5. Introdução do dispositivo vaginal:* cabritas e borregas têm diâmetro vaginal inferiores às cabras e ovelhas. Elas podem ter ainda o hímen que necessita ser rompido anteriormente (pelo menos sete dias). Essa ruptura deve ser preferencialmente feita com espéculos vaginais modelo Colin números 0 e 1. Limpe a vulva com papel toalha a seco, não lave com água. Lubrifique a ponta espéculo com gel e introduza-o lentamente e de forma a evitar seu contato com superfícies ósseas, o que causa desconforto. Abra lentamente o espéculo até se certificar que o hímen tenha sido rompido. O sangramento é comum e se efetuado no momento da aplicação do dispositivo vaginal, pode elevar o risco de aderências. Os aplicadores devem ser introduzidos de forma a alcançar a parte anterior da vagina, diminuindo a possibilidade de queda. Uma pequena porção de gel deve ser colocada na ponta do aplicador para facilitar sua introdução. Seja metuculoso e muito GENTIL durante todo o procedimento;

*6. Reutilização de implantes:* isso pode ser feito para implantes siliconizados intravaginais contendo progesterona, mas esses dispositivos devem passar por minuciosa lavagem, secagem, embalagem individual e indispensavelmente AUTOCLAVADOS. Caso não seja possível, não reutilize.

*7. Uso de antibióticos:* durante o período de permanência do dispositivo na vagina, um ambiente favorável ao desenvolvimento de microrganismos é criado. O uso de substâncias antibióticas aplicadas no dispositivo ou sobre ele é INDICADO (0,25 mL de oxitetraciclina injetável ou 1 a 2 segundos de oxitetraciclina *spray*);

8. *Seringas e agulhas*: sempre passe algodão embebido em álcool 70% ou álcool iodado no local da aplicação de medicamentos. Faça movimento no sentido contrário dos pelos, garantindo que a pele recebeu o produto. Isso pode evitar a formação de abscessos desenvolvidos a partir de agentes carregados pela agulha. Para prostaglandinas, administradas em volumes de 0,3 a 1 mL, prefira seringas de 1 mL tipo insulina e aquelas em que o êmbolo de borracha tenha uma projeção. Isso garantirá a correta aplicação do produto e reduzirá o resíduo que fica na parte frontal da seringa. Retire a agulha imediatamente após a aplicação, substituindo-a por uma nova, o que permite o uso continuado da seringa. Caso demore mais de 10 segundos para trocar a agulha, opte por descartar a seringa, ela poderá ter sido contaminada de forma retrógrada, do conteúdo da agulha para a seringa. NUNCA use uma agulha para mais de um animal. Cada agulha custa em média R\$ 0,10, irrisório considerando o potencial prejuízo sanitário que pode causar;

9. *Período, horários e dosagens*: certifique-se da duração exata do protocolo. Seja rígido com horários de administrações hormonais e na quantidade de produto administrado. Não abra mão de toda a disciplina acima durante todos os procedimentos. Disso dependerá o SUCESSO do seu programa;

10. *Não sobrecarregue os machos*: bodes e carneiros têm uma capacidade limitada de número de acasalamentos por dia. Nunca sincronize mais que 8 fêmeas por macho. Lembre-se que haverá uma grande concentração de fêmeas (60% a 70%) em cio, 24 a 48 horas após a retirada de dispositivo ou aplicação de prostaglandina. Excesso de fêmeas em cio pode superar a capacidade de cópula do macho e fêmeas em cio não cobertas. A primeira cobertura deve ser feita no momento da primeira identificação de cio e 24 horas após, se ainda em cio. Utilize como prioridade de acasalamento: (1) fêmeas pela primeira vez em cio, (2) fêmeas que foram acasaladas há mais tempo e (3) fêmeas que foram acasaladas há menos tempo. A janela ovulatória será coberta sempre com sêmen capacitado e disponível para a fertilização, além de permitir que todas as fêmeas recebam pelo menos uma monta. No caso de induções sucessivas de lotes de fêmeas, utilizar um intervalo de quatro dias entre um procedimento inicial de um lote para outro. Isso garante uma boa recuperação

dos machos entre os lotes de acasalamento. Conhecer a capacidade de acasalamento dos machos pode ser muito importante na determinação do número de fêmeas que serão utilizadas a cada programa. SEMPRE tenha um segundo macho na opção para cada acasalamento.

### **3.6. Implicações e perspectivas da indução e sincronização do estro e da ovulação em pequenos ruminantes**

A manipulação do ciclo estral em caprinos e ovinos deve estar fundamentada no conhecimento do comportamento reprodutivo desses animais nas condições onde vivem e produzem. Há uma série de possibilidades para se controlar ou manejar a reprodução. As técnicas variam das mais simples às mais complexas, das mais sincrônicas às menos sincrônicas, das mais onerosas às menos onerosas. Todavia, suas eficiências devem ser medidas em função do objetivo em questão. Portanto, orientações fisiológicas, técnicas e econômicas devem ser conjuntamente consideradas antes da escolha por este ou aquele método. Lembre-se que nenhuma boa tecnologia suporta uma má implantação e condução.

## **4. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL**

A inseminação artificial constitui importante, talvez a mais eficiente, de baixo custo e segura biotécnica reprodutiva para o progresso genético em ruminantes domésticos. Sua viabilidade, todavia, é limitada pela deficiência na comprovação da genética a ser veiculada via sêmen, pelo sistema de produção onde é aplicada e pela eficiência técnica com que é desenvolvida. Quanto à genética, frequentemente se enfoca o fator raça e ainda animais sem qualquer comprovação de potencial produtivo, cujas cifras de aquisição e uso podem inviabilizar sua implantação. Quanto ao sistema de produção, pouco se atenta que ele é o grande limitador da introdução de qualquer genética, pois pode não prover adequadamente as condições para que as progênes expresse seu potencial produtivo. Quanto à eficiência técnica da inseminação, o Brasil repete receituários de outros países, cujos procedimentos executados da mesma forma de origem naufragam em índices que, mais do que não potencializar, levam ao descrédito dessa primeira linha de biotecnologias de assistência reprodutiva.

## 4.1. Técnicas de inseminação artificial

A inseminação artificial compreende o conjunto de atividades, desde a seleção e preparo das fêmeas e reprodutores, escolha do tipo de sêmen (fresco, refrigerado ou congelado/descongelado) e técnica de sua aplicação conforme a abordagem e local de aplicação do sêmen no aparelho reprodutor feminino, até o diagnóstico de prenhez (OLIVEIRA; FONSECA, 2013).

A inseminação artificial representa a primeira linha de biotecnologias da reprodução, entretanto, seu uso ainda está restrito aos rebanhos de caprinos leiteiros e rebanhos de elite. Isso ocorre em parte, devido às dificuldades e peculiaridades da técnica e da reprodução de caprinos e ovinos. O pequeno número de reprodutores com sêmen à venda e, em sua grande maioria, disponibilidade de sêmen de animais não submetidos a testes apropriados que comprovem sua aptidão (teste de progênie) agravam o quadro.

A inseminação artificial, quando efetuada com base na observação de estro, estará inevitavelmente associada ao uso de rufiões. Entretanto, a exemplo de bovinos, pode ser realizada em tempo fixo desde que também associada à sincronização/indução de estro conforme descrito por Machado e Simplício (2001) e Fonseca (2006a). No entanto, parte do conhecimento sobre os protocolos em uso no Brasil, não foi desenvolvido no país, carecendo portanto, de validação, adequação ou mesmo de novos estudos compatíveis com as condições brasileiras. Isso inclui a interação da raça com o bioma onde é explorada, envolvendo todo o contexto da técnica, desde a preparação das fêmeas até a deposição do sêmen no sistema genital feminino (FONSECA; SIMPLÍCIO, 2008).

A inseminação artificial pode ser realizada de variadas formas que incluem desde a colocação do sêmen na vagina, semelhante ao acasalamento natural, à deposição do sêmen no corno uterino. De acordo com o local de deposição do sêmen, a inseminação pode ser vaginal, cervical superficial, intracervical, intrauterina efetuada no corpo do útero ou intrauterina efetuada no corno uterino. Quanto mais próxima do local de fertilização (ampola da tuba uterina) for a deposição do sêmen, maior será a taxa de gestação resultante.

As técnicas de inseminação artificial em pequenos ruminantes são sumarizadas a seguir:

*1- Vaginal:* feita com auxílio de vaginoscópio; recomenda-se o uso de sêmen fresco com baixas diluições ( $500 \times 10^6$  espermatozóides por dose); não é indicada para sêmen congelado; não se observa o local de deposição do sêmen; baixa exigência em especialidade do técnico, em contenção e tempo de manipulação; baixos índices de prenhez em comparação às seguintes.

*2- Inseminação pericervical:* localização do orifício caudal da cérvix, utilizando-se espéculo e luz; deposição de sêmen mais profunda possível (1 - 2 cm), sem a necessidade de transpor outros anéis cervicais; recomenda-se uso de sêmen fresco, com maior diluição (200 a  $300 \times 10^6$  espermatozóides por dose); não é indicada para sêmen congelado; fertilidade superior à vaginal.

*3- Inseminação cervical profunda ou intrauterina pela via cervical:* localização do orifício caudal da cérvix (espéculo/luz); uso de instrumentos facilitadores (espéculos, aplicadores, pinças, etc); deposição de sêmen mais profunda possível (2 - 4 cm), com transposição de anéis cervicais; requer técnicos bem treinados; em cabras 60% e em ovelhas 6% de sucesso (deposição); pode-se utilizar sêmen fresco com alta diluição ( $100 - 150 \times 10^6$  espermatozóides por dose), resfriado ou congelado/descongelado ( $100 \times 10^6$  espermatozóides por dose); requer cuidado maior para não perfurar a cérvix e o corpo do útero; fertilidade diretamente proporcional ao grau de penetração (passagem pelo canal cervical).

*4- Inseminação intrauterina por laparoscopia:* requer o uso de instrumentais de custo elevado; conduzida exclusivamente por veterinários; deposição de sêmen nos cornos uterinos; uso de instrumentos facilitadores (espéculos, aplicadores, pinças, etc.); requer anestesia e/ou sedação, tricotomia e em alguns casos, antibioticoterapia; pode ser utilizado sêmen fresco, resfriado ou congelado/descongelado ( $100 \times 10^6$  espermatozóides por dose); risco de perfurações gastrintestinais, de bexiga (para tanto, indica-se estimular reflexo de micção antes da inseminação) e de vasos sanguíneos; fertilidade superior a todas as outras técnicas (GONZÁLEZ, 2008).

## 4.2. Fatores que interferem na eficiência da inseminação artificial

### 4.2.1. Local de deposição do sêmen

A inseminação artificial pela via transcervical pode ter sua eficiência relacionada em função do local de deposição do sêmen referente ao número de anéis ultrapassados ou grau de penetração em centímetros. Ressalta-se que a penetração do aplicador depende da técnica utilizada. Desta forma, ultrapassar anéis cervicais pode não ser o objetivo em questão.

Quanto ao local de deposição de sêmen, a eficiência da técnica pode ser classificada como apresentada na Tabela 1.

**Tabela 1.** Medidas de eficiência da inseminação artificial pela via cervical em cabras e ovelhas relacionadas ao local de deposição do sêmen.

Score	Atribuição	Profundidade		
		Cm	Anéis	Local de deposição
0	Nula	0	0	Vaginal
1	Muito baixa	1-2	1	Cervical superficial
2	Baixa	2-3	2	Cervical inicial
3	Boa	3-4	3	Cervical média
4	Muito boa	4-5	4	Cervical profunda
5	Excelente	>5	5	Uterina

Fonte: Fonseca et al. (2011a).

Obviamente, esta classificação não é absoluta e deve ser flexível, uma vez que o comprimento e o número de anéis podem variar com a espécie, raça e ordem de partos. Por exemplo, nulíparas apresentam cérvix com comprimento inferior à de cérvix de pluríparas (NAQVI et al., 2005). Assim, o inseminador deve estar atento e atribuir o escore 5 sempre que a deposição de sêmen for intrauterina, mesmo que tenha ultrapassado apenas três anéis. Após a perda de resistência, a continuidade de introdução do aplicador pode resultar em perfuração uterina ou deposição intracornual de sêmen; ambos casos devem ser evitados. A anotação desses dados é de extrema importância. Eles podem gerar informações sobre o histórico da eficiência do inseminador, bem como ser indicador de falhas ou êxito da inseminação artificial.

A seguir são apresentados dados de eficiência da inseminação artificial em cabras e ovelhas. Características anatômicas das fêmeas devem ser consideradas (Tabela 2).

**Tabela 2.** Média dos valores anatômicos da cérvix da cabra e da ovelha e percentual de sucesso da inseminação artificial cervical em cabras e ovelhas.

Variável/fêmea	Cabra	Ovelha
Comprimento (cm)	3,15	3,53
Número de anéis	4,00	5,00
Penetração do aplicador (cm)	2,40	1,90
Penetração do aplicador (%)	76,00	54,00
Penetração completa do aplicador (%) <sup>1</sup>	60,00	6,00

<sup>1</sup>Das cabras (76%) e ovelhas (54%) nas quais se consegue algum grau de penetração, em 60,00 e 6,00% (respectivamente), o aplicador alcança o útero.

Fonte: Adaptado de Santoyo e Trejo (1991).

Ressalta-se que a meta da inseminação artificial segundo o local de deposição do sêmen deve ser o corpo do útero, caracterizando a inseminação intrauterina, mas, em geral, em mais de 50,0% das tentativas, o sêmen é depositado antes de alcançar o útero (Tabela 3).

**Tabela 3.** Porcentagem de partos em função da profundidade da inseminação artificial transcervical em cabras mestiças da raça Angorá.

Profundidade	Sêmen fresco diluído	Sêmen congelado/descongelado	Total
Até 1,0 cm	42,00 (37/88)	27,00 (17/63)	35,80 (54/151)
1,1 a 3,0 cm	58,30 (74/127)	45,90 (39/85)	53,30 (113/212)
Útero	69,10 (56/81)	68,60 (70/102)	68,90 (126/183)
Geral	56,40 (167/296)	50,40 (126/250)	53,70 (293/546)

(n/N) Número de fêmeas gestantes/fêmeas inseminadas.

Fonte: Adaptado de Evans e Maxwell (1987).

Na avaliação dos dados, pode-se concluir que 66,50% foram cervicais (363/546) e resultaram em 46,00% (167/363) de gestação e que 33,50% foram uterinas (183/546) e resultaram em 68,90% de gestação (126/183).

Da mesma forma, Andrade (1996) e Frazão Sobrinho et al. (2005) reportaram, respectivamente, 17 e 13 inseminações artificiais cervicais superficiais, 20 e 17 cervicais profundas e 29 e 10 uterinas com 29,00 e 23,10%; 45,00 e 23,50% e 58,00 e 70,00% de gestação, respectivamente. Apenas 44,00 e 25,00% (29/66 e 10/40) das inseminações foram intrauterinas, reiterando a dificuldade da técnica e chamando a

atenção para a importância da qualificação técnica e experiência do profissional para depositar o sêmen no útero, situação que compromete fortemente os resultados.

As inseminações em que o aplicador penetra além dos três centímetros de profundidade provavelmente alcançam o corpo do útero. Isso significa que, a parte do aplicador de sêmen que transpõe a cérvix não necessita ser superior a cinco centímetros. O aplicador de sêmen caprino mede 30 cm e não dispõe de nenhum sistema de travamento que limite sua penetração ao alcançar o corpo do útero. Assim, a inabilidade na inseminação associada à técnica tradicional, onde o animal fica em apoio bipedal anterior, podem favorecer a perfuração do útero ou, mais comumente, a inseminação intracornual, que também não é desejada, uma vez que não se pode prever em qual ovário, direito ou esquerdo, ocorrerá a ovulação. Isso é importante mesmo se tratando de espécies que frequentemente apresentam taxa de ovulação superior a uma ovulação, as quais podem acontecer em ambos os ovários, pois alguns animais podem ter apenas uma ovulação (FONSECA et al., 2010). Em ovinos, já existem aplicadores com tamanhos reduzidos (12 cm) e boa penetração da cérvix, entretanto, há a necessidade de pinçamento e/ou tracionamento da cérvix, cujas técnicas ainda são obstáculos à obtenção de resultados satisfatórios quando do uso de sêmen congelado ou fresco/diluído com uma dose inseminante de  $100 \times 10^6$  espermatozoides em palheta de 0,25 mL. Esse tipo de manipulação da cérvix pode alterar o perfil de liberação de oxitocina e contratilidade uterina após a inseminação, o que pode comprometer a fertilidade dos animais (HOUDEAU et al., 2002).

#### **4.2.2. Tempo de execução e número de inseminações**

O tempo de execução e a posição na qual o animal é contido podem ser indicadores de sucesso e eficiência da técnica e do bem-estar animal durante o processo. A seguir propomos escores para o tempo de execução (Tabela 4).

O tempo de execução neste caso é contado a partir da contenção do animal. Obviamente, a velocidade de deposição tem limites que devem ser cuidadosamente observados. Inseminações executadas de forma muito rápida devem observar o grau de facilidade de penetração do aplicador.

Um descuido nesse aspecto pode possibilitar perfuração cervical, algo que deve ser evitado.

**Tabela 4.** Medidas de eficiência da inseminação artificial pela via cervical em cabras e ovelhas relacionadas à duração do procedimento.

Escore	Duração em minutos	Atribuição
0	> 10	Péssima
1	5-10	Ruim
2	3-5	Regular
3	2-3	Média
4	1-2	Boa
5	< 1	Excelente

Fonte: Fonseca et al. (2011a).

Andrade (1996) descreveu que 43,20% dos animais foram inseminados com menos de cinco minutos (apoio bipedal anterior), resultando em 58% de gestação e o restante (56,8%) entre cinco e 10 minutos, resultando em 48%. Em cabras com estro induzido e inseminadas em estação (apoio quadrupedal, com pinçamento, mas sem tração cervical) e em tempo fixo às 54 horas após remoção da esponja, Fonseca et al. (2007) reportaram que o útero foi alcançado em 100,00% das pluríparas com uma duração de 21 segundos e em 68,75% das nulíparas com uma duração de 44 segundos. A taxa de gestação resultante foi de 62,50%.

O número de inseminações também deve ser considerado. Tanto em cabras (MACHADO; SIMPLÍCIO, 2001), quanto em ovelhas (GORDON, 1997), não há efeito adicional, em termos de taxa de gestação, quando uma segunda inseminação é realizada 12 horas após a primeira. Isso, inclusive, pode onerar a técnica, uma vez que maior quantidade de sêmen estaria sendo utilizada.

Assim, investigações que incluem maior facilidade de contenção e bem-estar animal e que propiciem maior eficiência na deposição de sêmen no útero podem ser importantes parâmetros a serem observados para a expansão e consolidação da técnica.

#### 4.2.3. Tipo de sêmen, muco e horário da inseminação

Basicamente, uma vez coletado, o sêmen pode ser utilizado: a fresco;

fresco diluído; resfriado diluído e congelado/descongelado. O sêmen fresco requer um período maior de tempo no sistema genital para se tornar apto a fecundar em relação ao sêmen congelado/descongelado, isso pela necessidade de realizar o fenômeno conhecido como capacitação espermática. Todavia, o sêmen fresco tem uma maior viabilidade ou longevidade quando comparado ao congelado/descongelado. O sêmen resfriado apresenta condição intermediária entre o dois.

O estro em ovelhas dura de 24 a 36 horas e de 24 a 48 horas nas cabras, sendo que a ovulação ocorre no final do estro em ambas as espécies. Esse parâmetro deve ser considerado em função da forma de apresentação e local de deposição do sêmen e do horário da inseminação. Para uma maior fertilidade, a inseminação deve ser feita de forma a permitir que os espermatozoides estejam aptos a fecundar quando o ovócito for liberado (ovulação) e estiver apto a ser fecundado (FONSECA et al., 2010).

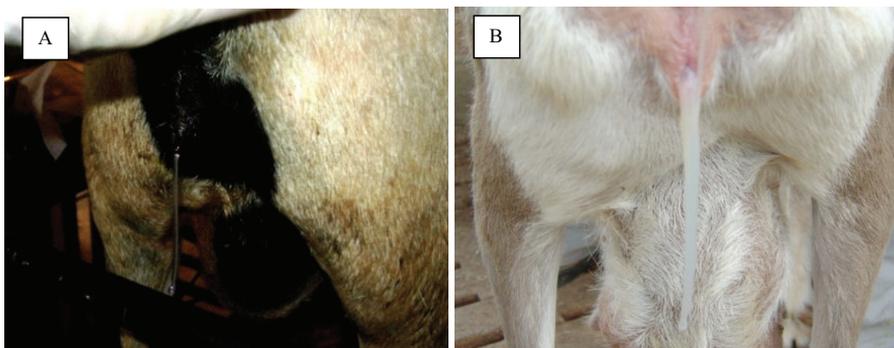
Em ambas as espécies, o tipo de sêmen a ser usado também deve ser considerado em função do momento da inseminação referente ao início do estro. Ovelhas e cabras, em estro, apresentam comportamento semelhante quanto à drenagem de muco através da vagina. Em geral, quanto ao aspecto, o muco é classificado em:

- *Score 0 ou ausente*: muco não observado. A fêmea pode não estar em estro e outros parâmetros devem ser considerados como comportamento e coloração da vagina;
- *Score 1 ou cristalino*: muco límpido e completamente transparente. Animal entre 0 e 6 horas do início do estro;
- *Score 2 ou cristalino/estriado*: muco começa a apresentar sinais de turbidez com finas estrias. Animal entre 6 e 12 horas do início do estro;
- *Score 3 ou estriado*: estrias amareladas e mais espessas são claramente evidenciadas. Animal entre 12 e 18 horas do início do estro;
- *Score 4 ou estriado/caseoso*: estrias amareladas e espessas tomam quase que completamente toda a extensão do muco. Animal entre 18

e 24 horas do início do estro;

- *Escore 5 ou caseoso*: muco corresponde a uma massa de aspecto caseoso, podem ser observadas floculações. Animal acima de 24 horas do início do estro;

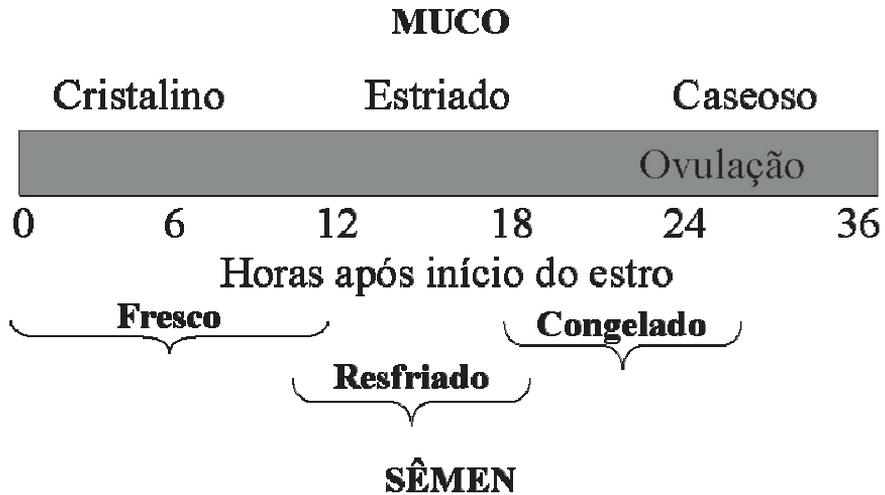
Claramente, a classificação acima é um recurso didático e prático. Os tipos de muco podem variar em função dos horários referentes ao início do estro. Espera-se do inseminador o reconhecimento dos três estádios principais: cristalino, estriado e caseoso (Figura 5). Esse parâmetro deve ser anotado no ato da inseminação e é muito importante para identificação de sucesso e fracasso.



**Figura 5.** Foto de fêmeas no estro com secreção de muco cristalino em ovelha (A) e estriado-caseoso em cabra (B).

Conhecendo-se que a ovulação ocorre no final do estro e que o aspecto do muco informa que estágio do estro a fêmea se encontra, recomenda-se o uso de sêmen fresco para muco 1 e 2, até 12 horas do início do estro e sêmen congelado para muco 3 e 4 entre 18 e 24 horas após o início do estro (FONSECA; SIMPLÍCIO, 2008). Para sêmen resfriado, considerar o muco 3 a partir de 12 horas do início do estro (SIQUEIRA et al., 2009).

Na Figura 6, pode-se observar a relação entre o tipo de muco e o horário ideal de inseminação relativo ao tipo de sêmen utilizado.



**Figura 6.** Variação do tipo de muco do início ao final do estro em cabras e ovelhas e sua relação com a ovulação e o horário ideal para inseminação com sêmen fresco, resfriado ou congelado.  
 Fonte: Adaptado de Fonseca e Simplício (2008).

#### 4.2.4. Aspectos gerais

Existem variações entre as raças quanto aos parâmetros reprodutivos de fêmeas submetidas à indução do estro. Adicionalmente, o comportamento reprodutivo é influenciado pela região do país/bioma onde os animais são explorados (FONSECA et al., 2010). A caracterização da dinâmica ovulatória dos animais desafiados com protocolo para indução de estro é um parâmetro imprescindível para a exequibilidade da técnica em programas iniciais de inseminação. Estes, muitas vezes, demandam o deslocamento de mão de obra especializada e inseminação de um número relativamente grande de animais por unidade de tempo. Adicionalmente, a caracterização da dinâmica da ovulação em animais em estro natural é um importante parâmetro para se definir o momento mais adequado à inseminação. Os dados inerentes ao estro natural ou induzido podem garantir o sucesso da técnica independentemente do sistema de produção em uso e do estágio fisiológico dos animais, isto é, estação reprodutiva ou de anestro (FONSECA et al., 2010).

### 4.3. Pontos essenciais para a inseminação artificial em caprinos e ovinos

A inseminação artificial possibilita a conservação por tempo indeterminado e a difusão de material genético com mínimos riscos sanitários. Ela representa o pilar central dos programas de melhoramento genético, permitindo testes simultâneos e comprovação de características desejadas passadas pelos indivíduos em teste com maior ou menor frequência para uma determinada população. Alguns fatores que podem influenciar a eficiência da inseminação artificial foram sumarizados em 10 passos:

1. *Escore da condição corporal (ECC) das fêmeas*: variando de 1 (muito magra) a 5 (muito gorda); deve estar entre 3 e 4, sem os animais estarem perdendo peso;

2. *Manejo alimentar*: evitar mudanças bruscas na dieta antes e depois da inseminação artificial. Alterações no manejo alimentar devem ser feitas de forma gradual, no mínimo 15 dias antes e 60 dias após a inseminação;

3. *Sanidade*: deve-se utilizar sempre animais saudáveis, livres de doenças crônicas-degenerativas. Vacinações e vermifugações devem ser feitas no mínimo 15 dias antes da sincronização do estro (cio) ou da inseminação artificial e no terço final da gestação;

4. *Sincronização/indução do estro (cio)*: atentar para o rigor nos horários de administração hormonal, programa de luz e efeito macho. Recomenda-se atenção para a caracterização do cio e não inseminar os animais no primeiro estro após o programa de luz ou efeito macho;

5. *Inseminação em tempo fixo (IATF)*: Nessa condição, cerca de 75% dos animais estão em condição ótima para inseminação no tempo pré-determinado (tempo fixo 48 a 55 horas após a retirada do dispositivo vaginal, a depender do protocolo, da raça e tipo de sêmen); alguns animais dão cio antes ou depois do tempo ideal. Assim, considerando 100 fêmeas, das quais 75 (75%) vão estar no momento ideal para a inseminação artificial, e que 60% dessas 75 fêmeas ficarão prenhes, teremos 45 gestações. Essas gestações equivalem a 45 % do número total de animais (100 animais). Lembre-se que, na inseminação artificial, a eficiência é medida por ciclo (cio) e não por estação. Durante uma estação de acasalamento por monta natural, pode-se obter até 80% a 90 % de

animais prenhes. Porém as fêmeas podem apresentar vários cios para alcançarem estes índices;

*6. Execução da técnica:* a palheta deve ser descongelada em água a 35 °C por 30 segundos, sempre ao abrigo da luz solar e cuidadosamente enxugada. O sucesso da inseminação artificial depende ainda da habilidade e rapidez para deposição de sêmen no útero e do manuseio do sêmen e do botijão. Quanto mais rápido e maior o número de inseminações intrauterinas, maior será a taxa de prenhez. A inseminação pela via transcervical ainda é um desafio em ovelhas, sobretudo com sêmen congelado, mas é a opção de escolha em cabras. Inseminações intrauterinas por laparoscopia resultam em índices de concepção iguais ou superiores (60% a 70%) à monta natural, desde que as fêmeas inseminadas estejam em cio e no horário ideal;

*7. Sêmen utilizado:* o sêmen pode ser utilizado a fresco, resfriado ou congelado. Cada um desses tipos exige um horário mais adequado para inseminação. Com relação ao início do cio, inseminações mais precoces podem ser feitas com sêmen fresco, mas nunca com congelado. Inseminações mais tardias, próximas à ovulação, devem ser feitas com sêmen congelado, mas nunca com fresco. O sêmen resfriado ocupa posição intermediária;

*8. Estresse:* causar o mínimo possível de estresse nutricional, sanitário ou do próprio manejo/rotina, durante todo o processo. O local onde será feita a inseminação deve ser de prévio conhecimento do animal e do inseminador. A contenção deve ser precisa e em caso da laparoscopia, o animal deverá ser sedado e anestesiado;

*9. Maximização do uso do reprodutor:* o emprego da inseminação artificial maximiza o uso de reprodutores, o que por si só, dependendo do sistema de produção e do valor dos machos envolvidos, já justifica o emprego da técnica. Um carneiro, em sistema de monta natural na relação de 3% (três machos para 100 fêmeas), tem uma perspectiva de ter 22 crias por ano (um macho para 33 fêmeas e 66% de fertilidade). Quando utilizado em inseminação artificial, o número de crias sobe para 500 com sêmen fresco (um macho para 1.020 fêmeas e 49% de fertilidade) ou 12.000 com sêmen congelado (um macho para 25.000 fêmeas e 48% de fertilidade). Todavia, antes de sua implantação, um diagnóstico minucioso do sistema de produção deve ser realizado;

*10. Anotações:* é imprescindível anotar o máximo de informações possíveis antes, durante e depois da inseminação. Isso poderá identificar possíveis falhas ou mérito no desempenho do inseminador e na taxa de concepção – é a escrituração zootécnica.

Obviamente, há vários outros aspectos que devem ser considerado, dentre eles a mão de obra, conforme mencionado no item 4.2.

#### **4.4. Implicações e perspectivas**

Tecnicamente, a inseminação artificial deve prover a deposição de sêmen o mais próximo possível do local de fertilização e obedecer a meia-vida funcional dos gametas masculinos e femininos; deve ser executada da forma mais rápida e segura possível e menos estressante para o animal e o homem; a qualquer época do ano; e não veicular agentes infecciosos ou causar infecções ou lesões físicas nos animais antes, durante e depois de todo o processo.

A expansão do uso da inseminação artificial em caprinos e ovinos deve necessariamente ser suportada pela geração de conhecimentos adequados à realidade de espécies e raças envolvidas, bem como, o local e o sistema de produção onde os animais são criados. Os machos utilizados devem apresentar produtividade comprovada. Se criteriosamente orientada, a inseminação artificial pode promover elevado impacto sobre a produção de caprinos e ovinos. Seu sucesso depende de uma sequência de atividades que compõe a técnica como um todo. A observação minuciosa e a execução precisa destas atividades são imprescindíveis para se alcançar a eficiência desejada.

### **5. MÚLTIPLA OVULAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES**

Os programas de múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE) englobam o conjunto de atividades necessárias para induzir crescimento e ovulação de vários folículos, fecundação dos oócitos, desenvolvimento dos embriões até estádios de mórula ou blastocisto, retirada dos embriões do útero da fêmea doadora e a posterior deposição desses no útero

de fêmeas receptoras, com a finalidade de completar o período gestacional. Dessa forma, possibilita que uma fêmea produza um número de crias superior ao que seria possível obter fisiologicamente durante sua vida reprodutiva. Em outras palavras, a MOTE baseia-se na indução ou sincronização do estro e superovulação das doadoras, seguida da monta natural ou inseminação artificial, colheita dos embriões por meio de lavagem uterina e posterior transferência (inovulação) dos embriões a fêmeas receptoras (REICHENBACH et al., 2002).

Esta biotécnica tem contribuído para a multiplicação dos pequenos ruminantes em todo o mundo (MENCHACA et al., 2010). No Brasil, o rebanho ovino e caprino tem aumentado consideravelmente, e associado a esse crescimento, observa-se crescimento da demanda dessa biotecnologia reprodutiva, no entanto não há um levantamento preciso referente ao número de programas de MOTE realizados no Brasil. Acredita-se que centenas, talvez milhares de coletas, congelações e inovulações de embriões sejam efetuadas anualmente por técnicos brasileiros (FONSECA et al., 2010).

Por permitir a maximização da disseminação do material genético de fêmeas doadoras de embriões, a MOTE é uma técnica considerada tão importante para as fêmeas, quanto a inseminação artificial é para os machos (FONSECA et al., 2010). O incremento do número de descendentes por fêmea faz dessa técnica um instrumento de progresso genético, por aumentar a pressão de seleção e ainda, reduzir o intervalo entre gerações pela obtenção de embriões de fêmeas jovens (OLIVEIRA et al., 2013a).

No aspecto sanitário, a MOTE garante a introdução nos rebanhos de material genético de alto valor zootécnico e comercial, com menor risco de transmissão de doenças infecto-contagiosas. Rigorosas medidas preventivas de higiene e desinfecção de equipamentos, meios e soluções utilizadas no manuseio dos embriões, bem como, técnicas específicas são implantadas para evitar a disseminação de doenças entre rebanhos, regiões ou países (OLIVEIRA et al., 2013a). A Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) recomenda procedimentos sanitá-

rios que garantem riscos mínimos de transmissão de doenças virais e bacterianas pelo embrião (THIBIER; GUÉRIN, 2000). Essa possibilidade depende da presença e da integridade da zona pelúcida, a qual isola o embrião dos agentes infecciosos. Devido essa garantia sanitária, há maior facilidade nos trâmites comerciais de importação e exportação de material genético.

Além do aspecto prático de produção animal, a MOTE demonstra grande interesse do ponto de vista básico, na investigação sobre a fisiologia ovariana e desenvolvimento embrionário e placentário e, ainda, como suporte a implantação de outras biotécnicas afins.

Resumidamente, o impacto da múltipla ovulação e transferência de embriões é evidente nos programas de melhoramento genético, zootécnicos e sanitários, bem como, no resgate e conservação de raças ameaçadas de extinção, na importação/exportação de germoplasmas e no apoio a outras biotécnicas relacionadas.

## **5.1. Seleção de doadoras**

A seleção de fêmeas a participarem de um programa de múltipla ovulação e transferência de embriões como doadoras de embriões é um dos pontos críticos dessa biotécnica e pode ser considerada a etapa mais importante, pois a escolha de fêmeas superiores garantirá a multiplicação desse potencial genético, conferindo aceleração e maior precisão no processo de seleção e melhoramento animal (FONSECA, 2006b).

Existem alguns critérios de avaliação para se realizar a seleção das fêmeas doadoras de embriões, podendo se basear em dados de genealogia, conformação corporal, desempenho e teste de progênie. Recomenda-se associar os referidos métodos de avaliação para a correta seleção de animais com características desejáveis e de interesse para o progresso genético dos rebanhos.

A seleção pela genealogia consiste em avaliar os animais simplesmente por meio do nome de seus ascendentes, ou seja, pais, avós e bisavós; dados contidos no Registro Genealógico dos Animais. Quando a esco-

Iha dos animais se restringe à avaliação dos nomes e não a dados de desempenho produtivo e reprodutivo, não pode assegurar a qualidade dos animais. Esse método é amplamente empregado, mas deve sempre ser associado aos outros em discussão (OLIVEIRA et al., 2013a).

A escolha das fêmeas por conformação corporal baseia-se na apreciação de seu exterior, sendo que as características mais avaliadas são: raciais; aprumos; harmonia das formas e capacidade corporal. Esta última está relacionada ao desempenho do indivíduo, como por exemplo, tórax largo e profundo indica boa capacidade respiratória, circulatória e digestória; o ângulo e a largura da garupa são associados à boa capacidade de parto; e a melhor implantação e maior volume das glândulas mamárias relacionam-se à produção de leite. Outras características fenotípicas como aparelho reprodutivo bem desenvolvido, sadio e sem a presença de defeitos ou anomalias congênitas ou hereditárias devem ser também avaliadas. Adicionalmente, a condição corporal indica o estado nutricional do animal, sendo necessária sua avaliação, como será discutido posteriormente.

Na avaliação e escolha das doadoras pelo desempenho, utilizam-se os dados produtivos (índices zootécnicos) das fêmeas, como: peso ao nascimento, ao desmame e ao primeiro ano; ganho de peso; conversão e eficiência alimentar; assim como, características da eficiência reprodutiva: idade à puberdade, ao primeiro parto e intervalo entre partos. As informações são coletadas ao longo da vida dos animais, requerendo grande período de avaliação.

A seleção pela progênie avalia a fêmea por meio do desempenho de seus descendentes (ex. filhos, netos). Esse método permite avaliar a herdabilidade das características de interesse e os ganhos genéticos e produtivos das progênies.

Assim, os métodos de seleção dos animais pelo desempenho e pela progênie são, sem dúvida, os que permitem maior confiabilidade, entretanto, demandam mais tempo para a avaliação. No caso da seleção de fêmeas ainda jovens, características dos pais e de seu desempenho até o

momento já podem auxiliar na escolha de animais mais precoces e com atributos desejáveis. Além dos critérios já discutidos, as fêmeas devem ser também avaliadas segundo a sanidade, condição corporal e características reprodutivas, seguindo um manejo adequado pré-programa de MOTE. A doadora deve estar com o calendário sanitário atualizado em função da raça, estado fisiológico, região do país em que se encontra ou é proveniente. Controle de verminose, tratamento de infecções e vacinações devem ser programados para pelo menos 15 dias antes do início do processo superovulatório e nunca durante o mesmo (FONSECA et al., 2007). Como já mencionado, a transferência de embriões previne a transmissão de alguns agentes infecciosos entre indivíduos, entretanto, a seleção de fêmeas acometidas com doenças com caráter reprodutivo pode apresentar piores resultados em um programa de MOTE.

Avaliação e acompanhamento da condição corporal das fêmeas são necessários durante os programas de MOTE. A condição corporal é um importante indicador do estado nutricional do animal e está relacionado ao seu desempenho produtivo e reprodutivo, podendo interferir no sucesso da atividade. As exigências nutricionais variam de acordo com os ciclos produtivos e reprodutivos ao longo da vida do animal. Similarmente, a disponibilidade de alimento modifica em decorrência das mudanças climáticas. Dessa forma, recomendam-se o planejamento e fornecimento adequado de volumoso, concentrado, minerais e água compatíveis ao requerimento da fêmea e oferta na região. Recomenda-se a seleção de fêmeas que apresentem escore de condição corporal superior a 2,5 (escala 1 - 5) de acordo com Russel et al. (1969), e que não estejam perdendo peso. Animais excessivamente gordos devem ser evitados.

Alterações no manejo nutricional devem ser feitas, se necessário, com pelo menos duas semanas antes do início do programa de MOTE, sendo contraindicada sua modificação durante o mesmo (FONSECA et al., 2007).

Por fim, na avaliação da doadora, devem-se incluir os exames reprodutivos (isto é, ginecológico e do histórico reprodutivo). Nos pequenos ruminantes, o diagnóstico ginecológico deve se respaldar em observações

de sinais clínicos, vaginoscopia e ultrassonografia. Nesse contexto, recomenda-se a espera de no mínimo 100 dias pós-parto para início de um programa de MOTE (FONSECA et al., 2007). Esse período é necessário para o completo restabelecimento tanto sob o ponto de vista endócrino, quanto da involução uterina e retorno à ciclicidade.

Aspectos de bem-estar animal também podem influenciar a eficiência da resposta ao tratamento, indicando-se selecionar animais com temperamento dócil e adotar práticas que minimizem o estresse. Nesse sentido, instalações apropriadas podem prover o máximo bem-estar animal e facilitar as intervenções (OLIVEIRA et al., 2013a). Outros fatores são apontados com desencadeadores de estresse aos animais e podem prejudicar o sucesso da biotécnica, como por exemplo: estresse térmico, afecções de casco e glândula mamária, pico de lactação em fêmeas com alta produção, manejo nutricional deficiente e mudanças de ambiente. Pelas mesmas razões, manejos como descorna ou casqueamento devem ser evitados durante os programas de MOTE, sendo indicado antecederem em 15 dias de seu início.

## 5.2. Protocolos de superovulação

O processo superovulatório fundamenta-se no fornecimento de preparações hormonais que estimulam o crescimento de vários folículos até tamanhos pré-ovulatórios, resultando em múltiplas ovulações (OLIVEIRA et al., 2013a). Os tratamentos superovulatórios foram desenvolvidos com base em conhecimentos da fisiologia do ciclo estral. Sabe-se que durante um ciclo estral normal, um a quatro folículos podem alcançar diâmetro ovulatório (DESHPANDE et al., 1999; EVANS, 2003; GINTHER; KOT, 1994). Esses folículos estabelecem sua dominância, entre outros aspectos, privando os demais folículos (subordinados) de FSH (GINTHER et al., 1996). Em mais detalhes, os folículos selecionados para estabelecerem a dominância secretam estradiol e inibina, os quais realizam "*feedback*" negativo, reduzindo a disponibilidade de FSH e, dessa forma, suprimindo o crescimento dos folículos subordinados dependentes da gonadotrofina. Nessas condições, o desenvolvimento dos folículos dominantes não é prejudicado, pois deslocam sua dependência de FSH para LH, após aquisição de receptores de LH (OLIVEIRA et al., 2013b).

Dessa forma, o princípio de um tratamento destinado a aumentar a taxa e número de ovulação e, conseqüentemente, o número de embriões obtidos implica no aumento do número de folículos pré-ovulatórios mediante aporte de altas doses de gonadotrofinas exógenas, como FSH, eCG e gonadotrofina menopausal humana (hMG).

Várias preparações hormonais com variações no número de aplicações e na dose dos hormônios utilizados têm resultado em sucesso (FONSECA et al., 2007). No começo se utilizou como agente estimulatório a eCG em dose única, normalmente, de 1.000-1.500 UI administrada 48 horas antes da retirada do progestágeno (RAINIO, 1991). A possibilidade de seu emprego em dose única se deve a sua meia-vida longa (aproximadamente 72 horas) (OLIVEIRA et al., 2013c). Atualmente, a eCG não é utilizada isoladamente em protocolos de superovulação, pois em elevadas dosagem estão relacionadas à alta taxa de folículos anovulatórios, que se luteinizam (ARMSTRONG et al., 1983). O efeito é dependente da dose, momento de aplicação e vida média do preparado comercial (LÓPEZ SEBASTIÁN et al., 2006). A produção de anticorpo anti-eCG observada em fêmeas que recebem o tratamento repetidas vezes tem ação biológica de inibir a atividade estimulatória da gonadotrofina administrada, levando a um atraso ou ausência da ovulação (BARIL et al., 1996), podendo afetar ainda a fertilidade dos animais (BODIN et al., 1997; ROY et al., 1999).

Alternativamente, nas últimas três décadas tem-se optado pela substituição da eCG por preparados de FSH de origem suína, ovina ou caprina (ARMSTRONG; EVANS, 1983; JABBOUR; EVANS, 1991). A modificação resultou em melhoria em eficiência, obtendo-se taxas de ovulações superiores e menor incidência de folículos anovulatórios, além de resposta individual mais uniforme quando comparado aos tratamentos com eCG (ARMSTRONG; EVANS, 1983). Entretanto, vale destacar que as preparações de FSH apresentam meia-vida curta, decrescendo a concentrações basais em 10 horas (DEMOUSTIER et al., 1988); o fato gera a necessidade de repetir as administrações em um curto intervalo de tempo, o que intensifica o manejo, tornando-o menos prático. Estimulação adequada dos folículos é alcançada administrando o FSH a intervalo de

12 horas (CHUPIN; PROCUREUR, 1985). Recomenda-se que o tratamento superestimulatório seja iniciado 48 horas antes da retirada do progestágeno, administrado em doses decrescentes (HOFFMAN et al., 1988), durante 2 - 4 dias (COGNIÉ, 1999; LÓPEZ SEBASTIÁN; INSKEEP, 1991). Resultados apresentados por D`Alessandro et al. (2005) sugerem que tratamentos hormonais mais longos (4 dias) com FSH-p e combinados com uma relação FSH/LH variável durante o período pré-ovulatório promovem desenvolvimento de um maior número de folículos ovulatórios. Assim, as preparações com múltiplas aplicações de FSH, comumente, empregam de 6 a 8 administrações.

Com relação à dose total da gonadotrofina (FSH) empregada nos protocolos superovulatórios, podem ser observadas recomendações variáveis. No Brasil, utilizam-se amplamente protocolos com doses totais de 256 mg (Folltropin®; GUSMÃO, 1996; OLIVEIRA et al., 2012) ou 200 UI (Pluset®; CORDEIRO et al., 2003), por ovelha superestimulada. Essas doses totais são consideradas elevadas (FONSECA et al., 2007), especialmente ao compará-las com protocolos empregados em fêmeas bovinas, que em geral, são de 100 a 150 mg/animal. Novas pesquisas estão sendo desenvolvidas utilizando dose total pouco inferiores (200 mg de Folltropin®), as quais têm obtido desempenho (taxa de ovulação e produção de embriões viáveis) similar aos relatados na literatura e resultados de campo (OLIVEIRA, 2011). Em caprinos, é necessário utilizar mais de 200 mg de FSH para a efetiva superovulação (SANTOS GARZA et al., 2008).

Conforme já mencionado, os protocolos cuja superestimulação gonadotrófica é realizada pelo uso de FSH, envolvem várias administrações durante a fase folicular, o uso prático em nível comercial é limitado, pois são trabalhosos e bastante estressantes para os animais, devido à manipulação excessiva. Por essa razão, há uma grande demanda por simplificação dos tratamentos superovulatórios. As alternativas estudadas são voltadas a possibilitar a superestimulação com dose única de FSH, sendo testadas sua associação com eCG (pela sua meia-vida longa) ou ainda em combinação com substâncias que possibilitem a liberação lenta e

mais duradoura da gonadotrofina. Nesse contexto, a redução do número de administrações de FSH pode ser obtida pela associação do fármaco a moléculas que propiciem sua liberação lenta. A associação de FSH com polivinilpirrolidina (PVP) obteve taxas de recuperação embrionárias idênticas aos protocolos de múltiplas administrações (D`ALESSANDRO et al., 2001). Vale ressaltar que embora essa associação se mostre favorável em primeiro momento, aprofundamento dos estudos ainda se faz necessário.

Paralelamente, independente dos protocolos de estimulação gonadotrófica escolhidos, este procedimento superestimulatório pode ser feito com base na observação de estro natural ou em protocolos de sincronização de estro. No último caso, há facilitação e otimização dos eventos envolvidos na superovulação e colheita de embriões pela simples possibilidades de programação dessas atividades. Tradicionalmente, utilizam-se protocolos com base no emprego de progesterona ou progestágenos impregnados em dispositivos/pessários vaginais ou implantes auriculares, os quais permanecem por um tempo de exposição superior a 10 dias para a indução e sincronização do estro em pequenos ruminantes (FONSECA et al., 2007). O mais comum é que em ovelhas o progestágeno permaneça por 14 dias (a determinação desse período teve como base a duração da fase lútea) e, em cabras, por 10 dias associado nesse último caso a um análogo de  $PGF2\alpha$  (BALDASSARRE, 2008) para indução da luteólise, pois o período é inferior a uma fase lútea normal em que a indução da luteólise ocorreria naturalmente. Nesses protocolos, as administrações de gonadotrofinas exógenas iniciam-se dois dias antes do término do tratamento.

Os referidos protocolos de sincronização são amplamente utilizados como base para a superovulação, entretanto apesar dos benefícios de sincronização, atribuí-se aos progestágenos efeito negativo ao número de ovulações e embriões transferíveis (BERLINGUER et al., 2007; GONZALÉZ-BULNES et al., 2004a). O perfil de progesterona induzido durante todo o tratamento não é constante, havendo ao final dos protocolos longos (10 a 14 dias) redução das concentrações de progesterona

a valores abaixo do fisiológico, denominadas subluteais. Portanto, os protocolos mais longos, especialmente os empregados em ovelhas com duração de 14 dias, induzem concentrações subluteais nos últimos dias. Esse evento é associado à alteração do padrão de crescimento folicular e persistência folicular (LETELIER et al., 2009; LEYVA et al., 1998; VIÑOLES et al., 1999), bem como a interferência no processo de fecundação e desenvolvimento de embriões de boa qualidade (GONZÁLEZ-BULNES et al., 2005; THEODOSIADOU et al., 2004), prejudicando assim a eficiência dos programas de MOTE.

Estratégias para superar o efeito negativo dos tratamentos com progestágenos incluem: (a) inserção de um segundo dispositivo de progesterona (do Dia 7 ao Dia 14) para evitar concentrações subluteais do hormônio durante o tratamento (GONZÁLEZ-BULNES et al., 2002; GUSMÃO, 2006; OLIVEIRA, 2011); (b) suplementação de gonadotrofinas logo após a remoção do dispositivo até a ovulação para evitar efeito nocivo do folículo dominante (MENCHACA et al., 2007; MENCHACA; RUBIANES, 2002) ou; (c) conduzir o tratamento superovulatório, baseando-se na detecção do estro natural (início das administrações de gonadotrofinas quatro dias após o estro), assim, faz-se uso de níveis fisiológicos de progesterona produzidos pelo corpo lúteo cíclico (MAYORGA et al., 2008; MAYORGA et al., 2011); e (d) diminuir o período de exposição dos progestágenos (para seis dias). Tem-se relatado sucesso em sua aplicação referente à resposta ovulatória e produção de embriões caprinos (FONSECA et al., 2005c). Nesse caso, a administração de prostaglandina durante o processo superovulatório é necessária. O conhecimento dos efeitos da progesterona exógena sobre o “*turnover*” folicular associado ao efeito luteolítico da prostaglandina em caprinos podem juntos prover a melhora da resposta superovulatória. Outra vantagem relacionada a este protocolo, refere-se à redução do período total entre o início do protocolo e a colheita de embriões.

Independente do emprego dessas estratégias voltadas a evitar ou superar os prejuízos causados pelas concentrações subluteais ao final dos protocolos, vale destacar que esses tratamentos foram desenvolvidos funda-

mentalmente considerando a duração do ciclo estral (COGNIÉ, 1999), e não o fenômeno biológico da dinâmica folicular (EVANS, 2000), desconhecendo-se os momentos das emergências das ondas foliculares e o padrão de desenvolvimento dos folículos (OLIVEIRA, 2011). O pouco conhecimento dos efeitos dos hormônios exógenos sobre a dinâmica folicular pode ser uma das razões para a ampla variabilidade das respostas superovulatórias aos tratamentos gonadotróficos, sendo este considerado o principal fator limitante da transferência de embriões em ovinos e caprinos (COGNIÉ et al., 1999; COGNIÉ et al., 2003; DRIANCOURT, 2001; GONZÁLEZ-BULNES et al., 2004a, 2004b). Nesse sentido, a ultrassonografia tem sido uma ferramenta muito útil para a busca de informações referentes à fisiologia ovariana, objetivando a melhoria da eficácia dos tratamentos superovulatórios (OLIVEIRA et al., 2013c).

Na produção *in vivo* de embriões, independentemente dos hormônios utilizados no tratamento superovulatório, protocolo de administração e método de sincronização das ovulações, as maiores limitações responsáveis pela variabilidade das respostas estão, possivelmente, relacionadas à dinâmica folicular, equilíbrio estímulo-inibição que determinam a taxa de ovulação em cada espécie, e aos mecanismos intraovarianos que controlam o crescimento folicular (LÓPEZ SEBASTIÁN, 2006). Assim, as pesquisas apontam que a condição folicular presente no início do protocolo superovulatório interfere na resposta ao tratamento. Acredita-se que há um efeito prejudicial da dominância folicular na resposta superovulatória em pequenos ruminantes. Tratamentos superovulatórios iniciados na ausência de um folículo dominante têm resultado em melhores taxas de recrutamento folicular, ovulação e produção de embriões em ovinos (GONZÁLEZ-BULNES et al., 2002; RUBIANES et al., 1995, 1997) e caprinos (GONZÁLEZ-BULNES et al., 2003; MENCHACA et al., 2002, 2007b). Folículos dominantes (maiores que 5-6 mm) presentes ao início do tratamento com FSH parecem afetar a maturação (VEIGA-LOPEZ et al., 2006) e a ovulação (RUBIANES et al. 1995; 1997) dos folículos menores. Esta seria uma das possíveis justificativas para a alta frequência de folículos anovulatórios em tratamentos superovulatórios desses animais.

Algumas estratégias têm permitido começar o tratamento superovulatório próximo à emergência da onda folicular (na ausência de um folículo dominante) em pequenos ruminantes, como é o caso do protocolo "Dia 0" - dia correspondente à ovulação -, no qual se inicia a superestimulação. Dessa forma, o tratamento gonadotrófico é efetivamente iniciado paralelamente à ovulação e emergência da primeira onda folicular do novo ciclo (FONSECA, 2006 a,b; MENCHACA et al., 2007; RUBIANES; MENCHACA, 2006), garantindo a ausência de um folículo dominante (FONSECA et al., 2007).

Outro exemplo de protocolos voltado a reduzir a variação individual da resposta superovulatório são os tratamentos com antagonistas do GnRH antes da superestimulação gonadotrófica (COGNIÉ et al., 2003); os quais podem ser considerados uma alternativa para eliminar os folículos dominantes. Segundo Heidari et al. (2010), o uso de antagonista do GnRH pode melhorar a resposta superovulatória e produção de embriões, mas também pode produzir um maior número de óvulos não fertilizados. A aplicação de pré-tratamentos com antagonistas de GnRH merece mais pesquisas para otimizar e eliminar quaisquer efeitos colaterais.

A indução de uma nova onda folicular é comumente realizada pelo uso de estrógenos em bovinos. O fármaco provoca a regressão do folículo dominante, e o processo é seguido pela emergência de uma nova onda folicular quatro a cinco dias após a administração do estrógeno. Recentemente foi empregado em pequenos ruminantes, observando melhora na resposta superovulatória (BARRETT et al., 2008; FLORES-FOXWORTH, 2007), entretanto, há grande pleito por novas pesquisas em ovinos e caprinos.

Outra possível causa relacionada à alta variabilidade da resposta superovulatória e produção de embriões em pequenos ruminantes é associada à deficiência ou inexistência do pico pré-ovulatório de LH após tratamento com gonadotrofina exógena (GONZÁLEZ-BULNES et al., 2003), ou devido à presença de folículos não responsivos, o que é

relacionado a uma baixa regulação dos receptores de LH na granulosa e teca (BOLAND et al., 1991; LOPEZ-DIAZ; BOSU, 1992). Nesse contexto, alguns estudos em MOTE (D`ALESSANDRO et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2012; PICAZO et al., 1996), têm focado no incremento da taxa ovulatória e número de embriões viáveis por modificar a taxa FSH:LH no final do tratamento superestimulatório, administrando-se LH exógeno. É importante ressaltar que, nesses protocolos há uma variação no momento ovulatório, informação que deve ser considerada quando for utilizar a inseminação artificial em tempo fixo (OLIVEIRA et al., 2008a, 2008b).

Paralelamente, a regressão luteal precoce é outra problemática que interfere nos resultados dos programas de MOTE em pequenos ruminantes. Esse fenômeno é exacerbado em cabras e ovelhas superovuladas e parece estar associado a elevadas concentrações plasmáticas de estrógenos durante a fase luteal inicial, notando-se como consequência, um decréscimo na resposta superovulatória e diminuição do número e qualidade dos embriões (FONSECA et al., 2007). A regressão luteal precoce é evidente cerca de quatro dias após o estro, mas as concentrações plasmáticas de progesterona incompatíveis com atividade luteal normal já são detectadas aos três dias após o estro em cabras acometidas (SAHARREA et al., 1998). Em ovelhas superovuladas, a frequência de regressão luteal precoce pode variar de 6% a 75% (FUKUI et al., 1998; LOPES JÚNIOR et al., 2006), e acometer a formação de todos ou parte dos corpos lúteos de um mesmo animal (OLIVEIRA, 2008). Podem-se observar ovários com corpos lúteos normais e em regressão pela Figura 7. A administração de progesterona exógena, agentes antiluteolíticos (anti-inflamatório; como, inibidores da prostaglandina) ou luteotróficos (hCG, GnRH, LH) pode prevenir ou reduzir os efeitos deletérios da regressão luteal precoce (FONSECA, 2005). Inibidores da prostaglandina-sintetase como a Flunixin meglumine administrado de uma a duas vezes ao dia, entre o 2º e 4º dia após a detecção do estro (período crítico), auxiliam no bloqueio do processo de regressão prematura dos corpos lúteos. Nesse sentido,

tem-se observado incremento na recuperação de embriões viáveis (TRALDI, 2002).



Figura 7. Imagens de ovários de ovelhas superovuladas, destacando corpos lúteos regredidos precocemente (setas brancas) e corpos lúteos normais (setas pretas).

### 5.3. Métodos de acasalamento

O acasalamento das fêmeas doadoras de embriões pode ser feito por monta natural, livre ou controlada; inseminação artificial (IA) seguida da detecção de estro ou ainda; inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Recomenda-se realizar de duas a três inseminações intervaladas de 12 horas (FONSECA, 2005). O mesmo deve ser empregado quando do uso de monta natural controlada. A necessidade de repetições desses procedimentos faz-se necessário devido à assincronia entre as ovulações de folículos de um mesmo animal e entre fêmeas.

A variabilidade no momento das ovulações é um fator limitante para se obter uma elevada taxa de fecundação e torna-se particularmente crítico quando do uso de sêmen congelado (FREITAS; SIMPLÍCIO, 2002). Se a manifestação do estro for detectada, a fêmea deve ser inseminada ou coberta de 12 a 24 horas após o início deste. A IA realizada em função do início do estro apresenta maior taxa de fecundação comparada a IATF (VALLET; BARIL, 1990). O momento recomendado para realizar a IATF é discutível, visto o desconhecimento do momento preciso em que ocorrem as ovulações de doadoras sincronizadas pelos diferentes protocolos disponíveis. Segundo Gusmão (2006), a primeira IATF deve ser realizada

36 horas após a retirada do dispositivo de progesterona. Variação nesse momento é observada de acordo com o protocolo utilizado e principalmente quando se adiciona ao tratamento indutores de ovulação (GnRH, LH e hCG).

Os machos selecionados para realizar a monta natural ou a coleta de sêmen visando à IA devem ser previamente avaliados quanto à qualidade seminal. As inseminações são preferencialmente feitas por via laparoscópica em ovelhas e transcervical em cabras. Os tratamentos prévios em que as fêmeas doadoras são submetidas bem como o elevado número de ovulações comprometem a taxa de fecundação dos oócitos. Assim, a deposição do sêmen diretamente no útero (intrauterino) contorna os problemas relacionados ao transporte e sobrevivência dos espermatozóides no sistema reprodutor feminino.

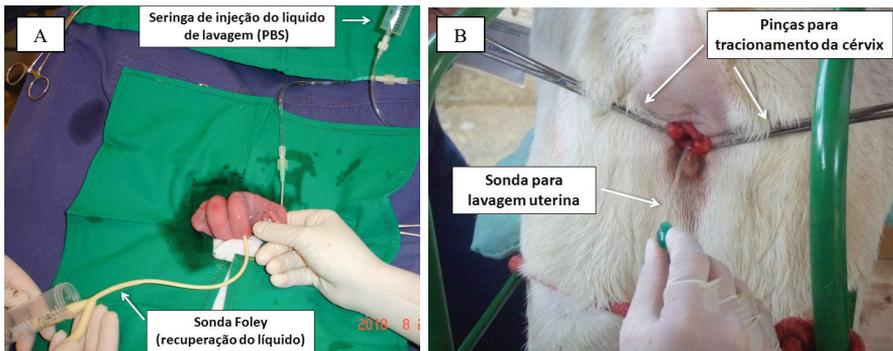
#### **5.4. Coleta e avaliação dos embriões**

A coleta dos embriões é feita por meio de lavagem dos cornos uterinos entre o 6º e o 8º dia após o início do estro. Esse período é estabelecido baseando-se principalmente: (1) no tempo em que o embrião leva para percorrer a tuba uterina e atingir o ápice do corno uterino; e (2) na recuperação de embriões em estágio de desenvolvimento em que apresenta a zona pelúcida íntegra, viabilizando a garantia sanitária (FREITAS; SIMPLÍCIO, 2002).

A lavagem uterina pode ser realizada basicamente por três métodos: laparotomia, laparoscopia e pela via transcervical (ISHWAR; MEMON, 1996; LIMA et al., 1996) demonstrado na Figura 8. Desses, o procedimento cirúrgico (laparotomia) é o mais invasivo, podendo, em alguns casos, limitar a possibilidade de repetição sequencial da técnica devido à ocorrência de aderências entre o sistema reprodutor e tecidos circunvizinhos. Embora seja uma técnica segura, precisa e muito empregada, submete a fêmea a todos os riscos e sequelas inerentes ao processo cirúrgico (ANDRIOLI et al., 1999).

Em virtude da anatomia da cérvix, especialmente em ovelhas, e as dimensões do aparelho reprodutor nos pequenos ruminantes, por muito

tempo o método cirúrgico e o laparoscópico tornaram-se as únicas opções para essa etapa. Com o desenvolvimento da técnica não cirúrgica de coleta de embriões para os pequenos ruminantes, ampliaram-se as possibilidades de emprego dos programas de MOTE, visto que reduziu a ocorrência de complicações futuras para as fêmeas (FONSECA et al., 2011b). O procedimento pode ser executado com a fêmea em estação e para facilitar a transposição do cateter pela cérvix, indica-se a dilatação desse canal. Em cabras, a administração de análogos da prostaglandina é recomendada entre 16 a 8 horas antes da lavagem e de ocitocina no momento da coleta (PEREIRA et al., 1998). A dilatação cervical em ovelhas tem sido obtida por meio da administração de misoprostol no fundo de saco vaginal cinco horas antes da coleta de embriões (GUSMÃO et al., 2009).



**Figura 8.** Imagens representativas de colheitas de embriões em ovelhas pelas técnicas: (A) cirúrgica, laparotomia e (B) não cirúrgica, via transcervical.

O meio de lavagem utilizado é a solução tampão-fosfato (PBS) na quantidade de 40 a 60 ml por corno uterino; total fracionado em duas lavagens sucessivas. A taxa de recuperação de estruturas é variável de acordo com o método de coleta (SCUDAMORE et al., 1991), qualidade do procedimento e prática do técnico. Em geral, recupera-se mais de 50% - 60% das estruturas. Essa taxa é calculada sobre a resposta ovulatória, indicando-se sua avaliação por ultrassonografia ou por via laparoscópica no dia da coleta dos embriões. Embora a via transcervical apresente vantagens expressivas frente às demais técnicas, sua eficiência (taxa de recuperação de estruturas) é ainda inferior.

Após a lavagem uterina, o meio de coleta recuperado é avaliado, sob estereomicroscópio (aumento de 40 - 80x), quanto sua morfologia. Os embriões encontrados são classificados quanto ao estágio de desenvolvimento e indicativos de qualidade. Espera-se que embriões colhidos entre o 6º e 8º dia após o início do estro estejam entre os estádios de mórula compacta e blastocisto expandido. Embriões viáveis são aqueles classificados de graus I a III (STRINGFELLOW; SEIDEL, 1999), Tabela 5, entretanto, essa avaliação não é garantia de viabilidade da prenhez e nascimento a termo. Recomenda-se a inovulação somente dos embriões classificados de I a III. Os embriões de graus I e II apresentam maior capacidade de desenvolvimento (LÓPEZ SEBASTIÁN, 2006).

**Tabela 5.** Classificação morfológica dos embriões quanto à qualidade.

<b>Grau</b>	<b>Classificação</b>	<b>Aspecto</b>
<b>I</b>	Excelente	Estádio de desenvolvimento com zona pelúcida intacta e esférica, massa celular homogênea com células de tamanho uniforme, nenhum ou poucos fragmentos celulares no espaço perivitelino
<b>II</b>	Bom	Alterações mínimas na forma e coloração com relação ao grau I, alguns fragmentos ou debris celulares no espaço perivitelino e/ou pequenas formações vesiculares nos blastômeros
<b>III</b>	Regular	Claras alterações comparadas com o grau II, embora com a maior parte da massa celular intacta
<b>IV</b>	Degenerado	Muitos fragmentos ou debris celulares no espaço perivitelino, vesículas maiores e em maior número e claras mudanças degenerativas nos blastômeros, com menos da metade da massa celular intacta

Fonte: Adaptado de Fonseca et al. (2001).

## 5.5. Inovulação dos embriões

Esta etapa do programa de MOTE consiste na deposição do embrião no corno uterino, ipsilateral ao(s) corpo(s) lúteo(s) cíclico(s), da fêmea receptora (OLIVEIRA et al., 2013a). Sua eficiência é diretamente dependente do sincronismo de estro entre doadora e receptora e ainda, da capacidade da fêmea receptora levar a gestação (como por exemplo, pela presença de corpo(s) lúteo(s) funcionais).

A seleção prévia da receptora pelos aspectos gerais de idade e estados sanitário, nutricional e reprodutivo é fundamental, mas não suficiente para

alcançar um alto grau de êxito considerando a taxa de prenhez (LÓPEZ SEBASTIÁN, 2006). Avaliação da manifestação de estro e, principalmente, da presença e qualidade do(s) corpo(s) lúteo(s) formado(s) é indispensável no processo de escolha da fêmea que receberá o(s) embrião(ões). Neste sentido, a ultrassonografia permite a identificação do ovário que possui corpo(s) lúteo(s), bem como, avaliação da qualidade e número desse(s). A mensuração de seus diâmetros e aspectos da ecogenicidade são parâmetros relacionáveis à produção de progesterona, podendo, assim, auxiliar no processo de seleção de fêmeas receptoras. Do mesmo modo, essa avaliação pode ser realizada por via laparoscópica. Fêmeas que apresentem corpos lúteos em regressão ou baixa qualidade morfológica devem ser eliminadas a fim de atingir taxas de prenhez superiores.

Podem-se selecionar fêmeas que manifestaram estro naturalmente, entretanto, usualmente empregam-se protocolos de sincronização, devendo atender à sincronia com a doadora. Normalmente, de cinco a dez receptoras são sincronizadas para cada doadora, caso seja realizado a transferência dos embriões a fresco. Devem-se preferir animais com sincronia total com a doadora (estro no mesmo dia) e em seguida animais com um dia de assincronia (+ 1 ou -1 dia).

A inovulação em cabras e ovelhas pode ser feita pelos métodos: cirúrgico (laparotomia), semicirúrgicos (laparoscopia, semilaparoscopia) ou não-cirúrgico (transcervical). Desses, o último é o menos invasivo, entretanto, pouco relatado em pequenos ruminantes (FONSECA, 2006); essa técnica é descrita como uma tendência futura, a exemplo do que ocorreu em bovinos. O diâmetro do inovulador, a idade e ordem de parição da fêmea poderão conferir maior ou menor facilidade à técnica pela eficiência em transpor o canal cervical, o que permanece como objeto de estudo (FONSECA et al., 2007). A técnica semilaparoscópica é a mais empregada atualmente. Nesse procedimento, a laparoscopia é utilizada para visualizar a resposta ovulatória da fêmea e guiar a apreensão do corno uterino ipse-lateral ao corpo lúteo. Apenas a porção cranial do corno uterino será exposta, a fim de efetuar a inovulação do(s) embrião(ões) no lúmen uterino (FONSECA et al., 2011b). Recomenda-se a inovulação de um ou

dois embriões por receptora, garantindo desenvolvimento e crescimento adequados do concepto. A transferência de um embrião para cada corno uterino também é reportada com sucesso.

A avaliação do sucesso do programa de MOTE é realizada pelo diagnóstico de prenhez das fêmeas receptoras e nascimento das proles. Indica-se diagnosticar a prenhez precocemente, a fim de identificar possíveis perdas embrionárias ou fetais. Essa prática de manejo proporciona atender adequadamente as exigências nutricionais e sanitárias das fêmeas prenhes, bem como, permite o aproveitamento intensivo das fêmeas receptoras vazias em programas sucessivos de TE. As taxas de prenhez dos programas de produção *in vivo* de embriões variam de 40% a 80%.

## 5.6. Criopreservação

Caso não haja o interesse de inovular os embriões a fresco, recomenda-se a criopreservação. A estocagem dos embriões criopreservados garante os trâmites comerciais (nacional ou internacional) e armazenamento de material genético em bancos de germoplasmas. A criopreservação deve ser usada preferencialmente nos embriões em estágio de mórula compacta até blastocisto expandido.

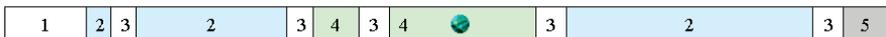
Os protocolos de criopreservação podem ser classificados basicamente em lentos ou rápidos, de acordo com a taxa de resfriamento e com o tipo e concentração dos aditivos (isto é, crioprotetores) utilizados (FONSECA, 2002; SHAW et al., 2000). Os crioprotetores mais empregados para os processos de congelação lenta ou vitrificação são etilenoglicol e glicerol, com elevadas taxas de sobrevivência embrionária.

No procedimento de congelação clássica (lenta), faz-se uso de uma máquina própria, a qual possui controle da taxa de resfriamento. Após a adição do crioprotetor e envase, as palhetas são colocadas na máquina para início do processo. À temperatura de -5 a -7 °C, induz-se a cristalização (*seeding*). A partir de então, submete-se a curva de resfriamento, a uma taxa que varia entre 0,3 a 0,6 °C/minuto até -35 °C, quando as palhetas contendo os embriões são imersas em nitrogênio líquido, permanecendo a -196 °C.

A vitrificação é a técnica de criopreservação onde se obtém solidificação sem formação ou separação de cristais de gelo e sem concentração de solutos (evita choque osmótico; FONSECA et al., 2007). Durante o resfriamento, há transformação da fase líquida do citoplasma das células em uma fase sólida (estado vítreo). Nesse procedimento, os embriões recebem sucessivos banhos em meio crioprotetores de concentrações crescentes.

Ato seguinte, faz-se o envase em palhetas e rápida imersão em nitrogênio líquido, atingindo altas taxas de resfriamento (2.500 °C/minuto). Essas taxas podem ainda ser superiores quando se utiliza OPS (*Open Pulled Straw* - palhetas modificadas, com diâmetro e espessura da parede diminuídos; VAJTA et al., 1997).

O envasamento dos embriões criopreservados comumente é realizado em palheta, constituindo-se de três colunas de meio de cultivo/manutenção separadas por bolhas de ar. O(s) embrião(ões) deve(m) ser colocado(s) na coluna central. No caso de embriões congelados para inovulação direta (*one step*), propõe-se o envase conforme Figura 9. A identificação correta das palhetas previne equívocos no momento da inovulação. Recomenda-se especificar a identidade do reprodutor e da doadora (raça, registro e identificações complementares necessárias), do embrião (classificação do estágio de desenvolvimento e qualidade morfológica; Tabela 5), data da coleta e técnico responsável.



**Figura 9.** Diferentes compartimentos da palheta de 0,25 ml utilizada para congelamento de embriões caprinos. 1 = selo da palheta (bucha / lacre), 2 = solução PBS 20% SFB, 3 = bolhas de ar, 4 = solução Etileno Glicol 1,5 M (10 min equilíbrio), 5 = selo da palheta (aquecimento), = embrião.

Fonte: Adaptado de Fonseca et al. (2005a).

Em ovinos, o sucesso reportado na criopreservação é similar entre as técnicas de congelamento lenta (38% - 73%) e vitrificação (52% - 79%), bem como, daqueles transferidos a fresco (50% - 90%) (BARIL et al., 2001; BETTENCOURT et al., 2009; GIBBONS et al., 2011; GREEN et al., 2009). O mesmo é demonstrado em caprinos, quando se obtêm taxas de prenhez a partir de embriões criopreservados pelo método de congelamento lenta de 45-64%, por vitrificação de 40-51,4% e transferido a

fresco de 57,1% (HONG et al., 2007; GIBBONS et al., 2011; GUIGNOT et al., 2006; TRALDI, 2000).

O estágio de desenvolvimento embrionário é considerado como um importante fator relacionado à viabilidade do embrião após criopreservação (CO-CERO et al., 1996). Em ovelhas, há relato de que mórulas compactas apresentam maior viabilidade comparada a blastocistos (GREEN et al., 2009). Já em caprinos, em geral, observa-se incremento na taxa de sobrevivência embrionária com o avanço dos estádios de desenvolvimento (de mórula a blastocisto; GARCIA-GARCIA et al., 2006). Em função da alta sensibilidade de mórulas, nessa espécie, ao processo de criopreservação, tem sido sugerido o cultivo desses embriões por 24 horas, quando atingem o estágio de blastocisto, para então serem congelados (FONSECA et al., 2007).

Atualmente, a técnica mais utilizada para a criopreservação de embriões ovinos e caprinos é a de congelação lenta (clássica). Provavelmente por ser um método melhor estabelecido e com resultados mais consistentes. No entanto, há demanda por avanços no processo de vitrificação, especificamente referente aos crioprotetores, concentração e taxa de resfriamento.

## **5.7. Implicações e perspectivas**

A múltipla ovulação e transferência de embriões em pequenos ruminantes é uma realidade, devido à grande demanda por intensificação dos programas de melhoramento genético e sistemas produtivos nessas espécies. Essa biotécnica é dependente de diversos fatores que se inter-relacionam. Entre eles, destacam-se: manejo sanitário e nutricional das fêmeas; sincronismo de estro entre doadoras e receptoras; resposta superovulatória da doadora; sistema de acasalamento (tipo e momento); qualidade seminal; eficiência nas etapas de coleta, avaliação e transferência (inovulação) dos embriões; bem como, qualidade da receptora e manejo até o parto. Por ser uma biotécnica complexa, requer experiência e habilidade do profissional. Atualmente, as pesquisas têm sido voltadas à simplificação e aumento da eficiência de todas as etapas envolvidas. Visa-se tornar os protocolos e procedimentos mais simples, eficientes, menos agressivos e estressantes, bem como, menos onerosos.

## 6. TECNOLOGIAS REPRODUTIVAS AVANÇADAS

### 6.1. Produção *in vitro* de embriões (PIVE)

A PIVE em ruminantes é uma excelente fonte de embriões, a relativo baixo custo para a pesquisa básica ou aplicação das biotecnologias emergentes, como a transferência nuclear e transgenia (BALDASSARE et al., 2002). A técnica de PIVE envolve a coleta de oócitos, a maturação *in vitro* (MIV) desses, a fecundação *in vitro* (FIV) dos oócitos maturados e o desenvolvimento *in vitro* (DIV) dos prováveis embriões obtidos até um estágio compatível com a sua transferência para o útero de receptoras. A PIVE apresenta vantagens quando comparada à transferência de embriões convencional, como por exemplo, a utilização de fêmeas pré-púberes, idosas, gestantes e, até mesmo, post-mortem. Essa técnica pode ainda ser uma alternativa para a conservação de espécies em risco de extinção ou em cativeiro. Adicionalmente, com o seu estabelecimento, técnicas como a clonagem e transgenia podem ser aprimoradas. Como desvantagens da técnica, estão os altos custos em equipamentos e a necessidade de treinamento, tanto do operador quanto do auxiliar para efetivamente minimizar trauma e tempo cirúrgico (BALDASSARRE, 2008; FREITAS; MELO, 2010; SIMPLÍCIO et al., 2005; TABET, 2007;).

Os primeiros relatos de ovinos e caprinos nascidos a partir de embriões produzidos totalmente *in vitro* são bastante recentes, 1991 e 1994, respectivamente, revisado por Fonseca et al., (2010). O primeiro nascimento de um cordeiro produzido por FIV comercial no Brasil ocorreu em agosto de 2006 na Faculdade de Medicina Veterinária – UNIFEOB em São João da Boa Vista – SP. A aplicação comercial da PIVE em pequenos ruminantes no Brasil da mesma forma foi iniciada em 2006, após a busca dessas tecnologias em centros de pesquisa na Austrália e no Canadá. Já em 2007, a empresa *In Vitro* Brasil já oferecia a técnica para produtores de ambas as espécies. Até o mês de setembro de 2008, cerca de 3.200 embriões ovinos produzidos por FIV pela empresa foram transferidos a fresco para receptoras. Nessa época, a empresa relatou o nascimento de mais de 500 cordeiros oriundos de PIVE no Brasil. Em média, são produ-

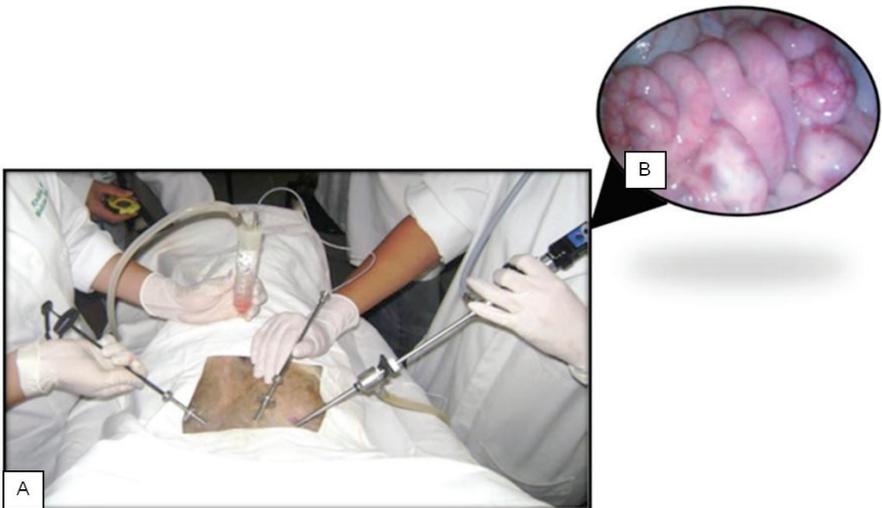
zidos 7,3 embriões por ovelha doadora e, após a transferência, 45% das receptoras apresentam diagnóstico positivo de gestação. Aparentemente, parece haver uma menor demanda dessa técnica por parte dos produtores de caprinos do que de ovinos conforme revisado por Basso et al. (2008).

### **6.1.1. Coleta de oócitos**

A recuperação de oócitos de boa qualidade é o primeiro passo para a PIVE. Para fins científicos, a PIVE pode ser realizada a partir de oócitos recuperados de ovários de matadouro, porém, sua utilização comercial só faz sentido em fêmeas de alto valor genético e/ou econômico (PAULA et al., 2008). Em fêmeas saudáveis, a obtenção de oócitos imaturos por aspiração folicular pode ser realizada por meio de laparotomia abdominal, com a exposição dos ovários, permitindo visualização direta e punção folicular; contudo, isso favorece a incidência de aderências ou infecções. Ao contrário de bovinos, no qual é utilizada a técnica de punção folicular orientada por ultrassom de forma eficiente (SANTL et al., 1998), em caprinos os resultados não foram satisfatórios (GRAAF et al., 1995) e, atualmente, os melhores resultados vêm sendo obtidos por meio de coleta de oócitos por laparoscopia (COL; BALDASSARRE, 2008). Esse procedimento é menos estressante ao animal, requer menos tempo que a laparotomia e pode ser repetido sem afetar em demasia o estado reprodutivo da doadora e a produção de oócitos (STANGL et al., 1999).

Para o procedimento de COL, as doadoras são colocadas em uma maca de contenção apropriada em plano inclinado e mantidas sob anestesia geral. Na laparoscopia, visualizam-se os ovários e aspiram-se os folículos de 2 a 6 mm de diâmetro, utilizando uma agulha conectada a um tubo de coleta, em sistema de vácuo (Ver Figura 10A e 10B). Quando executado por um técnico experiente, o procedimento leva de 15 a 20 min por fêmea, o que permite uma coleta de mais de 100 oócitos em uma sessão de 2 a 3 h (BALDASSARRE et al., 2002; BALDASSARRE; KARATZAS, 2004). A técnica pode ser feita associada ou não a tratamentos hormonais. É possível recuperar em média cinco oócitos por sessão de aspiração folicular em doadoras ovinas não tratadas (KUHHLER et al., 1997). Todavia, maior número de oócitos por

sessão de COL é alcançado quando protocolos superestimulatórios são empregados. As fêmeas doadoras, em geral, têm o seu estro sincronizado além de receber estímulo por gonadotrofinas. Diferentes combinações hormonais foram testadas para caprinos, principalmente com múltiplas aplicações de FSH ou aplicação única de FSH e eCG às 36 ou 48 h antes da COL. Usando esse último protocolo, durante quatro anos, pesquisadores obtiveram uma média de 13,4 oócitos por cabra em 1.580 laparoscopias (BALDASSARRE; KARATZAS, 2004). Em ovelhas, os regimes superovulatórios testados incluem tratamentos com doses constantes ou decrescentes de FSH ou eCG ou, ainda, dose única de eCG (BALDASSARRE et al., 1996; STANGL et al., 1999). Técnicos relatam uma média de 14,3 oócitos/ovelha (6.613 oócitos obtidos a partir da aspiração de 587 ovelhas) trabalhando comercialmente no Brasil, conforme revisado por Basso et al. (2008).



**Figura 10.** Sistema de coleta de oócitos por laparoscopia (COL) em fêmea caprina (A); Visualização do trato reprodutivo da doadora por meio de endoscópio (B).

Fonte: Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução (LFCR) da Universidade Estadual do Ceará (UECE).

Diversos fatores afetam o número de folículos disponíveis para a aspiração e a qualidade dos oócitos recuperados, dentre eles: idade; estado nutricional; protocolo hormonal empregado e a pressão de vácuo da bomba. Essa deve ser suficiente para aspirar o conteúdo do folículo sem,

no entanto, ser excessiva para causar a perda das células dos *cumulus*. O conteúdo folicular depois de aspirado é transportado para uma placa de Petri e, com auxílio de estereoscópio, os complexos *cumulus*-oócito (CCOs) são recuperados e classificados. A classificação dos oócitos baseia-se na sua morfologia, considerando-se os aspectos e integridade do citoplasma e das células do *cumulus*, como descrito na Tabela 6. Para manter a adesão das células do *cumulus* em oócitos de cabras e ovelhas, o uso rotineiro de agulhas 22 G e uma pressão de vácuo de 30 mmHg foram sugeridos por Freitas e Melo (2010).

**Tabela 6.** Critério para identificar o grau de complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) recuperados após coleta de oócitos por laparoscopia (COL) em pequenos ruminantes.

Característica	Grau
Multicamadas de células do <i>cumulus</i> e ooplasma homogêneo	I
Uma a três camadas de células do <i>cumulus</i> e ooplasma homogêneo	II
Oócito com morfologia anormal e ooplasma heterogêneo ou apoptótico	III
Oócitos com células do <i>cumulus</i> de aspecto coloidal	IV

Fonte: Adaptado de Freitas e Melo (2010).

### 6.1.2. Maturação *in vitro* (MIV)

A MIV envolve o cultivo dos oócitos imaturos para que eles atinjam o estágio da metáfase II da meiose e completem a maturação nuclear e citoplasmática, quando estarão prontos para serem fecundados. Um desafio para o sucesso da MIV é a grande heterogeneidade na qualidade dos oócitos, resultando em maior variabilidade na produção de embriões. Isso ocorre, pois apesar da classificação morfológica proposta, esses parâmetros podem não ser suficientes para prever a competência do oócito em se desenvolver após a fecundação (FONSECA et al., 2010).

Após classificação dos CCOs, eles são pipetados e transferidos para as placas com meio de maturação. A incubação é realizada em estufa a 39 °C, com 5% de CO<sub>2</sub> em ar e atmosfera úmida, por um período de 22 a 27 h. Oócitos de caprinos e ovinos são geralmente maturados em TCM 199 tamponados e suplementados com piruvato, soro tratado pelo calor e hormônios (FSH, LH, estradiol), dentre outros (BALDASSARRE et al., 1996). Estudos demonstram que o uso de diferentes compostos de tiol (cisteína, cisteamina, etc.) para meios de MIV melhoram o desenvolvi-

mento do embrião, aumentando a concentração intra-citoplasmática de glutathiona (GSH) e protegendo as células do estresse oxidativo do cultivo (PARAMIO, 2010). A função desses suplementos é tentar mimetizar as condições que os oócitos encontrariam *in vivo*. Utilizando esses meios, a porcentagem de maturação nuclear de oócitos obtidos por aspiração laparoscópica em cabras e ovelhas estimuladas com gonadotrofinas se encontra na ordem de 80 a 90%. Apesar disso, a maturação citoplasmática não ocorre de forma adequada *in vitro* e a taxa de desenvolvimento permanece em torno de 50% para essas estruturas. Já em oócitos maturados *in vivo*, o processo é mais eficiente, com 60 a 70 % dos oócitos ovulados se desenvolvendo até o estágio de blastocisto, após FIV e DIV (COGNIÉ; BARIL, 2002; COGNIÉ et al., 2003).

### 6.1.3. Fecundação *in vitro* (FIV)

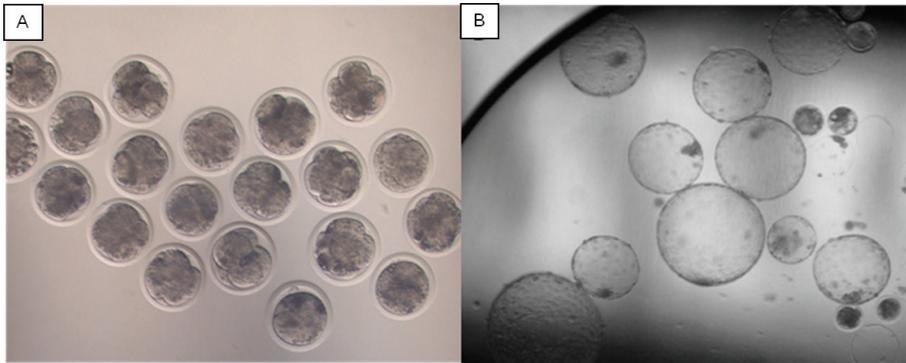
A fecundação dos oócitos maturados *in vitro* pode ser realizada com sêmen fresco ou congelado/descongelado. Em qualquer situação, é imprescindível a separação dos espermatozoides vivos dos mortos. Isso pode ser obtido por meio de técnicas como gradiente de Percoll ou *Swim-up*. Na seleção dos melhores espermatozoides, o gradiente de Percoll (45%/90%) parece uma boa escolha (COGNIE et al., 2003). Para que ocorra a fecundação, os espermatozoides devem ser capacitados, o que pode ser feito por meio de agentes indutores da capacitação como a heparina, previamente à coincubação com os oócitos (BALDASSARRE, 2008; BALDASSARRE; KARATZAS, 2004). A concentração de espermatozoides utilizada tem variado de 1 a  $3,5 \times 10^6$  células/mL, com duração de 16 a 20 h (BALDASSARRE; KARATZAS, 2004; COX; ALFARO, 2007). Ressalta-se que a concentração espermática elevada pode levar ao aumento do índice de polispermia, o que compromete a capacidade de desenvolvimento do embrião. A baixa concentração espermática na FIV torna viável o uso do sêmen sexado. Todavia, ainda não está disponível sêmen sexado comercialmente para caprinos e ovinos no Brasil (FONSECA et al., 2010). Depois da coincubação dos gametas, os presumíveis zigotos devem ser retirados do meio de fertilização e incubados em meio de DIV até o estágio de blastocisto.

#### 6.1.4. Desenvolvimento *in vitro* (DIV)

Enquanto as etapas anteriores são realizadas em estufa de incubação à atmosfera controlada de 5% de CO<sub>2</sub>, o DIV deve ser realizado em estufa contendo três gases (CO<sub>2</sub>, 5%; O<sub>2</sub>, 5% e N<sub>2</sub>, 90%) por sete a oito dias. Durante esse período, são utilizados meios de cultivo com componentes que permitam ao zigoto desenvolver-se até o estágio de blastocisto. Existem diferentes sistemas de cultivo embrionário *in vitro*, como por exemplo, o uso ou não de co-cultivo com células da granulosa. A melhoria das condições de cultivo nessas espécies depende da avaliação dos efeitos dos diversos componentes prováveis de terem ação benéfica sobre as taxas de produção e qualidade dos embriões, bem como, sobrevivência pós-descongelamento. Espera-se ainda que se produzam menores distúrbios moleculares e celulares.

Normalmente, a eficiência da FIV é verificada por meio de avaliação da taxa de clivagem (Figura 11A) às 48 ou 72 h após o seu término, enquanto a eficiência do sistema de DIV por meio da taxa de blastocistos (Figura 11B) em função ao número de estruturas clivadas. A taxa mais representativa do processo como um todo é a produção de blastocistos em função do número inicial de oócitos que foram colocados para MIV. A inovulação em receptoras previamente preparadas resulta em uma fertilidade ao parto inferior àquela obtida com embriões produzidos *in vivo*: 61% vs 89% (COGNIÉ et al., 2001). Todavia, conforme descrito anteriormente, vale lembrar que a PIVE possui algumas vantagens com relação à MOTE e mesmo com taxas de produção de embriões inferiores, em alguns casos ela é fortemente indicada.

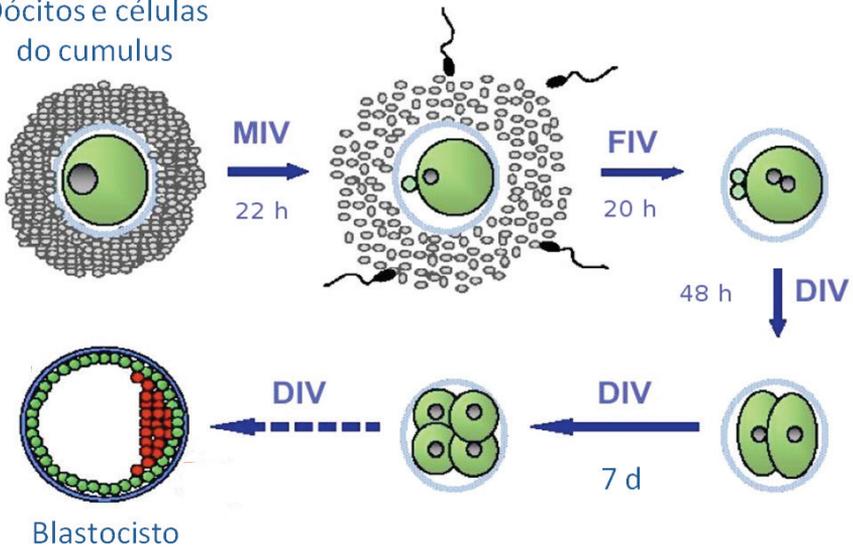
Os dados disponíveis na literatura já permitem afirmar a viabilidade da técnica para ovinos e caprinos. Entretanto, existe ainda um número limitado de estudos abordando seus vários aspectos, quando se compara com bovinos. Com o avanço das pesquisas e o estabelecimento de procedimentos de manipulação *in vitro*, a técnica tem potencial de atender a um mercado com infraestrutura já estabelecida pela demanda de embriões bovinos (FONSECA et al., 2010). Um esquema representativo da técnica de PIVE em pequenos ruminantes pode ser evidenciado na Figura 12.



**Figura 11.** A: Oócitos caprinos clivados às 48 h após a FIV. B: Visualização de embriões caprinos no oitavo dia após a FIV.

Fonte: INRA, Nouzilly, França.

Oócitos e células do cumulus



**Figura 12.** Esquema representativo das principais etapas da produção *in vitro* de embriões em pequenos ruminantes.

Fonte: Arquivo Pessoal.

## 6.2. Transgênese

### 6.2.1. Definição, técnica e aplicações

Poucos assuntos geram tanta controvérsia como os transgênicos. A transgênese é uma nova tecnologia que permite alterar as características fenotípicas dos animais pela troca direta de seu material genético. Como

o DNA contém um código genético universal, que é comum a todos os organismos vivos, a princípio pode-se transferi-lo a organismos não pertencentes à mesma espécie, originando organismos com características peculiares e “úteis” que, de forma natural não poderia ocorrer. Uma definição mais pontual é que transgênicos são animais ou organismos cujo patrimônio genético foi manipulado artificialmente pela introdução, modificação ou deleção de uma sequência de DNA no seu genoma. A alteração é observada em todas as células, incluindo-se a linhagem de células germinativas, de tal forma que seja transferida aos seus descendentes (FUKAMIZU, 1993). A técnica hoje mais difundida e utilizada para obtenção de animais transgênicos é a microinjeção pró-nuclear. Como o próprio nome sugere, a microinjeção pró-nuclear consiste na injeção de uma solução de DNA, contendo o gene de interesse, no pró-núcleo de um oócito recém-fecundado. Os embriões são cultivados e transferidos para uma fêmea. As crias que receberam o gene de interesse são identificadas por técnicas moleculares (PEREIRA, 2008).

Entre as vantagens da transgênese, é possível destacar: **Especificidade** – A característica requerida pode ser escolhida com muito mais precisão, assim os riscos indesejáveis reduzem bastante; **Velocidade** – Pode-se estabelecer uma característica desejada em uma geração, enquanto que, na reprodução seletiva, seriam necessárias muitas gerações e **Economia** – Podem-se introduzir novas características nos animais, para reduzir suas necessidades alimentícias e tratamento médico-veterinário. Já com relação às desvantagens, é preciso salientar: **Saúde do animal** – A inserção de um transgene pode alterar a expressão do genoma (“homeostasia” do animal) e **Transmissão de vírus** – Particularmente preocupante no caso da reprodução de animais como doadores de tecidos.

A tecnologia de transgênese vem sendo aplicada em diversos seres vivos e com inúmeros propósitos. As aplicações médicas são várias e incluem o polêmico xenotransplante, ou seja, o transplante de órgãos animais para o ser humano. Estima-se que, a cada ano sejam necessários 5.000 órgãos para transplantes apenas nos Estados Unidos e essa demanda não é atendida por doadores. Nesse sentido, a transgenia vem

sendo utilizada para a criação de suínos imuno-compatíveis com o ser humano. Foi possível produzir uma linhagem de suínos que não expressa uma proteína imunogênica em seres humanos, e, atualmente, está sendo testado o transplante de corações desses animais para macacos. O xenotransplante pode resolver a questão da disponibilidade de órgãos para transplantes, contudo, as questões de biossegurança devem ser fortemente analisadas. Animais transgênicos ainda representam uma poderosa ferramenta de pesquisa para a descoberta e o desenvolvimento de novos tratamentos para várias doenças humanas. É possível introduzir genes mutantes de humanos em ratos, induzindo determinada doença para poder estudá-la e conhecê-la melhor, com a finalidade de se buscar sua cura, sem a necessidade de os seres humanos passarem por testes experimentais. Uma vez estabelecido, o modelo transgênico, por exemplo, pode ser usado para o estudo de mecanismos moleculares que contribuem na patogênese de uma doença, para identificar agentes que possam eliminá-la, retardar sua progressão ou melhorar seus sintomas (PEREIRA, 2008).

Entre as aplicações da transgênese, provavelmente a mais concreta e frequente é a utilização de biorreatores para produção em grande escala de proteínas de interesse farmacêutico, em algum tecido de fácil purificação. Produtos como insulina, hormônio de crescimento e fator de coagulação podem ser obtidos do leite de cabras ou ovelhas transgênicas. A espécie caprina tem representado um excelente modelo, já que a produção de animais transgênicos e os custos operacionais são significativamente inferiores em relação aos bovinos. Um exemplo é a cabra transgênica que produz em seu leite uma proteína da teia de aranha. Sua purificação em grande escala, a partir do leite, permite a criação de um material leve e flexível com enorme resistência, que poderá ser usado em aplicações militares (coletes e uniformes a prova de bala) e médicas (fio de sutura), entre outras (BALDASSARRE, 2008; PEREIRA, 2008). No que diz respeito à produção animal, alterações genéticas em animais criados para fins comerciais podem levá-los a um crescimento acelerado em um menor espaço de tempo, carne com índice de gordura reduzido ou, ainda, redução da sensibilidade a doenças.

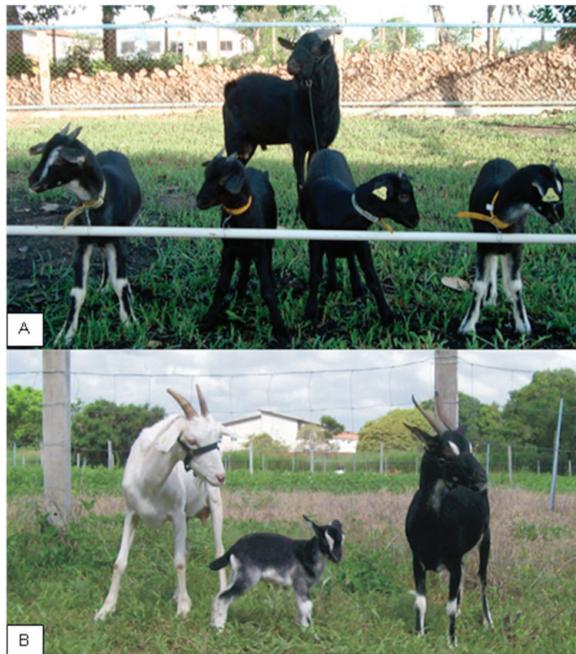
### 6.2.2. Transgênicos no mundo e no Brasil

Diversas empresas privadas, universidades ou centros de pesquisa de países como o Canadá, Estados Unidos, Inglaterra, França, Israel, Coreia do Sul, China e Brasil têm produzido caprinos biorreatores (MOURA, 2008). Atualmente, somente uma proteína recombinante de origem animal, a antitrombina humana (Atryn®), produzida por caprinos transgênicos, foi liberada como medicamento para uso clínico em humanos, na Europa e nos Estados Unidos (KLING, 2009; SCHMIDT, 2006). Pesquisadores de várias áreas vêm utilizando, de forma crescente, esses animais, tornando essa tecnologia uma poderosa ferramenta no desenvolvimento de novas drogas terapêuticas, na produção de moléculas comercialmente importantes, na elucidação de mecanismos biológicos, entre muitas outras aplicações.

Apesar de já ser rotineiramente empregada em laboratórios comerciais e de pesquisa em muitos países, a tecnologia para a geração de animais transgênicos ainda é incipiente no Brasil. Em dezembro de 2001, Vítor, o primeiro animal transgênico (camundongo) produzido no Brasil pela técnica de microinjeção pró-nuclear, foi obtido (PESQUEIRO et al., 2002). Esse fato representou um marco na produção nacional de animais transgênicos. Em ruminantes, o Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução (LFCR) da Universidade Estadual do Ceará (UECE) foi pioneiro em obter os primeiros caprinos nascidos por microinjeção pró-nuclear (FREITAS et al., 2003), e o primeiro caprino transgênico da América Latina (FREITAS et al., 2007). Esse animal era transgênico para o Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos humano (hG-CSF), proteína que estimula o crescimento e diferenciação das células de defesa no ser humano, principalmente neutrófilos. Posteriormente, o laboratório obteve um casal caprino da raça naturalizada Canindé transgênico para a mesma proteína e crias de ambas as linhagens (Figuras 13A e 13B).

Vale lembrar que da produção de animais biorreatores até a comercialização da proteína humana de interesse para uso clínico, várias eta-

pas são necessárias. Elas vão desde avaliações referentes ao próprio animal transgênico, à proteína em questão, até testes pré-clínicos e clínicos antes da proteína ser aprovada para uso humano. No Brasil, a Instituição que deseja trabalhar com células e animais transgênicos deve acatar as recomendações da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), já que o uso dessa biotecnologia deve seguir leis específicas (CLARK, 1998; MOURA, 2008). A tecnologia transgênica em animais, ainda se encontra em fase experimental. Com o tempo e experiência, poderá vir a ser extensamente utilizada. Nessa fase, é possível ver as potenciais vantagens e prever os possíveis riscos que essa nova técnica possa acarretar. O público em geral manifesta a sua preocupação perante essa tecnologia. Contudo, a tecnologia genética é demasiado prometedora para ser rejeitada com base na desconfiança.



**Figura 13.** Macho caprino transgênico da raça Canindé para o hG-CSF com quatro crias transgênicas (A); Fêmea caprina transgênica da raça Canindé para o hG-CSF com uma cria transgênica e a receptora sem padrão racial definido (B).

Fonte: Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução (LFCR) da Universidade Estadual do Ceará (UECE).

## 6.3. Clonagem ou transferência nuclear de células somáticas (TNCS)

### 6.3.1. Definição, técnica e aplicações

Clonagem é a produção de indivíduos geneticamente iguais. A técnica de TNCS está inserida no contexto das biotecnologias da reprodução animal e suas aplicações são muito amplas. Essa técnica se divide em duas etapas. A primeira consiste na obtenção e utilização de oócitos enucleados (sem o núcleo) de uma fêmea qualquer. A segunda é a reconstrução do embrião utilizando essa primeira estrutura obtida e o núcleo de uma célula somática de um animal de interesse (que vai ser clonado), após fusão entre ambas. Esse embrião é então transferido para uma receptora, a qual irá parir um indivíduo clone. Teoricamente, qualquer célula somática pode ser utilizada para esse fim, contudo, algumas são mais indicadas devido à maior capacidade de reprogramação celular, como as células da glândula mamária, fibroblastos, células do *cumulus*, condrócitos, leucócitos e células tronco embrionárias (PEREIRA; FREITAS, 2009).

Entre as vantagens da clonagem, é possível destacar:

1. *Conservação* – Existe a possibilidade de clonar animais ameaçados de extinção;
2. *Estudos na medicina humana* – Produção de células totipotentes capazes de se diferenciarem em quaisquer linhagens celulares, que poderiam, por exemplo, ser utilizadas para regeneração do pâncreas para diabéticos ou células sanguíneas para leucêmicos; e
3. *Transgênese* – Gera a possibilidade de gerar clones transgênicos.

Todavia, essa técnica também possui algumas desvantagens, como:

1. *Custos* – Demanda grandes investimentos financeiros e de recursos humanos;
2. *Ética* – A clonagem motiva conflitos, sobretudo no aspecto religioso; e
3. *Eficiência* – A maior parte dos clones morre precocemente.

Os problemas associados com a técnica de TNCS são em decorrência dos danos gerados em ambas as células envolvidas no processo, resultando numa taxa elevada de mortalidade dos embriões. Sem dúvida, o

melhor exemplo do uso da TNCS para a preservação de espécies em risco de extinção ou recuperação de espécies extintas é o *bucardo* (*Capra pyrenaica pyrenaica*). A população de *bucardo* era abundante nos Pirineus, mas diminuiu bruscamente, provavelmente em função da pressão de caça, restando apenas três fêmeas idosas em 1989. Em 1999, apenas uma fêmea *bucardo* com cerca de 12 anos de idade encontrava-se viva. Amostras de pele foram obtidas dessa fêmea, multiplicadas e criopreservadas. Essa fêmea veio a óbito em 2000 e o governo espanhol declarou o *bucardo* extinto. Experimentos foram conduzidos e foi possível o nascimento de uma fêmea *bucardo* morfológicamente normal (FOLCH et al., 2009).

Talvez a mais importante aplicação da TNCS esteja mesmo na associação com a tecnologia de modificação genética, os clones transgênicos. A produção da ovelha “Polly”, obtida a partir de células transfectadas com gene humano e capaz de produzir o fator IX humano com valor terapêutico é um exemplo disso (NEVES et al., 2010; PEREIRA; FREITAS, 2009; SCHNIEKE et al., 1997).

### 6.3.2. Clonagem no mundo e no Brasil

Da mesma forma que na transgênese, a pesquisa envolvendo a produção de clones bovinos é mais onerosa, e o uso de pequenos ruminantes como modelo tornou-se uma possibilidade viável. O primeiro mamífero nascido clonado pela técnica de TNCS foi a “Dolly” (WILMUT et al., 1997), a partir da célula de uma ovelha de seis anos de idade, que ocorreu após 276 tentativas fracassadas (ZATZ, 2004). Os pesquisadores usaram uma célula da glândula mamária, cujo núcleo foi retirado e transferido para um oócito enucleado. Esse novo embrião formado foi então implantado no útero de uma terceira ovelha, onde Dolly foi gerada (WILMUT et al., 1997).

No Brasil, clones bovinos já foram conseguidos a partir de células embrionárias, fetais e adultas. Em março de 2001 nasceu a bezerro “Vitória”, primeiro animal produzido por TNCS na América Latina por pesquisadores da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia a partir de células embrionárias. Com o objetivo de fazer uma TNCS de

um animal clone, foi produzida a “Vitoriosa da Embrapa” - primeiro clone do clone da América Latina (Revisado por NEVES et al., 2010). Em 2005 foi produzido o primeiro ovino clone derivado de células da pele de um carneiro adulto por pesquisadores da Universidade de São Paulo (TRALDI et al., 2007b). Apenas em 2010, pesquisadores do LFCR, da UECE, obtiveram os primeiros blastocistos clones caprinos utilizando células da pele de um animal transgênico adulto (ALCÂNTARA NETO et al., 2010).

#### **6.4. Implicações e perspectivas**

A possibilidade de aumentar o número de repetições de coleta de oócitos utilizando a técnica de laparoscopia associado aos resultados de desenvolvimento embrionário obtidos após MIV, FIV e DIV pode impulsionar a eficiência reprodutiva e produtiva de pequenos ruminantes. A transgênese, por sua vez, ainda apresenta eficiência muito baixa atualmente. Todavia, quando ela é feita com sucesso sendo possível o nascimento de animais transgênicos, torna-se uma biotécnica interessante tanto para fins de produção comercial como de pesquisa fundamental. A associação da transgênese com a clonagem pode facilitar uma multiplicação mais rápida desses animais.

### **7. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os avanços da fronteira do conhecimento na área da biotecnologia associadas à reprodução de caprinos e ovinos apresentou aumento significativo nas últimas décadas. Esses avanços foram possíveis graças ao uso de técnicas consagradas como a laparoscopia e ultrassonografia em tempo real e ao aumento de interesse pela reprodução destes animais. Em todo o mundo, grupos de pesquisadores, referências em outras espécies, e também de pesquisadores emergentes, passaram a focar esse tema. Como consequência, técnicas, outrora eficientes e incontestáveis, são substituídas cada vez mais por outras tão ou mais eficientes, menos invasivas e menos onerosas. Todas essas ferramentas de controle, manipulação e potencialização da reprodução,

se adequadamente orientadas, prestar-se-ão a inúmeras finalidades, desde a simples multiplicação em massa, passando pela preservação das espécies e raças e, chegando a obtenção, em escala, de fármacos com potencial de uso humano.

## 8. REFERÊNCIAS

ABECIA, J. A.; FORCADA, F.; GONZÁLEZ-BULNES, A. Pharmaceutical control of reproduction in sheep and goats. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v. 27, n. 1, p. 67-79, Mar. 2011.

ALCÂNTARA NETO, A. S.; CARNEIRO, I. S.; PEREIRA, A. F.; ALMEIDA, K. C.; FELTRIN, C.; LIMA-VERDE, J.B.; BERTOLINI, L. R.; MELO, L. M.; FREITAS, V. J. F.; BERTOLINI, M. Handmade cloning in goats. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 38, supl. 2, s797, 2010. Abstracts 193. 24th. Brazilian Embryo Technology Society (SBTE) Annual Meeting, Porto de Galinhas, PE, Brasil, Ago. 2010.

ANDRADE, J. S. **Sêmen caprino congelado**: efeito de dois diluentes sobre a taxa de fertilidade. 1996. 53 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

ANDRIOLI, A.; SIMPLÍCIO, A. A.; SOARES, A. T.; VISINTIN, J. A. Eficiência da recuperação de embriões e os efeitos de consecutivas colheitas sobre o aparelho reprodutor de doadoras da espécie caprina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 36, n. 3, p. 136-143, 1999. Disponível em: < <http://www.scielo.br/scieloOrg/php/articleXML.php?pid=S1413-95961999000300006&lang=en> > . Acesso em: 15 fev. 2013.

ARMSTRONG, D. T.; EVANS, G. Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats. **Theriogenology**, Butterworths, v. 19, n. 1, p. 31-42, Jan. 1983.

ARMSTRONG, D. T.; PFITZNER, A. P.; WARNES, G. M.; SEAMARK, R. F. Superovulation treatments and embryo transfer in Angora goats. **Journal Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 67, n. 2, 403-410, Mar. 1983.

BALDASSARRE, H. Coleta, conservação e transferência de embrião. In: AISEN, E.G. **Reprodução ovina e caprina**. São Paulo: MedVet., 2008. p. 143-152.

BALDASSARRE, H.; FURNUS, C. C.; DEMATOS, D. G.; PESSI, H. *In vitro* production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis: alternative gonadotrophin treatments for stimulation of oocyte donors. **Theriogenology**, Butterworths, v. 45, n. 3, p. 707-717, Feb. 1996.

BALDASSARRE, H.; KARATZAS, C. N. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 82/83, p. 255-266, Jul., 2004. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S037843200400082X>>. Acesso em: 15 fev. 2013.

BALDASSARRE, H.; WANG, B.; KAFIDI, N.; KEEFER, C.; LAZARIS, A.; KARATZAS, C. N. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pickup and *in vitro* embryo production technologies. **Theriogenology**, Butterworths, v. 57, n. 1, p. 275-284, Jan. 2002.

BARIL, G.; REMY, B.; LEOEUF, B.; BECKERS, J. F.; SAUMANDE, J. Synchronization of estrus in goats: the relationship between eCG binding in plasma, time of occurrence of estrus and fertility following artificial insemination. **Theriogenology**, Butterworths, v. 45, n. 8, p. 1553-1559, June, 1996.

BARIL, G.; TRALDI, A.S.; COGNIÉ, Y.; LEOEUF, B.; BECKERS, J. F.; MERMILLOD, P. Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. **Theriogenology**, Butterworths, v. 56, n. 2, p. 299-305, Jul., 2001.

BARRETT, D. M.; BARTLEWSKI, P. M.; DUGGAVATHI, R.; DAVIES, K. L.; HUCHKOWSKY, S. L.; EPP, T.; RAWLINGS, N. C. Synchronization of follicular wave emergence in the seasonally anestrous ewe: The effects of estradiol with or without medroxyprogesterone acetate. **Theriogenology**, Butterworths, v. 69, n. 7, p. 827-836, Apr., 2008.

BASSO, C. A.; MARTINS, J. F. P.; FERREIRA, C. R.; ERENO, A.; TANNURA, J.; TABET, A.; FIGUEIREDO, C. L.; OLIVEIRA, P. C.; PONTES, J. H. F. Produção *in vitro* de embriões ovinos: aspectos da técnica de aspiração folicular e do tratamento hormonal de doadoras. **O Embrião**, Jaboticabal, v. 10, n. 38, p. 8-11, nov./dez., 2008.

BERGAMASCHI, H. **Fotoperiodismo**. 2006. Disponível em: < <http://www2.ufpel.edu.br/faem/agrometeorologia/Fotoper.pdf> >. Acesso em: 23 jun. 2009.

BERLINGUER, F.; GONZÁLEZ-BULNES, A. SUCCU, S.; LEONI, G.; MOSSA, F.; BEBBERE, D.; ARIZNAVARRETA, C.; TRESGUERRES, J. A. F.; VEIGA-LOPEZ, A.; NAITANA, S. Effects of progestagens on follicular growth and oocyte developmental competence in FSH-treated ewes. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 32, n. 4, P. 303-14, May, 2007.

BETTENCOURT, E. M.; BETTENCOURT, C. M.; SILVA, J. C. e; FERREIRA, P.; MATOS, C. P.; ROMÃO, R. J.; ROCHA, A. Fertility rates following the transfer of ovine embryos cryopreserved using three protocols. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 82, n. 2/3, p. 112-116, Apr. 2009.

BODIN, L.; DRION, P.V.; REMY, B.; BRICE, G.; COGNIÉ, Y.; BECKERS, J. F. Anti-PMSG antibody levels in sheep subjected annually to oestrus synchronization. **Reproduction, Nutrition, Development**, Paris, v. 37, n. 6, p. 651-60, Nov./Dec. 1997. Disponível em: < <http://hal.archives-ouvertes.fr/docs/00/90/00/59/PDF/hal-00900059.pdf> >. Acesso em: 15 fev. 2013.

BOLAND, M. P.; GOULDING, D.; ROCHE, J. F. Alternative gonadotropins

for superovulation in cattle. **Theriogenology**, Butterworths, v. 35, n. 1, p. 5-17, 1991.

CELI, I.; GATICA, M.C.; GUSMAN, J.L.; GALLEGO-CALVO, L.; ZARAZAGA, L.A. Influence of the male effect on the reproductive performance of female Payoya goats implanted with melatonin at the winter solstice. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 137, n. 3/4, p. 183-188, 2013.

CHEMINEAU, P.; GUILLAUME, D.; MIGAUD, M.; THIÉRY, J.C.; PELLICER-RUBIO, M.T.; MALPAUX, B. Seasonality of Reproduction in Mammals: Intimate Regulatory Mechanisms and Practical Implications. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 43, supl. 2, p. 40-47, Juy. 2008.

CHEMINEAU, P.; PELLETIER, J.; GUÉRIN, Y.; COLAS, G.; RAVAUULT, J. P.; TOURÉ, G.; ALMEIDA, G.; THIMONIER, J.; ORTAVANT, R. Photoperiodic and melatonin treatments for the control of seasonal reproduction in sheep and goats. **Reproduction Nutrition, Development**, Paris, v. 28, n. 2B, p. 409-422, 1988.

CHUPIN, D.; PROCUREUR, R. Efficiency of pituitary extracts (FSH) for induction of superovulation in cattle: effect of injection regimen. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 6, p. 11-23, 1985.

CLARK, A. J. The mammary gland as a bioreactor: expression, processing and production of recombinant proteins. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, New York, v. 3, n. 3, p. 337-350, 1998.

COCERO, M. J.; SEBASTIAN, A. L.; BARRAGAN, M. L.; PICAZO, R. A. Differences on post-thawing survival between ovine morulae and cryopreserved blastocysts with ethylene glycol or glycerol. **Cryobiology**, San Diego, v. 33, n. 5, p. 502-507, Oct., 1996.

COGNIÉ, Y. State of the art in sheep-goat embryo transfer. **Theriogenology**, Butterworths, v. 51, n. 1, p. 105-116, Jan. 1999.

COGNIÉ, Y.; BARIL, G. Le point sur la production et le transfert d'embryons obtenus *in vivo* e *in vitro* chez la brebis e la chèvre. **Productions Animales**, Paris, v. 15, n. 2, p. 199-207, 2002. Disponível em: <[http://www6.inra.fr/productions-animales/content/download/3887/40104/version/1/file/Prod\\_Anim\\_2002\\_15\\_3\\_05.pdf](http://www6.inra.fr/productions-animales/content/download/3887/40104/version/1/file/Prod_Anim_2002_15_3_05.pdf)>. Acesso em: 12 mar. 2013.

COGNIÉ, Y.; BARIL, G.; POULIN, N.; MERMILLOD, P. Current status of embryo technologies in sheep and goat. **Theriogenology**, Butterworths, v. 59, n. 1, p. 171-88, Jan. 2003.

COGNIÉ, Y.; POULIN, N.; BARIL, G.; GUIGNOT, F.; BECKERS, J. F.; MERMILLOD, P. Embryo survival after transfer of *in vitro* and *in vivo* produced goat embryos. In: SCIENTIFIC MEETING OF EUROPEAN EMBRYO TRANSFER ASSOCIATION, 17., 2001, Lyon. **Proceedings...** Lyon: EETA, 2001. p. 110.

CORDEIRO, M. F.; LIMA-VERDE, J. B.; LOPES-JÚNIOR, E. S.; TEIXEIRA, D. I. A.; FARIAS, L. N.; SALES, H. O.; SIMPLÍCIO, A. A.; RONDINA, D.; FREITAS, V. J. F. Embryo recovery rate in Santa Inês ewes subjected to successive superovulatory treatments with pFSH. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 49, n. 1, p. 19-23, Jul. 2003.

CORDEIRO, P. R. C. Sincronização de estro em cabras leiteiras puras de origem com fotoperiodismo artificial. In: CONGRESSO MUNDIAL VETERINÁRIA, 24., 1991, Rio de Janeiro. **Resumos...** Rio de Janeiro: Associação Mundial de Veterinária, 1991.

COX, J. F.; ALFARO, V. *In vitro* fertilization and development of OPU derived goat and sheep oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 42, n. 1, p. 83-87, Feb. 2007.

D'ALESSANDRO, A. G.; MARTEMUCCI, G.; COLONNA, M. A.; BORGHESE, A.; TERZANO, M. G.; BELLITTI, A. Superovulation in ewes by a single injection of pFSH dissolved in polyvinylpyrrolidone (PVP): effects of PVP molecular weight, concentration and schedule of treatment. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 65, n. 3/4, p. 255-264, Feb. 2001.

D'ALESSANDRO, A. G.; MARTEMUCCI, G.; TAIBI, L. How the FSH/LH ratio and dose numbers in the p-FSH administration treatment regimen, and insemination schedule affect superovulatory response in ewes. *Theriogenology*, Butterworths, v. 63, n. 6, p. 1764-1774, Apr. 2005.

DELGADILLO, J. A.; FLORES, J. A.; VÉLIZ, F. G.; DUARTE, G.; VIELMA, J.; HERNANDEZ, H.; FERNANDEZ, I. G. Importance of the signals provided by the Buck for the success of the male effect in goats. *Reproduction Nutrition Development*, Paris, v. 46, n. 2, p. 391-400, Jul./Aug. 2006.

DELGADILLO, J. A.; GELEZ, H.; UNGERFELD, R.; HAWKEN, P. A. R.; MARTIN, G. B. The 'male effect' in sheep and goats: revisiting the dogmas. **Behavioural Brain Research**, Amsterdam, v. 200, n. 2, p. 304-314, June, 2009.

DEMOUSTIER, M. M.; BECKERS, J.-F.; VAN DER ZWALMEN, P.; CLOSSET, J.; GILLARD, J.-L.; ECTORS, F. Determination of porcine plasma levels during superovulation treatment in cows. **Theriogenology**, Butterworths, v. 30, n. 2, p. 379-386, Aug. 1988.

DESHPANDE, D.; RAVINDRA, J. P.; NARENDRANATH, R.; NARAYANA, K. Ovarian antral follicular dynamics and serum progesterone concentration during the oestrous cycle of Bannur ewes. **The Indian Journal of Animal Science**, New Delhi, v. 69, n. 11, p. 932-934, 1999.

DEVESON, S. L.; FORSYTH, I. A.; ARENDT, J. Induced out of season breeding in British Saanen dairy goats: use of artificial photoperiods and/or melatonin administration. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 29, n. 2-3, p. 1-15, Sept. 1992.

DIAS, F. E. F.; LOPES JUNIOR, E. S. L.; VILLAROEL, A. B. S.; RONDINA, D.; LIMA-VERDE, J. B.; PAULA, N. R. O.; FREITAS, V. J. F. Sincronização do estro, indução da ovulação e fertilidade de ovelhas deslanadas após tratamento hormonal com gonadotrofina coriônica equina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 53, n. 5, p. 618-623, out. 2001.

DRIANCOURT, D. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals: implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, Butterworths, v. 55, n. 6, p. 1211-1239, Apr. 2001.

ESPESCHIT, C. J. B. Alternativas para o controle da estacionalidade reprodutiva de cabras leiteiras. In: ENCONTRO NACIONAL PARA O DESENVOLVIMENTO DA ESPÉCIE CAPRINA, 5., 1998, Botucatu. **Anais...** Botucatu: UNESP/FMVZ; Capripaulo, 1998. p. 7-33.

ESPESCHIT, C. J. B. **Sincronização do estro em cabras tratadas com progestágeno (MAP) associado a gonadotropina sérica (PMSG) e cloprostenol**. 1986. 64 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

EVANS, A. C. O. Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 78, n. 3/4, p. 289-306, Oct. 2003.

EVANS, C.; DUFFY, P.; HYNES, N.; BOLAND, M. P. Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. **Theriogenology**, Butterworths, v. 53, n. 3, p. 699-715, 2000.

EVANS, G.; MAXWELL, V. M. C. **Salamon's artificial insemination of sheep and goats**. Sydney : Butterworths, 1987. 194 p.

FLORES-FOXWORTH, G. Reproductive Biotechnologies in the Goat. In: YOUNGQUIST, R. S. THRELFALL, W. R. (Ed.). **Current therapy in large animal, theriogenology**. 2<sup>th</sup>. ed. St. Louis: Saunders Elsevier, 2007. p. 603-614.

FOLCH, J.; COCERO, M. J.; CHESNÉ, P.; ALABART, J. L.; DOMÍNGUEZ, V.; COGNIÉ, Y.; ROCHE, A.; FERNÁNDEZ-ARIAS, A.; MARTÍ, J. I.; SÁNCHEZ, P.; ECHEGOYEN, E.; BECKERS, J. F.; SÁNCHEZ BONASTRE, A.; VIGNON, X. First birth of an animal from an extinct subspecies (*Capra pyrenaica pyrenaica*) by cloning. **Theriogenology**, Butterworths, v. 71, n. 6, p. 1026-1034, Apr. 2009.

FONSECA, J. F. da. Alguns aspectos da transferência de embriões em caprinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 34, supl. 2, p. 65-70, 2006a. Edição da Reunião 20 Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Araxá, MG, ago. 2006b. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/52210/1/AAC-Alguns-aspectos.pdf>>. Acesso em: 5 mar., 2013.

FONSECA, J. F. da. **Biotecnologias da reprodução em ovinos e caprinos**. Sobral: Embrapa Caprinos, 2006b. 30 p. (Embrapa Caprinos. Documentos, 64). Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPC/20258/1/doc64.pdf>>. Acesso em: 5 fev. 2013.

FONSECA, J. F. da. **Controle e perfil hormonal do ciclo estral e performance reprodutiva de cabras Alpinas e Saanen**. 2002. 107 f. Tese (Doctor Scientiae) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG. Disponível em: <<http://alexandria.cpd.ufv.br:8000/teses/zootecnia/2002/175008f.pdf>>. Acesso em: 17 mar. 2013.

FONSECA, J. F. da. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiânia. **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2005. 9 f. 1 Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/44472/1/AAC-Estrategias-para-o-controle.pdf>>. Acesso em: 12 mar. 2013.

FONSECA, J. F. da; ALVIM, G.P.; LOBO, A. M. B. O.; FACÓ, O. **Técnica Embrapa de inseminação artificial transcervical em caprinos por meio de fixação cervical**. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2011a. 7 p. (Embrapa Caprinos e Ovinos. Circular Técnica, 43).

FONSECA, J. F. da; BRUSCHI, J. H. A caprinocultura leiteira no Brasil: uma visão histórica. In: FONSECA, J. F. da; BRUSCHI, J. H. (Ed.). **Produção de caprinos na região da Mata Atlântica**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite; Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2009a. p. 15-24.

FONSECA, J. F. da; BRUSCHI, J. H. Introdução. In: FONSECA, J. F.;

BRUSCHI, J. H. (Ed.). **Produção de caprinos na região da Mata Atlântica**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite; Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos, 2009b. p. 11-13.

FONSECA, J. F. da; BRUSCHI, J. H.; VIANA, J. H. M. Freezing goat embryos using ethylene glycol and a slow cooling rate. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE EUROPEAN SOCIETY FOR REPRODUCTION IN DOMESTIC ANIMALS, 9., 2005, Murcia. **Proceedings...** Utrecht: European Society for Domestic Animal Reproduction, 2005a.

FONSECA, J. F. da; BRUSCHI, J. H.; ZAMBRINI, F. N.; DEMCZUK, E.; VIANA, J. H. M.; PALHÃO, M. P. Induction of synchronized estrus in dairy goats with different gonadotrophins. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 2, n. 1, p. 50-53, jan./mar., 2005b. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/52421/1/API-Induction-of-synchronized.pdf>>. Acesso em: 5 abr. 2013.

FONSECA, J. F. da; CRUZ, R. C.; PINTO, P. H. N.; FACÓ, O. Inseminação Artificial em Ovinos e Caprinos. In: WORKSHOP SOBRE CIÊNCIA ANIMAL NA BAHIA, 1., 2010, Ilhéus. **Anais...** Ilhéus: UESC, 2010. 1 CD-ROM.

FONSECA, J. F. da; LOBO, R. N. B.; VILLELA, L. C. V.; COUTO, J. F. Timed artificial insemination (TAI) in Saanen goats. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 42, p. 139, 2007. Suppl. 2, Abstracts P230. Poster Abstracts 11<sup>st</sup> Annual Conference ESDAR, 2007. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/85859/1/RAC-Timed-artificial-insemination.pdf>>. Acesso em: 5 mar. 2013.

FONSECA, J. F. da; OLIVEIRA, M. E. F.; VIANA, J. H. M. Uso de procedimentos não cirúrgicos para a produção, recuperação e inovulação de embriões em pequenos ruminantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p. 113-117, abr./jun. 2011b. Palestra apresentada no XIX Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Recife, PE, Brasil, maio de 2011. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/51919/1/API-Uso-de-procedimentos.pdf>>. Acesso em: 5 jan. 2013.

FONSECA, J. F. da; SILVA FILHO, J. M.; PINTO NETO, A.; PALHARES, M. S. Estádios de desenvolvimento embrionário de vacas zebuínas superovuladas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 53, n. 6, p. 671-676, 2001. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v53n6/a10v53n6.pdf>>. Acesso em: 5 mar. 2013.

FONSECA, J. F. da; SIMPLÍCIO, A. A. Inseminação artificial e transferência de embrião em ovinos e caprinos. In: ENCONTRO INTERNACIONAL DA PECUÁRIA DA AMAZÔNIA, 1., 2008, Belém, PA. **Meio ambiente e pecuária**: [anais]. Belém, PA: FAEPA; Instituto Frutal; SEBRAE-PA, 2008. 21 f. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/43347/1/AAC-Insemincao-artificial.pdf>>. Acesso em: 5 mar. 2013.

FONSECA, J. F. da; SOUZA, J. M. G.; BRUSCHI J. H. Considerações sobre eficiência reprodutiva no sistema de produção. In: SIMPÓSIO MINEIRO DE OVINOCULTURA, 5., 2009, Lavras. **Sustentabilidade e perspectivas**: anais. Lavras: UFLA, 2009. p. 152-180, 2009.

FONSECA, J. F. da; SOUZA, J. M. G. de; BRUSCHI, J. H. Sincronização de estro e superovulação em caprinos e ovinos. In: SIMPÓSIO DE CAPRINOS E OVINOS DA EV-UFGM, 2., 2007, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: UFGM, 2007. p. 167-194.

FONSECA, J. F. da; SOUZA, J. M. G. de; CAMARGO, L. S. A. Estado da arte de ovócitos e embriões de caprinos e ovinos: passado, presente, futuro. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 38, supl. s353-369, 2010. Edição dos resumos da 25ª. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Porto de Galinhas, PE, 2010. Disponível em: <[http://www.ufrgs.br/actavet/38-suple-2/03\\_SBTE\\_RUMINANTES.pdf](http://www.ufrgs.br/actavet/38-suple-2/03_SBTE_RUMINANTES.pdf)>. Acesso em: 5 mar. 2013.

FONSECA, J. F. da; VIANA, J. H. M.; BRUSCHI, J. H.; ZAMBRINI, J. H.; PALHÃO, M. P.; SANTOS, A. F. A. Resposta superovulatória de cabras Saanen lactantes a protocolos curtos e a somatotropina bovina recombinante (rbST). **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 33,

supl. 1, p. s243, 2005c. Edição dos resumos da 19ª. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Angra dos Reis, RJ, ago., 2005. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/60055/1/RAC-Resposta-superovulatoria.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

FRAZÃO SOBRINHO, J. M.; VIEIRA, R. J.; MACEDO, N. A.; SOUZA JÚNIOR, A.; CAVALCANTE, V. C.; SILVA, J. M. Fertilidade de cabras SRD inseminadas por via transcervical de acordo com o local de deposição do sêmen e número de inseminações. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiânia. [Anais...]. [Belo Horizonte: CBRA], 2005.

FREITAS, V. J. de F.; BARIL, G.; SAUMANDE, J. Estrus synchronization in dairy goats: use of fluorogestone acetate vaginal sponges or norgestomet ear implant. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 46, n. 3/4 p. 237-244, Apr. 1997.

FREITAS, V. J. de F.; MELO, L. M. In vitro embryo production in small ruminants. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 39, p. 409-413, 2010. Suplemento especial. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbz/v39sspe/45.pdf>>. Acesso em: 5 fev. 2013.

FREITAS, V. J. F.; RUBIANES, E. Preparacións de las hembras. Detección y control del estro y la ovulación. In: AISEN, E. G. (Ed.). **Reproduccion ovina y caprina**, Buenos Aires: Inter-Médica, 2004. p. 87-98.

FREITAS, V. J. de F.; SEROVA, I. A.; ANDREEVA, L. E.; DVORYANCHIKOV, G. A.; LOPES JUNIOR, E. S.; TEIXEIRA, D. I. A.; DIAS, L. P. B.; AVELAR, S. R. G.; MOURA, R. R.; MELO, L. M.; PEREIRA, A. F.; CAJAZEIRAS, J. B.; ANDRADE, L. M. M.; ALMEIDA, K. C.; SOUSA, F. C.; CARVALHO, A. C. C.; SEROV, O. L. Production of transgenic goat (*Capra hircus*) with human Granulocyte Colony Stimulating Factor (hG-CSF) gene in Brazil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 4, p. 585-592, dez. 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/aabc/v79n4/a03v79n4.pdf>>. Acesso em: 18 fev. 2013.

FREITAS, V. J. de F.; SEROVA, I. A.; ANDREEVA, L. E.; LOPES JÚNIOR, E. S.; TEIXEIRA, D. I. A.; CORDEIRO, M. F.; RONDINA, D.; PAULA, N. R.; ARRUDA, I. J.; VERDE, J. B.; DVORANTCHIKOV, G.; SEROV, O. Birth of normal kids after microinjection of pronuclear embryos in a transgenic goat (*Capra hircus*) production program in Brazil. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 2, n. 2, p. 200-205, Jun. 2003.

FREITAS, V. J. de F.; SIMPLÍCIO, A. A. Transferência de embriões em caprinos. In: GONÇALVEZ, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. de F. (Ed.). **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2002. p. 179-194.

FUKAMIZU, A. Transgenic animals in endocrinological investigation. **Journal of Endocrinological Investigation**, Milano, v. 16, n. 6, p. 461-473, 1993.

FUKUI, Y.; OKADA, M.; ISHIDA, N. Incidence of premature luteal regression in ewes superovulated with a single injection of follicle-stimulating hormone combined with equine chorionic gonadotropin. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo, v. 44, n. 4, p. 407-412, 1998. Disponível em: <[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/44/4/44\\_4\\_407/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jrd/44/4/44_4_407/_pdf)>. Acesso em: 19 mar. 2013.

GARCIA-GARCIA, R. M.; GONZALEZ-BULNES, A.; DOMINGUEZ, V.; VEIGA-LOPEZ, A.; COCERO, M. J. Survival of frozen-thawed sheep embryos cryopreserved at cleavage stages. **Cryobiology**, San Diego, v. 52, n. 1, p. 108-113, Fev. 2006.

GIBBONS, A.; CUETO, M. I.; PEREYRA BONNET, F. A simple vitrification technique for sheep and goat embryo cryopreservation. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 95, n. 1, p. 61-64, Jan. 2011.

GINTHER, O. J.; KOT, K. Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. **Theriogenology**, Butterworths, v. 42, n. 6, p. 987-1001, Nov. 1994.

GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.; FRICHE, P. M.; GIBBONS, J. R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 55, n. 6, p. 1187-1194, 1996. Disponível em: <<http://www.biolreprod.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=8949873>>. Acesso em: 25 mar. 2013.

GONZÁLEZ, A. A. T.; RUZ, Y. P.; SANSÓN, C. D. Control del estro y La ovulación en ovinos y caprinos. In: GONZÁLEZ, R. S.; HERNÁNDEZ, J. A. M. (Ed.). **Reproducción de ovejas e y cabras**. Cuautitlán: Universidad Nacional Autónoma de México, 2008. p. 174- 189.

GONZÁLEZ-BULNES, A.; BAIRD, D. T.; CAMPBELL, B. K.; COCERO, M. J.; GARCIA-GARCIA, R. M.; INSKEEP, E. K.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, A.; MCNEILLY, A. S.; SANTIAGO-MORENO, J.; VEIGA-LÓPEZ, A. Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. **Reproduction, Fertility and Development**, Victoria, Australia, v. 16, n. 4, p. 1-15, 2004.

GONZÁLEZ-BULNES, A.; CARRIZOSA, J. A.; DÍAZ-DELFA, C.; GARCÍA-GARCÍA, R. M.; URRUTIA, B.; SANTIAGO-MORENO, J.; COCERO, M. J.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, A. Effects of ovarian follicular status on superovulatory response of dairy goats to FSH treatment. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 48, n. 1, p. 9-14, Apr. 2003.

GONZÁLEZ-BULNES, A.; SANTIAGO-MORENO, J.; COCERO, M. J.; SOUZA, C. J. H.; GROOME, N. P.; GARCIA-GARCIA, R. M.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; BAIRD, D. T. Measurement of inhibin A and follicular status predict the response of ewes to superovulatory FSH treatments. **Theriogenology**, Butterworths, v. 57, n. 4, p. 1263-1272, Mar. 2002.

GONZALEZ-BULNES, A.; SANTIAGO-MORENO, J.; GARCIA-GARCIA, M. R.; SOUZA, C. J. H.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, A.; MCNEILLY, A. S. Effect of GnRH antagonists treatment on gonadotrophin secretion, follicular development and inhibin A secretion in goats. **Theriogenology**, Butterworths, v. 61, n. 5, p. 977-985, Apr. 2004.

GONZALEZ-BULNES, A.; SANTIAGO-MORENO, J.; LÓPEZ-SEBASTIÁN, A. Effect of follicular development and superovulatory protocol on ovulation rate in ewes. In: I CONGRESSO IBÉRICO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1., Estoril. **Proceedings...** Vale de Santarém: Sociedade Portuguesa de Reprodução Animal, 2007. v. 2, p. 40-41.

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. Effects of progestagens and prostaglandin analogues on ovarian function and embryo viability in sheep. **Theriogenology**, Butterworths, v. 63, n. 7, p. 2523-2534, 2005.

GORDON, I. **Controlled reproduction in sheep and goats**. London: CAB International, 1997. v. 2, 450 p. (Controlled Reproduction in Farm Animals, 2).

GRAAF, K. J.; MEINTJES, M.; PAUL, J. B.; DYER, V. W.; DENNISTON, R. S.; ZIOMEK, C.; GODKE, R. A. Ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery from FSH-treated goats for IVF. **Theriogenology**, Butterworths, v. 43, n. 1, p. 223, 1995. Abstract.

GREEN, R. E.; SANTOS, B. F. S.; SICHERLE, C. C.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; BICUDO, S. D. Viability of OPS vitrified sheep embryos after direct transfer. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 44, n. 3, p. 406-410, Jun. 2009.

GUIGNOT, F.; BOUTTIERA, A.; BARIL, G.; SALVETTIA, P.; PIGNONA, P.; BECKERS, J. F.; TOUZÉ, J. L.; COGNIÉ, J.; TRALDI, A. S.; COGNIÉ, Y.; MERMILLOD, P. Improved vitrification method allowing direct transfer of goat embryos. **Theriogenology**, Butterworths, v. 66, n. 4, p. 1004-1011, Sept. 2006.

GUSMÃO, A. L. Transferência de embriões em pequenos ruminantes. **O Embrião**, Jaboticabal, v. 25, p. 6-9, 2006.

GUSMÃO, A. L.; SILVA, J. C.; BITTENCOURT, T. C. C.; MARTINS, L. E.

P.; GORDIANO, H. D.; BARBOSA, L. P. Coleta transcervical de embriões em ovinos da raça Dorper no semiárido do Nordeste Brasileiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 2, p. 313-318, 2009. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v61n2/a05v61n2.pdf> >. Acesso em: 15 dez. 2013.

HEIDARI, F.; GHARAGOZLOO, F.; VOJGANI, M.; FARROKHI, N.; VAJHI, A. R.; MASOUDIFARD, M.; MIRTORABI, M.; NAYERI FASAEI, B. The effect of a GnRH antagonist pre-treatment, in the superovulation of goats. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 93, n. 2/3, p. 140-143, Oct. 2010.

HOFFMAN, K. A.; WALLER, S. L.; YOUNGS, C. R. Once daily versus twice daily treatments with follicle stimulating hormone in ewes synchronized with different doses of norgestomet, **Theriogenology**, Butterworths, v. 29, n. 1, p. 261, Jan. 1988.

HONG, O. H.; TIAN, S. J.; ZHU, S. E.; FENG, J. Z.; YAN, C. L.; ZHAO, X. M.; LIU, G. S.; ZHENG, S. M. Vitrification of Boer Goat morulae and early blastocysts by straw and open-pulled straw method. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 42, n. 1, p. 34-38, Feb. 2007.

HOUDEAU, E.; RAYNAL, P.; MARNET, P. G.; GERMAIN, G.; MORMÈDE, P.; ROSSANO, B.; MONNERIE, R.; PRUD'HOMME, M. J. Plasma levels of cortisol and oxytocin, and uterine activity after cervical artificial insemination in the ewe. **Reproduction Nutrition Development**, Paris, v. 42, n. 4, p. 381-392, Jul./Aug. 2002.

ISHWAR, A. K.; MEMON, M. A. Embryo transfer in sheep and goats: a review. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 19, n. 1, p. 35-43, Jan. 1996.

JABBOUR, H. N.; EVANS, G. Ovarian and endocrine responses of Merino ewes to treatment with PMSG and/or FSH-p. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 26, n. 1/2, p. 93-106, Nov. 1991.

JAINUDEEN, M. R.; WAHID, H.; HAFEZ, E. Ovinos e caprinos. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. (Ed.). **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004. p. 173-182.

KLING, J. First US approval for a transgenic animal drug. **Nature Biotechnology**, New York, v. 27, p. 302-303, 2009.

KUHHOLZER, B.; MULLER, S.; TREUER, A.; SEREGI, J.; BESENFELDER, U.; BREM, G. Repeated endoscopic ovum pick-up in hormonally untreated ewes: a new technique. **Theriogenology**, Butterworths, v. 48, n. 4, p. 1855-1862, Sept. 1997.

KUMAR, S.; PUROHIT, G. N. Effect of a single subcutaneous injection of melatonin on estrous response and conception rate in goats. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 82, n. 2/3, p. 152-155, Apr. 2009.

LEBOEUF, B.; MANFREDI, E.; BOUE, P.; PIACÈRE, A.; BRICE, G.; BARIL, G.; BROQUA, C.; HUMBLLOT, P.; TERQUI, M. Artificial insemination of dairy goats in France. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 55, n. 3, p. 193-203, Sept. 1998.

LETELIER, C. A.; CONTRERAS-SOLIS, I.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, R. A.; ARIZNAVARRETA, C.; TRESGUERRES, J. A. F.; FLORES, J. M.; GONZALEZ-BULNES, A. Ovarian follicular dynamics and plasma steroid concentrations are not significantly different in ewes given intravaginal sponges containing either 20 or 40 mg of fluorogestone acetate. **Theriogenology**, Butterworths, v. 71, n. 4, p. 676-682, Mar. 2009.

LEYVA, V.; BUCKRELL, B. C.; WALTON, J. S. Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous progestagen. **Theriogenology**, Butterworths, v. 50, n. 2, p. 395- 416, Aug. 1998.

LIMA, P. F. de; OLIVEIRA, M. A. L.; GUERRA, M. M. P.; ALVES, J. D. R.; F. NETO, J. E.; RABELO, M. C. Eficiência de diferentes métodos de coleta embrionária em caprinos: resultados preliminares. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 20, n. 2, p. 63-68, 1996.

LOPES JÚNIOR, E. S.; MAIA, E. L. M. M.; ALMEIDA, K. C.; PAULA, N. R. O.; TEIXEIRA, D. I. A.; RONDINA, D.; SELAIVE-VILLAROEL, A. B.; FREITAS, V. J. F. Influência dos níveis plasmáticos de progesterona sobre a resposta ovariana e produção embrionária de ovelhas Morada Nova (variedade branca). **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 34, p. 510, 2006. Supl. Resumo.

LOPEZ-DIAZ, M. C.; BOSU, W. T. K. A review and an update of cystic ovarian degeneration in ruminants. **Theriogenology**, Butterworths, v. 37, n. 6, p. 1163-1183, June, 1992.

LÓPEZ SEBASTIÁN, A.; GONZÁLEZ DE BULNES, A.; SANTIAGO MORENO, J.. Control y manejo reproductivo en pequeños rumiantes. In: CURSO INTERNACIONAL DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, 29., 2006, Madrid. **Compendio de conferencias...** Madrid: Universidad Politécnica de Madrid, 2006. P. 43-52.

LÓPEZ SEBASTIÁN, A.; INSKEEP, E. K. Response of ewes of Mediterranean sheep breeds to subcutaneous implants of melatonin. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 27, n. 1/2, p. 177-184, Feb. 1991.

LOUREIRO, M. F. P. **Indução do estro por implante de melatonina em ovinos da raça Suffolk**. 2003. 68 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

MACHADO, R.; SIMPLÍCIO, A. A. Avaliação de programas hormonais para a indução e sincronização do estro em caprinos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 36, n. 1, p. 171-178, jan., 2001. Disponível em: <[http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/ALSEDE/18923/1/pab99\\_156.pdf](http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/ALSEDE/18923/1/pab99_156.pdf)>. Acesso em: 12 abr. 2013.

MAFFILI, V. V.; TORRES, C. A.; FONSECA, J. F. da; MORAES, E. A.; PONTES, R. A. M. Sincronização de estro em cabras da raça Saanen com esponja intravaginal e CIDR-G®. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, n. 5, p. 591-598, out.,

2005. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v57n5/26907.pdf>>. Acesso em: 15 mar. 2013.

MARTIN, G. B.; MILTON, J. T. B.; DAVIDSON, R. H.; BANCHERO HUNZICKER, G. E.; LINDSAY, D. R.; BLACHE, D. Natural methods for increasing reproductive efficiency in small ruminants. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 82/83, p. 231-246, Jul. 2004.

MAYORGA, I.; MARA, L.; SANNA, D.; STELLETTA, C.; MORGANTE, M.; CASU, S.; DATTENA, M. Good quality sheep embryos produced by superovulation treatment without the use of progesterone devices. **Theriogenology**, Butterworths, v. 75, n. 9, p. 1661-1668, 2011.

MAYORGA, I.; MASIA, F.; MARA, L.; CHESSA, F.; CASU, S.; JUYENA, N.; DATTENA, M. Superovulation p-FSH protocol in Sarda ewes without progestagen synchronization treatment. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 43, Supl. S3, p. 193, 2008. Abstract 16<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction, Budapest, July, 2008.

MELLADO, M.; ALEMÁN, R.; OROZCO, F. J. Effect of prostaglandin F2 $\alpha$  dosage and route of administration on estrous response in Criollo goats under range conditions. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 14, n. 3, p. 205-208, Oct. 1994.

MELLADO, M.; HERNÁNDEZ, J. R. Ability of androgenized goat wethers and does to induce estrus in goats under extensive conditions during anestrus and breeding seasons. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 23, n. 1, p. 37-42, Nov., 1996.

MENCHACA, A.; PINCZAK, A.; RUBIANES, E. Follicular recruitment and ovulatory response to FSH treatment initiated on Day 0 or Day 3 postovulation in goats. **Theriogenology**, Butterworths, v. 58, n. 9, p. 1713-1721, Dec., 2002.

MENCHACA, A.; RUBIANES, E. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. **Reproduction, Fertility and**

**Development**, Victoria, Australia, v. 16, n. 4, p. 403-413, 2004.

MENCHACA, A.; RUBIANES, E. Relation between progesterone concentrations during the early luteal phase and follicular dynamics in goats. **Theriogenology**, Butterworths, v. 57, n. 5, p. 1411-1419, Mar., 2002.

MENCHACA, A.; VILARIÑO, M.; CRISPO, M.; CASTRO, T.; RUBIANES, E. New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, Victoria, Australia, v. 22, n. 1, p. 113-118, 2010.

MENCHACA, A.; VILARIÑO, M.; CRISPO, M.; PINCZAK, A.; RUBIANES, E. Day 0 protocol: superstimulatory treatment initiated in the absence of a large follicle improves ovarian response and embryo yield in goats. **Theriogenology**, Butterworths, v. 68, n. 8, p. 1111-1117, 2007.

MOURA, R. R. **Produção de embriões pró-nucleares em fêmeas doadoras das raças Canindé e Saanen durante um programa de transgênese caprina**. 2008. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

NAQVI, S. M. K.; PANDEY, G. K.; GAUTAM, K. K.; JOSHI, A.; GEETHALAKSHMI, V.; MITTAL, J. P. Evaluation of gross anatomical features of cervix of tropical sheep using cervical silicone moulds. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 85, n. 3/4, p. 337- 344, Feb. 2005.

NASCIMENTO, P. M. P.; BRANDÃO, F. Z.; PEREIRA, P. F. V.; PONTELLO, V. R.; OLIVEIRA, A. P.; BRUSCHI, J. H.; FONSECA, J. F. da. Evaluation rates of ovulation and pregnancy in Toggenburg goats after hormonal treatment with synthetic progesterone 12, 9 and 6 days. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS, 9.; REUNIÓN NACIONAL SOBRE CAPRINOCULTURA, 23., 2008, Querétaro, México. **Sustainable goat production: challenges an opportunities of small and large enterprises**; proceedings. Querétaro: International Goat Association,

2008. p. 242. Ref. 346. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/48869/1/rac-Evaluation-rates.pdf>>. Acesso em 12 mar., 2013.

NEVES, J. P.; MIRANDA, K. L.; TORTORELLA, R. D. Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, MG, v. 39, p. 414-421, jul. 2010. Supl. Especial. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbz/v39sspe/46.pdf>>. Acesso em: 12 abr., 2013.

OLIVEIRA, M. E. F. **Dinâmica folicular no uso em protocolos de sincronização de estro e superovulação em ovelhas Santa Inês**. 2011. 101 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal, SP.

OLIVEIRA, M. E. F. **Efeito da administração do LH ao final do tratamento superestimulatório na taxa de ovulação e produção de embriões em ovelhas da raça Santa Inês**. 2008. 67 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP.

OLIVEIRA, M. E. F.; BARTLEWSKI, P. M.; FELICIANO, M. A. R. Controle do ciclo estral. In: OLIVEIRA, M. E. F.; TEIXEIRA, P. P. M.; VICENTE, W. R. R. (Ed.). **Biotécnicas reprodutivas em ovinos e caprinos**. São Paulo: MedVet, 2013c. p.71-89.

OLIVEIRA, M. E. F.; CORDEIRO, M. F.; FELICIANO, M. A. R.; OLIVEIRA, L. G. Fisiologia do ciclo estral. In: OLIVEIRA, M. E. F.; TEIXEIRA, P. P. M.; VICENTE, W. R. R. (Ed.). **Biotécnicas reprodutivas em ovinos e caprinos**. São Paulo: MedVet, 2013b. p. 17-24.

OLIVEIRA, M. E. F.; CORDEIRO, M. F.; FERREIRA, R. M.; SOUZA, S. F.; PIERONI, J. S. P.; RODRIGUES, L. F. S.; FONSECA, J. F. da; VICENTE, W. R. R. Does supplemental LH changes rate and time to ovulation and embryo yield in Santa Ines ewes treated for superovulation with FSH plus eCG? **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 6, p. 1077-

1082, 2012. Disponível em: <<http://acervodigital.unesp.br/bitstream/unesp/138648/1/SO103-84782012000600021.pdf>>. Acesso em 12 mar. 2013.

OLIVEIRA, M. E. F.; FERREIRA, R. M.; CORDEIRO, M. F.; PIERONI, J. S. P.; SOUZA, S. F.; SANTOS, I. C. C.; RODRIGUES, L. F. S.; FONSECA, J. F. da; VICENTE, W. R. R. Efeito da administração do LH ao final do tratamento superovulatório sobre as taxas de ovulação e produção de embriões em ovelhas Santa Inês. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 36, Supl. 2, p. s598, 2008a. Edição dos Resumos 22a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Guarujá, SP, 2008a. Disponível em: < <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/52243/1/RAC-Efeito-da-adminstracao.pdf>>. Acesso em: 15 mar. 2013.

OLIVEIRA, M. E. F.; FONSECA, J. F. da. Inseminação artificial. In: OLIVEIRA, M. E. F.; TEIXEIRA, P. P. M.; VICENTE, W. R. R. **Biotécnicas reprodutivas em ovinos e caprinos**. São Paulo: MedVet, 2013. p. 91-102.

OLIVEIRA, M. E. F.; FONSECA, J. F. da; OLIVEIRA, L. G. Transferência de embriões. In: OLIVEIRA, M. E. F.; TEIXEIRA, P. P. M.; VICENTE, W. R. R. **Biotécnicas reprodutivas em ovinos e caprinos**. São Paulo: MedVet, 2013a. p. 103-120.

OLIVEIRA, M. E. F.; VICENTE, W. R. R.; COSTA, D. A. C. P.; CORDEIRO, M. F.; FERREIRA, R. M.; SOUSA, S. F.; RODRIGUES, L. F. S. Effects of LH administration at end of the FSH superovulatory regimen on ovulatory period in Santa Inês sheep. **Hungarian Veterinary Journal**, Budapest, n. 130, p. 129, 2008b. Abstracts do XXV World Buiatrics Congress, Budapest, July, 2008.

OTT, R. S.; NELSON, D. R.; HIXON, J. E. Effect of presence of the male on initiation of estrous cycle activity of goats. **Theriogenology**, Butterworths, v. 13, n. 2, p. 183-190, Feb. 1980.

PARAMIO, M. T. *In vivo* and *in vitro* embryo production in goats. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 89, n. 2, p. 144-148, Apr. 2010.

PAULA, N. R. O.; CARDOSO, J. F. S.; OLIVEIRA, M. A. L.; FREITAS, V. J. F. Embriões caprinos produzidos *in vivo* ou *in vitro*: técnicas, problemas e perspectivas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 32, n. 1, p. 21-35, jan./mar. 2008. Disponível em: <<http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/RB049%20pag21.pdf>>. Acesso em 12 abr. 2013.

PEREIRA, A. F.; FREITAS, V. J. F. Clonagem em ruminantes: progressos e perspectivas atuais. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 33, n. 3, p. 118-128, jul./set. 2009. Disponível em: <<http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/pag118-128.pdf>>. Acesso em: 12 abr. 2013.

PEREIRA, L.V. Animais transgênicos: nova fronteira do saber. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 60, n. 2, p. 40-42, 2008. Acesso em: <<http://cienciaecultura.bvs.br/pdf/cic/v60n2/a17v60n2.pdf>>. Acesso em: 15 fev. 2013.

PEREIRA, R. J.; SOHREY, B.; HOLTZ, W. Nonsurgical embryo collection in goats treated with prostaglandin F2a and oxytocin. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.76, n. 2, p. 360-363, Fev. 1998.

PESQUEIRO, J. B.; MAGALHÃES, L. E. de; BAPTISTA, H. A.; SABATINI, R. A. Animais transgênicos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, DF, n. 27, p. 52-56, jul./ago. 2002. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio27/animais.pdf>>. Acesso em: 5 jan. 2014.

PICAZO, R. A.; COCERO, M. J.; BARRAGAN, M. L.; LÓPEZ SEBASTIÁN, A. Effects of LH administration at the end of an FSH superovulatory regimen on ovulation rate and embryo production in three breeds of sheep. **Theriogenology**, Butterworths, v. 45, n. 2, p. 1065-1073, Apr. 1996.

PINTADO, B.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; PÉREZ LLANO, B. Superovulatory response of Murciana goats to treatments based on PMSG/antiPMSG or combined FSH/PMSG administration. **Theriogenology**, Butterworths, v. 50, n. 3, p. 357-364, Aug. 1998.

POINDRON, P.; CÓGNIE, Y.; GAYERIE, F.; ORGEUR, P.; OLDHAM, C. M.; RAVAUT, J. P. Changes in gonadotrophins and prolactin levels in isolated (seasonally or lactationally) anovular ewes associated with ovulation caused by the introduction of rams. **Physiology and Behavior**, New York, v. 25, n. 2, p. 227-236, 1980.

RANIO, V. PMSG-dose in Finnsheep embryo production. **Theriogenology**, Butterworths, v. 35, n. 1, p. 261, Jan. 1991. Abstracts Annual Conference of the International Embryo Transfer Society Bournemouth, Jan. 1991.

REICHENBACH, H. D.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F.; SANTOS FILHO, A. S.; ANDRADE, J. C. O. Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: GONÇALVES, P. A.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. (Ed.). **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2002. p. 127-177.

RESTALL, B. J.; RESTALL, H.; WALKDEN-BROWN, S. W. The induction of ovulation in anovulatory goats by oestrous females. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 40, n. 2, p. 299-303, Dec. 1995.

RODRIGUES, L. F. de S.; ARAUJO, A. A. de; NUNES, J. F.; MOURA, A. A. A.; MOREIRA, E. P. Sincronização do estro em ovelhas deslanadas: efeito de diferentes doses de gonadotrofina coriônica eqüina sobre a taxa de ovulação. **Revista de Ciências Agrárias**, Belém, PA, n. 41, p. 215-222, 2004.

ROMANO, J. E. Effect of two doses of cloprostenol in two schemes for estrous synchronization in Nubian goats. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 28, n. 2, p. 171-176, May, 1998.

ROMANO, J. E. Synchronization of estrus using CIDR, FGA or MAP intravaginal pessaries during the breeding season in Nubian goats. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 55, n. 1/2, p. 15-19, Oct. 2004.

ROSA, H. J. D.; BRYANT, M. J. Seasonality of reproduction in sheep. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v. 48, n. 3, p. 155-171, June, 2003.

ROY, F.; COMBES, B.; VAIMAN, D.; CRIBIU, E. P.; POBEL, T.; DELÉTANG, F.; COMBARNOUS, Y.; GUILLOU, F.; MAUREL, M. -C. Humoral immune response to equine chorionic gonadotropin in ewes: Association with major histocompatibility complex and interference with subsequent fertility. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 61, n. 1, p. 209-218, Jul. 1999.

RUBIANES, E.; IBARRA, D.; UNGERFELD, R.; CARBAJAL, B.; DE CASTRO, T. de. Superovulatory response in anestrus ewes is affected by the presence of a large follicle. **Theriogenology**, Butterworths, v. 43, n. 2, p. 465-472, Jan. 1995.

RUBIANES, E.; MENCHACA, A. Dinâmica folicular, sincronização de estro e superovulação em ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 34, Supl. 1, p. 251-261, 2006.

RUBIANES, E.; MENCHACA, A. The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 78, n. 3/4, p. 271-287, Oct. 2003.

RUBIANES, E.; UNGERFELD, R.; VIÑALES, C.; RIVERO, A.; ANDADAMS, G. P. Ovarian response to gonadotropin treatment initiated relative to wave emergence in ultrasonographically monitored ewes. **Theriogenology**, Butterworths, v. 47, n. 2, p. 1479-1488, June, 1997.

RUSSEL, A. J. F.; DONEY, J. M.; GUNN, R. G. Subjective assessment of body fat in live sheep. **Journal of Agricultural Science**, Cambridge, v. 72, n. 2, p. 451-454, June, 1969.

SAHARREA, A.; VALENCIA, J.; BALCÁZAR, A.; MEDÍA, O.; CERBÓN, J. L.; CABALLERO, V.; ZARCO, L. Premature luteal regression in goats superovulated with PMSG: effect of hCG or GnRH administration during the early luteal phase. **Theriogenology**, Butterworths, v. 50, n. 7, p. 1039-1052, Nov. 1998.

SAMPAIO, J. A. R. **Efeito macho interespécie: indução de estro em cabras pela presença de um macho ovino**. 2008. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

SANTL, B.; WENIGERKIND, H.; SCHERNTHANER, W.; MÖDL, J.; STOJKOVIC, M.; PRELLE, K.; HOLTZ, W.; BREM, G.; WOLF, E. Comparison of ultrasound-guided vs laparoscopic transvaginal ovum pick-up (OPU) in Simmental heifers. **Theriogenology**, Butterworths, v. 50, n. 1, p. 89-100, Jul. 1998.

SANTOS GARZA, R.; SÁNCHEZ DAVILA, F.; VILLARREAL ARREDONDO, J. F.; LEDEZMA, R.; ROMERO JUAREZ, P. G.; HERNANDEZ, B. E. Effect of different levels of FSH on the response to ovulation and quality of embryo transfer in goats, during the breeding season. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS, 9.; REUNIÓN NACIONAL SOBRE CAPRINOCULTURA, 23., 2008, Querétaro, México. **Sustainable goat production: challenges and opportunities of small and large enterprises; proceedings**. Querétaro: International Goat Association, 2008. p. 455.

SANTOYO, A.; TREJO, A. Aspectos anatómicos comparativos del cervix ovino y caprino em relación a la inseminación artificial. In: CONGRESO NACIONAL DE PRODUCCIÓN OVINA, 4., 1991, San Cristóbal de Las Casas. **Memórias...** San Cristobal de las Casas, Chiapas: Universidad Autónoma Chiapas, 1991. p. 130-133.

SCHMIDT, C. Belated approval of first recombinant protein from animal. **Nature Biotechnology**, New York, v. 24, p. 877, 2006. Abstract.

SCHNIEKE, A. E.; KIND, A. J.; RITCHIE, W. A.; MYCOCK, K.; SCOTT, A. R.; RITCHIE, M.; WILMUT, I. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. **Science**, New York, v. 278, n. 5346, p. 2130-2133, Dec. 1997.

SCUDAMORE, C. L.; ROBINSON, J. J.; AITKEN, R. P.; KENNEDY, D. J.; IRELAND, S.; ROBERTSON, I. S. Laparoscopy for intrauterine insemination and embryo recovery in superovulated ewes at a commercial embryo transfer unit. **Theriogenology**, Butterworths, v. 35, n. 2, p. 329-337, Feb. 1991.

SHAW, J. M.; ORANRATNACHAI, A.; TROUSON, A. O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissues. **Theriogenology**, Butterworths, v. 53, n. 1, p. 59-72, Jan. 2000.

SHELTON, M. Reproduction and Breeding of Goats. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 61, n. 7, p. 994-1010, Jul. 1978.

SIMPLÍCIO, A. A.; FREITAS, V. J. F.; SANTOS, D. O. Biotécnicas da reprodução em caprinos. **Revista de Ciências Agrárias**, Belém, PA, n. 43, jun./jul. 2005. Suplemento. 20 f. Seção Palestras. 1 CD-ROM. Edição de anais do 3º Congresso Norte Nordeste de Reprodução Animal, Belém, PA, 2006. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/94531/1/AAC-Biotecnicas-da-reproducao-em-caprinos.pdf>>. Acesso em: 18 mar., 2014.

SIQUEIRA, A. P.; FONSECA, J. F. da; SILVA FILHO, J. M.; BRUSCHI, J. H.; VIANA, J. H. M.; PALHARES, M. S.; BRUSCHI, M. C. M. PEIXOTO, M. P. Parâmetros reprodutivos de cabras Toggenburg inseminadas com sêmen resfriado, após diluição em meio à base de gema de ovo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 61, n. 2, p. 299-305, 2009. Disponível em: <<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/52226/1/API-Parametros-reprodutivos-de-cabras-Toggenburg-inseminadas-com-semen-resfriado.pdf>>. Acesso em: 18 jan. 2014.

SOUZA, J. M. G.; TORRES, C. A. A.; MAIA, A. L. R. S.; BRANDÃO, F. Z.; BRUSCHI, J. H.; VIANA, J. H. M.; OBA, E.; FONSECA, J. F. da. Autoclaved, previously used intravaginal progesterone devices induces estrus and ovulation in anestrus Toggenburg goats. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 129, n. 1/2, p. 50-55, Nov. 2011.

STANGL, M.; KÜHHOLZER, B.; BESENFELDER, U.; BREM, G. Repeated endoscopic ovum pick-up in sheep. **Theriogenology**, Butterworths, v. 52, n. 4, p. 709-716, Sept. 1999.

STRINGFELLOW, D. A.; SEIDEL, S. M. **Manual da sociedade internacional de transferência de embriões**. 3. ed. [Uberlândia]: Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, 1999. 180 p.

TABET, A. F. **Transferência intratubárica videolaparoscópica de embriões ovinos fertilizados *in vitro***. 2007. 74 f. Tese (Doutorado em Clínica e Cirurgia Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

THEODOSIADOU, E.; GOULAS, P.; KOUSKOURA, T. H.; SMOKOVITIS, A. Oestrogen and progesterone concentrations in plasma and oviductal tissue of ewes exhibiting a natural or induced oestrus. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 80, n. 1/2, p. 59-67, Jan. 2004.

THIBIER, M.; GUÉRIN, B. Hygienic aspects of storage and use of semen for artificial insemination. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 62, n. 1/3, p. 233-251, Aug. 2000.

TRALDI, A. S. **Biotecnologia da reprodução de pequenos ruminantes**. [S.l.]: USP-Laboratório de Biotecnologia de Ovinos e Caprino, 2002. 85 p. Apostila.

TRALDI, A. S. Vitrification of goat *in vivo* and *in vitro* produced embryos. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS, 7., 2000, Tours, France. **Proceedings...** Paris: INRA: IGA: Institut de Elevage, 2000. v. 2, p. 1031.

TRALDI, A. S.; LOUREIRO, M. F. P.; CAPEZZUTO, A.; MAZORRA, A. L. Métodos de controle da atividade reprodutiva em caprinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 2, p. 254-260, 2007a. Disponível em: < <http://www.cbra.org.br/pages/publicacoes/rbra/download/254.pdf> >. Acesso em: 15 fev. 2013.

TRALDI, A. S.; MIRANDA, M. S.; TAROUCOU, A. K.; RICCIARDI, M.; FREITAS, I. S.; CATTO, D. R.; SILVA, R. O. C.; MEIRELLES, F. V. Gestação de clones ovinos obtidos por transferência nuclear de célula somática em oócitos homólogos e heterólogos. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 35, p. 1234, 2007b. Supl. 3. Edição dos anais da 21a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões - SBTE, Salvador, 2007.

VAJTA, G.; BOOTH, P. J.; HOLM, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Successful vitrification of early stage bovine in vitro produced embryos with the Open Pulled Straw (OPS) method. **Cryo-Letters**, London, v. 18, p. 191-195, 1997.

VALLET, J. C.; BARIL, G. Effect of time of laparoscopic intrauterine insemination in superovulated dairy goats. In: SCIENTIFIC MEETING OF ASSOCIATION EUROPEENNE DE TRANSFERT EMBRYONNAIRE, 6., 1990, Lyon. **Proceedings...** Nouzilly: European Embryo Transfer Association, 1990. v. 1. p. 188. Abstract.

VÁZQUEZ, M. I.; BLANCH, M. S.; ALANIS, G. A.; CHAVES, M. A.; GONZALEZ-BULNES, A. Effects of treatment with a prostaglandin analogue on developmental dynamics and functionality of induced corpora lutea in goats. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 118, n. 1, p. 42-47, Mar. 2010.

VEIGA-LOPEZ, A.; GONZALEZ-BULNES, A.; TRESGUERRES, J. A. F.; DOMINGUEZ, V.; ARIZNAVARRETA, C.; COCERO, M. J. Causes, characteristics and consequences of anovulatory follicles in superovulated sheep. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 30, n. 2, p. 76-87, Feb. 2006.

VÉLIZ, F. G.; MORENO, S.; DUARTE, G.; VIELMA, J.; CHEMINEAU, P.; POINDRON, P.; MALPAUX, B.; DELGADILLO, J. A. Male effect in seasonally anovulatory lactating goats depends on the presence of sexually active bucks, but not estrous females. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 72, n. 3/4, p. 197-207, Aug. 2002.

VIÑALES, C.; FORSBERG, M.; BANCHERO, G.; RUBIANES, E. Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. **Theriogenology**, Butterworths, v. 55, n. 4, p. 993-1004, Mar. 2001.

VIÑALES, C.; MEIKLE, A.; FORSBERG, M.; RUBIANES, E. The effect of subluteal levels of exogenous progesterone on follicular dynamics and endocrine patterns during the early luteal phase of the ewe. **Theriogenology**, Butterworths, v. 51, n. 7, p. 1351-1361, May, 1999.

WILDEUS, S. Current concepts in synchronization of estrus: Sheep and goats. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 77, p. 1-14, 2000.

WILMUT, I.; SCHNIEKE, A. E.; MCWHIR, J.; KIND, A. J.; CAMPBELL, K. H. S. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, London, v. 385, n. 6619, p. 810-813, Feb. 1997.

ZARCO, L.; RODRÍGUEZ, E. F.; ANGULO, M. R. B.; VALENCIA, J. Female to female stimulation of ovarian activity in the ewe. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 39, n. 3, p. 251-258, Sept. 1995.

ZATZ, M. Clonagem e células-tronco. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 18, n. 51, p. 247-256, 2004. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/ea/v18n51/a16v1851.pdf>>. Acesso em: 15 fev. 2013.

ZEDER, M. A.; HESSE, B. The initial domestication of goats (*Capra hircus*) in the Zagros mountains 10000 years ago. **Science**, New York, v. 287, n. 5461, p. 2254-2257, Mar. 2000.

ZEUNER, F. E. **A history of domesticated animals**. London: Hutchinson, [1963]. 560 p.

