

APLICAÇÃO DAS BIOTÉCNICAS DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES E FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* NA REPRODUÇÃO DE CAPRINOS

[*Accomplishment of the biotechniques embryo transfer and in vitro fertilization on caprine reproduction*]

Gabriela Liberalino Lima, Érika Aparecida Araújo dos Santos*

Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN.

RESUMO - A caprinocultura vem apresentando um ciclo de crescimento mundial, o qual vem se intensificando principalmente nos países em desenvolvimento. Nesse contexto, há a necessidade da aplicação de técnicas de reprodução assistida com o objetivo de aumentar a eficiência reprodutiva e produtiva dos rebanhos. Apesar de algumas biotécnicas existirem há mais de 50 anos, nos últimos dez anos houve um grande aprimoramento das já existentes e o desenvolvimento de novas. Atualmente, algumas técnicas já apresentam grande aplicabilidade a campo como a inseminação artificial, a sexagem de sêmen, a transferência e criopreservação de embriões e a produção *in vitro* de embriões. Estas biotécnicas contribuem para acelerar o ganho genético de animais superiores bem como permitem superar alguns obstáculos de eficiência reprodutiva. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi realizar uma breve revisão sobre algumas biotécnicas aplicadas à reprodução da espécie caprina.

Palavras-chave: Caprinocultura, reprodução assistida, biotecnologia.

ABSTRACT - The goat business is presenting a world improve cycle, which has been intensified especially in developing countries. On this context, it is needed to apply assisted reproduction techniques with the aim to increase the reproductive and productive efficiency of cattles. In spite of some techniques has existed far from 50 years ago, in the last ten years it was a huge improvement of them and the development of other ones. Currently, some techniques already present large use at farm such as artificial insemination, semen sorting, embryo transfer and cryopreservation and embryo *in vitro* production. These techniques contribute to accelerate the genetic gain in superior animals such as allow to overcome some obstacles of reproductive efficiency. On this way, the objective of the present work was to perform a brief review of some biotechniques applied to goat reproduction.

Keywords: Goat business, assisted reproduction, biotechnology.

INTRODUÇÃO

A caprino-ovinocultura brasileira, apesar de numericamente predominante na região Nordeste, tem se expandido em todo o País. O Brasil possui um efetivo de cerca de 9,3 milhões de caprinos, e, deste total, a região Nordeste concentra cerca de 8,5 milhões (91% do rebanho nacional) (Bezerra, 2009). Inicialmente esta atividade apresentava grande ênfase na produção leiteira, contudo, na atualidade, existe uma crescente demanda pela exploração caprina e ovina especializada na

produção de carne e peles. Isso faz da caprinocultura uma importante alternativa para o desenvolvimento social e econômico dessa região (Lima, 2008).

Apesar da sua grande importância para a economia do Nordeste, nesta região a criação ainda possui um perfil predominantemente de subsistência, com manejo extensivo (Pedrosa *et al.*, 2003). Nesse contexto, as condições sanitárias e nutricionais ainda são precárias, o que faz com que a mortalidade de animais seja alta, comprometendo o desenvolvimento da atividade (Filgueira *et al.*, 2009).

* Autor para correspondência. E-mail: erikasantos_vet@hotmail.com.

Mesmo apresentando dificuldades, projeta-se uma multiplicação da ordem de cinco vezes o rebanho brasileiro atual para os próximos vinte anos, multiplicando o rebanho atual em mais de 50 milhões de cabeças (Fonseca, 2005). Dentro desta perspectiva, haverá ampla necessidade de se assistir a reprodução destes animais, seja para permitir o aumento da eficiência reprodutiva e/ou produtiva dos rebanhos, ou para a multiplicação mais eficiente dos genótipos utilizados (Bezerra, 2009).

Apesar de algumas biotécnicas existirem há mais de 50 anos, nos últimos dez anos houve um grande aprimoramento das já existentes e o desenvolvimento de novas, sendo que muitos centros de pesquisa migraram para locais mais próximos ao produtor. Atualmente, algumas técnicas já apresentam grande aplicabilidade a campo como a inseminação artificial, a sexagem de sêmen, a transferência e criopreservação de embriões e a produção *in vitro* de embriões (Milazzotto *et al.*, 2008).

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi realizar uma abordagem sobre Transferência de embriões e Fertilização *in vitro*, as quais são algumas das principais biotécnicas aplicadas à reprodução da espécie caprina.

TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES

A transferência de embriões é uma técnica que consiste em aumentar a produção embrionária, através do aumento do número de óvulos liberados, após a administração de hormônios, em uma fêmea geneticamente superior, dentro de um período sexual, e transferir essas estruturas para o trato reprodutivo de fêmeas de baixo valor zootécnico, para completarem a gestação (Oliveira & Gonzales, 1992).

A técnica baseia-se na indução ou sincronização do estro e superovulação das doadoras, seguida da cobertura ou inseminação artificial e da colheita dos embriões através da lavagem uterina. Os embriões colhidos são avaliados e aqueles viáveis são inovulados em receptoras sincrônicas, a fresco ou após congelamento/descongelamento (Simplício *et al.*, 1999).

Esta técnica visa um maior aproveitamento das fêmeas durante seu período de vida reprodutiva, através da elevação da prolificidade de animais geneticamente superiores em tempo bastante curto (Valle *et al.*, 1988). O sucesso da transferência de embriões depende de vários fatores relacionados

com o trinômio doadora/embrião/receptora. A fertilidade depende tanto da qualidade do embrião coletado como da condição da receptora para qual o embrião é transferido. Além disso, fatores extrínsecos como temperaturas elevadas, mudanças climáticas bruscas, traumatismos por manejo inadequado, podem influenciar na fertilidade da fêmea (Thibier & Nibart, 1992).

Apesar do primeiro relato de sucesso com TE em caprinos ter ocorrido nos anos 30 (Warwick *et al.*, 1934), tentativas para ampliar esta tecnologia só foram descritas bastante tempo depois, com os experimentos de Moore (1974), Tervit *et al.* (1983), Chemineau *et al.* (1986) e Agrawal & Goel (1991).

As vantagens da transferência de embriões são várias, como a multiplicação rápida de material genético superior, possibilita a importação e exportação de embriões, evitando a importação de animais, melhora a adaptabilidade ao meio ambiente de cabritos nascidos dentro da região, auxilia no controle de doenças infecciosas, como a Artrite Encefalite Caprina a Vírus (CAEV), auxilia nos testes de progênie que geralmente são lentos e possibilita futuros trabalhos na engenharia genética, como a fecundação *in vitro*, sexagem de embriões, quimerismo, clonagem e indivíduos transgênicos (Oliveira & Gonzales, 1992).

Dentre as limitações existentes na execução da técnica podem se destacar o elevado custo inicial para a aquisição de material e equipamentos, limitações no uso do método cirúrgico, em virtude dos custos e possíveis ocorrências de aderências e traumatismos pós-operatórios no genital da fêmea e dificuldades na prática da técnica não cirúrgica em pequenos ruminantes, devido ao diâmetro estreito e a irregularidade do canal cervical desses animais (Oliveira & Gonzales, 1992).

Para um programa de Transferência de Embriões deve-se realizar uma rigorosa seleção das doadoras e receptoras, uma vez que problemas de ordem sanitária e nutricional podem comprometer o sucesso da técnica (Thibier & Nibart, 1992).

Na seleção das doadoras um dos fatores mais importantes é a qualidade genética, juntamente com o estado fisiológico e sanitário. Além disso, deve ser considerada a idade, histórico reprodutivo, os animais devem apresentar-se em perfeito estado sanitário ao exame clínico e ginecológico que deve ser feito três meses antes do início do tratamento hormonal, respeitando um intervalo de no mínimo, cinco meses entre a última parição e o início do tratamento (Santana, 1994).

As receptoras são fêmeas que deveriam assegurar a sobrevivência e o desenvolvimento embrionário e devem apresentar boas condições para levar a gestação até o final (Santana, 1994). As fêmeas devem exteriorizar sinais de estros regulares, em média a cada 21 dias, devem encontrar-se em bom estado nutricional e sanitário, livres de doenças do sistema reprodutor; boa habilidade materna e boa aptidão leiteira, sua qualidade genética não tem influência neste caso (Oliveira & Gonzales, 1992).

O controle do estro e da ovulação das doadoras e receptoras é de fundamental importância, independente do uso de embriões frescos ou criopreservados (Simplício *et al.*, 1999). Para que se obtenha uma alta percentagem de gestações é necessário que a receptora esteja em estro simultaneamente ou com diferença de mais ou menos um dia relativamente à doadora (Simplício *et al.*, 2002).

Existem dois métodos básicos de sincronização do ciclo estral em espécies domésticas. Eles dependem da inibição da secreção de LH, ou encurtamento do tempo de vida do corpo lúteo (CL), e do subsequente início de cio e ovulação. Para o prolongamento da fase luteínica realiza-se a administração de um progestágeno por longo prazo, de modo que o CL regride naturalmente durante o período em que ele esteja sendo administrado. Com esta abordagem, o progestágeno exógeno continua exercendo uma retroalimentação negativa na secreção de LH após a regressão do CL. Depois da remoção do progestágeno, o crescimento folicular, o cio e a ovulação ocorrem dentro de 2 a 8 dias. O segundo método induz a regressão precoce do CL do ciclo. Os dois agentes luteolíticos principais são o estrógeno e a prostaglandina $F_2\alpha$ ou seu análogo (cloprostenol). Uma única injeção de $PGF_2\alpha$ normalmente regride o CL dentro de 24 a 72 horas e o cio e a ovulação ocorrem dentro de 2 a 3 dias (Hafez & Hafez, 2004).

Para se produzir um maior número de embriões é realizada a superovulação da fêmea doadora. A superovulação é definida como sendo a superestimulação ovariana, através de gonadotrofinas exógenas, permitindo a obtenção de números de óvulos superior àquele que é normalmente produzido em cada ciclo reprodutivo (Santana, 1994). O aumento do número de folículos pré ovulatórios, o qual conduz à superovulação, é obtido pela administração massiva de hormônios gonadotrópicos de origem coriônica (PMSG ou eCG) ou hipofisária (FSH e LH) (Baril, 1995).

A resposta superovulatória está sujeita a grandes variações, as quais podem decorrer de fatores intrínsecos como raça, idade, variação individual e estágio da lactação e, extrínsecos, ou seja, nutrição, saúde, época do ano e a gonadotrofina usada (Armstrong; Evans, 1983; Meinecke-Tillman *et al.*, 1987; Doijode *et al.*, 1992; Senn & Richardson, 1992).

As doadoras superovuladas são então inseminadas (produção *in vivo*), ou ainda pode ser realizada a coleta de oócitos e produção *in vitro* de embriões. Quando a produção de embriões é feita *in vivo* deve-se então realizar a coleta dos mesmos. Historicamente, os embriões eram coletados de ovidutos ou úteros de doadoras após abate ou através de cirurgia. Desde o início dos anos 1990, técnicas laparoscópicas e transcervicais estão sendo usadas mais frequentemente (Hafez & Hafez, 2004).

Os embriões são normalmente coletados por lavagem dos cornos uterinos entre o 6º e 8º dia após o início do estro (Baril, 1995). O método de colheita mais utilizado em pequenos ruminantes é a laparotomia (Tervit *et al.*, 1983, 1986; Kraemer, 1989; Wischral *et al.* 1989; Pegoraro-Rumpf *et al.*, 1992; Ishwar & Memon, 1996; Gootwine *et al.*, 1997). No entanto, o desenvolvimento de técnicas menos invasivas para colheita e transferência de embriões, tornaram-se uma necessidade em virtude das repetidas colheitas cirúrgicas, no mesmo animal, contribuírem, positivamente, para a redução da fecundação e da taxa de recuperação de embriões em decorrência do desenvolvimento de aderências entre ovários, tubas e cornos uterinos entre si e com órgãos adjacentes ao sistema genital (Pegoraro-Rumpf *et al.*, 1992; Andrioli-Pinheiro, 1993).

Após a coleta os embriões são avaliados a fim de observar sua viabilidade sobre os critérios morfológicos em função do dia da coleta. Assim no 7º dia, o estágio característico é de mórula, ao 8º dia é de blastocisto. Além da diferença entre dois estágios, isto é, desenvolvimento mais ou menos pronunciado de blastocelo e início de formação do botão embrionário, os embriões que não apresentem este tipo de arranjo celular são considerados mortos ou degenerados, ou em via de degeneração. Somente os embriões julgados, pelo menos, de boa qualidade devem ser utilizados (Santana, 1994).

Lindner e Wright (1983) estabeleceram os seguintes critérios de avaliação de embriões: excelente, que corresponde ao embrião ideal, esférico, simétrico, contendo células de tamanho, cor e textura uniforme;

bom, que apresenta pequenas imperfeições, como blastômeros separados, uma forma irregular, algumas vesículas; medíocre, os quais possuem defeitos mais visíveis, entretanto sem gravidade, tais como presença de blastômeros, forma irregular, algumas vesículas; mau, apresenta defeitos graves, muitos blastômeros separados, células degeneradas, células de diferentes tamanhos, múltiplas vesículas, mas aparência de uma massa embrionária viável.

Quanto a inovulação, a técnica por laparoscopia ganhou espaço em relação a laparotomia, permitindo a transferência dos embriões para a junção útero-tubárica e minimizando a possível ocorrência de aderências, o que é bastante comum quando a transferência é realizada através de cirurgia. Salles *et al.* (1996) descrevem a semi-laparoscopia como alternativa segura para a inovulação em caprinos. A técnica permite a avaliação dos ovários, a exposição da junção útero-tubárica adjacente ao ovário com, pelo menos, um corpo lúteo funcional, e a transferência dos embriões contidos num tubo capilar que é acoplado a uma seringa de 1ml (Simplício *et al.*, 1999).

A taxa de sobrevivência dos embriões após o transplante é normalmente próxima de 50%, porém vários parâmetros podem fazê-la variar (Baril, 1995). Esta técnica pode contribuir para a produção de carne, leite e outros produtos. Estudos recentes mostram que a cerca de 60% dos blastocistos produzidos *in vitro* resultou em cabritos vivos, o que foi similar às taxas daqueles desenvolvidos *in vivo*. (Hafez & Hafez, 2004).

FERTILIZAÇÃO *IN VITRO*

A aplicação de tecnologias de reprodução assistida possibilita o incremento do desempenho do melhoramento genético. Algumas dessas técnicas aumentam a seleção diferencial, como a inseminação artificial e a transferência de embriões, enquanto outras aceleram o progresso encurtando o intervalo entre gerações, como a produção *in vitro* de embriões a partir de animais pré-púberes (Baldassarre *et al.*, 2004)

Os estudos *in vitro* têm mostrado resultados bastante satisfatórios com animais de laboratório. Eppig e O'Brien (1996) obtiveram o nascimento de um camundongo a partir de folículos primordiais crescidos, maturados e fecundados *in vitro*. Mais recentemente, esta mesma equipe aperfeiçoando o protocolo utilizado anteriormente, relatou a produção de embriões e o nascimento de 59 camundongos saudáveis a partir de folículos pré-

antrais cultivados, maturados e fecundados *in vitro* (O'Brien *et al.*, 2003).

A técnica de FIV consiste basicamente em realizar a fecundação, ou seja, a união do gameta masculino (espermatozóide) e o gameta feminino (óvulo ou ovócito), em um ambiente de laboratório, totalmente controlado e com o objetivo de produzir embriões em larga escala e mais baratos. De acordo com Lima (2004) esta técnica é um procedimento que consiste das etapas de maturação e fecundação de oócitos e da cultura ou da co-cultura desde a fase de zigoto até a de blastocisto. A fecundação *in vitro* (FIV) tem ocupado lugar de destaque em função do potencial que oferece para acelerar a melhoria genética dos rebanhos (Hasler, 1992).

É uma biotécnica utilizada, alternativamente, para acelerar a produção de animais geneticamente superiores e impedir, pela aspiração *in vivo* de folículos, o descarte precoce de fêmeas geneticamente privilegiadas portadoras de alterações adquiridas que impedem que a reprodução ocorra de forma natural ou até mesmo pela transferência de embriões (Gonçalves *et al.*, 2002). Recentes avanços na maturação oocitária e no desenvolvimento embrionário têm conduzido a um progresso substancial dos sistemas de produção *in vitro* de embriões caprinos (Cognié *et al.*, 2004).

A Produção *in vitro* de embriões (PIV) se apresenta na realidade como uma técnica que pode ser realizada durante todo o ano, não são necessários protocolos extensos no preparo das doadoras, uma única dose de sêmen é capaz de fecundar oócitos de várias fêmeas doadoras, a quantidade de hormônio é mínima, as doadoras podem ser aspiradas mensalmente, produção de cabras que não respondem ao protocolo de superovulação, possível aspiração após a morte eventual da doadora e doadora pode ser fecundada com reprodutores diferentes (Cognié *et al.*, 2004).

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

valor genético, bem como devido ao desconhecimento das condições sanitárias dos animais utilizados (Cognié *et al.*, 2004) que pode ter como conseqüência o aumento da incidência de diversas doenças no rebanho receptor dos embriões produzidos a partir dessa fonte de oócitos.

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

A técnica de punção folicular guiado por ultra-som permite maximizar o aproveitamento de óvulos que fisiologicamente são produzidos nos ovários de uma fêmea, levando-os a um sistema de produção in vitro de embriões (Pieterse *et al.*, 1992). Ao contrário da espécie bovina em que a punção folicular é praticada rotineiramente, poucas equipes no mundo utilizam esse método em caprinos (Paula, 2008).

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

Outra possibilidade de fonte oocitária de caprinos é a punção in vivo de folículos, por meio de uma agulha acoplada a uma bomba de vácuo, guiada por ultra-sonografia transvaginal. Pelo uso desse método, Graff *et al.* (1999) obtiveram entre 60 e 78% da taxa de colheita oocitária. No entanto, esse método ainda é pouco utilizado em caprinos e vem sendo alvo de estudos para seu aprimoramento e futura utilização em larga escala (Paula, 2008).

Para se obter uma FIV é necessário uma capacitação espermática e o protocolo que vem sendo mais utilizado atualmente é a indução após descongelamento

e centrifugação em gradiente de Percoll, pela incubação durante uma hora em meio suplementado com 10% de soro de ovelha em estro (Cognié *et al.*, 2003).

Em determinados laboratórios, os oócitos maduros são colocados em contato durante 17 horas com os espermatozoides (106/mL) em meio Fluido Sintético de Oviduto (SOF), sob óleo mineral e em uma atmosfera a 5% de CO₂ mantido a 38,5 °C, e em média 75 a 80% de zigotos normalmente fecundados são obtidos na rotina (Cognié *et al.*, 2004). Esse período de 17 horas de incubação dos oócitos com os espermatozoides foi originalmente estabelecido por questões práticas. Contudo, após quatro horas de co-incubação dos oócitos caprinos com os espermatozoides capacitados, a taxa de clivagem e a de blastocistos são similares às 17 h de co-incubação (Cognié *et al.*, 2003). Nesse contexto, estudos são necessários para determinar se a redução do período de interação espermatozóide-oócito e, conseqüentemente, a remoção dos potenciais danos oriundos dos produtos provenientes do metabolismo espermático (como os radicais livres) e soro, afetam o desenvolvimento embrionário e melhoram as taxas de implantação após transferência embrionária nos animais domésticos, como tem sido observado para fertilização in vitro humana (Gianaroli *et al.*, 1996).

Na fertilização in vitro caprina, tem-se observado que muitos embriões que clivam precocemente apresentaram baixas taxas de desenvolvimento (Cognié *et al.*, 2004). Dessa forma, um maior conhecimento dos mecanismos de interação entre os gametas faz-se necessário para incremento na produção e sobrevivência dos embriões caprinos produzidos in vitro.

Três sistemas de cultivo são rotineiramente utilizados para produção in vitro: (1) co-cultivo com células somáticas; (2) condições semidefinidas no meio proposto para suprir os requerimentos embrionários; ou (3) desenvolvimento in vivo em oviduto. O co-cultivo de embriões caprinos é geralmente realizado em meio TCM199 ou B2, usualmente suplementado com soro fetal bovino (SFB) (Cognié *et al.*, 2004). Izquierdo *et al.* (2002) mostraram que o tipo de sistema de cultivo in vivo ou in vitro não influenciou as taxas de desenvolvimento de maturação in vitro / fertilização in vitro de oócitos caprinos. Cognié *et al.* (2003) indicam que, no dia seguinte à inseminação, os presumíveis zigotos devem ser cultivados em microgotas de fluido sintético de oviduto e, assim, mantidos durante sete dias em uma atmosfera contendo 5% de CO₂, 5% de O₂, e 90% de N₂.

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

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

Os resultados de fertilidade de receptoras de embriões caprinos variam bastante conforme a origem desses embriões: frescos ou criopreservados e produzidos *in vivo* ou *in vitro* (Paula, 2008). Resultados encorajadores em termos de taxas de sobrevivência após transferência de embriões caprinos vitrificados/desvitrificados têm sido relatados (Traldi *et al.*, 1999).

A produção *in vitro* de embriões caprinos vem avançando rapidamente. A aplicação de técnicas *in vitro* (maturação, fertilização e cultivo) para a espécie caprina pode facilitar a produção de um grande número de embriões a partir de uma única fêmea doadora. Somando-se a essa situação, a utilização de animais pré-púberes, em que a colheita de óocitos é realizada em idade precoce, pode reduzir o intervalo de gerações e, conseqüentemente, acelerar a propagação de animais valiosos. Contudo, é evidente que a inadequada maturação oocitária *in vitro* é a etapa limitante para a utilização dos embriões produzidos por esse método (Paula, 2008).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento e aprimoramento das biotécnicas ligadas a reprodução contribuiu para o crescimento do setor da caprinocultura, uma vez que permitiu o aumento da eficiência produtiva dos rebanhos. Isso porque estas técnicas promoveram a diminuição do intervalo entre partos, bem como permitiu um maior número de crias por fêmea, o que levou a uma maior disseminação de materiais genéticos desejáveis. Entre outros benefícios, do ponto de vista sanitário, estas técnicas são mais seguras, permitindo o controle de doenças no rebanho. Quando associadas com outras técnicas, a TE e a FIV possibilitam a comercialização de material genético dentro e entre países, a introdução de novos genótipos em rebanhos por um preço mais acessível e a formação de bancos de germoplasma de raças nativas ou naturalizadas ameaçadas de extinção.

REFERÊNCIAS

- Aguilar B., Roche A., Oliveira J., Folch J., Alabart J.L. 2002. Oocyte retrieval after repeated ovum pick-up in unstimulated sheep and goat. In: Meeting Association Européenne de Transfert Embryonnaire (AETE), 18, Nouzilly, France. Proceedings ... Nouzilly: INRA, p.130.
- Agrawal K.P. & Goel A.K. 1991. Production of elite jaminapari kids by embryo transfer technology. *Indian J. Anim. Reprod* 12:78-80.
- Armstrong D.T., Pfizner A.P., Warnes G.M., Seamark R.F. 1983. Superovulation treatments and embryo transfer in Angora goats. *Journal of Reproduction and Fertility* 67(2):403-410.
- Baldassarre H., Karatzas C.N. 2004. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. *Anim Reprod Sci* 82/83:255-266.
- Baril, G. 1995. Possibilidades atuais da transferência de embriões em caprinos. In: Congresso brasileiro de reprodução animal 11, 111- 119.
- Beatty R.A. 1951. Transplantation of mouse eggs. *Nature* 168:995.
- Besenfelder U., Möblaher G., Brem G. 1999. Oocyte collection. *Reprod Domest Anim Suppl* 6:38-44.
- Bezerra F.S.B. 2009. Criopreservação do sêmen caprino: efeito de diferentes palhetas, taxas de descongelamento e crioprotetores. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal área de concentração Produção e Sanidade Animal) – Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró. 93p.
- Chemineau P., Procureur R., Cognié Y., Lafevre P.C., Locatelli A., Elsdén, R.P., Nelson L.D., Seidel G.E., Jr. 1978. Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotrophin. *Theriogenology* 9:17-26.
- Cognié Y., Poulin N., Locatelli Y., Mermillod P. 2004. State-of-the-art production, conservation and transfer of *in-vitro*-produced embryos in small ruminants. *Reprod Fertil Dev* 16:437-445.
- Cognié Y., Baril G., Poulin N., Mermillod P. 2003. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology* 59:171-188.
- Cognié Y., Baril G. 2002. Le point sur la production et le transfert d'embryons obtenus *in vivo* e *in vitro* chez la brebis e la chèvre. *Prod Anim* 15:199-207.
- Cognié Y. State of art in sheep-goat embryo transfer. 1999. *Theriogenology* 51:105-116.
- Doijode S.V., Bakshf S.A., Pargaonkar D.R., Markandeya N.M. 1992. Studies on synchronization of oestrus, superovulation and recovery of embryos in goats. *Indian Journal of Animal Science* 62(9):846-848.
- Eppig J.J., O'Brien M.J. 1996. Development *in vitro* of Mouse Oocytes from Primordial Follicles. *Biol Reprod* 54:197-207.
- Figueiredo J.R., Gonçalves, P.B.D., Freitas, V.J.F. 2002. Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal. 2ª edição. Varela, São Paulo, p. 340.
- Filgueira T.M.B., Ahid, S.M.M., Suassuna A.C.D., Souza W.J., Fonseca, Z.A.A.S. 2009. Aspectos epidemiológicos e sanitários das criações de caprinos na região da chapada do apodi. *Revista*

- Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável 4(2):64-67.
- Fonseca J. F. 2005. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. In: Congresso Brasileiro De Reprodução Animal, 16, 2005. Anais... Goiânia: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, p. 1-9.
- Freitas V.J.F., Serova I.A., Andriiiva L.I., Serov O. 2007a. Estado da arte na produção de caprinos transgênicos clonados. Acta Scientiae Veterinariae 35:899-904.
- Freitas V.J.F., Serova, I. A., Andriiiva L.I., Dvoriantchikov G., Lopes Junior E.S., Teixeira D.I.A., Moura R.R., Melo L.M., Pereira A.F., Carvalho A.C.C., Serov O. 2007b. Production of transgenic goat (*Capra hircus*) with human Granulocyte Colony Stimulating Factor (hG-CSF) gene in Brazil. Anais da Academia Brasileira de Ciências 79:585-592.
- Freitas V.J.F., Serova I.A., Andreeva L.E. et al. 2002. Embryo recovery and transfer in a transgenic goat program in Brazil. Theriogenology 57:780.
- Gianaroli M.C., Magli M.C., Ferrareti A.P., Fiorentino A., Tosti E., Panzella S. 1996. Reducing the time of sperm-oocyte interaction in human in vitro fertilization improves the implantation rate. Human Reprod 11:166-171.
- Gonçalves P.B.D., Vizintin J.A., Oliveira M.A.L., Montagner M.M., Costa L.F.S. 2002. Produção in vitro de embriões. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. São Paulo: Varela, p.195-226.
- Gootwin, E., Barash I., Bor A., Dekel I., Friedler A., Heller M., Zaharoni U., Zenua A., Shani M. 1997. Factors affecting success of embryo collection and transfer in a transgenic goat program. Theriogenology 48(3):485-499.
- Gordon J.W., Scangos G.A., Plotkin D.J., Barbosa J.A., Ruddle F.H. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. Proc Natl Acad Sci USA 77:7380-7384.
- Gordon J.W., Ruddle F.H. 1981. Integration and Stable Germ Line Transmission of Genes Injected Into Mouse Pronuclei. Science 214:1244-1246.
- Graff K.J., Meintjes M., Dyer V.W., Paul J.B., Denniston R.S., Ziomek C., Godke R.A. 1999. Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval following FSH stimulation of domestic goats. Theriogenology 51:1099-1119.
- Gutierrez C.G., Ralph J.H., Telfer E.E., Wilmut I., Webb R. 2000. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture. Biol Reprod, 62:1322-1328.
- Hafez E.S.E., Hafez B. 2004. Reprodução animal. 7a ed. Manole, São Paulo.
- Hammer R.E., Pursel V.G., Rexroad C.E., Wall R.J., Bolt D.J., Ebert K.M., Palmiter R.D., Brinster R.L. 1985. Production of Transgenic Rabbits, Sheep and Pigs by Microinjection. Nature 315:680-683.
- Hasler, J.F. 1992. Current status and potential of embryo transfer and reproductive technology in dairy cattle. Journal of Dairy Science, Champaign 75(10):2857-79.
- Hirao Y., Nagai T., Kubo M., Miyano T., Miyake M., Sato S. 1994. In vitro growth and maturation of pig oocytes. J Reprod Fertil 100:333-339.
- Houdebine L.M. 2005. Use of transgenic animals to improve human health and animal production. Reprod Domest Anim 40:269-281.
- Houdebine L.M. 2002. The methods to generate transgenic animals and to control transgene expression. J Biotechnol 98:145-160.
- Hsu S.Y., Hsueh A.J. 2000. Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis, p. An ovarian paradigm. Physiol Rev 80:593-614.
- Huanmin Z., Yong Z. 2000. In vitro development of caprine ovarian preantral follicles. Theriogenology 54:641-650.
- Hulshof S.C.J., Figueiredo J.R., Beckers J.F. 1994. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. Veterinry Quarterly 16:78-80.
- Hunter C.V., Tiley L.S., Sang H.M. 2005. Developments in transgenic technology: applications for medicine. Trends Mol Med 11:293-298.
- Ishwar A.K., Memon M.A. 1996. Embryo transfer in sheep and goats: a review. Small Ruminant Research 19(1):35-43.
- Izquierdo D., Villamediana P., Lopez-Bejar M., Paramio M.T. 2002. Effect of in vitro and in vivo culture on embryo development form prepubertal goat IVM/IVP oocytes. Theriogenology 57:1431-1441.
- Jaenisch R. 1988. Transgenic animals. Science 240:1468-1474.
- Jaenisch R., Fan H., Croker B. 1975. Infection of preimplantation mouse embryos and of newborn mice wit leukemia virus: tissue distribution of viral DNA and RNA and leukemogenesis in the adult animal. Proceedings of the National Academy of Sciences of thw United States of America, Washington 72(10): 4008-4012.
- Kraemer D.C. 1989. Embryo collection and transfer in small ruminants. Theriogenology 31(1):141-148.
- Lima R.A.S. 2008. Distribuição do rebanho caprino no Brasil nos anos 1995/96 e 2006. In.: Congresso da Sociedade Brasileira de Economia. Rio Branco, XLVI, 2008. Anais... Acre: Sociedade Brasileira de Economia, Administracao e Sociologia Rural. p. 1-10.
- Lima P.F. 2004. Use of retinoids and growth factor to in vitro production of bovine embryos. Recife: Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife.
- Lindner G.M., Wright R.W. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. Theriogenology 20:407-416.
- Markstrom E., Svensson E., Shao R. et al. 2002. Survival factors regulating ovarian apoptosis-dependence on follicle differentiation. Reproduction 123:23-30.
- Martins F.S., Silva J.R.V., Rodrigues A.P.R., Figueiredo J.R. 2008. Fatores Reguladores da Foliculogênese em Mamíferos. Rev Bras Reprod Anim, Belo Horizonte 32(1):36-49.
- Meinecke-Tillman S., Evers P., Meincke B. 1987. Relationships between PMSG plasma concentrations and ovarian response after superovulatory treatment in Merino ewes. Theriogenology 27(1):259.
- Milazzotto M.P., Visintin J.A., Assumpção M.E.O. 2008. A. Biologia molecular aplicada à biotecnologia. Ciênc. Vet. Tróp. 11(1):145-148.

- Moore N.W. 1974. Multiple ovulation and ovum transfer in the goat. *Proc. Austral. Sci. Anim. Produc* 10:246-249.
- Niemann H., Kues W.A., Carnwath J.W. 2005. Transgenic farm animals: present and future. *Rev Sci Tech OIE* .24:285-298.
- O'Brien M.J., Pendola J.K., Eppig J.J. 2003. A revised protocol for in vitro development of mouse oocyte from primordial follicles dramatically improves their development competence. *Biol Reprod* 68:1682-1686.
- Oliveira V.S., Gonzales C.I.M. 1992. Transferência de embriões em caprinos. I Simpósio nordestino sobre caprinos e ovinos deslanados. 21-32p.
- Paula N.R., Cardoso J.F.S., Oliveira M.A.L., Freitas V.J.F. 2008. Embriões caprinos produzidos in vitro ou in vivo: técnicas, problemas e perspectivas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. Belo Horizonte 32(1):21-35.
- Pedrosa K.Y.F., Barrêto Jr. R.A., Costa E.S., Leite A.I., Paula V.V.P. 2003. Aspectos epidemiológicos e sanitários das criações de caprinos na zona noroeste do Rio Grande do Norte. *Caatinga* 16(1/2):17-21.
- Pegoraro-Rumpf L.M., Bem A.R. De, Rumpf R., Peixer M.A.S., Deschamps J.C. 1992. Comparação de diferentes crioprotetores na congelção de embriões caprinos. In: *Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões*, 7, 1992. Anais... Jaboticabal, São Paulo: SBTE, p.95.
- Pieterse M.C., Kappen K.A. 1992. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 30:751- 762.
- Salles H.O., Andrioli-Pinheiro A., Soares A.T., Moura Sobrinho P.A., Marques M.A.J., Moraes J.B. 1996. Utilização da semi-laparoscopia na transferência de embriões em caprinos. In: *REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES*, 24, 1996, Anais... Águas de Lindóia, São Paulo: SBTE, p.
- Santana A. F de. 1994. Transferência de embriões em caprinos. Seminário apresentado no curso de mestrado em produção e reprodução de pequenos ruminantes da faculdade de veterinária da Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza-Ceará.
- Senn B.J., Richardson M.E. 1992. Seasonal effects on caprine response to synchronization of estrus and superovulatory treatment. *Theriogenology* 37(3):579-585.
- Simplicio A.A., Salles H.O., Santos D.O. 2002. Transferencia de embriões nos pequenos ruminantes domésticos. In: *Cong. Norte/Nordeste de Reprod. Anim* 1:17-27.
- Simplicio A.A., Santos D.O., Souza T.E.F. De, Wanderley A.A.D. 1999. Inovulação a fresco e após criopreservação de embriões caprinos produzidos in vivo em fêmeas pré-púberes e púberes. *Arquivo da Faculdade de Veterinária, UFRGS, São Paulo* 27(1):318.
- Tervit H.R., Goold P.G., Mckenzie, R.D., Clarkson D.J. 1983. Techniques and success of embryo transfers in Angora goats. *New Zealand Veterinary Journal* 31(5):67-70.
- Tervit H.R., Goold P.G., Mckenzie R.D. 1986. Development of an effective goat embryo transfer regime. In: *NEW ZEALAND SOCIETY ANIMAL PRODUCTION*, 1986. *Proceedings...*,46:233-236.
- Tervit H.R., Goold P.G., Mckenzie R.D., Clarkson D.T. 1983. Techniques and success of embryo transfer in Angora goats. *New Zeal. Vet. J.*31: 67-70.
- Thibier M., Nibart M. 1992. Clinical aspects of embryo transfer in some domestic farm animals. *Animal Reproduction Science* 28:139-148.
- Traldi A.S., Leboeuf B., Cognié Y., Poulin N., Mermillod P. 1999. Comparative results of in vitro and in vivo survival of vitrified in vitro produced goat and sheep embryos. *Theriogenology* 51:175.
- Valle M.A.G., Amâncio M.J.J., Andrade S.J.T., Chow L.A. 1988. Transferência de embriões em caprinos leiteiros. *Cabras & Bodes*. Ano IV 16:13-14.
- Warwick B.L., Berry R.O., Horlacher W.R. 1934. Results of mating rams to Angora female goats. *Proc. Amer. Sci. Anim. Produc.* p.225.
- Wischnal A., Lima P.F., Oliveira M.A.L., Ribeiro V.M.F. 1989. Transferência de embriões caprinos. *Revista do Centro de Ciências Rurais* 19:19.