

Abordagem histórica do desenvolvimento das biotécnicas da reprodução em ruminantes com ênfase em caprinos e ovinos.

Resumo

Caprinos e ovinos são animais de produção que se tornam cada vez mais importantes na indústria pecuária, quer seja no Brasil ou no resto do mundo. Parte importante do sucesso destas espécies deve-se ao fato que as mesmas são responsivas ao uso das diferentes biotécnicas reprodutivas. Assim, esta revisão tem por objetivo realizar a abordagem histórica do uso dessas biotécnicas, dando ênfase aos aspectos pioneiros, sobretudo os fatos ocorridos no Brasil.

Palavras-chave: caprino, ovino, reprodução, biotécnicas.

Abstract

Goats and sheep are production animals becoming increasingly important in the livestock industry, whether in Brazil or elsewhere in the world. An important part of the success of these species is due to the fact that they are responsive to the use of different reproductive biotechnologies. Thus, this review aims to make a historical approach to the use of these biotechnologies, emphasizing the pioneering aspects, especially the events in Brazil.

Keywords: goat, sheep, reproduction, biotechnologies.

Inseminação Artificial e Sincronização do Estro

Foi Iwanow, biólogo russo, quem estabeleceu os princípios técnico-científicos para o uso da inseminação artificial em diferentes espécies, incluindo a ovina, inicialmente usando sêmen fresco (Iwanow, 1907). Enquanto, Milowanow, cientista russo, na década de 30 usou pela primeira vez a vagina artificial para colheita de sêmen em ovinos e formulou diluidores que deram suporte ao transporte de sêmen. Ressalte-se que, nos dias atuais a inseminação artificial (IA), independente de espécie, ainda é a biotécnica da reprodução que mais impacta o processo produtivo além de contribuir fortemente para o controle de doenças e a melhoria genética dos rebanhos. No Brasil, na fêmea caprina, provavelmente, as primeiras inseminações com sêmen congelado-descongelado foram as descritas por França (1981), seguido por Costa et al. (1982) no Estado de Pernambuco, ao usarem cabras nativas sincronizadas com prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$). Ainda, no Brasil, devem-se destacar as contribuições para o conhecimento, o desenvolvimento e a consolidação do uso da IA nas fêmeas bovina e ovina, como prática de manejo reprodutivo, feitas por Souza (1912), Jordão (1934; 1936-1937; 1937); Barreto e Mies Filho (1944); Mies Filho e Barreto (1949) e Mies Filho (1977). Na fêmea caprina, o primeiro registro de uso da IA, possivelmente ocorreu há, aproximadamente, 82 anos (Benediktovic, 1934) e tem sido bastante usada, principalmente na França. No Brasil o fato data, de 62 anos (Inseminação ... 1954; Machado e Simplício, 1995). No entanto, apesar de transcorrido mais de meio século a IA como técnica de manejo reprodutivo, ainda não se firmou, independente da forma de uso do sêmen: fresco, resfriado ou congelado. Entende-se que a quase completa ausência de organização e gestão da cadeia produtiva da caprinocultura como atividade inserida no agronegócio não é a única, mas provavelmente a principal responsável. Na fêmea ovina,

dentre os fatores responsáveis pelo limitado uso da IA destacam-se a anatomia da cérvix uterina; a ausência de uma técnica de inseminação eficaz, simples e de baixo custo e a inexistência de técnicas eficazes e seguras para se avaliar a capacidade fecundante da célula espermática, antes e após a congelação (Luz et al., 2000). Killen e Caffery (1982), ao usarem a laparoscopia como técnica de IA na fêmea ovina deram uma grande contribuição para a expansão do uso desta técnica em nível de unidade produtiva. A laparoscopia, afora permitir a suplantação da barreira física imposta pela condição anatômica da cérvix favorece a redução da dose inseminante, mesmo quando se usa espermatozóide sexado, podendo ser usada independente da época do ano; do regime de manejo; do tipo de estro: natural, sincronizado ou induzido e da forma de apresentação e de preparação do sêmen (Luz et al., 2000). No Brasil, as primeiras inseminações intra-uterinas feitas na ovelha, com sêmen congelado, por laparoscopia, possivelmente foram as descritas por Artola et al., 1987; Aginsky e Canabarro Filho, 1988). Independente da técnica usada, a experiência do inseminador contribui fortemente para se alcançar os resultados compatíveis com a capacidade biológica dos indivíduos, fêmea e macho, e com o sistema de exploração. Meza e Ross (2000), ao usarem sêmen congelado-descongelado em fêmeas caprinas leiteiras, pluríparas e em estro natural, concluíram que os principais fatores que limitam o sucesso da técnica é a ausência de qualificação e de experiência do inseminador. Certamente, o local de deposição do sêmen no sistema genital não deve ser negligenciado, pois contribui diretamente para o aumento da fertilidade ao parto. Este aspecto é fundamental para a aceitação da IA quanto técnica de manejo reprodutivo e por consequência para o seu uso amplo com sêmen congelado em nível de rebanho.

Independente de espécie, para o sucesso da IA como técnica de manejo reprodutivo e como ferramenta auxiliar no melhoramento genético dos rebanhos, é de importância fundamental o uso de sêmen oriundo de doadores geneticamente testados e aprovados. Neste contexto, no Brasil, a avaliação genética de machos caprinos e ovinos jovens e a identificação daqueles superiores ganham importância. Também, a necessidade de intercâmbio de sêmen congelado oriundo desses animais, entre os estados, as regiões e os países. Na fêmea caprina, a IA com sêmen congelado-descongelado, via cérvix uterina é uma realidade no Brasil e no mundo. Na fêmea ovina, apesar dos resultados animadores descritos na literatura com relação ao sucesso da inseminação pela via transcervical, ainda existe os desafios da praticidade e da eficácia desta técnica (Halbert et al., 1990; Buckrell et al., 1994). Ressalte-se que a técnica transcervical, afora contribuir para a redução dos custos operacionais, favorece a massificação do uso do sêmen congelado-descongelado. A sincronização do estro nas fêmeas dos ruminantes domésticos, geralmente é feita mediante o uso de progesterona base e dos progestágenos: - acetato de fluorogestona (FGA); - acetato de medróxiprogesterona (MAP) e - norgestomet e da $PGF_{2\alpha}$ e seus análogos sintéticos. Provavelmente, o mais importante marco tecnológico por sua praticidade de uso e eficácia, para o sucesso da sincronização do ciclo estral e indução do estro e da ovulação e, por consequência no uso da IA, na fêmea ovina, foi feito por Robinson (1964) ao desenvolver a técnica da esponja intra-vaginal impregnada com progestágeno. A técnica, também, teve impactos positivos e significativos na ampliação e massificação do uso da IA, na fêmea caprina no mundo. Avanços substanciais, científico e técnico, têm sido feitos quanto ao momento da IA em associação a sincronização hormonal do estro (Freitas et al., 1997). Esta, além de favorecer o uso da IA, fortemente contribui para sua massificação em nível de unidade produtiva.

No Brasil, na fêmea bovina a sincronização do estro e da ovulação em associação a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), dispensando a observação das fêmeas para ocorrência de estro clínico já é realidade como prática de manejo reprodutivo (Barros et al., 1998; Ribeiro Filho et al., 2002). Nas fêmeas, caprina e ovina, avanços significativos têm sido feitos no sentido de encurtar o período de exposição das fêmeas aos progestágenos e tornar a IATF de uso corrente (Menchaca e Rubianes, 2006; Fonseca et al., 2007). Em regiões tropicais, a IATF via cérvix com o uso de sêmen criopreservado deve ser feita a partir das 44 horas em ralação ao momento da remoção da esponja intravaginal, impregnada com progestágeno e aplicação intramuscular de gonadotrofina coriônica equina (eCG) (Machado e Simplício, 2001). Menchaca e Rubianes (2004) e Menchaca et al. (2006) têm descritos resultados alvissareiros de fertilidade ao parto com o uso de uma única IATF nas fêmeas dos pequenos ruminantes domésticos submetidas a sincronização do estro. Entende-se que com o estro sincronizado a relação custo-benefício é favorável quando uma única IATF garante, pelo menos, 60,0% de fertilidade ao parto.

Transferência de Embriões

A transferência de embriões (TE) é uma biotécnica da reprodução que quando usada com critérios, técnico e científico contribui, positivamente, para o melhoramento genético dos rebanhos e a multiplicação rápida de animais em via de extinção. Também, de indivíduos geneticamente provados e superiores, contribuindo para a redução do intervalo entre as gerações por possibilitar a obtenção de embriões de fêmeas púberes e mesmo pré-púberes como descrito em caprinos (Salles et al., 1998; 2000). A TE com foco na produção de embriões *in vivo* apresenta alguns desafios, dentre eles a impossibilidade de se prever a produção de embriões de qualidade e sua repetibilidade. Ainda, a técnica tem sido usada para controle de doenças, particularmente das viroses (Wolfe et al., 1987). Ressalta-se a importância da integridade da zona pelúcida para a eficácia e segurança do processo (Shisong e Wrathall, 1989). No Brasil, evidenciam-se o uso da TE como técnica de controle da Artrite Encefalite Caprina (CAE) (Castro, 1994; Andrioli-Pinheiro et al., 1996; Cavalcante et al., 1998).

A possibilidade da transferência de embriões na espécie caprina foi demonstrada nos Estados Unidos por Warwick et al. (1934) e Warwick e Berry (1949). No Brasil, a primeira experiência em caprino foi feita por Chow et al. (1986), em Minas Gerais, ao transferirem embriões frescos da raça Branca Alemã para receptoras mestiças, redundando no abortamento de dois fetos, de sexos diferentes, de uma mesma receptora, aos 130 dias de gestação. Entretanto, o nascimento de crias caprinas viáveis oriundas de transferências de embriões frescos ocorreu em 1989, no Estado do Paraná (Multiplicação ..., 1989) e em Pernambuco (Wischnal et al., 1989). Enquanto, em ovino a primeira inovulação foi conduzida por Selaive-Villaroel e Mies Filho (1979), na Embrapa, em Bagé, no Rio Grande do Sul. Avanços significativos têm sido feitos em diferentes etapas do processo, ressaltando-se a escolha das doadoras e receptoras; a sincronização do estro, da ovulação e a superovulação das doadoras; as técnicas de colheita e de criopreservação de embriões; o manejo de doadoras e receptoras e na própria técnica de transferência (Salles et al., 2002). Nos pequenos ruminantes domésticos, a colheita é feita seis a oito dias após o início do estro e é recomendável jejum hídrico e alimentar, mínimo de 24 horas. No Brasil, na fêmea caprina a colheita de embriões pela via transcervical foi posta em prática com os resultados alcançados por Pereira et al. (1998). Ainda no Brasil, Gusmão et al. (2002) descrevem a

modificação da técnica de colheita de embriões por meio da cérvix ao usarem catéter desprovido de balão. No entanto, acredita-se que Salles (2001), fez a diferença ao desenvolver a técnica de circuito fechado para a fêmea caprina, propiciando assim a possibilidade da colheita de embriões em condições de higiene quase que total. A inovulação na cabra deve ser feita com embriões em estádios de mórula e de blastocisto e com a sincronia entre o estágio de desenvolvimento dos embriões e o dia do ciclo estral da receptora igual ou inferior a 24 horas (Salles et al., 2002; Simplício et al, 2002). Ainda, a semi-laparoscopia é a técnica mais usada, por ser pouco invasiva e conseqüentemente de menor risco para a receptora, pela praticidade na execução e pelo custo (Salles et al., 2002; Gusmão e Andrade Moura, 2005). A inovulação por meio da cérvix foi descrita por Lin et al. (1979), mas o uso da técnica ainda não se tornou rotina. Na fêmea ovina, a colheita de embriões tem sido feita, preferencialmente por laparotomia e laparoscopia e sob anestesia geral. Geralmente, a laparotomia não é repetida mais do que três vezes (Cordeiro et al., 2003). No entanto, a colheita pela via transcervical em ovelhas foi reportada com sucesso (Almeida et al., 2002; Silva et al., 2005). Fato atribuído à contribuição significativa feita na simplificação da técnica e ao aumento no número de técnicos qualificados (Gusmão 2006; Fonseca et al, 2007). A técnica pode ser executada com o animal em estação, sob anestesia epidural, da cérvix uterina, bem como sob sedação leve.

As receptoras devem ser submetidas à avaliação técnica, considerando o genótipo e as características reprodutivas, particularmente o histórico de fertilidade, o intervalo de partos e a habilidade materna. Esta característica deve focar a capacidade de parir sem a interferência humana e de criar e desmamar cria(s) com bom desenvolvimento corporal. O animal deve estar, no mínimo, com 60 dias pós-parto, em ganho de peso positivo e com escore de condição corporal (ECC) igual ou superior a 2,5, porém não superior a 4,0, considerando a escala de 1 a 5. É recomendável que as doadoras e as receptoras sejam submetidas ao exame ginecológico (Silva e Neves, 1983) e, quando possível, associá-lo a ultrassonografia. A condição de estresse e a subnutrição afetam, negativamente, a resposta quanto a porcentagem de gestação e de sobrevivência dos embriões como demonstrado por Mani et al. (1994) na cabra. Observa-se que no transcorrer dos primeiros 40 a 50 dias após a inovulação, a oferta e o consumo de alimentos devem permanecer em nível de manutenção, desde que a alimentação-nutrição excessiva nesse período pode contribuir, negativamente, para a fertilidade ao parto. Práticas como vermifugação, banho antiparasitário e vacinação e mudanças no manejo alimentar e da nutrição devem ser feitas, pelo menos, com duas a três semanas de antecedência em relação ao início da sincronização do estro nas doadoras e receptoras. Como prática de manejo reprodutivo ressalte-se que o sucesso da TE depende de fatores como: a organização e a gestão da unidade produtiva; o regime de manejo imposto às doadoras e receptoras, particularmente no tocante ao ambiente e aos manejos alimentar, da nutrição e da prevenção de doenças e promoção da saúde; a resposta das doadoras frente ao desafio gonadotrófico; a porcentagem de fecundação das doadoras; as técnicas de colheita e de inovulação; a qualidade dos embriões; a condição em que os embriões são manipulados, isto é, fresco ou criopreservado; a sincronia entre o estágio reprodutivo das receptoras e a idade dos embriões; a sobrevivência dos embriões e a qualificação e experiência da equipe técnica.

Produção e Micromanipulação de Embriões

O Brasil ocupa a liderança mundial na produção de embriões bovinos usando-se a aspiração folicular guiada por ultrassonografia em associação a fecundação (FIV) e ao cultivo (CIV) *in vitro*. Ressalte-se que, possivelmente, o primeiro protocolo desenvolvido para maturação de oócitos *in vitro* foi descrito em ovinos por Moor e Trounson (1977). Mas, é possível que a primeira cria caprina oriunda de FIV no mundo foi conseguida a partir de oócitos maturados *in vivo* (Hanada, 1985). No entanto, o nascimento de crias caprinas a partir de oócitos maturados e fecundados *in vitro* seguido de CIV, por sete dias, ocorreu em 1992 (Crozet et al., 1993). No Brasil, em setembro de 2006 nasceu a primeira cria ovina obtida a partir da FIV (Pontes, 2006).

Nos pequenos ruminantes domésticos a qualidade, a porcentagem de maturação e de fecundação de oócitos e o desenvolvimento e a qualidade dos embriões produzidos *in vitro* são influenciadas por diversos fatores. É de fundamental importância que o oócito ao ser aspirado já tenha adquirido competência meiótica e esta tem sido correlacionada com o tamanho do folículo puncionado (Martino et al., 1994a; Crozet et al., 1995). A idade da doadora; a técnica de aspiração dos oócitos; a presença ou ausência de células da granulosa; a presença e a concentração de gonadotrofinas e esteróides nos meios de maturação, fecundação e cultivo; a temperatura de incubação; a fonte de soro sanguíneo e sua concentração nos meios de maturação, fecundação e cultivo e a composição do meio de maturação, fecundação e cultivo influenciam diretamente no número e na morfologia das estruturas colhidas e na porcentagem de maturação alcançada (Martino et al., 1994b; Pawshe et al., 1994; Thompson et al., 1989; Walker et al., 1989; De Smedt et al., 1992; Staigmiller e Morr, 1984; Song e Iritani, 1987; Martino et al., 1995; Simplício et al., 1997).

O período de tempo para a completa maturação *in vitro* varia com a espécie como descrito para a ovina (Szöllösi et al., 1988) e a caprina (Kim et al., 1984; Le Gall et al., 1992; Keskintepe et al., 1994; Sharma et al., 1996). Restall e Wales (1966) e Tervit et al. (1972) ao estabelecerem a composição química do líquido originário das trompas uterinas deram um grande passo para se viabilizar a preparação de meio de cultivo (SOF) que suportassem o desenvolvimento de embriões bovinos e ovinos do estágio de oito células para os estádios de mórula e blastocisto. Estádios estes em que os embriões são transferidos e criopreservados. Brackett e Oliphant (1975) prestaram importante e significativa contribuição ao desenvolverem um meio de capacitação para os espermatozóides de coelho. Este meio serviu de suporte a adaptações para a capacitação dos espermatozóides de ruminantes, congelados sob a ação de diferentes crioprotetores e descongelados (Cox et al., 1995; Poulin et al., 1996). Em princípio, independente da espécie de ruminante, a FIV teve início com oócitos obtidos de ovários oriundos de abatedouro. No entanto, a aspiração folicular *in vivo* tornou-se uma realidade. Na fêmea caprina, a aspiração folicular *in vivo* tem sido usada a partir de Graff et al. (1995). A colheita de oócitos em animais vivos e saudáveis, sob controle laparoscópico, pode ser realizada a cada semana, Tabela 1. Com uso da aspiração folicular guiada por laparoscopia e posterior MIV, FIC e CIV, Souza-Fabjan et al (2014) obtiveram os primeiros embriões da raça caprina Canindé, naturalizada do Nordeste do Brasil. A técnica de aspiração folicular guiada por laparoscopia, seguida da FIV e CIV de zigotos até o estágio de blastocisto favorece se obter um grande número de embriões e, desta forma, aumentar a descendência de fêmeas geneticamente provadas e superiores (Freitas e Melo, 2010). Também permite produzir embriões filhos de vários machos, mas, de uma mesma fêmea, dando suporte a testes de progênie. A aspiração folicular guiada por laparoscopia é menos invasiva e mais simples que a colheita de embriões por laparotomia. A técnica também é eficaz em momentos específicos como a

pré-puberdade e o início da gestação, Tabelas 2 e 3. Ressalte-se que, durante esta, a produção de embriões *in vivo* é impossível (Baldassarre e Karatzas, 2004; Baldassarre et al., 2004). Ressalte-se que com este protocolo elimina-se a necessidade do controle da regressão precoce de corpo lúteo que ocorre numa porcentagem significativa de cabras superovuladas (Cognié et al, 2003).

A produção de embriões *in vivo* e *in vitro*, particularmente esta, aliada a criopreservação e transferência de embriões é muito importante para a preservação e multiplicação de genótipos, principalmente aqueles em via de extinção. Também, favorece o melhoramento genético dos rebanhos por permitir à multiplicação rápida dos indivíduos e em consequência a redução do intervalo entre as gerações. O processo de criopreservação pode contribuir para o desenvolvimento sócio-econômico da humanidade desde que as técnicas usadas sejam de execução simples, seguras e eficazes e possam ser aplicadas as espécies, humana e animal. Provavelmente, a primeira cria ovina nascida viva a partir de embriões congelados foram obtidas por Willadsen et al. (1976). Enquanto, a sobrevivência de embriões caprinos a congelação rápida, possivelmente, foi descrita pela primeira vez por Rao et al. (1988). Yuswiatti e Holtz (1990) descreveram o nascimento de crias caprinas oriundas de embriões produzidos *in vivo* e vitrificados usando uma solução crioprotetora a base de glicerol e propanediol. O sucesso da vitrificação de embriões ovinos e os fatores que afetam a viabilidade de hemi-embriões, frescos e congelados-descongelados foram discutidos por Shelton (1992) e Ali e Shelton (1993). Evidencie-se que, independente da técnica de congelação, o uso exclusivo do etilenoglicol ou do glicerol, bem como, da solução dos dois têm favorecido o alcance dos melhores resultados (Fieni et al., 1995; Salles et al. 1997; Traldi et al., 1997; 1999). Ressalte-se que o uso do etilenoglicol favorece a transferência direta dos embriões com a remoção do crioprotetor ocorrendo no útero. Por outro lado, a cada dia, resultados, científico e técnico, mostram que a vitrificação é a técnica de criopreservação de oócitos e embriões de ruminantes que mais pode contribuir para se otimizar a transferência de embriões como ferramenta de manejo reprodutivo, em especial quando associada a transferência direta (Vajta et al., 1998; Dattena et al., 2000; Osborn, 2007). Apesar dos avanços feitos nas diferentes fases do processo de produção de embriões *in vitro* não se pode deixar de chamar a atenção para a ocorrência de problemas: anormalidades nos oócitos, abortamento, hidroalantóide, período de gestação prolongado, mortalidade perinatal elevada, anomalia congênita, peso ao nascer elevado, dentre outros (Peixer et al., 2000). No entanto, com os conhecimentos e tecnologias ora disponíveis entende-se que a produção e inovulação de embriões *in vitro* a partir de animais vivos, testados e geneticamente aprovados, oferecem resultados mais eficazes do que a transferência de embriões produzidos *in vivo*.

Tabela 1. Aspiração folicular em fêmeas caprinas por laparoscopia: número médio de folículos aspirados (NFA) e de oócitos recuperados (NOR) por doadora e porcentagem de recuperação.

Doadoras (N)	NFA	NOR	Recuperação (%)	Fonte
16	16,1	11,5	71,4	Graft et al., 1995
27	20,0	14,4	72,0	Graft et al., 1999
21	19,0	15,9	83,7	Koeman et al., 2000
23 ^a	39,0	28,4	72,8	Koeman et al., 2000
15	14,1	9,7	68,8	Terzano et al., 2000

60	18,5	14,8	80,0	Baldassarre et al., 2001
210	15,7	13,4	85,4	Baldassarre et al, 2003
10 ^a	42,0	33,0	78,6	Baldassarre et al., 2003
18	13,9	11,7	84,1	Avelar et al., 2012

^a Fêmeas pré-púberes.

Tabela 2. Aspiração folicular em fêmeas caprinas pré-púberes por laparoscopia: número médio de folículos aspirados (NFA) e de oócitos recuperados (NOR) por doadora e porcentagem de recuperação.

Idade, dia	Doadoras, N	NFA	NOR	Recuperação, %
50 a 89	20	59,3 ± 28 ^a	49,7 ± 24 ^a	83,8
90 a 150	36	34,4 ± 20 ^b	27,4 ± 14 ^b	79,7

^{a,b} P < 0,001. Fonte: Baldassarre et al., 2002.

Tabela 3. Aspiração folicular em fêmeas caprinas pré-púberes por laparoscopia: - fecundação *in vitro* e crias nascidas após transferência de embriões a fresco.

Variável/ Idade (mês)	Dois a três	Seis a sete	Probabilidade
Animais (N)	5	5	---
Folículos aspirados (± dp)	57 ± 16	28 ± 5	< 0,05
Oócitos recuperados (± dp)	41 ± 9	25,8 ± 6	< 0,05
Embriões inovulados	139	105	---
% oócitos/embriões	67,8	81,4	< 0,01
Receptoras (N)	23	15	---
N; % de gestação ao 28 ^o dia	9; 39,1	12; 80,0	< 0,05
N; % de perda de gestação	1; 11,0	0; 0	NS
Crias nascidas por receptora	1,9	2,2	NS

NS = não significativo. Fonte: Baldassarre et al., 2002.

Sexagem de Gametas e Embriões

O interesse pela determinação precoce do sexo nos mamíferos domésticos tem levado ao desenvolvimento de técnicas e protocolos em busca de segurança e eficácia (Jafar e Flint, 1996). A determinação do sexo pela observação da sequência de DNA do cromossomo Y a partir de células colhidas do embrião, por biópsia, é possível ser feita em bovinos após a amplificação do DNA através da reação em cadeia da polimerase (PCR). No entanto, os kits comercialmente disponíveis para sexagem de embriões bovinos podem ser usados para embriões caprinos e ovinos (Rao e Totey, 1992). O custo é elevado e, em geral, o preço obtido pela cria sexada não justifica o investimento, o que limita o uso da técnica em rotina. No entanto, após os avanços feitos com as técnicas de biologia molecular e com o conhecimento do genoma dos ruminantes, a possibilidade de tipagem genética do embrião antes da inovulação abre perspectivas de uso das técnicas de seleção assistida por marcadores biológicos. Também, uma alternativa é buscar determinar o sexo do feto pela identificação do tubérculo genital e sua migração. Nos pequenos ruminantes bons

resultados com a ultrassonografia transabdominal são obtidos entre o 40^o e o 75^o dia após a cobertura ou IA, enquanto, a transretal já é eficaz entre o 25^o e o 30^o dia (Haibel, 1990; Ishwar, 1995; Santos et al., 2006a, b; 2007). Entende-se a necessidade da sexagem dos fetos e do conhecimento do número deles em função da sua importância para se definir com mais eficácia os manejos da prevenção de doenças e promoção da saúde, alimentar e da nutrição das matrizes, em especial no transcórreo do terço final da gestação (Dawson et al., 1994).

Bissecção e Clonagem

Independente de espécie, a produção de dois animais geneticamente idênticos é perfeitamente possível após a bissecção seguida da transferência dos dois hemi-embriões para uma receptora previamente preparada (Saito e Niemann, 1993). No entanto, a bipartição de embriões caprinos parece ser mais difícil de operacionalizar em comparação com embriões de outros ruminantes, particularmente devido à junção célula-célula ser mais frágil, o que durante a manipulação pode levar a desintegração da maioria dos embriões. Também, a zona pelúcida dos embriões caprinos parece ser mais flexível do que a dos bovinos e ovinos, favorecendo o maior efeito de deslizamento quando da tentativa de cortá-la com a microlâmina. Ainda, os debris celulares decorrentes da bissecção do embrião favorecem a ocorrência de aderência ao instrumento. Todavia, a taxa de gestação após transferência dos hemi-embriões assemelha-se àquela alcançada após a inovulação de embriões inteiros (Udy, 1987). Em 2001 o nascimento das primeiras crias caprinas, gêmeas idênticas, em decorrência da bipartição e transferência a fresco dos hemi-embriões, teve lugar na Embrapa Caprinos (O Nordeste, 2001; O Berro, 2002). No final dos anos 80 e início da década de 90 a transferência nuclear de blastômeros para oócitos enucleados teve início e a técnica mostrava-se comercialmente promissora, mas, a variabilidade no desenvolvimento dos embriões assim reconstituídos e na taxa de gestação após inovulação não favorecia o sucesso comercial da técnica (Willadsen, 1986; Smith e Wilmut, 1990). Avanços significativos foram feitos com o nascimento de uma cria ovina a partir de um núcleo originado de células somáticas adultas mantidas em cultivo por algumas semanas (Wilmut et al., 1997). Fêmeas caprinas transgênicas que produzem leite rico em proteínas biologicamente ativas e por conseqüência de interesse para a saúde humana e comercial, têm sido multiplicadas através da técnica de clonagem somática (Baldassarre et al., 2004).

Transgenia

A produção de animais transgênicos, o desenvolvimento de protocolos para obtenção e seus desafios, bem como a importância desses animais para a agropecuária e a espécie humana têm sido descritos (Amarnath e Rao, 2000; Niemann et al., 2005). Ainda, a possibilidade de produção e liberação de proteína recombinante através do leite de animais transgênicos tem recebido atenção no meio científico. Neste contexto, a fêmea caprina é particularmente interessante, pois afora produzir quantidade significativa de leite o investimento para aquisição e o custo de manutenção desse tipo animal são menores em comparação a fêmea bovina.

A técnica tradicional para produção de caprinos transgênicos envolve a microinjeção de uma construção de DNA no interior do pró-núcleo de zigotos produzidos

in vivo (Ebert et al., 1991). No entanto, a técnica é pouco eficiente devido à integração aleatória e resultados imprevisíveis em termos de porcentual de crias nascidas transgênicas, em geral, menos de 10,0%, e a expressão da proteína recombinante que tem variado de zero a 10 g/ litro de leite. No entanto, avanços significativos têm sido feitos em protocolos e técnicas, particularmente no uso de zigotos produzidos *in vitro* a partir de oócitos colhidos por aspiração folicular sob controle laparoscópico (Baldassarre et al., 2002; Robl et al., 2007). Esta técnica maximiza o número de colheitas realizadas durante a vida de cada doadora, é mais eficiente em termos de número de embriões produzidos a partir de oócitos colhidos favorecendo a disponibilidade e o domínio do conhecimento quanto ao momento da fecundação e, conseqüentemente da microinjeção de DNA. Baldassarre e Karatzas (2004), enfatizam que este aspecto é crítico para o sucesso da integração do transgene. No Brasil, a partir da parceria entre a Universidade Estadual do Ceará (UECE) e a Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) nasceram as primeiras crias caprinas transgênicas após microinjeção de uma construção de DNA - Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos humano (hG-CSF) e transferência para receptoras (Freitas et al., 2012). O mesmo grupo demonstrou que os animais transgênicos eram férteis e que tanto a fêmea fundadora quanto a geração F1 produziu em seu leite quantidades significativas da proteína recombinante (Batista et al., 2014).

AUTORES

Aurino Alves Simplício, Médico Veterinário, CRMV-RN 0463, PhD em Ciência Animal, Empresa de Pesquisa Agropecuária de Rio Grande do Norte S/A (EMPARN)

Vicente José de Figueiredo Freitas, Médico Veterinário, CRMV-CE 1037, Doutor em Ciências da Vida, Universidade Estadual do Ceará (UECE)/ Faculdade de Veterinária (FAVET)

Referências

AGUINSKY, P.; CANABARRO FILHO, C.E. Inseminação intra-uterina em ovinos de corte com sêmen congelado. Emprego da via transperitonal por laparoscopia. **A Hora Veterinária**, v.45, p.5-7, 1988.

ALI, J.; SHELTON, J.M. Successful vitrification of day-6 sheep embryos. **J. Reprod. Fert.**, v.99, n.1, p.65-70, 1993.

ALMEIDA, V.M. et al. Colheita de embriões via transcervical em ovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.5, p.82-84, 2002.

AMARNATH, D.; RAO, B.S. Induction of transgenesis: a review. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS, 7, 2000. Tours, France. **Proceedings ... Paris: INRA, IGA, 2000. v.1, p.30-35.**

ANDRIOLI-PINHEIRO, A. et al. Controle da Artrite Encefalite Caprina a Vírus (CAEV) através da transferência de embriões (TE). In: Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias, 15, 1996, Campo Grande, **Anais...** Campo Grande: 1996. PN.13-63, p.391.

ARTOLA, L.A.B. et al. Inseminação intra-uterina por laparoscopia em ovinos com utilização de sêmen congelado. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL**, 7, Belo Horizonte, 1987. Anais ... p.102.

AVELAR, S.R.G.; MOURA, R.R.; SOUSA, F.C.; PEREIRA, A.F.; ALMEIDA, K.C.; MELO, C.H.S.; TELES-FILHO, A.C.A.; BARIL, G.; MELO, L.M.; TEIXEIRA, D.I.A.; FREITAS, V.J.F. Oocyte production and in vitro maturation in Canindé goats following hormonal ovarian stimulation. **Animal Reproduction**, v. 9, p.1-7, 2012.

BALDASSARRE, H.; KARATZAS, C.N. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. **Anim. Reprod. Sci.**, v.82-83, p.255-266, 2004.

BALDASSARRE, H.; KEEFER, C.; WANG, B.; LAZARIS, A.; KARATZAS, C.N. Nuclear transfer in goats using in vitro matured oocytes recovered by laparoscopic ovum pick-up. **Cloning and Stem Cells**, v. 5, p. 279-285, 2003.

BALDASSARE, H. et al. Laparoscopic ovum pick-up and zygote recovery in goats treated with deslorelin implants before superovulation. **Theriogenology**, v.55, n.1, p.510, 2001.

BALDASSARE, H. et al. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pickup and in vitro embryo production technologies. **Theriogenology**, v.57, p.275-284, 2002.

BALDASSARRE, H. et al. Prepubertal propagation of transgenic cloned goats by laparoscopic ovum pick-up and in vitro embryo production. **Cloning and Stem Cells**, v.6, n.1, p.25-29, 2004.

BARRETO, J.F.; MIES FILHO, A. Inseminação artificial em ovinos. **B. Insem. Artif.**, Rio de Janeiro, v.1, p.5-72, 1944.

BARROS, C.M.; MOREIRA, M.B.P.; FERNANDES, P. Manipulação farmacológica do ciclo estral para melhorar programas de inseminação artificial ou de transferência de embriões. **Arq. Fac. Vet.**, UFRGS, supl. 26, p.179-189, 1998.

BENEDIKTOVIC, S. **Anim. Breed. Abstr.**, v.2, n.3, p.219, 1934.

BRACKETT, B.G.; OLIPHANT, G. Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. **Biol. Reprod.**, v.12, p.260-274, 1975.

BUCKRELL, B.C. et al. Further development of a transcervical technique for artificial insemination in sheep using previously frozen semen. **Theriogenology**, v.42, n.4, p.601-611, 1994.

CASTRO, R.S. Emprego da biotecnologia da reprodução no controle da artrite encefalite caprina: Revisão. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.18, n.1-2, p.55-68, 1994.

- CAVALCANTE, T.V.; SALLES, H.O.; FREITAS, V.J.F. Produção de embriões de cabras soropositivas para artrite encefalite caprina a vírus. **Ciênc. Vet. Tróp.**, v.1, n.2, p.71-75, 1998.
- CHOW, L.A.; VALLE, M.A.G.; COELHO, S.G. Transferência de embriões em caprinos: relato de um caso. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.10, n.1, p.9-10, 1986.
- COGNIÉ, Y.; BARIL G; POULIN, N. Current status of embryo technologies in sheep and goats. **Theriogenology**, v.59, p.171-188, 2003.
- CORDEIRO, M. F. et al. Embryo recovery rate in Santa Inês ewes subjected to successive superovulatory treatments with pFSH. **Small Rum. Res.**, v.49, p.19-23, 2003.
- COSTA, S.A. da; FRANÇA, M.P.; VINHA, N.A. Inseminação artificial em cabras nativas, com sêmen congelado, após sincronização do cio com prostaglandina F2-alfa. **Arq. da Escola de Veterinária da UFMG**, v.34, n.2, 1982.
- COX, J.F. et al. Dose-dependent effect of heparin on fertilizing ability of goat spermatozoa. **Theriogenology**, v.44, p.451-460, 1995.
- CROZET, N.; AHMED-ALI, M.; DUBOS, M.P. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture in vitro. **J. Reprod. Fert.**, v.103, n.2, p.293-298, 1995.
- CROZET, N. et al. Normal development following in vitro oocyte maturation and fertilization in the goat. **Theriogenology**, v.39, p.206, 1993.
- DATTENA, M. et al. Lambing rate following transfer after vitrification of *in vitro* and *in vivo*-produced ovine embryos. **Theriogenology**, v.53, p.252, 2000.
- DAWSON, L. J. et al. Determination of fetal numbers in Alpine does by real-time ultrasonography. **Small Rum. Res.**, Amsterdam, v.14, n.2, p.225-231, 1994.
- De SMEDT, V. et al. In vitro maturation and fertilization of goat oocytes. **Theriogenology**, v.37, n.5, p.1049-1060, 1992.
- EBERT, K.M. et al. Transgenic production of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: generation of transgenic goats and analysis of expression. **Biotechnology**, v.9, p.835-838, 1991.
- FIENI, F. et al. T. Evaluation of cryopreservation techniques for goat embryos. **Reprod. Nutr. Dev.**, v.35, n.4, p.367-373, 1995.
- Filhotes de um mesmo embrião. **Revista O Berro**, n.50, p.10, 2002.
- FLORES-FOXWORTH, G. et al. A comparison between laparoscopic and transcervical collection and transfer in goats. **Theriogenology**, v.37, n.1, p.213, 1992.

FONSECA, J.F.; SOUZA, J.M.G.; BRUSCHI, J.H. Sincronização de estro e superovulação em ovinos e caprinos. In: SIMPÓSIO MINEIRO DE CAPRINOS E OVINOS, 2, 2007, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, 2007. CD-Rom

FRANÇA, M.P. **Inseminação artificial com sêmen congelado de caprino no Sertão de Pernambuco**. 1981. 59 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal Fluminense, 1981.

FREITAS, V.J.F.; MELO, L.M. In vitro embryo production in small ruminants. **R. Bras. Zootec.**, v.39, p.409-413, 2010

FREITAS, V.J.F. et al. Physiological limits to further improvement in the efficiency of oestrous synchronization in goats. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.9, n.5, p.551-556, 1997.

FREITAS, V.J.F. et al. The establishment of two transgenic goat lines for mammary gland hG-CSF expression. **Small Rum. Res.**, v.105, p.105-113, 2012.

GRAFF, K.J. et al. Ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery from FSH-treated goats for IVF. **Theriogenology**, v.43, n.1, p.223, 1995.

GRAFF, K.J. et al. Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval following FSH stimulation of domestic goats. **Theriogenology**, v.51, p.1099-1119, 1999.

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

GUSMÃO, A.L.; ANDRADE MOURA, J.C. Avanços tecnológicos da transferência de embriões em pequenos ruminantes. In: CONGRESSO NORTE/NORDESTE DE REPRODUÇÃO ANIMAL, II. **Anais ...** Teresina, Piauí, 2005. 13p. CD - Room.

GUSMÃO, A.L. et al. Modificação da técnica de colheita transcervical de embriões de cabras com um catéter desprovido de balão. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, supl.5, p.101-103, 2002.

HAIBEL, G.K. Use of ultrasonography in the productive management of sheep and goats. **Vet. Clinic of North American, Food and Animal Practice**, v.6, n.8, p.597-613, 1990.

HALBERT, G.W. et al. A technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. **Theriogenology**, v.33, n.5, p.993-1010, 1990.

HANADA, A. In vitro fertilization in goats. **Jap. J. Anim. Reprod.**, v.31, n.5, p.21-26, 1985.

INSEMINAÇÃO artificial em caprinos. **B. Insem. Artif.**, Rio de Janeiro, v.6, n.2/3, p.169-170, 1954.

ISHWAR, A.K. Pregnancy diagnosis in sheep and goats: a review. **Small Rum. Res.**, v.17, n.1, p.37-44, 1995.

IWANOW, I.I. De la fécondation artificielle chez les mammiferes. **Arch. Sci. Biol.**, v.12, p.377-511, 1907.

JAFAR, S.I.; FLINT, A.P.F. Sex selection in mammals: a review. **Theriogenology**, v.46, n.2, p.191-200, 1996.

JORDÃO, L.P. Teoria e prática da fecundação artificial – tradução. **Rev. da Indústria Animal**, 1934.

JORDÃO, L.P. Inseminação artificial. **Rev. do Gado Holandês**, 1936-1937.

JORDÃO, L.P. Inseminação artificial. **Rev. da Sociedade Paulista de Medicina Veterinária**, 1937.

KESKINTEPE, L. et al. In vitro development of morulae from immature caprine oocytes. **Zygote**, v.2, p.97-102, 1994.

KESKINTEPE, L.; SIMPLÍCIO, A.A.; BRACKETT, B.G. Caprine blastocyst development after in vitro fertilization with spermatozoa frozen in different extenders. **Theriogenology**, v.49, n.7, p.1265-1274, 1998.

KILLEN, I.D.; CAFFERY, G.J. Uterine insemination of ewes with the aid of a laparoscope. **Aust. Vet. J.**, v.59, n.3, p.95, 1982.

KIM, C.I. et al. Maturation division of goat follicular oocytes cultured in vitro. **Korean J. Anim. Sci.**, v.26, n.5, p.435-439, 1984.

KOEMAN. et al. Developmental competence of prepubertal and adult goat oocytes cultured in semi-defined media. **Theriogenology**, v.53, n.1, p.297, 2000.

Le GALL, F. et al. In vivo and in vitro survival of goat embryos after freezing with ethylene glycol or glycerol. **Theriogenology**, v.40, n.4, p.771-777, 1993.

Le GALL, F.; GALL, L.; De SMEDT, V. Changes in protein synthesis pathern during in vitro maturation of goat oocytes. **Mol. Reprod. Dev.**, v.32, n.1, p.1-8, 1992.

LIN, A. et al. Non-surgical embryo transfer in goats. **Memoirs of the College of Agriculture: National Taiwan University**, v.19, p.25-33, 1979.

LUZ, S.L.N. da; NEVES, J.P.; GONÇALVES, P.B.D. Parâmetros utilizados na avaliação do sêmen congelado ovino para inseminação laparoscópica. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.37, n.2, p.10-18, 2000.

MACHADO, R.; SIMPLÍCIO, A.A. Avaliação de programas hormonais para a indução e sincronização do estro em caprinos. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.36, n.1, p.171-178, 2001.

MACHADO, R.; SIMPLÍCIO, A.A. Inseminação artificial em caprinos no Brasil: estágio atual. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.19, n.1-2, p.61-72, 1995.

MANI, A.U; WATSON, E.D; MCKELVEY, W.A.C. The effects of subnutrition before or after embryo transfer on pregnancy rate and embryo survival. **Theriogenology**, v.41, p.1673-1678, 1994.

MARTINO, A. et al. Influence of collection technique of prepubertal goat oocytes on *in vivo* maturation and fertilization. **Theriogenology**, v.42, n.5, p.859-873, 1994a.

MARTINO, A. et al. Meiotic competence of prepubertal goat oocytes. **Theriogenology**, v.41, n.4, p.969-980, 1994b.

MARTINO, A. et al. In vitro maturation and fertilization of prepubertal goat oocytes. **Theriogenology**, v.43, n.2, p.473-485, 1995.

MENCHACA, A.; RUBIANES, E. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.16, p.403-413, 2004.

MENCHACA, A.; RUBIANES, E. Dois novos protocolos para controlar a atividade ovariana em caprinos: protocolo de curta duração para inseminação artificial em tempo fixo e protocolo para transferência de embriões iniciado no dia 0. **Acta Sci. Vet.**, v.34, supl.1, p.51-58, 2006.

MESA H.C.A.; ROSS, T.T. Factors affecting fertility and prolificacy of dairy goats inseminated with frozen-thawed semen. In: **INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS**, 7, 2000, Tours, France. Proceedings... Paris: INRA; IGA, 2000. v.1, p. 476-478.

MIES FILHO, A. Dados históricos da inseminação artificial no Brasil. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.1, n.1, p.11-22, 1977.

MIES FILHO, A.; BARRETO, J.F. **Noções sobre reprodução dos animais e inseminação artificial**. Série Didática, n° 9, Ministério da Agricultura, SAI, Rio de Janeiro, 1949.

MOOR, R.M.; TROUNSON, A.O. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent development capacity. **J. Reprod. Fert.**, v.49, p.101-109, 1977.

MULTIPLICAÇÃO das cabras. **Manchete Rural**, v.3, n.27, p.55-56, 1989.

NIEMANN, H.; KUES, W.; CARNWATH, J.W. Evolução dos animais de produção transgênicos. **Acta Sci. Vet.**, v.33, supl.1, p.83-102, 2005.

O NORDESTE. Pesquisadores da Embrapa Caprinos desenvolve técnica de duplicação de embrião. Setembro, 22, 2001. Sobral, Ceará.

OSBORNE, D.W. Vitrification as a tool to optimize embryo transfer in sheep. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE CAPRINOS E OVINOS DE CORTE, 3. João Pessoa, Paraíba, 2007. 5p. Cd-room

PAWSHE, C.H.; TOTEY, S.M.; JAIN, S.K. A comparison of three methods of recovery of goat oocytes for in vitro maturation and fertilization. **Theriogenology**, v.42, n.1, p.117-125, 1994.

PEIXER, M.A.S.; DODE, M.A.M.; RUMPF, R. In vitro production of embryos – Embrapa genetic resources and biotechnology point of view. **Arq. Fac. Vet.**, UFRGS, v.28, supl.1, p.163-166, 2000.

PEREIRA, R.J.T.A.; SOHNREY, B.; HOLTZ, W. Nonsurgical embryo collection in goats treated with prostaglandin F_{2-alpha} and oxytocin. **J. Anim. Sci.**, v.76, n.2, p.360-363, 1998.

PONTES, J.H.F. Fertilização *in vitro* já é realidade em ovinos. **O Berro**, n.97, p.102, 2006.

POULIN, N. et al. In vitro production of goats embryos: heparin in IVF medium affects developmental ability. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS, 6, 1996, Beijing, China. **Proceedings**. Beijing: International Academic, 1996. v.1, p.838-890.

RAO, K.B.; TOTEY, S.M. Sex determination in sheep and goats using bovine Y-chromosome specific primers via polymerase chain reaction: potential for embryo sexing. **Indian J. Exper. Biol.**, v.30, n.9, p.775-777, 1992.

RAO, V.H. et al. Survival of goat embryos frozen and thawed rapidly. **Anim. Reprod. Sci.**, v.16, n.3/4, p.261-264, 1988.

RESTALL, B.J.; WALES, R.G. The Fallopian tube of the sheep. III. The chemical composition of the fluid from the Fallopian tube. **Aust. J. Biol. Sci.**, v.19, p.687-698, 1966.

RIBEIRO FILHO, A.L. et al. Situação atual e perspectivas do controle farmacológico do ciclo estral em bovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, supl. 5, p.9-17, 2002.

ROBL, J.M. et al. Transgenic animal production and animal biotechnology. **Theriogenology**, v.67, p.127-133, 2007.

ROBINSON, T.J. Synchronization of oestrus in sheep by intravaginal and subcutaneous application of progestin impregnated sponges. **Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.**, v.5, p.47-52, 1964.

SAITO, S.; NIEMANN, H. *In vitro* and *in vivo* survival of bovine demi-embryos following simplified bisection and transfer of one or two halves per recipient. **J. Reprod. Dev.**, v.39, p.251-258, 1993.

SALLES, H.O. **Circuito fechado para colheita de embriões em caprinos.** www.ruralnet.com.br/artigos, 2001.

SALLES, H.O. et al. **Manual de Transferência de Embriões em Caprinos**. Sobral: Embrapa Caprinos, 2002. 64p. (Embrapa Caprinos. Documentos, 40).

SALLES, H.O.; SANTOS, D.O.; SIMPLÍCIO, A.A. Superovulação em fêmeas caprinas pré-púberes e púberes da raça Anglo-nubiana. **Ciênc. Anim.**, v.10, supl. 1, p.137-138, 2000.

SALLES, H.O.; SIMPLÍCIO, A.A.; SANTOS, D.O. Embryo viability after induction or synchronization in pre-pubertal and pubertal female goats. In: SCIENTIFIC MEETING OF EUROPEAN EMBRYO TRANSFER ASSOCIATION (AETE), 11, 1998.Veneza, Itália, **Proceedings...** Veneza, Itália: AETE, p.240, 1998.

SALLES, H.O. et al. Viabilidade das técnicas de congelamento e descongelamento de embriões caprinos mediante o uso de etileno glicol e sacarose. **Arq. Fac. Vet.**, UFRGS, Porto Alegre, v.25, n.1, p.298, 1997.

SANTOS, M.H.B. dos et al. Sexing of Boer fetuses using transretal ultrasonography. **Anim. Reprod.**, v.3, n.3, p.359-363, 2006a.

SANTOS, M.H.B. dos et al. Sexagem fetal em ovelhas Santa Inês por ultrassonografia. **Ciência Rural**, v.36, n.2, p.573-578, 2006b.

SANTOS, M.H.B. dos et al. Sexagem fetal pela ultrassonografia identificando-se o tubérculo genital ou a genitália externa de caprinos da raça Alpina Americana. **Ciência Anim. Brasileira**, v.8, n.2, p.325-332, 2007.

SELAIVE-VILLAROEL, A.B.; MIES FILHO, A. Transferência de óvulos fecundados em ovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.3, n.4, p.338-341, 1979.

SHARMA, G.T.; MAJUMDAR, A.C.; BONDE, S.W. Chronology of maturational events in goat oocytes cultured in vitro. **Small Rum. Res.**, v.22, n.1, p.25-30, 1996.

SHELTON, J.N. Factors affecting viability of fresh and frozen-thawed sheep demi-embryos. **Thriegenology**, v.37, n.3, p.713-721, 1992.

SHISONG, C.; WRATHALL, A.E. The importance of the zona pellucida for disease control in livestock by embryo transfer. **British Vet. J.**, v.145, n., p.19-140, 1989.

SILVA, C.A.M.; NEVES, J.P. Eficiência reprodutiva após tratamento de infecções genitais num rebanho ovino no Rio Grande do Sul. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.7, n.3, p.25-28, 1983.

SILVA, J.C. et al. Colheita transcervical de embriões ovinos da raça Dorper no semi-árido nordestino. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16, 2005, Goiânia, Anais... Goiânia. 2005.

SIMPLÍCIO, A.A.; BRACKETT, B.G.; KESKINTEPE, L. Use of cryopreserved spermatozoa for caprine in vitro fertilization (IVF). **Thriegenology**, v.47, n.1, p.299, 1997.

SIMPLÍCIO, A.A.; SALLES, H.O.; SANTOS, D.O. Transferência de embriões nos pequenos ruminantes domésticos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, supl. 5, p.17-27, 2002.

SNDA/SEFIS/DFIMA – Ministério da Agricultura, 1979. In: INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL. Transferência de embriões, p.87-90.

SMITH, L.C.; WILMUT, I. Factors affecting the viability of nuclear transplanted embryos. **Theriogenology**, v.33, p.153-164, 1990.

SONG, H.B.; IRITANI, A. Studies on in vitro maturation of follicular oocytes in the immature goats. **Korean J. Anim. Sci.**, v.29, n.7, p.303-309, 1987.

SOUZA, E. Inseminação Artificial. **Revista de Veterinária e Zootecnia**, v.2, 1912.

SOUZA-FABJAN, J.M.G. et al. Assessment of the reproductive parameters, laparoscopic oocyte recovery and the first embryos produced in vitro from endangered Canindé goats (*Capra hircus*). **Reprod. Biol.**, v.13, p.325-332, 2013.

STAIGMILLER, R.B.; MOOR, R.M. Effect of follicle cells on the maturation and developmental competence of ovine oocytes matured outside the follicle. **Gamete Res.**, v.9, p.221-229, 1984.

SZÖLLÖSI, D. et al. In vitro maturation of sheep ovarian oocytes. **Reprod. Nutr. Develop.**, v.28, p.1047-1080, 1988.

TERVIT, H.R.; WHITTINGHAM, D.G.; ROWSON, L.E.A. Successful culture *in vitro* of sheep and cattle ova. **J. Reprod. Fert.**, v.30, n.3, p.493-497, 1972.

TERZANO, G.M. et al. Recovery of oocytes by laparoscopy follicle aspiration in FSH-treated goats. **Theriogenology**, v.53, n.1, p.509, 2000.

THOMPSON, J.G.E. et al. Development of sheep preimplantation embryos in media supplemented with glucose and acetate. **Theriogenology**, v.32, n.2, p.323-330, 1989.

TRALDI, A.S. et al. Vitriificação: método alternativo para a criopreservação de embriões caprinos produzidos in vitro. **Arq. Fac. Vet.**, UFRGS, Porto Alegre, v.25, n.1, p.312, 1997.

TRALDI, A.S. et al. Vitriificação: um bom método alternativo para a criopreservação de embriões caprinos e ovinos. **Arq. Fac. Vet.**, UFRGS, Porto Alegre, v.27, n.1, p.301, 1999.

UDY, G. B. Commercial splitting of goats embryos. **Theriogenology**, v.28, n.6, p.837-847, 1987.

VAJTA, G. et al. Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to avoid cryo injuries of mammalian ova and embryos. **Mol. Reprod. Dev.**, v.51, p.53-58, 1998.

WALKER, S.K.; LAMPE, R.J.; SEAMARK, R.F. Culture of sheep zygotes in synthetic oviduct fluid medium with different concentrations of sodium bicarbonate and hepes. **Theriogenology**, v.32, n.5, p.797-804, 1989.

WARWICK, B.L.; BERRY, R.O. Inter-generic and intra-specific embryo transfers in sheep and goats. **J. Heredity**, v.40, p.297-303, 1949.

WARWICK, B.L.; BERRY, R.O.; HORLACHER, W.R. Results of mating rams to Angora female goats. **Proceedings** of American Society Animal Production, Annual Meeting, 27, 1934. p.225-227.

WILLADSEN, S.M. Nuclear transplantation in sheep embryos. **Nature**, v.320, p.956-962, 1986.

WILLADSEN, S.M. et al. Deep freezing of sheep embryos. **J. Reprod. Fert.**, v.46, n.1, p.151-154, 1976.

WILMUT, I. et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, v.385, p.810-813, 1997.

WISCHRAL, A. et al. Transferência de embriões caprinos. **Rev. do Centro de Ciências Rurais**, v.19, suplemento, p. 19, 1989.

WOLFE, D.F. et al. Embryo transfer from goats seropositive for Caprine Arthritis-Encephalitis Virus. **Theriogenology**, v.28, n.3, p.307-315, 1987.

YUSWIATI, E.; HOLTZ, W. Successful transfer of vitrified goat embryos. **Theriogenology**, v.34, n.4, p.629-632, 1990.