

Capítulo 3

Biotécnicas aplicadas à reprodução de caprinos

Vicente José de Figueirêdo Freitas

Luciana Magalhães Melo

Dárcio Ítalo Alves Teixeira

Edilson Soares Lopes Junior

Daniel Maia Nogueira

Introdução

A espécie caprina, uma das primeiras a serem domesticadas, tem sido usada em sistemas produtivos por milhares de anos. No decorrer desses anos, a seleção e a reprodução têm sido o resultado do uso de métodos tradicionais, como a monta natural ou a inseminação artificial (IA). Porém, graças ao desenvolvimento de diversas técnicas aplicadas à reprodução, avanços já foram obtidos no sentido de propagar mais rapidamente genes superiores voltados para o incremento dos níveis produtivos do rebanho.

As modernas biotécnicas reprodutivas que são utilizadas na espécie caprina, entre outras, buscam a otimização do material genético disponível. Neste capítulo, serão abordadas as seguintes biotécnicas: sincronização do estro, produção in vivo e in vitro de embriões, criopreservação de embriões e, finalmente, as biotécnicas de última geração transgênese e clonagem.

Sincronização do estro e da ovulação

Essa biotécnica tem por objetivo agrupar, no menor espaço de tempo possível (24 a 48 horas), o maior número de fêmeas com capacidade de serem fecundadas (Moraes et al., 2014). Em caprinos, as técnicas utilizam manipulações hormonais, programas de luz artificial ou “efeito macho” para a sincronização da manifestação de estro e para ocorrência da ovulação. No entanto, neste capítulo, serão abordados somente os tratamentos com uso de hormônios. Desta forma, a IA pode ser programada e realizada em um grande número de fêmeas dentro de um período pré-determinado e relativamente curto, possibilitando a programação das datas de nascimento das crias para épocas mais favoráveis do ano, o planejamento alimentar e a formação de lotes uniformes em tamanho e peso para o mercado (Simplício et al., 2000).

Os protocolos hormonais de sincronização do estro fazem uso de drogas e/ou hormônios exógenos que provocam artificialmente variações nas secreções endócrinas, as quais

controlam o ciclo estral. De forma geral, a sincronização de estro pode ser efetivamente alcançada pela redução do tempo da fase lútea do ciclo estral, utilizando-se a prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) ou seus análogos sintéticos, tais como o cloprostenol ou dinoprost. Essa sincronização também pode ser obtida prolongando-se a fase lútea com o uso de progesterona ou de progestágenos, como o acetato de medroxiprogesterona (MAP), o acetato de fluorogestona (FGA) ou o norgestomet (Moraes et al., 2014). Os protocolos que reduzem a fase lútea só devem ser utilizados em fêmeas cíclicas, pois esses protocolos promovem a destruição do corpo lúteo (luteólise), com consequente redução dos níveis plasmáticos de progesterona e o desencadeamento de uma nova fase folicular. Dos protocolos que reduzem a fase lútea, o uso da $PGF_{2\alpha}$ ou de seus análogos sintéticos pode ser uma alternativa se utilizados em duas aplicações intervaladas por 7 dias (Menchaca; Rubianes, 2004). O uso da prostaglandina ou de seus análogos não tem sido recomendado para os 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: Apesar disso, Nogueira et al. (2009) obtiveram uma taxa de fertilidade, aos 45 dias pós-IA, de 61,5%.

Em relação aos protocolos que prolongam artificialmente a fase lútea do ciclo estral, são utilizadas esponjas intravaginais, implantes auriculares ou ainda uma matriz de silicone impregnada com progesterona, o *controlled internal drug release* (CIDR) de uso vaginal. Este último tem como vantagem a possibilidade de reutilização (Souza-Fabjan et al., 2014a). Em cabras leiteiras da raça Saanen e Pardo-Alpina, foi observado que um mesmo CIDR pode ser utilizado por até três vezes em protocolos de sincronização do estro de 9 dias, sem afetar os resultados de fertilidade pós-IA (Tabela 1).

Tabela 1. Percentual de cabras em estro, intervalo entre o final do tratamento e o início do estro e fertilidade ao parto de acordo com o número de usos de *controlled internal drug release* (CIDR).

Tratamento	Número de cabras tratadas	Cabras em estro (%)	Fim tratamento início estro (h)	Fertilidade ao parto (%)
CIDR 1x	15	100	13,3 ± 1,1	93,3
CIDR 2x	15	100	13,8 ± 2,6	73,3
CIDR 3x	15	100	13,3 ± 1,4	80,0

Não foram observadas diferenças estatísticas entre os tratamentos ($P > 0,05$).

Fonte: Nogueira et al. (2011).

É também comum associar os dois princípios de encurtamento ou alongamento da fase lútea com adição da gonadotrofina coriônica equina (eCG). A gonadotrofina, administrada 48 horas antes da retirada do progestágeno, permite uma melhor sincronização da ocorrência do estro e da ovulação. Além disso, a gonadotrofina pode aumentar a taxa de ovulação após os tratamentos de sincronização do estro (Freitas et al., 2004). No entanto, o uso da eCG deve ser feito com cautela, pois já foi verificado que a aplicação dessa por várias vezes causa a aparição de anticorpos anti-eCG; fenômeno responsável pela ocorrência de estros

tardios e consequente queda na taxa de fertilidade pós-IA, devido à realização da IATF precocemente (Baril et al., 1996). Assim, recomenda-se o uso de um tratamento progestágeno de 10 ou 11 dias, associado a injeções intramusculares de um luteolítico e de eCG (Figura 1). Estima-se que esse tratamento resulte em uma taxa de fertilidade ao parto de 60% após uma única IA com sêmen congelado/descongelado realizada entre 43 e 45 horas após a retirada do progestágeno.



Figura 1. Esquema do protocolo hormonal de sincronização do estro e da ovulação em cabras.

eCG = gonadotrofina coriônica equina.

Produção in vivo de embriões

Por meio de algumas biotécnicas, pode-se aumentar a seleção de animais geneticamente superiores e também diminuir o intervalo entre gerações. No caso da produção in vivo de embriões, também denominada múltipla ovulação e transferência de embriões (Mote), é possível explorar o potencial genético tanto do macho quanto da fêmea. Para a execução bem-sucedida dessa técnica, é necessário seguir à risca as diversas etapas descritas a seguir.

Sincronização e superovulação das cabras doadoras

Os tratamentos de sincronização do estro são basicamente aqueles apresentados no item anterior, ou seja, um período de 10 a 11 dias de impregnação com progestágeno associado a uma injeção de luteolítico 48 horas antes da remoção da fonte de progestágeno (esponja vaginal ou CIDR). No entanto, no caso da Mote, torna-se necessário uma estimulação ovariana com o intuito de elevar a resposta ovulatória das doadoras de embriões, a qual quase sempre é realizada pelo uso do hormônio foliculo estimulante (FSH).

Estudos comparativos mostraram a eficiência de extratos hipofisários suínos (pFSH) e ovinos (oFSH) em produção de embriões morfológicamente viáveis para transferência. Porém, em razão de suas curtas meias-vidas, essas gonadotrofinas necessitam ser aplicadas em regime sequencial, ou seja, seis injeções em doses decrescentes com 12 horas de intervalo nos últimos 3 dias de tratamento progestágeno. Extratos purificados de pFSH, tais como Folltropin (Vetrepharm, Canadá) ou Pluset (Calier, Espanha), estão disponíveis no mercado nacional e no Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução¹, com esses tratamentos, já foram obtidos resultados favoráveis referentes ao número de ovulações e de embriões transferíveis (Lima-Verde et al., 2003; Lopes Júnior et al., 2006).

¹ Disponível em: <www.uece.br/lfcr>.

Deve-se ter cautela com uma resposta muito elevada ao tratamento de superovulação, pois existe uma correlação negativa entre o número elevado de ovulações (>15 corpos lúteos) e o número de embriões morfológicamente viáveis. Esse resultado é possivelmente devido a uma falha na fecundação resultante da dificuldade no transporte dos espermatozoides através da cérvix (Baril et al., 1993). Contudo, para amenizar o problema, recomenda-se que o sêmen seja depositado diretamente no lúmen do útero por meio de IA guiada por laparoscopia.

Outro grave problema com o uso da superovulação em caprinos é a regressão prematura de corpos lúteos. Essa condição está associada com o retorno precoce ao estro, e também se acredita que ela provoca o transporte anormal de estruturas embrionárias na tuba uterina, o que causa uma baixa taxa de coleta de embriões, geralmente de baixa qualidade. A secreção de PGF_{2α} endógena é o fator responsável pela regressão prematura dos corpos lúteos nas fêmeas doadoras. A utilização de um antagonista das prostaglandinas, a flunixin meglumina, reduz significativamente o número de cabras com esse problema. Essa substância deve ser administrada na dose de 1,1 mg kg⁻¹ de peso vivo, durante 3 dias consecutivos, em intervalos de 24 horas, a partir das 72 horas após o final do tratamento com progestágeno (Lopes Júnior et al., 2004). Assim, esse procedimento eleva o número de operações para a obtenção de embriões viáveis e, por consequência, o custo do processo.

Fecundação das cabras doadoras

Para que as fêmeas doadoras de embriões sejam fecundadas com sucesso, é fundamental que haja um número viável de espermatozoides móveis dentro do trato genital no momento apropriado. Outro fator importante é o sincronismo entre o momento da IA e das ovulações. Embora a monta natural possa ser utilizada, acredita-se que para um completo aproveitamento das vantagens das biotécnicas da reprodução, torna-se essencial a aplicação da IA com uso do sêmen de reprodutores comprovadamente férteis e melhoradores.

A IA é uma biotécnica largamente difundida. É caracterizada como um método eficaz, uma vez que permite disseminar o material genético do macho em pouco tempo, pois uma única ejaculação pode produzir dezenas de doses de sêmen, o que resulta na fecundação de várias fêmeas. Em caprinos, a IA de fêmeas doadoras pode ser realizada pelo método transvaginal, com auxílio de espéculo, ou intrauterino, guiado por laparoscopia (Figura 2). No caso do método transvaginal, recomenda-se realizar uma IA no momento de início do estro e outra 24 horas depois. Já no caso da laparoscopia, é indicado realizar a IA de 20 a 24 horas após o início do estro.

Coleta de embriões

A coleta de embriões é uma etapa muito importante nos programas de Mote. A coleta pode ser realizada pelos métodos cirúrgico (laparotomia), semicirúrgico (laparoscopia) e não cirúrgico (transcervical).

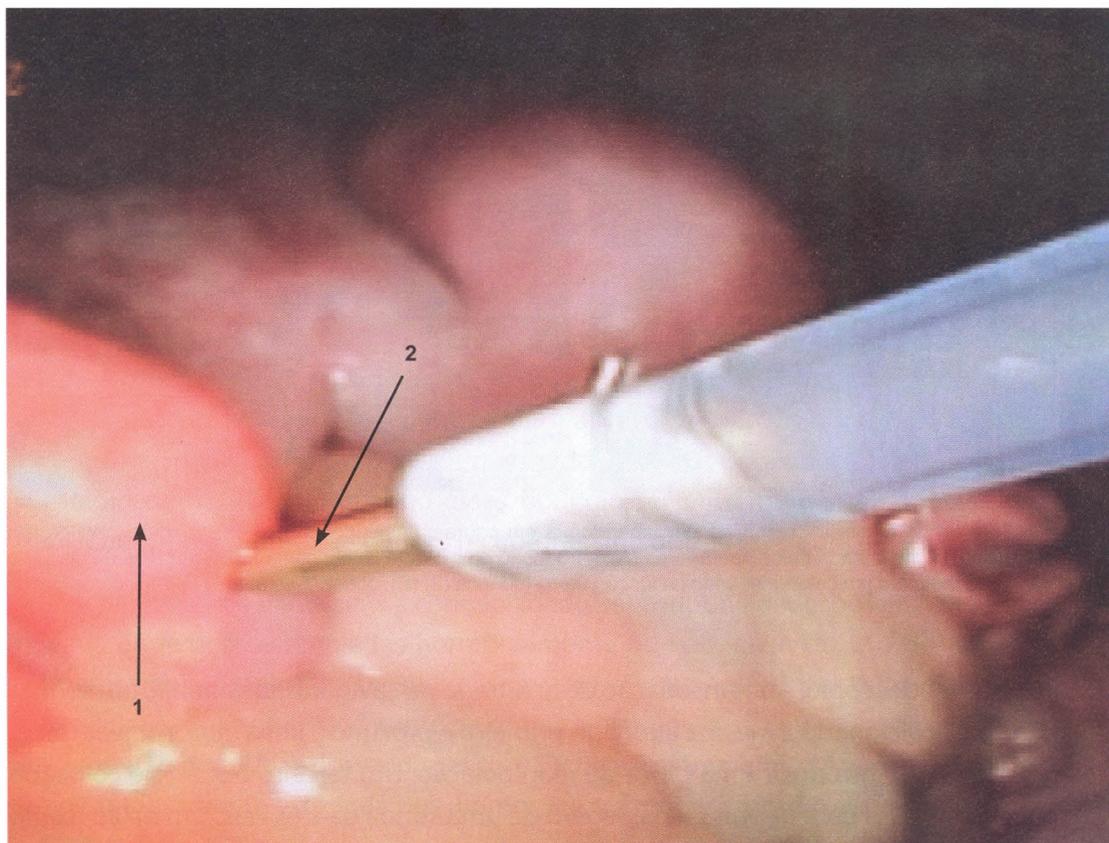


Foto: Vicente José de Figueirêdo Freitas

Figura 2. Detalhe da inseminação artificial (IA) guiada por laparoscopia em cabras doadoras de embriões: corno uterino (1) sendo puncionado pela agulha (2) da pipeta de IA com a dose de sêmen.

A laparotomia permite que os embriões sejam obtidos com êxito tanto da tuba uterina (a partir do 3º ou 4º dia do ciclo) como do corno uterino (a partir do 5º dia). Para sua realização, é necessário que as fêmeas estejam em jejum hídrico e alimentar de 24 horas. A cabra doadora é submetida à anestesia geral e contida em maca apropriada com inclinação anteroposterior de 30º a 45º. O trato genital é exteriorizado e a contagem dos corpos lúteos é realizada, tornando possível avaliar a eficiência do tratamento superovulatório. A lavagem uterina é realizada através da infusão de uma solução salina tampão fosfato (PBS) a 37 °C, que é injetada por seringa no lúmen do corno uterino e coletada próximo à junção útero-tubárica (Figura 3). Com uso dessa técnica, é possível coletar mais de 80% das estruturas (embriões ou oócitos não fecundados) presentes no útero.

Com intuito de diminuir os efeitos deletérios da coleta por laparotomia, foi desenvolvida a técnica semicirúrgia ou guiada por laparoscopia. Porém, essa técnica exige mão de obra qualificada e uso de equipamentos de custo elevado (endoscópio, fonte de luz fria, etc.). A fêmea é anestesiada e colocada em decúbito dorsal como na laparotomia. Porém, ao invés da incisão, são realizadas punções. Uma primeira punção, realizada de 4 cm a 5 cm cranial ao úbere e 10 cm à esquerda da linha alba, permite o posicionamento do trocarte,

Fotos: Dárcio Ítalo Alves Teixeira



Figura 3. Detalhe da coleta de embriões por laparotomia em cabras: cabra doadora é anestesiada, contida em maca apropriada e manipulada pelos operadores (A); introdução do meio de coleta com uma seringa de 20 mL (1) e recuperação do meio em um cateter inserido na junção útero-tubárica (2) (B), observa-se alguns corpos lúteos (setas brancas).

que recebe o endoscópio. Após insuflação de ar filtrado na cavidade abdominal, um segundo trocarte é posicionado à mesma altura do primeiro e próximo à linha alba. Através dessa punção é possível introduzir uma pinça de manipulação. Um terceiro trocarte é colocado próximo à linha alba para permitir a passagem de uma sonda de três vias. Um balão fixado sobre a sonda é inflado para obstruir a luz uterina e o meio de coleta é injetado para dentro do corno uterino. A pressão criada no corno uterino permite o retorno do meio pelo cateter. A colheita de embriões sob controle laparoscópico pode ser realizada por várias vezes na mesma doadora sem efeito sobre a taxa de colheita, que pode variar de 60% a 70% (Baril et al., 1993).

Em caprinos, a coleta de embriões através da cérvix não é largamente empregada em razão da dificuldade em alcançar os cornos uterinos. Todavia, com o objetivo de transpor as barreiras inerentes às aderências do sistema reprodutor, minimizar custos com equipamentos sofisticados e com mão de obra especializada, bem como pela necessidade de assegurar a coleta de embriões em uma mesma doadora por diversas vezes, foram desenvolvidas pesquisas visando aperfeiçoar essa metodologia. Neste âmbito, vale salientar os trabalhos realizados pelo grupo do Dr. Jeferson Fonseca (Embrapa Caprinos). Nesse método, as cabras, com a região perineal bem higienizada, recebem uma injeção de luteolítico 12 horas antes da coleta. Alguns minutos antes da coleta, realizam-se injeções de acepromazina a 1% por via intramuscular e de cloridrato de lidocaína a 2%, por via epidural, antes da colocação do espéculo vaginal. Duas pinças de Pozzi são colocadas lateralmente à abertura cervical. Depois da imobilização do colo do útero, com o auxílio de uma pinça Allis (26 cm), uma gaze estéril embebida em com lidocaína a 2% é introduzida ventralmente à abertura cervical e é mantida no local durante todo o procedimento. Depois de inserir um dilatador

na abertura cervical, o cateter para coleta é passado pelos anéis com auxílio de um mandril de metal e dirigido para um dos cornos uterinos. O circuito é ligado ao cateter, e uma seringa de 60 mL é conectada a esse dispositivo para controlar o volume de meio de coleta inserido em cada corno uterino. Com esse método, aproximadamente 80% das estruturas presentes no útero são coletadas (Fonseca et al., 2013).

Produção in vitro de embriões

Após a IA e a Mote, a produção in vitro de embriões (Pive) representa a terceira geração de biotécnicas da reprodução animal. A Pive envolve quatro etapas principais: a coleta de oócitos a partir de grandes folículos antrais, a maturação in vitro (MIV) desses oócitos, a fecundação in vitro (FIV) dos oócitos maturados e o cultivo in vitro (CIV) dos embriões até o estágio de blastocisto, quando esses poderão ser eficientemente criopreservados ou transferidos para o útero de fêmeas receptoras sincronizadas (Figura 4).

A Pive possui como vantagens a confiabilidade, reprodutibilidade, possibilidade de utilizar oócitos de fêmeas estimuladas hormonalmente ou não, além do uso de doadoras pré-púberes, senis, prenhes ou mesmo *post mortem*. Finalmente, um sistema eficiente de Pive é essencial para o desenvolvimento de outras biotecnologias, como clonagem e transgênese, que serão discutidas posteriormente. A técnica é extremamente versátil e, por isso, vem sendo intensamente estudada nos últimos anos. Entretanto, as taxas de sucesso ainda são

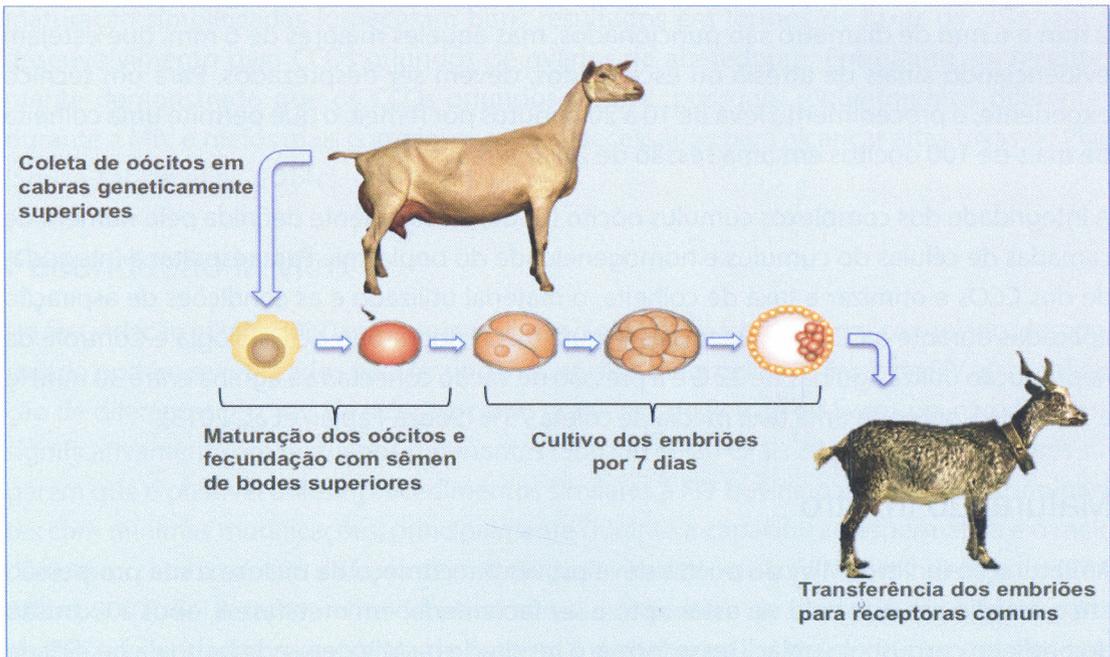


Figura 4. Esquema de um programa de melhoramento genético em caprinos pelo uso da produção in vitro de embriões (Pive).

bem inferiores em comparação aos embriões produzidos *in vivo* ou aqueles produzidos *in vitro* na espécie bovina, na qual a biotécnica está muito bem estabelecida.

Coleta de oócitos

Em caprinos, oócitos imaturos podem ser obtidos a partir de ovários de abatedouro ou de animais vivos. Os ovários de abatedouro podem representar uma fonte de grande número de oócitos de relativo baixo custo. Essas estruturas, obtidas de fêmeas de origem desconhecida, são importantes para fins científicos, pois possibilitam estudar e estabelecer protocolos mais eficientes. Entretanto, no Brasil, o número de cabras abatidas legalmente ainda é reduzido e, conseqüentemente, torna-se difícil conduzir experimentos impactantes utilizando essa fonte de oócitos. Dessa forma, a coleta de oócitos em fêmeas vivas é a opção mais viável. Além disso, a utilização comercial da Pive só fará sentido em fêmeas de alto valor genético e/ou econômico.

O Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução vem obtendo resultados animadores (Souza-Fabjan et al., 2013) utilizando a coleta de oócitos por laparoscopia (COL). Esse procedimento é menos estressante para o animal, requer menos tempo que a laparotomia e pode ser repetido sem afetar o estado reprodutivo da doadora e a produção de oócitos. Para esse procedimento, as fêmeas doadoras são submetidas a um jejum prévio de 24 a 36 horas e colocadas em uma maca de contenção apropriada. Sob observação laparoscópica, são visualizados os ovários, e os folículos são puncionados utilizando uma agulha montada em um guia, conectada a um tubo de colheita e a um sistema de vácuo. Os folículos entre 2 mm e 6 mm de diâmetro são puncionados, mas aqueles maiores de 6 mm, que estejam evidenciando sinais de atresia ou escurecidos, devem ser desprezados. Para um técnico experiente, o procedimento leva de 10 a 20 minutos por fêmea, o que permite uma colheita de mais de 100 oócitos em uma sessão de 2 a 3 horas.

A integridade dos complexos cumulus oócito (CCOs) é usualmente definida pelo número de camadas de células do cumulus e homogeneidade do ooplasma. Para respeitar a integridade dos CCOs e otimizar a taxa de colheita, o material utilizado e as condições de aspiração aplicadas durante a COL são essenciais (Figura 5). O Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução utiliza agulhas de 22 G e a pressão de vácuo conectada a agulha entre 30 mmHg e 35 mmHg, obtendo uma taxa média de coleta 75% (Souza-Fabjan et al., 2013).

Maturação *in vitro*

A maturação *in vitro* (MIV) do oócito deve prover o recomeço da meiose e sua progressão até o estágio em que esse vai estar apto a ser fecundado, em metáfase II, após a extrusão do primeiro corpúsculo polar. Dessa forma, o resultado da MIV depende tanto da qualidade intrínseca dos oócitos imaturos, quanto das condições *in vitro* da maturação, que podem modular a competência final do oócito após MIV (Souza-Fabjan et al., 2014b).



Fotos: Vicente José de Figueirêdo Freitas

Figura 5. Etapas da coleta oocitária por laparoscopia (COL) em caprinos: campo operatório e posicionamento dos trocartes para introdução do endoscópio, guia para agulha de punção e pinça de manipulação (A); detalhe do momento da punção folicular (B); complexos *cumulus* oócitos (CCOs) obtidos (elevado número de oócitos com poucas camadas de células do *cumulus*) (C).

Com relação às condições físicas da MIV, a literatura não varia muito: a MIV deve ser realizada incubando grandes grupos de CCOs em placas de quatro poços, com 500 μL de meio, em estufa de 5% CO_2 , entre 38 °C e 39 °C, por 22 a 27 horas.

A etapa de MIV é normalmente realizada utilizando meios de cultivo complexos, enriquecidos com aminoácidos e glicose, suplementados com hormônios e soro sanguíneo inativado. Em geral, o meio mais utilizado para pequenos ruminantes é o TCM-199 suplementado com FSH (de origem porcina ou ovina), LH, estradiol, 10% de soro fetal bovino (SFB) ou soro de cabra/ovelha em estro. Entretanto, todos esses componentes complexos têm falta de reprodutibilidade, já que eles apresentam elevadas variações químicas. Dessa forma, existe uma tendência mundial em utilizarem-se meios mais definidos. Essas condições de maturação simplificadas forneceram bons resultados em termos de taxas de clivagem e desenvolvimento para CCOs oriundos de ovários de abatedouro. Entretanto, foi recentemente demonstrado que os CCOs oriundos de COL possuem requerimentos diferentes durante a MIV e meios mais complexos seriam necessários para alcançar altas taxas de Pive (Souza-Fabjan et al., 2014c).

Fecundação in vitro

Na fecundação in vitro (FIV) em caprinos, tanto o sêmen fresco quanto o congelado/descongelado podem ser utilizados para fecundar os oócitos maturados. As taxas de FIV após aplicação de diferentes técnicas de seleção, como gradiente de Percoll ou Swim-up, não diferiram significativamente em pequenos ruminantes (Souza-Fabjan et al., 2014b). Alguns autores sugerem que é possível utilizar procedimentos similares à FIV bovina para pequenos ruminantes com mínimas modificações, principalmente durante a capacitação espermática e o meio de cultivo, como redução da força de centrifugação e adição de soro de ovelha em estro (Cox; Alfaro, 2007). Foi recentemente demonstrado que o número de blastocistos obtido a partir de CCOs fecundados na presença de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de heparina foi maior do que aqueles sem heparina, sugerindo que esse meio eleva a capacitação de espermatozoides caprinos congelados/descongelados. As concentrações variam de 1 a $3,5 \times 10^6$ espermatozoides por mL

em interação com oócitos por 16 a 20 horas em estufa com 5% CO₂ e temperatura entre 38 °C e 39 °C (Souza et al., 2013).

Cultivo in vitro

Após a FIV, os possíveis zigotos são removidos do meio e colocados no cultivo in vitro (CIV) em condições que lhes permitam desenvolver-se até o estágio de blastocisto. Já foi relatado que – enquanto as taxas de sucesso na Pive com relação ao número de blastocistos dependem da qualidade intrínseca do oócito e das condições de maturação – a qualidade dos blastocistos resultantes está mais relacionada às condições encontradas durante o início do CIV. Embora diferentes meios de cultivo já tenham sido utilizados com sucesso em pequenos ruminantes, o fluido sintético do oviduto (SOF) tem sido o mais amplamente difundido e empregado durante o CIV. Para garantir o confinamento embrionário, o que facilita a ação dos fatores autócrinos, os embriões são normalmente cultivados em gotas de meio cobertas por óleo mineral, em proporção de 1 µL por embrião (Paramio, 2010).

Meios de cultivo embrionário são usualmente suplementados com várias fontes proteicas (albumina sérica bovina, BSA, SFB e fatores de crescimento), embora essas substâncias possam estar associadas à síndrome da cria grande em diversas espécies, incluindo pequenos ruminantes. Além disso, o soro pode induzir diferenças fisiológicas e morfológicas em embriões. Dessa forma, um meio quimicamente definido para o cultivo de embriões de FIV pode permitir driblar alguns dos inconvenientes do uso de aditivos biológicos, como o soro. Todavia, resultados de estudos utilizando somente meios definidos ainda resultam em baixo desenvolvimento. Um ponto importante a não ser negligenciado é que para o CIV de embriões caprinos é essencial utilizar uma mistura de gases (5% CO₂, 5% O₂ e 90% N₂) e temperatura entre 38 °C e 39 °C.

Criopreservação de embriões

Na espécie caprina, como nas demais espécies de produção, a criopreservação de embriões apresenta vantagens econômicas e genéticas não negligenciáveis. Essa técnica permite preservar raças em vias de extinção, fazer a manutenção e a estocagem da biodiversidade em um banco de germoplasma e transportar material genético com mais facilidade do que com animais vivos, pois evita a perda de animais geneticamente importantes durante o transporte, o que reduz o risco sanitário e permite uma comercialização mais fácil e com menos custos. A criopreservação de embriões amplia as possibilidades do comércio internacional de genética, situação muito importante na atualidade para a espécie caprina, a qual pode ter seus embriões criopreservados basicamente por dois métodos: a congelação clássica (lenta) e a vitrificação.

Congelação clássica

Os protocolos mais difundidos mundialmente são aqueles com uso da congelação clássica, que necessitam de equipamentos programáveis, de custo elevado para serem adquiridos. Essa técnica de congelação tem por princípio o equilíbrio progressivo entre os crioprotetores e o compartimento líquido do embrião.

Os crioprotetores já testados em pequenos ruminantes foram: glicerol, etilenoglicol, dimetilsulfóxido e o propanodiol. Nos dias atuais, o etilenoglicol é o crioprotetor de eleição, com elevadas taxas de sobrevivência embrionária, aproximando-se daquelas obtidas com embriões frescos. A criopreservação deve ser utilizada nos embriões em estágio de mórula compacta até blastocisto expandido. Essa sugestão decorre não apenas da obtenção de uma maior sobrevivência após inovulação, mas particularmente da importância da integridade da zona pelúcida para segurança sanitária da transferência.

A mistura do etilenoglicol ao meio de conservação (PBS + 0,4% de BSA) provoca aumento na pressão osmótica. Para uma adaptação gradual, os embriões são submetidos, de modo sucessivo e durante 5 minutos, a banhos de meio de congelação em concentrações crescentes de etilenoglicol: 0,5 M, 1,0 M e 1,5 M. Após o último banho, os embriões são acondicionados em palhetas de polipropileno de 0,25 mL. Realizada a etapa de acondicionamento, as palhetas são colocadas em congelador programável para realizar as seguintes etapas de congelação: resfriamento, cristalização (*seeding*), nova redução de temperatura e, finalmente, imersão da palheta no nitrogênio líquido. O primeiro resfriamento é feito a $3\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até a temperatura de $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$, que deve ser mantida por 10 minutos. Na metade desse período, deve ser realizada a cristalização e, logo em seguida, inicia-se um novo resfriamento ($0,3\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$) até obter-se a temperatura de $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$. Atingindo essa temperatura, as palhetas podem ser imersas no nitrogênio líquido. Todo esse processo de congelação é monitorado por uma curva previamente estabelecida. Atualmente, no mercado nacional, são encontrados excelentes equipamentos para congelação programável de embriões, o que evita a dependência de equipamentos importados.

A descongelação da palheta contendo os embriões é realizada por passagem de 5 s no ar e depois 15 s na água de $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após a descongelação, é necessária a retirada do crioprotetor pela passagem sucessiva dos embriões em concentrações decrescentes (1,5 M, 1,0 M, 0,5 M e 0) em intervalos de 5 minutos. Outra opção é descongelar e colocar os embriões em um primeiro banho de PBS + 0,25 M de sacarose por 10 minutos e logo depois um segundo banho em solução de PBS por 5 minutos. Neste último banho, os embriões a serem transferidos são avaliados. No caso da transferência direta, a palheta contendo os dois embriões é descongelada, e eles são transferidos sem a necessidade de reexaminar ou eliminar o crioprotetor.

Vitrificação

Este procedimento é vantajoso em razão da simplicidade e da rapidez na execução. Dessa forma, um número crescente de laboratórios vem somando esforços para que o método se torne rotineiro. A vitrificação é uma técnica rápida, que não necessita de equipamentos caros. Nela, os embriões podem ser vitrificados à medida que são colhidos e, portanto, não ficam esperando, como acontece com a congelação clássica.

A vitrificação, diferentemente da congelação lenta, é uma técnica de “não equilíbrio”. Com essa técnica, evita-se ao máximo a formação de cristais de gelo durante o resfriamento, transformando a fase líquida do citoplasma celular em fase sólida amorfa, também denominada de estado vítreo. Isso é possível com uso de crioprotetores em concentrações muito elevadas (6,0 M a 7,5 M) com velocidades rápidas para resfriamento e aquecimento, o que induz a uma forte viscosidade do meio. No entanto, a necessidade de elevadas concentrações de crioprotetores é altamente tóxica para os embriões. O tempo de passagem em cada um dos banhos, sobretudo no último, é crítico. A desidratação do embrião deve parar em um tempo preciso, dependendo da velocidade de difusão dos crioprotetores, de suas concentrações e da temperatura de incubação. Para alcançar o resultado esperado, é necessário respeitar esses tempos e contar com um operador experiente e habilidoso. A técnica de vitrificação é classicamente utilizada em estudos experimentais. No que diz respeito à aplicação prática, os estudos são escassos, mas com resultados encorajadores (Araújo-Lemos et al., 2014).

Transferência de embriões

A transferência de embriões propriamente dita, ou inovulação, consiste na deposição do embrião no útero da fêmea receptora, que pode ser feita pelo ato cirúrgico (laparotomia), semicirúrgico (laparoscopia) ou transcervical. Todos os três métodos são utilizados, embora a laparoscopia e o método transcervical são mais indicados por não produzirem aderências pós-cirúrgicas (Fonseca et al., 2016).

Na laparotomia, a receptora é anestesiada e faz-se uma incisão na linha alba. Os cornos uterinos são expostos e aquele ipsilateral ao ovário, com pelo menos uma ovulação, é puncionado próximo à junção útero-tubárica para a introdução de um cateter contendo os embriões. Embora muito utilizada no início das pesquisas com transferência de embriões, essa técnica tende a não ser mais utilizada, devido à ocorrência de aderências pós-cirúrgicas que surgem com a repetição dos procedimentos (Freitas et al., 2014).

Na inovulação por laparoscopia, a receptora é anestesiada e colocada em decúbito dorsal em maca apropriada para a realização de uma punção no abdômen para a introdução do laparoscópio e avaliação da resposta ovulatória da receptora. Em seguida, é realizada uma

pequena incisão por onde será exposto parte do corno uterino, próximo à junção útero-tubárica, e onde serão depositados os embriões (Lopes Júnior et al., 2005).

Finalmente, o método de inovulação pela via transcervical consiste no tracionamento da cérvix para a porção anterior da vagina. A receptora é preparada para uma coleta de embriões, e um cateter com os embriões é colocado no óstio cervical, ultrapassando os anéis cervicais. Por sua praticidade, bem-estar animal e uma taxa de parição que pode ser de até 50%, esse método deveria ser mais estudado para que seja estabelecido como padrão em caprinos (Fonseca et al., 2014).

A sobrevivência embrionária pós-inovulação é influenciada por vários fatores e, dentre eles, podem ser citados: a condição corporal e taxa de ovulação das receptoras, o número de embriões transferidos, o estágio de desenvolvimento dos embriões, o local de inovulação e o sincronismo entre o estágio de desenvolvimento dos embriões e o dia do ciclo estral da receptora (Freitas et al., 2014).

Diagnóstico precoce de prenhez

Uma grande variedade de técnicas tem sido proposta para o diagnóstico de prenhez, como: radiografia, dosagem de progesterona e proteínas associadas à prenhez; porém, a que reúne mais vantagens é, sem dúvida, a ultrassonografia. Em caprinos, essa biotécnica vem se tornando cada vez mais frequente e essencial para incrementar as boas práticas de manejo do rebanho, como modificar a alimentação das fêmeas conforme o estágio de prenhez, prever a data precisa do parto, determinar a quantidade e viabilidade fetal, além da determinação do sexo fetal.

A ultrassonografia em tempo real é uma técnica não invasiva e acurada recorrentemente utilizada para o diagnóstico de prenhez em caprinos. A evolução dos equipamentos ultrassonográficos tem propiciado uma riqueza de detalhes nas imagens e do desenvolvimento fetal (Oliveira et al., 2014). No exame ultrassonográfico do trato reprodutor de caprinos, pode-se utilizar três tipos de transdutores: convexo transabdominal, linear transretal e setorial transvaginal. Para o diagnóstico precoce de prenhez, é necessário o uso de um transdutor linear transretal de 6 MHz a 8 MHz. Devido às particularidades anatômicas das cabras, utiliza-se um dispositivo para adequar a sonda transretal. Antes da introdução da sonda, realiza-se a retirada das fezes para evitar interferências na imagem.

O procedimento é realizado com a cabra em estação, e a bexiga urinária é usada como guia para localização uterina. Em seguida, a sonda deve ser inserida quase perpendicular à parede abdominal. O escaneamento deve ser realizado no sentido horário de 90° e anti-horário de 180° para localização do útero e dos cornos uterinos. Dessa forma, é possível realizar o diagnóstico de prenhez a partir do 20 dia pós-IA. No entanto, nesse período, a acurácia ainda é baixa, pois apenas o saco gestacional (estrutura anecoica circular ou elíptica

localizada no lúmen do útero) poderá ser visualizado (Figura 6A). A partir do 40º dia de gestação, o feto já está bem desenvolvido e é possível realizar a contagem fetal. As imagens dos placentomas são visualizadas como pequenos nódulos ecogênicos de 0,7 cm, progredindo para forma de “C” ou “O” ecogênicos (Figura 6B) com o decorrer da prenhez (Medan et al., 2004). Além da fácil visualização dos placentomas, a calcificação das estruturas ósseas do feto facilita a visualização, pois pode-se identificar o crânio, as costelas, a coluna vertebral e os ossos longos.

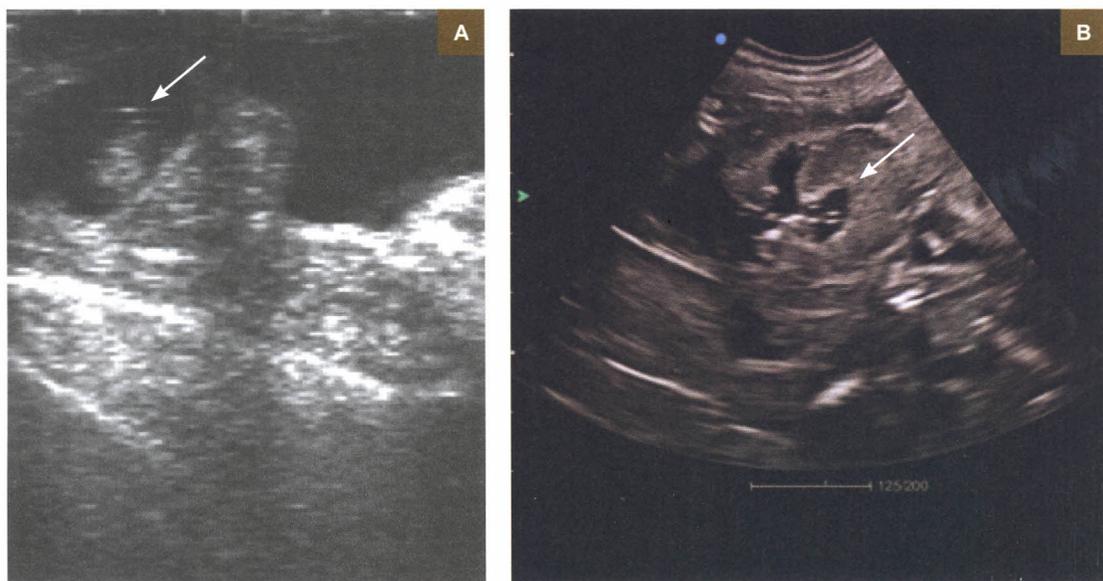


Figura 6. Imagens ultrassonográficas do diagnóstico precoce de prenhez em caprinos: saco gestacional por volta dos 25 dias (A); placentomas em forma de “C” aos 60 dias (B).

Fonte: Medan et al. (2004).

Transgênese e clonagem

Entre as modernas biotécnicas usadas em animais, a transgênese teve um avanço importante. Transgênese pode ser definida como uma modificação da informação genética de um organismo por meio de técnicas de DNA recombinante. A produção de animais domésticos transgênicos, que possuam DNA exógeno incorporado de modo estável em seu genoma, e, portanto, transmitindo o “transgene” à sua descendência por herança mendeliana, pode apresentar várias aplicações. Além do interesse óbvio para o estudo de genes e sua regulação, a tecnologia de animais transgênicos tem sido proposta como método de acelerar o melhoramento do rebanho, pela introdução de novos genes ou modificação de genes endógenos que regulam características de importância econômica (Melo et al., 2007).

A tecnologia do DNA recombinante causou uma revolução na produção de proteínas de ação terapêutica. Proteínas humanas são bastante utilizadas em medicina há muitos anos, mas sua disponibilidade é limitada e, atualmente, obtida por sistemas de cultivo bacteriano

ou células de mamíferos. Dessa forma, o uso de animais transgênicos como biorreatores apresenta-se como uma alternativa interessante a esses sistemas. Dessa forma, animais transgênicos podem ser fonte praticamente ilimitada de proteínas estáveis, ativas e processadas corretamente para uso clínico a custos mais baixos.

Ao contrário do que a maioria da comunidade pensava sobre a clonagem, a ideia inicial desta técnica não foi a produção de animais geneticamente idênticos para aplicação comercial. Na realidade, o nascimento da ovelha Dolly significou o desenvolvimento de uma nova metodologia para a obtenção de animais transgênicos (Wilmot et al., 1997). Tal afirmativa pôde ser comprovada pelo nascimento da ovelha Polly, produzida a partir de células transfectadas com gene para a produção do Fator IX de coagulação humano no leite (Schnieke et al., 1997).

O primeiro passo para a produção de um animal transgênico é a obtenção da construção de DNA, a qual terá como objetivo a expressão da proteína em um determinado tecido. No caso da espécie caprina, a expressão é quase sempre direcionada para a glândula mamária e com a posterior secreção da proteína recombinante no leite durante a lactação. As metodologias utilizadas para a produção de caprinos transgênicos são basicamente: a microinjeção da construção de DNA em embriões pró-nucleares, a transferência nuclear de células somáticas (TNCS) ou a técnica de CRISPR/Cas9. Freitas et al. (2012) obtiveram o nascimento dos primeiros caprinos transgênicos no Brasil, utilizando a técnica de microinjeção pró-nuclear (Figura 7). Esses animais expressam no leite o fator estimulante de colônia de granulócitos humano (hG-CSF) em elevada concentração ($> 600 \mu\text{g mL}^{-1}$ de leite) durante a lactação induzida (Moura et al., 2013) e ambos os fundadores (um macho e uma fêmea) demonstraram ser férteis e transmitiram o transgene à sua progênie (Batista et al., 2014).

Quanto ao uso da TNCS, uma das peculiaridades que agrega força à técnica como ferramenta para a transgênese é o fato de que a construção de DNA pode ser introduzida nas células em cultivo, permitindo a seleção com marcadores de clones celulares que realmente integraram a sequência de interesse no genoma. Usando essa técnica, também no Brasil, pesquisadores obtiveram caprinos transgênicos para glucocerebrosidase (Oliveira, 2015). A TNCS também pode ser uma ferramenta aliada da transgênese quando, a partir de um animal transgênico fundador, pode-se utilizar a técnica no intuito de realizar a clonagem do mesmo animal, como já descrito no Brasil por Pereira et al. (2013).

O sistema CRISPR/Cas9 foi descrito em *Escherichia coli* como séries de pequenas repetições palindrômicas interespaçadas por sequências curtas, e depois, associadas ao sistema imune bacteriano. Posteriormente, o sistema foi aplicado pela primeira vez para a edição de genoma em células de mamíferos (Cong et al., 2013). Desde então, diversas aplicações dessa tecnologia já foram empregadas com sucesso. Em caprinos, Wang et al. (2016) publicaram o primeiro relato de animais geneticamente modificados pelo uso da técnica.



Figura 7. Caprinos transgênicos obtidos por microinjeção pró-nuclear: momento da microinjeção do transgene em embriões recém-fecundados no estágio pró-nuclear (A); fêmea transgênica fundadora (B); macho transgênico fundador (C).

Considerações finais

O uso de biotécnicas aplicadas à reprodução pode trazer inúmeros benefícios à exploração produtiva da espécie caprina. Além disso, oócitos e embriões caprinos podem ser manipulados e criopreservados com intuito de aumentar o número de crias de animais geneticamente superiores ou para formação de bancos de embriões em programas de conservação de raças.

Assim, modernas biotécnicas como a clonagem e a transgênese, podem incrementar a exploração de caprinos, já que essa espécie possui características peculiares que a indicam como modelo para uso de tais biotécnicas.

Referências

- ARAÚJO-LEMONS, P. F.; FREITAS NETO, L. M.; MOURA, M. T.; MELO, J. V. Comparison of vitrification and conventional freezing for cryopreservation of caprine embryos. *Zygote*, v. 23, p. 594-602, Aug. 2014. DOI: 10.1017/S0967199414000215.
- BARIL, G.; BREBION, P.; CHESNÉ, P. **Manuel de formation pratique pour la transplantation embryonnaire chez la brebis et la chèvre**. Roma: FAO, 1993.
- BARIL, G.; REMY, B.; LEBOEUF J. F.; BECKERS J.; 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*, v. 45, p. 1553-1559, 1996. DOI: 10.1016/0093-691X(96)00123-9.
- BATISTA, R. I. T. P.; MELO, C. H.; SOUZA-FABJAN, J. M.; TEIXEIRA, D. I.; MELO, L. M.; FREITAS, V. J. Phenotypic features of first-generation transgenic goats for human granulocyte-colony stimulation factor production in milk. *Biotechnology Letters*, v. 36, p. 2155-2162, June 2014.
- CONG, L.; RAN, A.; COX, C.; LIN, S.; BARRETTO, R.; HABIB, N.; HSU, P. D.; WU, X.; JIANG, W.; MARRAFFINI, L.; ZHANG, F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, v. 339 (6121), p. 819-823, Feb. 2013. DOI: 10.1126/science.1231143.
- COX, J. F.; ALFARO, V. In vitro fertilization and development of OPU derived goat and sheep oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 42, p. 83-87, Jan. 2007. DOI: 0.1111/j.1439-0531.2006.00735.x.
- FONSECA, J. F.; ZAMBRINI, F. N.; ALVIM, G. P.; PEIXOTO, M. G. C. D.; VERNEQUE, R. S.; VIANA, J. H. M.. Embryo production and recovery in goats by non-surgical transcervical technique. *Small Ruminant Research*, v. 111, p. 96-99, April 2013. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2012.08.007.

- FONSECA, J. F.; ESTEVES, L. O. V.; ZAMBRINI, F. N.; BRANDÃO, F. Z.; PEIXOTO, M. G. C. D.; VERNEQUE, R. S.; SIQUEIRA, L. G. B.; VIANA, J. H. M. Viable offspring after successful non-surgical embryo transfer in goats. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, p. 613-616, April 2014. DOI: 10.1590/1678-41626783.
- FONSECA, J. F.; SOUZA-FABJAN, J. M.; OLIVEIRA, M. E.; LEITE, C. R.; NASCIMENTO-PENIDO, P.; BRANDÃO, F. Z.; LEHLOENYA, K. C. Nonsurgical embryo recovery and transfer in sheep and goats. **Theriogenology**, v. 86, p. 144-151, July 2016. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2016.04.025.
- FREITAS, V. J. F.; OLIVEIRA, M. A. L.; SIMPLÍCIO, A. A.; BARIL, G.; POULIN, N.; COGNIÉ, Y. Produção, criopreservação e transferência de embriões em pequenos ruminantes. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2014. p. 241-260.
- FREITAS, V. J. F.; RONDINA, D.; LOPES JÚNIOR, E. S.; TEIXEIRA, D. I. A.; PAULA, N. R. O. Hormonal treatments for the synchronisation of oestrus in dairy goats raised in the tropics. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, p. 415-420, July 2004. DOI: doi.org/10.1071/RD04031.
- FREITAS, V. J. F.; SEROVA, I. A.; MOURA, R. R.; ANDREEVA, L. E.; MELO, L. M.; TEIXEIRA, D. I. A. The establishment of two transgenic goat lines for mammary gland hG-CSF expression. **Small Ruminant Research**, v. 105, p. 105-113, June 2012. DOI: 10.1016/j.smallrumres.2012.03.009.
- LIMA-VERDE, J. B.; LOPES JÚNIOR, E. S.; TEXEIRA, D. I. A.; PAULA, N. R. O.; FREITAS, V. J. F. Transcervical embryo recovery in Saanen goats. **South African Journal of Animal Science**, v. 33, p. 127-130, 2003. DOI: 10.4314/sajas.v33i2.3766.
- LOPES JUNIOR, E. S.; MAIA E. L. M. M.; PAULA, N. R. O.; TEIXEIRA, D. I. A.; VILLARROEL, A. B. S.; RONDINA, D.; FREITAS, V. J. F. Effect of age of donor on embryo production in Morada Nova (white variety) ewes participating in a conservation programme in Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 38, p. 555-561, Aug. 2006. DOI 10.1007/s11250-006-4344-1.
- LOPES JÚNIOR, E. S.; MAIA, E. L. M. M.; TEIXEIRA, D. I. A.; PADILHA, R. T.; ALMEIDA, A. P. Fertilidade de receptoras e sobrevivência embrionária após transferência de embriões de ovinos Morada Nova (variedade branca) submetidos a dois protocolos de descongelamento. In: REUNIÃO ANUAL DA SBTE, 19., 2005, Angra dos Reis. **Anais... Angra dos Reis: SBTE**, 2005. p. 241.
- LOPES JÚNIOR, E. S.; TEIXEIRA, D. I. A.; LIMA-VERDE, J. B.; CORDEIRO, M. F.; PAULA, N. R. O.; ARRUDA, I. J. RONDINA, D.; FREITAS, V. J. F. Uso do Flunixin Meglumine na prevenção da regressão lútea prematura em cabras submetidas a tratamento superovulatório. **Veterinary Practice News**, v. 68, p. 7-8, 2004.
- MEDAN, M.; WATANABE, G.; ABSY, G.; SASAKI, K.; SHARAWY, S.; TAYA, K. Early pregnancy diagnosis by means of ultrasonography as a method of improving reproductive efficiency in goats. **Journal of Reproduction and Development**, v. 50, p. 391-397, 2004. DOI: 10.1262/jrd.50.391.
- MELO, E. O.; CANAVESSI, A. M. O.; FRANCO, M. M.; RUMPF, R. Animal transgenesis: state of the art and applications. **Journal of Applied Genetics**, v. 48, p. 47-61, Mar. 2007.
- MENCHACA, A.; RUBIANES, E. New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 16, p. 403-413, July 2004. DOI: 10.1071/RD04037.
- MORAES, J. C. F.; MORAES, J. C. F.; SOUZA, C. J. H. de; GONÇALVES, P. B. D.; FREITAS, V. J. de F.; LOPES JÚNIOR, E. S. Controle do estro e da ovulação em ruminantes. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2014. p. 33-56.
- MOURA, R. R.; ALBUQUERQUE, E. S.; MELO, C. H.; ALCÂNTARA-NETO, A. S.; BATISTA, R. I. T. P.; NUNES-PINHEIRO, D. C.; PEREIRA, A. F.; TEIXEIRA, D. I.; MELO, L. M.; SEROVA, I. A.; ANDREEVA L. E.; SEROV, O. L.; FREITAS, V. J. Dynamics of recombinant hG-CSF in transgenic goat: preliminary study in the founder during hormonally induced lactation. **Animal Biotechnology**, v. 24, p. 10-14, Feb. 2013. DOI: 10.1080/10495398.2012.729000.
- NOGUEIRA, D. M.; LOPES JÚNIOR, E. S.; PEIXOTO, R. M.; CHRISTILIS, M.; MARTINS, S. R.; MONTE, A. P. O. Using the same CIDR up to three times for estrus synchronization and artificial insemination in dairy goats. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 33, p. 321-325, July-Sept. 2011. DOI: 10.4025/actascianimsci.v33i3.10120.
- NOGUEIRA, D. M.; LOPES JÚNIOR, E. S.; SOUZA, P. H. F. de; CARVALHO JÚNIOR, J. M. de. Efeito da sincronização do estro com dupla aplicação de d-cloprostenol associada ou não à eCG sobre o desempenho reprodutivo de cabras ½ Boer/SRD exploradas na região semiárida do Nordeste do Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, p. 618-626, abr./jun. 2009.

- OLIVEIRA, M. Cabras transgênicas: animais recebem genes humanos e produzem proteínas no leite para tratamento de doenças. **Pesquisa Fapesp**, v. 236, p. 62-65, out. 2015.
- PEREIRA, A. F.; FELTRIN, C.; ALMEIDA, K. C.; CARNEIRO, I. S.; AVELAR, S. R. G.; ALCÂNTARA NETO, A. S. Analysis of factors contributing to the efficiency of the in vitro production of transgenic goat embryos (*Capra hircus*) by handmade cloning (HMC). **Small Ruminant Research**, v. 109, p.163-172, Jan. 2013. DOI: 0.1016/j.smallrumres.2012.07.020.
- SCHNIEKE, A. E.; KIND, A. J.; RITCHIE, W. A. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. **Science**, v. 278, p. 2130-2133, 1997. DOI: 10.1126/science.278.5346.2130.
- SIMPLÍCIO, A. A.; SANTOS, D. O.; SALLES, H. O. Manejo de caprinos para produção de leite em regiões tropicais. **Ciência Animal**, v. 10, n. 1, p. 13-27, 2000.
- SOUZA, J. M. G.; DUFFARD, N.; BERTOLDO, M. J.; LOCATELLI, Y.; CORBIN, E.; FATET, A.; FREITAS, V. J.; MERMILLOD, P. Influence of heparin or the presence of cumulus cells during fertilization on the in vitro production of goat embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 138, p. 82-89, 2013.
- SOUZA-FABJAN, J. M. G.; LOCATELLI, Y.; DUFFARD, N.; CORBIN, E.; TOUZÉ, J. L.; PERREAU, C.; BECKERS, J. F.; FREITAS, V. J. F.; MERMILLOD, P. In vitro embryo production in goats: slaughterhouse and laparoscopic ovum pick up-derived oocytes have different kinetics and requirements regarding maturation media. **Theriogenology**, v. 81, n. 8, p. 1021-1031, May 2014c. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2014.01.023.
- SOUZA-FABJAN, J. M. G.; PANNEAU, B.; DUFFARD, N.; FIGUEIREDO JÚNIOR, L. de R. FREITAS V. J. F. In vitro production of small ruminant embryos: late improvements and further research. **Theriogenology**, v. 81, n. 9, 1149-1162, June 2014b. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2014.02.001.
- SOUZA-FABJAN, J. M. G.; PEREIRA, A. F.; MELO, C. H. S.; SANCHEZ, D. J. D.; OBA, E. Assessment of the reproductive parameters, laparoscopic oocyte recovery and the first embryos produced in vitro from endangered Canindé goats (*Capra hircus*). **Reproductive Biology**, v. 13, p. 325-332, Dic. 2013. DOI: 10.1016/j.repbio.2013.09.005.
- SOUZA-FABJAN, J. M. G.; TORRES, C. A. A.; MAIA, A. L. R. S.; BRANDÃO, F. Z.; OBA, E.; BELTOLDO, M. J.; FONSECA, J. F. da. Re-used progesterone devices efficiently synchronise oestrus and ovulation after autoclaving process in Toggenburg goats during the breeding season. **Animal Production Science**, v. 55, p. n. 6, p. 818-822, 2014a.
- TELES FILHO, A. C. de A.; BATISTA, R. I. T, P.; PEREIRA, A. F.; MELO, L. G. M.; FREITAS, V. J. de F.; TEIXEIRA, D. I. A. Ultrasonographic evaluation of hG-CSF transgenic goat conceptus. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v. 21, p. 53-59, jan./mar. 2014. DOI: 10.22409/rbcv.v21i1.465.
- WANG, X.; CAI, B.; ZHOU, J.; ZHU, H.; NIU, Y.; Disruption of FGF5 in Cashmere goats using CRISPR/Cas9 results in more secondary hair follicles and longer fibers. **PLoS One**, v. 11, e0164640, Oct. 2016.
- WILMUT, I.; SCHNIEK, A. E.; MCWHIR, J.; KIND, A. J.; CAMPBELL, K. H. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, v. 385 (6619), p. 810-813, Feb.1997.