

Manual de Transferência de Embriões em Caprinos



República Federativa do Brasil

Fernando Henrique Cardoso
Presidente da República

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Marcus Vinícius Pratini de Moraes
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Conselho de Administração

Márcio Fortes de Almeida
Presidente

Alberto Duque Portugal
Vice-Presidente

Dietrich Gerthard Quast
José Honório Accarini
Sérgio Fausto
Urbano Campos Ribeiral
Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Alberto Duque Portugal
Diretor-Presidente

Bonifácio Hideyuki Nakasu
Dante Daniel Giacomelli Scolari
José Roberto Rodrigues Peres
Diretores-Executivos

Embrapa Caprinos

Aurino Alves Simplicio
Chefe-Geral

Luiz da Silva Vieira
Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

Maria Eliene da Silva Dourado
Chefe-Adjunto de Administração



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

ISSN 1676-7659

Dezembro, 2002

Documentos 40

Manual de Transferência de Embriões em Caprinos

Hévila Oliveira Salles

Alice Andrioli

Aurino Alves Simplício

José Nóbrega Medeiros

Osmarilda Maria Machado

Sobral, CE
2002

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Caprinos

Estrada Sobral/Groáiras, Km 04, Caixa Postal D 10

CEP 62011-970 - Sobral, CE

Fone: (0xx88) 677-7000

Fax: (0xx88) 677-7055

Home-page: <http://www.cnpc.embrapa.br>

E-mail: sac@cnpc.embrapa.br

Comitê de Publicações

Presidente: *Ângela Maria Xavier Eloy*

Secretário-Executivo: *Francisco Selmo Fernandes Alves*

Membros: *José Ubiraci Alves*

Luiz da Silva Vieira

Tânia Maria Chaves Campêlo

Supervisão editorial/Normalização bibliográfica: *Tânia Maria C. Campêlo*

Revisão gramatical: *Eneas Reis Leite*

Editoração eletrônica: *Fábio de Sousa Fernandes*

1ª edição

1ª impressão (2002): 500 exemplares

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº9.610).

Manual de transferência de embriões em caprinos / Hévila

Oliveira Salles... [et. al.]. - Sobral, CE : Embrapa

Caprinos, 2002.

64p. ; (Embrapa Caprinos. Documentos, 40).

Bibliografia: p. 35 a 40.

1. Caprino - Transferência de embrião. I. Andrioli, Alice.
- II. Simplício, Aurino Alves. III. Medeiros, José Nóbrega.
- IV. Alves, Osmarilda Maria Machado. V. Título. VI. Série.

CDD 636.089264

© Embrapa 2002

Autores

Hévila Oliveira Salles

Méd., Vet., M.Sc., em Biologia Molecular
Embrapa Caprinos
Estrada Sobral/Groaíras, km 4
Sobral, CE, 62011-970
Email: hevila@cnpc.embrapa.br

Alice Andrioli

Méd., Vet., D.Sc., em Ciência Animal
Embrapa Caprinos
Email: alice@cnpc.embrapa.br

Aurino Alves Simplício

Méd., Vet., P.D., em Biotecnologia da
Reprodução Animal
Email: asimplic@cnpc.embrapa.br

José Nóbrega Medeiros

Técnico Agrícola, Assistente de Pesquisa
Embrapa Caprinos
Email: nobrega@cnpc.embrapa.br

Osmarilda Maria M. Alves

Auxiliar de Operações, Laboratorista
Embrapa Caprinos
Email: osmarild@cnpc.embrapa.br

Apresentação

Os pequenos ruminantes domésticos apresentam potencial para contribuir, efetivamente, com o desenvolvimento sócioeconômico do País, desde que racionalmente explorados.

Para que as explorações caprina e ovina sejam economicamente viáveis, é necessário que a unidade produtiva, na sua essência, esteja organizada e gerida com visão empresarial e focalizada no respectivo agronegócio. Para tanto, o uso da biotecnologia se torna um componente indispensável para o sucesso da atividade.

A transferência de embriões em caprinos e ovinos é uma técnica moderna e avançada de manejo reprodutivo, tendo como principal objetivo a maximização reprodutiva de fêmeas de elite, explorando, assim, seu potencial biológico e, conseqüentemente, contribuindo para uma rápida multiplicação de animais geneticamente superiores.

Portanto, o uso dessa prática se faz extremamente necessária nos programas de melhoramento animal e na formação de rebanhos de elite, reduzindo, acentuadamente, o tempo utilizado pelos métodos tradicionais de reprodução. Ao mesmo tempo em que favorece a manutenção produtiva da atividade e a qualidade genética dos indivíduos.

Em adição, esta técnica exige garantias de um manejo sanitário adequado para o rebanho e que alguns cuidados devam ser observados por ocasião da colheita e do processamento de embriões. Observa, também, que para o sucesso da técnica em questão, sua implantação deverá ser atrelada a um nível mínimo de organização e gestão da propriedade e, sobretudo, do rebanho.

Este documento, portanto, traz orientações e recomendações vitais para técnicos, estudantes, produtores, e profissionais de Medicina Veterinária, numa linguagem bastante acessível, quanto aos procedimentos a serem adotados para a obtenção de melhores resultados no processo de transferência de embriões em caprinos e ovinos.

Luiz da Silva Vieira
Chefe de P&D

Sumário

Introdução	9
Organização da Propriedade	11
Escrituração zootécnica	11
Descarte orientado	12
Avaliação de eficiência reprodutiva	13
Seleção de matrizes	13
Seleção de reprodutores	15
Morfologia do Sistema Genital Feminino	16
Estro	20
Comportamento sexual da fêmea em estro	21
Comportamento sexual do macho frente a uma fêmea em estro ..	21
Ciclo Estral	22
Implantação de um Programa de Transferência de Embriões	22
Seleção de fêmeas doadores e receptores de embriões	23
Preparo de doadoras	24
Método de superovulação	24
Preparo de receptoras	25
Método de sincronização do estro e da ovulação	25
Cobertura / Inseminação Artificial	25
Colheita	26
Colheita por via transcervical em circuito fechado	27
Lavagem e avaliação das estruturas recuperadas	28
Criopreservação	31
Método clássico de criopreservação	33
<i>Desidratação do embriões e congelação</i>	33
<i>Descongelação e reidratação dos embriões</i>	34
Inovulação por semi-laparoscopia	35
Referências Bibliográficas	35

Anexos

Manual de Transferência de Embriões em Caprinos

Hévila Oliveira Salles

Alice Andrioli

Aurino Alves Simplicio

José Nóbrega Medeiros

Osmarilda Maria Machado Alves

Introdução

Os pequenos ruminantes domésticos muito podem contribuir para o desenvolvimento sócio-econômico do País, desde que racionalmente explorados. Entretanto, para a exploração econômica desses animais no Brasil, é necessário a organização e a gestão da atividade à luz do agronegócio, pelo uso de tecnologia, por investimento na formação e qualificação de mão-de-obra e pela avaliação da relação custo-benefício das inovações tecnológicas, dentre outros aspectos. Esse conjunto de fatores leva à necessidade de se explorar as duas espécies respeitando-se suas aptidões e as condições edafo-climáticas de cada macro-região, tendo como foco os objetivos e metas a serem alcançados.

Ressalte-se que a organização e gestão da atividade, em consonância com os princípios do agronegócio e o uso de tecnologias, em regiões subdesenvolvidas ou em desenvolvimento, é muitas vezes penalizada pela limitada capacidade de investimento do produtor, pelo baixo nível de aceitação e de adoção de tecnologias, bem como pelo grau de instrução do cliente a ser beneficiado. Por outro lado, as pastagens tropicais não preenchem os requerimentos nutricionais exigidos pelos ruminantes para expressarem e manterem níveis elevados de produção, sendo a escassez e o baixo valor nutritivo das mesmas os principais fatores limitantes (Mannetje, 1981; Leite et al., 1990). Além desses aspectos, considerem-se também, aqueles inerentes à raça a ser explorada, principalmente no que diz respeito à capacidade de adaptação e de sobrevivência ao meio ambiente, à saúde do rebanho e à diferença entre o potencial biológico da raça e a rentabilidade econômica.

Apesar das limitações existentes em regiões tropicais, é possível implementar biotécnicas da reprodução visando o incremento do desfrute e, por conseguinte, a rentabilidade dos rebanhos e da Unidade Produtiva como um todo. Dentre as biotécnicas disponíveis, ressaltam-se a inseminação artificial, a sincronização do estro e da ovulação, a transferência de embriões e o diagnóstico precoce de prenhez.

Cuidados devem ser tomados ao se adotar novas tecnologias pois, em geral, o incremento nos custos só se justifica quando redundam em aumento líquido na rentabilidade da atividade ou em ganho genético dos rebanhos. No entanto, é indispensável a implantação de práticas de manejo reprodutivo quando se objetiva o aumento da produtividade dos rebanhos, ressaltando-se que o sucesso no uso de tecnologias da reprodução só ocorrerá se o estado de nutrição e de saúde dos animais estiver, no mínimo, regular ao início da aplicação da prática, e o ganho em peso no transcorrer do processo for positivo. É importante observar, também, que o sucesso ou insucesso da exploração é resultante, dentre outros aspectos, de dois componentes biológicos, a fêmea e o macho. Este, em geral, participa de forma mais ativa, devido ao seu elevado poder multiplicador, em especial quando se usa a inseminação artificial (IA). É importante observar que a IA, apesar de ser uma forte ferramenta de manejo reprodutivo, pode ainda favorecer o ganho genético. Por outro lado a técnica pode disseminar enfermidades infecciosas ou de outras naturezas. Ressalte-se que a transferência de embriões, apesar de não competir numericamente com o alcance da inseminação artificial, não deve ser negligenciada quanto aos cuidados, pois também apresenta um grande poder multiplicador, especialmente do componente fêmea.

A implementação de toda e qualquer prática de manejo reprodutivo, da mais simples à mais sofisticada, deve ser antecedida de uma análise da relação custo:benefício, bem como de cuidados quanto ao manejo, em especial da alimentação e da nutrição, das condições de saúde dos rebanhos e, também, dos cuidados quanto a adequação das instalações. As matrizes, particularmente as doadoras e as receptoras de embriões, bem como os reprodutores e doadores de sêmen, devem ser submetidos, respectivamente, a avaliações periódicas clínico-ginecológica e clínico-andrológica. Ressalte-se, ainda que a seleção dos animais e rebanhos a serem trabalhados influencia direta e significativamente os resultados alcançados. Por outro lado, a organização e gestão da Unidade Produtiva são pontos fundamentais para o sucesso do empreendedor.

Organização da Propriedade

Escrituração zootécnica

A escrituração zootécnica é fundamental para o sucesso da exploração dos pequenos ruminantes domésticos, afora favorecer a implementação de um eficiente sistema de controle do rebanho. Em acréscimo, ela é imprescindível na implantação de um programa que objetiva o uso de biotécnicas da reprodução. Ressalte-se que, através do acompanhamento dos rebanhos, podem-se identificar animais portadores de taras genéticas e improdutivos ou menos produtivos, ajudando a estabelecer metas e estratégias que levem ao alcance dos objetivos.

Os registros dos animais e da produção devem ser de fácil uso e conter o máximo de informações inerentes ao rebanho e ao sistema de produção. Devem considerar os objetivos e metas a serem alcançados, o sistema de exploração e o regime de manejo impostos aos rebanhos, ressaltando-se o manejo da nutrição, da saúde e da reprodução. Devem ser feitos em fichas individuais e coletivas, visando avaliações de desempenho individual e do rebanho e, por conseqüência, do sistema de produção. Devem permitir ressaltar os pontos fortes e fracos, como os animais de alta produção, os menos produtivos, os improdutivos e os portadores de problemas de outras ordens, favorecendo, assim, a manutenção e a multiplicação acelerada dos animais superiores e o descarte dos inferiores.

Nas fichas individuais devem ser anotadas informações como: identificação; pelagem; presença ou ausência de chifres; pais; avós; data e tipo de nascimento; peso ao nascer; desenvolvimento ponderal; data e peso à primeira cobrição ou IA; época e duração da estação de monta; tipo de monta, se a campo ou em curral; IA, data, fornecedor do sêmen e número da partida; data e tipo de parto; condição corporal; ordem de parto; regime de exploração; data e causa provável do descarte ou morte etc. Como auxiliar ao sistema de fichas individuais e coletivas, estão disponíveis, no mercado, inúmeros softwares, programas para controle e monitoramento da produção, os quais facilitam o trabalho do produtor e do técnico quando da avaliação das características reprodutivas e produtivas de cada indivíduo ou de todo o rebanho.

Descarte orientado

O descarte orientado caracteriza-se por ser uma prática simples, de baixo custo, e pelo incremento que, por si só, confere à produtividade. Baseia-se na remoção dos indivíduos portadores de taras, improdutivos e menos produtivos do rebanho, obedecendo a critérios técnico-econômicos, e em consonância com os objetivos e metas estabelecidos para a exploração.

Dentre os critérios a serem considerados para se fazer o descarte orientado, a Embrapa (1995) ressalta os seguintes:

- Animais portadores de taras ou defeitos, tais como bragnatismo, prognatismo, criptorquidismo, hérnia escrotal e/ou umbilical, etc.
- Defeitos graves de úbere e de aprumos.
- Animais intersexos.
- Animais despigmentados, quando explorados em regiões tropicais.
- Animais idosos que apresentam problemas nos sistemas apreensor e mastigatório.
- Matrizes portadoras de mastite crônica, uni ou bilateral.
- Fêmeas adultas portadoras de tetas excessivamente grandes e/ou dilatadas.
- Fêmeas jovens ou adultas que apresentam assimetria acentuada das glândulas mamárias, teta com duplo esfíncter e/ou bipartida.
- Cabra de segunda ou mais ordem de parto que produz leite por um período inferior a seis meses, para as mestiças Alpinas, sete a oito meses para a Anglo-nubiana e nove a dez meses para as Alpinas.
- Toda e qualquer cabra que produz menos do que a média de produção de leite do rebanho.
- Fêmeas que exploradas para corte desmamam menos quilogramas de crias do que a média do rebanho, considerando-se a raça e a ordem de parto.
- Fêmeas jovens que do sétimo ao oitavo mês não tenham alcançado, pelo menos, 50,0% do peso vivo médio das matrizes de segunda ou mais ordem de parto.
- Machos caprinos mochos de nascimento.
- Reprodutores portadores de sacos escrotais excessivamente pendulosos e com assimetria testicular ou epididimária.
- Reprodutores portadores de orquite crônica e/ou testículos pequenos e endurecidos, mesmo quando simétricos.

- Machos adultos excedentes, observando-se a relação de um reprodutor para 50 a 80 matrizes.
- Animais reincidentes de linfadenite caseosa e portadores de pododermatite crônica refratária ao tratamento clínico.

Avaliação da eficiência reprodutiva

A eficiência reprodutiva é, possivelmente, a característica que mais contribui para o aumento da produtividade. Numa exploração de caprinos é importante considerar a idade e o peso à primeira cobertura ou à IA e, por conseguinte, ao primeiro parto. É importante observar, também, a ordem de parto e o intervalo entre partos (IEP) (Araújo et al., 1999). Deve-se considerar, também, a fertilidade ao parto (FP), definida como o número de fêmeas paridas sobre o número de fêmeas expostas ao macho ou artificialmente inseminadas; a prolificidade, que é o número de crias nascidas sobre o número de fêmeas paridas, e que é influenciada pela raça e pelas condições edafo-climáticas (Santiago, 1946; Gill & Dev, 1972; Gonzalez-Stagnaro et al., 1974; Chawla & Bhatnagar, 1984; Rodrigues, 1988) e a sobrevivência das crias à idade do desaleitamento ou desmame, a depender do manejo da mãe e das crias em uso. É importante compreender também, que o desempenho reprodutivo do rebanho é influenciado por fatores intrínsecos e extrínsecos ao animal. Os intrínsecos são a capacidade biológica do macho e da fêmea para se reproduzir; a taxa de ovulação (TO); a produção e a liberação de sêmen; a fecundação; a sobrevivência embrionária; a habilidade materna; e a capacidade de adaptação ao meio ambiente. Já a nutrição, a qual é reflexo do manejo nutricional, a saúde, a qual é reflexo do manejo sanitário, as instalações, a umidade relativa do ar e do solo, a temperatura ambiente, o regime de exploração, dentre outros, são fatores extrínsecos que também influenciam sobremaneira o desempenho reprodutivo (Simplício et al., 1990; Simplício, 1994).

Seleção de matrizes

Dentre os parâmetros desejáveis em uma boa matriz, destacam-se:

- O padrão racial característico da raça explorada.
- O aspecto feminino.
- O bom desenvolvimento ponderal.

- A ausência de taras ou defeitos físicos.
- A boa conformação do úbere e presença de apenas duas tetas.
- A habilidade materna.
- Cascos sadios e bons aprumos.
- A idade jovem e compatível para uso em reprodução.
- A boa fertilidade ao parto e prolificidade compatível com a raça.
- A prenhez e os partos fisiológicos.

Deve-se ressaltar que a aceleração da produção de crias está na dependência de matrizes com características reprodutivas superiores, isto é, alta fertilidade ao parto e prolificidade, elevada habilidade materna, partos eutócicos e passíveis de serem cobertas e fecundadas ao longo do ano. Por outro lado, não se deve selecionar uma fêmea unicamente pelo número de crias nascidas, mas pelo número e quilos de crias desmamadas. Este aspecto, além de ressaltar a habilidade materna, pode ser usado como critério para se fazer seleção dentro de rebanho. Desta forma, sempre que o regime de manejo permitir, deve-se encorajar os produtores a selecionar fêmeas que são sexualmente precoce, parem gêmeos com mais freqüência e desmamam crias em número e peso vivo corporal acima da média do rebanho, com pouca ou nenhuma interferência do homem.

Ressaltada a importância da raça, da produção e da eficiência reprodutiva, é mais racional considerar a condição corporal (CC) do que o peso vivo, pois este é fortemente influenciado pela raça e pelo tamanho do indivíduo. A CC deve ser preferida para se definir quais fêmeas devem ou não ser submetidas à estação reprodutiva, usando-se a monta natural ou a IA, com ou sem a sincronização do estro-ovulação ou superovulação, no caso das receptoras e doadoras de embriões, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1. Influência da condição corporal (CC) ao parto sobre o comportamento e a eficiência reprodutiva de cabras, em região tropical.

CC	N	PS	Fertilidade ao parto	P	Mortalidade de crias ¹ (%)
<1	18	92 ^B	66,7 ^B	1,42 ^B	11,8 ^B
2	26	73 ^{AB}	73,1 ^{AB}	1,47 ^{AB}	10,7 ^B
3	31	56 ^A	77,4 ^A	1,58 ^A	5,3 ^A
>3	15	58 ^A	73,3 ^{AB}	1,52 ^A	6,7 ^A

N = Número de matrizes; PS = Período de Serviço; P = Prolificidade.

¹ Durante o período de zero (0) a trinta dias de idade.

P < 0,05 para valores seguidos de letras diferentes, na mesma coluna.

Fonte: Gonzalez - Stagnaro (1991).

A mensuração da CC consiste na atribuição de um escore numa escala de 1 a 5 (anexo 1), de acordo com o grau de distribuição do músculo e do tecido adiposo (gordura) ao longo de algumas partes do corpo. O sucesso do sistema depende, primariamente, da experiência do técnico e/ou do caprinocultor. A mensuração é feita principalmente na região lombar, entre a segunda e a quinta vértebras lombares (L_2 a L_5), em torno e ao longo das vértebras e na região do esterno. A mesma consiste na avaliação da proeminência quanto ao grau de arredondamento dos processos espinhosos das vértebras lombares. Em seguida, avaliam-se a proeminência e o grau de cobertura adiposa dos processos transversos das vértebras para, posteriormente, avaliar-se a cobertura muscular e adiposa abaixo dos processos transversos e o preenchimento pela musculatura e cobertura adiposa observados no ângulo formado entre os processos espinhosos e transversos. Finalmente, avalia-se a região do esterno. As fêmeas que apresentarem as condições 1 e 5 não devem ser usadas, temporariamente, para fins de reprodução, pois ambas as condições interferem negativamente na fertilidade ao parto (Morand-Fehr et al., 1989).

Seleção de reprodutores

A seleção do animal que se destina a reprodução, em monta natural (MN) ou como doador de sêmen, em um programa de TE, é fator determinante para o sucesso deste. Recomenda-se avaliar as condições clínico-andrológica e de comportamento reprodutivo, isto é, a libido através da reação frente a fêmea em estro e de execução plena da cópula - capacidade de serviço - dos animais, em especial antes da compra ou aquisição, pré estação reprodutiva (ER), e a intervalos regulares para os doadores de sêmen. Os reprodutores devem receber atenção especial a partir de oito a seis semanas antes do início da estação reprodutiva, já que o ciclo espermatogênico nos pequenos ruminantes apresenta uma duração de 49 a 53 dias. A depender das condições edafo-climáticas, do regime de manejo em uso e da relação macho : fêmeas, existe a necessidade de suplementação alimentar nos períodos pré e durante a ER. É importante considerar a suplementação mineral dos animais e ressaltar, mais uma vez, a importância da alimentação-nutrição para os doadores de sêmen ao longo do ano.

Em geral, as características desejáveis são:

- Padrão racial característico da raça.
- Não ser portador de doenças específicas da reprodução.
- Apresentar aspectos masculinos.
- Possuir testículos morfologicamente normais.
- Não ser portador de lesões penianas e prepuciais.
- Presença de boa libido.
- Apresentar cascos saudios e bons aprumos.
- Ausência de defeitos hereditários.
- Ter boa capacidade reprodutiva e fertilidade comprovada.
- Não ser mocho de nascimento, para os caprinos.

Morfofisiologia do Sistema Genital Feminino

O sistema genital feminino da cabra é composto por ovários, ovidutos, útero, cérvice, vagina, vestíbulo e vulva (Fig. 1 e 2).

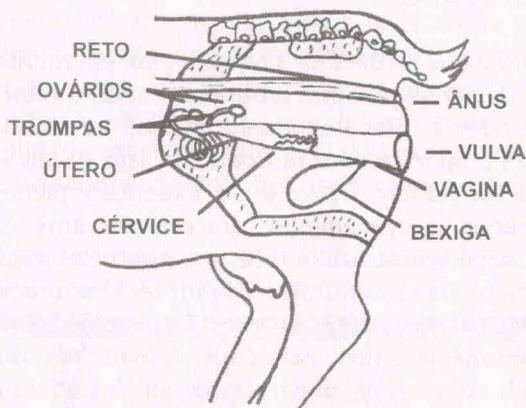


Fig. 1. Visão topográfica do sistema genital feminino.

Fonte: Adaptado de Santos et al. (1999).

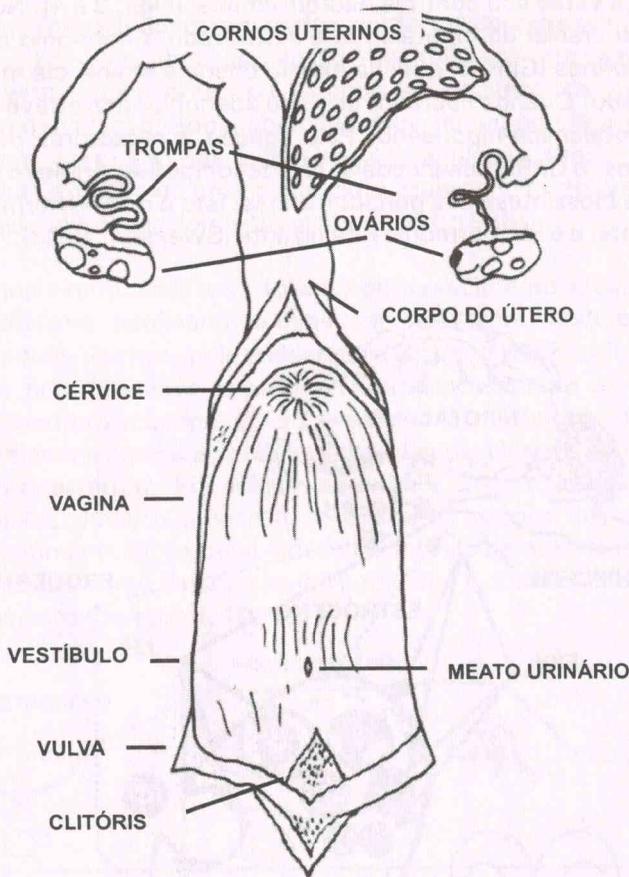


Fig. 2. Sistema genital feminino.

O ovário, composto por medula e córtex, é circundado pelo epitélio germinativo. A medula ovariana consiste de tecido conjuntivo fibroelástico irregularmente distribuído, de nervos extensivos e sistemas vasculares que atingem o ovário pelo hilo. O córtex ovariano contém folículos e/ou corpos lúteos (CL) em vários estádios de desenvolvimento e regressão. O tecido conjuntivo do córtex contém muitos fibroblastos, algumas fibras colágenas e reticulares, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos (Hafez, 1988).

Os ovários estão sob controle neurohormonal (Figs. 3 e 4). Nos neurônios da porção cranial do hipotálamo, é sintetizado o hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH), que via axônio chega à eminência média, onde é armazenado. Quando liberado, chega à adenohipófise através do sistema porta-hipotalâmico-hipofisário. Pela ligação a receptores de membrana específicos, o GnRH desencadeia, na adenohipófise, primeiro a liberação e a seguir a biossíntese das gonadotrofinas, isto é o FSH, hormônio folículo estimulante, e o LH, hormônio luteinizante (Swenson, 1988).

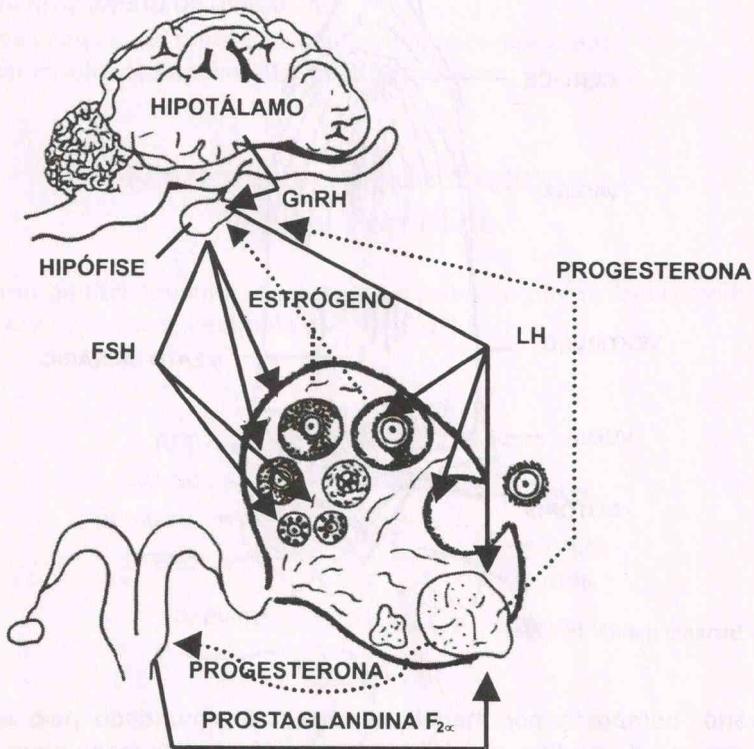


Fig. 3. Morfofisiologia do sistema neuro-hipotalâmico-hipofisário-uterino na cabra.

Fonte: Adaptado de Hafez (1988).

O crescimento folicular ocorre em ondas, conforme descrito por Ginther & Kot (1994). Envolve uma população de folículos em estágio de desenvolvimento semelhante, culminando o processo de maturação folicular com a ovulação. Sob a ação dos estrógenos, ocorre a formação de receptores para LH nas células da granulosa, sendo o LH a gonadotrofina responsável pela ovulação e manutenção do corpo lúteo nos pequenos ruminantes domésticos (Swenson, 1988).

Os estrógenos sintetizados pelo folículo em crescimento atuam sobre o sistema hipotálamo-hipofisário de duas maneiras: bloqueando a liberação de FSH da adenohipófise, pelo mecanismo de *feed back*, e induzindo a liberação do pico pré-ovulatório de LH. Simultaneamente às variações hormonais, ocorrem mudanças na bioquímica e morfologia do folículo maduro, mediante a luteinização das células da granulosa, que dão início à síntese de progesterona. Em adição, se inicia a síntese intra-folicular de prostaglandinas, dá-se o aumento do índice de mitose das células da granulosa, o aumento da permeabilidade da barreira hemato-folicular, com o conseqüente aumento da pressão intra-folicular e conclusão da primeira meiose do ovócito (Swenson, 1988).

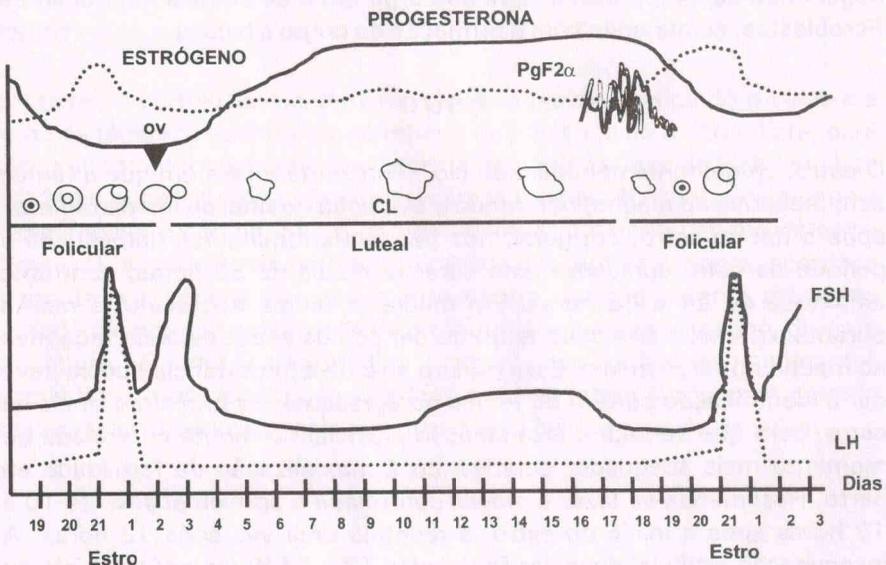


Fig. 4. Morfofisiologia do sistema reprodutivo feminino.

Fonte: Adaptado de Baril et al. (1993).

Na fase final da maturação folicular, na região onde se dará a rutura, tem início o adelgaçamento da parede do folículo, a qual fica fina e transparente. Essas alterações são fruto da ação de enzimas proteolíticas, as quais levam à picnose das células da granulosa. Ao processo de rutura da parede folicular estão associados, ainda, outros mecanismos desencadeados pela ação do LH, tais como: o aumento da pressão e do afluxo sangüíneo e, pela ação das prostaglandinas, a contração das células da theca interna. Após a ovulação, a parede do folículo se contrai e as células da granulosa proliferam e se transformam em células luteínicas. Ocorre, ainda, a difusão de capilares e de células da theca externa, levando à formação de trabéculas.

As células luteínicas, estimuladas pelo LH, são responsáveis pela síntese de progesterona. O final da fase luteínica é determinado pela síntese e liberação de prostaglandina de origem uterina, que é transportada até o ovário via anastomose ou pela difusão entre a veia uterina e a artéria ovariana (Swenson, 1988).

Após a luteólise, a produção de progesterona cessa e as células luteínicas degeneram-se. A regressão total do corpo lúteo se dá pela infiltração de fibroblastos, culminando com a formação do corpo albicans.

Estro

O estro, comumente denominado cio, representa a fase em que a fêmea está receptiva ao macho, ocorrendo a ovulação no final ou imediatamente após o fim do estro. Em geral, nos pequenos ruminantes domésticos o período de estro apresenta uma duração média de 36 horas, com uma amplitude de 24 a 48 horas. Em média, a fêmea não aceita a monta durante o primeiro e terceiro terço do período de estro, estando receptiva ao macho no terço médio. Esse quadro suscita a importância que se deve dar à identificação correta da fêmea ao apresentar os primeiros sinais de estro, para que se faça a inseminação artificial ou monta controlada no momento mais adequado, objetivando a maximização da fertilidade ao parto. Recomenda-se fazer a monta controlada a aproximadamente 10 a 12 horas após o início do estro, e repeti-la uma vez após 12 horas. A inseminação artificial deve ser feita entre 12 e 24 horas após o início do estro.

A observação do rebanho, visando a identificação das fêmeas em início de estro, deve ser feita por pessoa com experiência em manejo reprodutivo e por observação direta dos animais, duas a três vezes por dia, e preferencialmente com o auxílio de rufião. Este pode ser um macho adulto, o qual foi submetido a deferentectomia ou desvio do pênis, ou uma fêmea ovariectomizada e estrategicamente androgenizada.

Comportamento sexual da fêmea em estro

A fêmea caprina em estro apresenta inquietação; urina e berra com frequência; diminui a ingestão de alimentos; agita a cauda com movimentos rápidos e no sentido horizontal; procura se aproximar do macho; apresenta a vulva edemaciada, isto é, levemente inchada e avermelhada. A vagina mostra-se úmida, com presença de muco de aspecto cristalino, semelhante a clara de ovo, no início do estro; creme claro, durante o terço médio e brancacento - viscoso, semelhante a requeijão, no terço final do estro.

Comportamento sexual do macho frente a uma fêmea em estro

Em geral, o cortejo sexual tem início com o macho cheirando a vulva e a urina da fêmea, a qual flui como reflexo da presença do macho. Este, para sentir os feromônios presentes na urina, realiza o reflexo de Flehmen, isto é, o lábio superior é erguido em direção às narinas. Na tentativa de que a fêmea aceite a cópula, não é raro se observar o macho caprino bater na fêmea. Quando a fêmea permanece parada e receptiva à monta, acontece a monta e a cópula que geralmente ocorre durante o terço médio do período de estro. O movimento de arranque efetuado pelo macho, durante a cópula, é uma característica comum aos pequenos ruminantes domésticos. Após a cobrição é comum a fêmea retrair o posterior, quando às vezes, se observa parte do líquido seminal fluindo através da vulva.

Ciclo Estral

O ciclo estral é o período compreendido entre dois estros, que na cabra tem uma duração média de 21 dias, podendo variar de 17 a 24 dias. Caprinos explorados em regiões de clima tropical apresentam ciclo estrais continuamente ao longo do ano. Em geral este comportamento somente é interrompido por ocasião da prenhez; em consequência de subnutrição; de doença, em especial, a de caráter crônico debilitante, e na presença de uma hidrometra ou mucometra.

Implantação de um Programa de Transferência de Embriões

A transferência de embriões (TE), técnica de manejo da reprodução ainda em fase de consolidação no Brasil, tem como principal objetivo a maximização reprodutiva da fêmea, explorando assim seu potencial biológico ao maximizar suas possibilidades naturais, e contribuindo para a disseminação de animais geneticamente superiores.

A técnica baseia-se na indução ou sincronização do estro e na superovulação das doadoras, seguida da fecundação após cobertura ou inseminação artificial e da colheita dos embriões através da lavagem uterina, preferencialmente entre o sexto e o oitavo dia após o início do estro. Os embriões colhidos são avaliados. Aqueles viáveis são inovulados, a fresco ou após congelamento/descongelamento, em receptoras sincrônicas. Os embriões criopreservados podem ser estocados por longo período. Desta forma, a TE, associada à criopreservação, possibilita a comercialização de material genético dentro e entre países, a introdução de novos genótipos em rebanhos por um preço mais acessível e a formação de bancos de germoplasma de raças nativas ou naturalizadas brasileiras e ameaçadas de extinção.

A TE também representa garantia sanitária, isto é, é uma biotécnica eficaz contra a introdução ou transmissão de agentes infecciosos, bacterianos e virais, o que depende da presença e integridade da zona pelúcida. Esta isola o embrião dos agentes infecciosos presentes no ambiente uterino (Shisong & Wrathall, 1989). Contudo, patógenos podem ser transmitidos se estes se encontrarem no interior do embrião, sobre o embrião ou ainda

presentes no meio que mantém o embrião durante a inovulação (Singh, 1987). Por isso é importante adquirir embriões em centrais idôneas, minimizando os riscos com a introdução e/ou disseminação de doenças nos rebanhos.

O reduzido potencial de transmissão de doenças no processo de transferência de embriões são inerentes às técnicas utilizadas na colheita e no processamento do embrião. Dentre eles, a lavagem do útero com um substancial volume de meio leva à diluição dos patógenos que porventura estejam presentes no útero (Singh, 1987). Também, a remoção do embrião do meio usado na colheita para o meio de transferência, após lavagem sucessiva do embrião, combinada ou não a tratamento enzimático, pode evitar a transmissão de infecções (Singh et al., 1982; Bowen et al., 1983; Thomas et al., 1983). Singh (1987) e Shisong & Wrathall (1989) citam que ocorre a inativação de certos patógenos após a congelamento dos embriões. Em consonância com esses resultados, a transferência de embriões surgiu como uma nova alternativa de controle de doenças, o que foi demonstrado após lavagens sucessivas dos embriões oriundos de fêmeas soropositivas e inovulados em fêmeas soronegativas, evitando-se a transmissão de enfermidades como a língua azul em bovinos (Thomas et al., 1983; Bowen et al., 1983), caprinos (Chemineau et al., 1986) e ovinos (Singh et al., 1997); a scrapie em ovinos (Foote et al., 1993); a leucose viral bovina (Digiacoimo et al., 1990) e a diarreia bovina a vírus (Brock et al., 1997).

Por ser a transferência de embriões uma técnica avançada de manejo reprodutivo, sua implantação deve ser atrelada a um excelente nível de organização e gestão da unidade produtiva. Alguns pontos relevantes para implantação da TE serão discutidos a seguir.

Seleção de fêmeas doadoras e receptoras de embriões

Deve-se selecionar criteriosamente as fêmeas receptoras e doadoras de embriões, levando-se em consideração os critérios enfatizados no item referente a seleção de matrizes. Em adição, deve-se observar o estado sanitário, clínico geral e ginecológico dessas fêmeas, as quais devem ser comprovadamente férteis e apresentarem equilíbrio nutricional. A não observação destes parâmetros pode contribuir para a baixa taxa de

ovulação, o que representará perda econômica para o pecuarista. Vale salientar, também, a importância de se utilizar como doadoras fêmeas geneticamente melhoradoras, para que seu potencial genético possa ser multiplicado em um curto espaço de tempo.

Preparo de doadoras

A estimulação adequada dos ovários é fundamental para a resposta dessas gônadas e para a qualidade das estruturas obtidas, repercutindo diretamente sobre a exequibilidade de um programa de TE, independentemente do uso de embriões frescos ou criopreservados. É a partir do uso de hormônios gonadotróficos exógenos que se possibilita a obtenção de um maior número de folículos ovarianos em desenvolvimento, levando a múltiplas ovulações (Moor et al., 1984). Contudo, a resposta superovulatória está sujeita a grandes variações, as quais podem decorrer de fatores intrínsecos, como raça, idade, variação individual e estágio da lactação, e fatores extrínsecos como nutrição, saúde, época do ano e a gonadotrofina usada (Armstrong & Evans, 1983).

Método de superovulação

O estro é sincronizado utilizando-se esponjas intravaginais impregnadas com 50 mg de acetato de medroxiprogesterona, por 11 dias, iniciando-se o tratamento superovulatório 48 horas antes do final do tratamento com progestágeno. Pode-se utilizar como hormônio folículo estimulante 200 mg de NIH-FSH-P1 de Foltropin-V (Vetrepharm, Ontario, Canadá), ou 37,5 unidades de NIH-FSH-S1 de Super-ov (Ausa, Montreal, Canadá), ou 250 a 500 UI de Pluset (Serono, Barueri, São Paulo ou outors). Com qualquer um desses hormônios de origem suína, a dose total deve ser fracionada em seis aplicações decrescentes, intervaladas em 12 horas. Ao mesmo tempo da primeira aplicação do FSH, administra-se, por via IM, 50 µg de cloprostenol. Setenta e duas horas após a retirada da esponja inicia-se o tratamento antiluteolítico com flunixin meglumine, na dose de 1,1 mg/kg, diário, durante três dias (anexo 2).

Preparo de receptoras

O controle do estro e da ovulação são instrumentos fundamentais para a implementação de um programa de TE, quer para embriões frescos quer criopreservados. Apesar de ser possível usar as receptoras após o estro natural, é preferível se trabalhar com doadoras e receptoras submetidas à sincronização do estro e da ovulação.

Na cabra, o tratamento progestativo deve ter uma duração de nove a onze dias, associado ao uso do cloprostenol. A resposta à sincronização do estro e da ovulação varia com vários fatores, dentre eles enumeram-se: o estágio fisiológico da fêmea, cabras x fêmeas púberes x pré-púberes; o estado de nutrição e saúde dos animais, enfatizando-se aqui a importância da condição corporal; o período transcorrido entre o parto e a sincronização; o horário de remoção do progestágeno; e a droga usada. Nesse caso, ressalte-se que o acetato de fluorogestona (FGA) - 45 mg e o acetato de medroxiprogesterona (MAP) - 50 mg a 60 mg, pela via vaginal, e o norgestomet 1,5 mg, por implante subcutâneo, oferecem resultados similares. Em adição, a gonatotrofina coriônica equina (eCG), na dose de 200 UI, favorece positivamente a sincronia dos estros e a taxa de ovulação das receptoras.

Método de sincronização do estro e da ovulação

Na sincronização do estro utilizam-se esponjas intravaginais impregnadas com 50 mg de acetato de medroxiprogesterona, por 11 dias, com aplicação de 200 UI de eCG no nono dia após a colocação da esponja, juntamente com a aplicação de 50 µg de cloprostenol, por via intramuscular (IM). Observa-se o início e a duração do estro através do uso de rufiões a partir de 24 horas da retirada das esponjas.

Cobertura / Inseminação Artificial

A partir de 12 horas da retirada das esponjas, até o final do estro, as fêmeas são observadas quanto à manifestação de estro duas vezes ao dia, no início da manhã e no final da tarde. A fêmea doadora, uma vez em estro, deve ser coberta e a cobertura repetida uma vez a cada 12 horas, até a não mais aceitação da monta. Um macho adulto, com fertilidade comprovada

e em bom estado de nutrição e saúde, deve realizar de quatro a seis coberturas por dia. No caso do uso da inseminação artificial poderá ser feita 12 a 18 horas após o registro da fêmea em estro, e repetida uma a duas vezes, com intervalos de 12 horas.

Colheita

A colheita dos embriões deve ser feita entre o sexto e o oitavo dia do ciclo estral (dia do estro = dia zero), devido à possibilidade de se obter embriões em estágio de mórula e blastocisto (Fig. 5), e estes poderem ser transferidos a fresco ou após criopreservação. Entretanto, quando os embriões se destinam exclusivamente à criopreservação, as colheitas devem ser feitas, preferencialmente, entre o sexto e o sétimo dia, tendo em vista ocorrer, a partir do oitavo dia, uma elevada incidência de blastocistos eclodidos, o que é indesejável do ponto de vista sanitário e de intercâmbio de germoplasma (Andrioli-Pinheiro et al. 1996).

Estádios de desenvolvimento embrionário	Dias após a ovulação
Uma célula	0-1
Duas células	0-1
Quatro células	1-2
Oito células	2-3
Mórula inicial	2-4
Mórula compacta	4-6
Blastocisto inicial	5-7
Blastocisto	6-7
Blastocisto expandido	7-8
Blastocisto eclodido	7-9

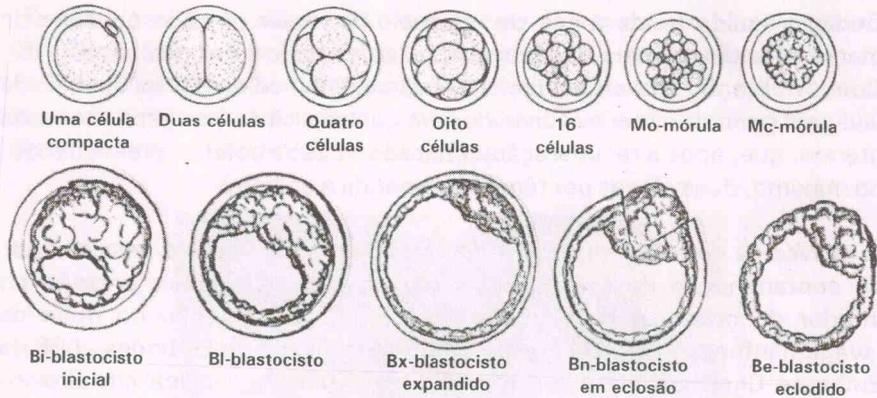


Fig. 5. Estádios de desenvolvimento embrionário.
Fonte: Adaptado de De Bem et al. (1993).

Colheita por via transcervical em circuito fechado

Aproximadamente 24 horas antes do início da colheita, administra-se, por via intramuscular, 50 µg de cloprostenol. A colheita é feita com o animal em estação, contido em tronco próprio, sem qualquer tipo de analgesia ou anestesia, e após realizada tricotomia na cauda e higiene da região perineal.

Com o auxílio de um espéculo vaginal localiza-se a entrada da cérvix, e com uma pinça de Allis faz-se a tração da cérvix em direção à vulva. Uma vez fixada a cérvix, introduz-se uma sonda oro-nasal em direção ao lúmen do corno uterino.

Após ultrapassar a cérvix com a sonda oro-nasal, direciona-se esta para um dos cornos. Conecta-se o equipo e a este o filtro de colheita e a seringa com o meio de lavagem, ou seja, uma solução de phosphate buffered saline (PBS) acrescida de 1,0% de soro fetal bovino (SFB), (anexo 3). Injeta-se o meio até sentir resistência. A seguir fecha-se esta via e abre-se a de comunicação com o filtro.



Fig. 6. Colheita transcervical em circuito fechado.

Como o líquido tende a sair de um meio de maior pressão para um de menor pressão, o meio de lavagem flui através do filtro coletor (Fig. 6). Com a utilização do sistema fechado usa-se, em média, 100 ml de meio de lavagem por corno uterino, divididos em quatro a cinco lavagens por corno uterino, que, após a recuperação, é filtrado no tubo coletor, preenchendo, no máximo, duas placas por fêmea submetida à colheita.

A técnica de colheita em circuito fechado, afora minimizar a possibilidade de contaminação do material colhido, propicia uma maior pressão no interior do corno uterino, o que favorece a recuperação do meio de lavagem infundido. No Laboratório de Biotecnologia de Embriões - LBE da Embrapa Caprinos tem sido obtido, com o uso da técnica em circuito fechado, uma taxa de recuperação do líquido infundido de 95,17%, e uma média de 7,83 estruturas recuperadas por doadora. Estas médias são similares às obtidas após colheita cirúrgica, pela mesma equipe e no mesmo Laboratório.

Lavagem e avaliação das estruturas recuperadas

Sob estereomicroscópio os embriões recuperados são lavados de 12 a 13 vezes, conforme recomendação da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS) (Stringfellow & Seidel, 1999). A lavagem consiste na passagem dos embriões por cinco gotas de PBS, acrescido de 50µg/ml de gentamicina e de 0,4% de albumina sérica bovina (BSA) e, depois, a dois banhos de tripsina a 0,25%, em uma solução balanceada de Hanks, sem cálcio e magnésio, com pH de 7,6 a 7,8, por 60 a 90 segundos (Fig.7). Após o tratamento com tripsina os embriões são passados por cinco banhos em PBS contendo 2,0% de SFB, e, finalmente, em uma solução de PBS-BSA a 0,4% com antibiótico. O processo possibilita a remoção de microorganismos presentes no meio de colheita ou aderidos ao embrião.

Após as lavagens os embriões são avaliados e selecionados para congelamento ou transferência a fresco, segundo a classificação preconizada pela IETS (Stringfellow & Seidel, 1999). Os embriões de grau I - excelente; II - bom e III - regular, são considerados viáveis para transferência a fresco. Para congelamento, apenas os de graus I e II devem ser usados. Esta avaliação é baseada em padrões morfológicos que julgam

a forma, o tamanho, a coloração, a homogeneidade do citoplasma, a forma e a integridade da membrana pelúcida, o tamanho e a presença de células no espaço perivitelíneo (EPV) e a presença de vesículas. Por ser subjetiva, somente a prática adquirida mediante o manuseio é que dará ao técnico o discernimento da qualidade dos embriões.

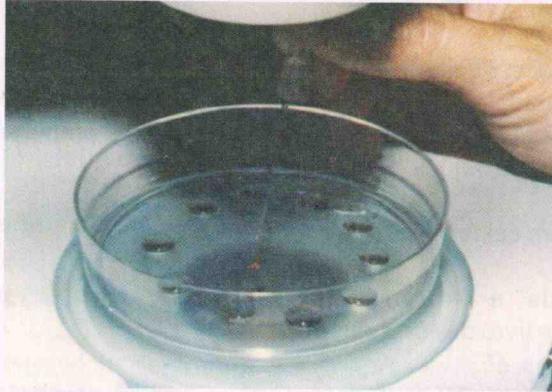


Foto: Hévila O. Salles

Fig. 7. Técnica de lavagem de embriões.

A classificação dos embriões, proposta pela IETS, segundo o estágio do desenvolvimento, é dividida em sete categorias (Fig.5):

- Mórula - Mo

Apresenta-se como uma massa de células com separação nítida entre os blastômeros, ocupando a quase totalidade do espaço EPV.

- Mórula compacta - Mc

Os blastômeros estão agregados entre si, formando uma massa compacta (compactação) e ocupam 60% a 70% do EPV.

- Blastocisto inicial - Bi

Início da blastocele e da diferenciação entre trofoblasto e botão embrionário. O embrião ocupa 70% a 80% do EPV.

- Blastocisto - B1

No blastocisto existe uma evidente diferenciação entre as células do trofoblasto e do botão embrionário. As células deste estão compactadas, a blastocele é predominante e o embrião ocupa a totalidade do EPV.

- Blastocisto expandido - Bx

Nesta fase de desenvolvimento o embrião aumenta 1,2 a 1,5 vezes o seu diâmetro, enquanto a zona pelúcida diminui em 1/3 sua largura. Também é evidente a pressão do líquido da blastocele, a qual empurra o tofoblasto contra a membrana pelúcida.

- Blastocisto em eclosão - Bn

Ainda é nítida a presença da blastocele, mas o embrião está completamente livre da zona pelúcida.

Considerando os parâmetros descritos e o padrão de qualidade adotado pela IETS, os embriões são identificados e classificados em seis categorias:

- Embrião grau I - excelente

É esférico, os blastômeros apresentam forma bem definida, cor e textura uniforme e nenhuma extrusão celular.

- Embrião grau II - bom

É aquele com imperfeições sem importância, com pouca extrusão celular. Ocasionalmente há pequena distinção na forma e na cor dos blastômeros e/ou presença de poucas vesículas.

- Embrião grau III - regular

Apresenta alguns blastômeros com forma e cor heterogênea, porém coesos. Presença de células no EPV e a blastocele com algumas vesículas.

- Embrião grau IV - pobre

Com forma e cor heterogênea entre vários blastômeros, diferenciação celular confusa, extrusão evidente com degeneração e grande número de vesículas.

- Embrião degenerado - Dg

Não apresenta uma forma definida, sendo impossível determinar o estágio de desenvolvimento; é evidente a desorganização celular.

- Não fecundado - Nf (ovócito)

Sem nenhum contorno celular, somente pigmentado.

Criopreservação

Associar a transferência de embriões à criopreservação oportuniza aos produtores e técnicos a possibilidade de vencer as barreiras do tempo e do espaço, possibilitando que a técnica adquira grande importância zootécnica e econômica.

Com a implementação da criopreservação de embriões, favorece-se:

- A importação e a exportação de germoplasma, dispensando-se o transporte de animais e os períodos de quarentena, o que significa redução nos custos do processo de aquisição de animais.
- A transferência de embriões para fêmeas em estro natural, sem a necessidade de sincronização artificial do estro e da ovulação da receptora.
- A preservação de embriões colhidos excedentes ao número de receptoras sincrônicas.
- A adequação da época de partos, independentemente da data da colheita dos embriões.
- A formação de bancos de germoplasma, objetivando a preservação de espécies e/ou raça em perigo de extinção.

- A comercialização, o transporte e a disseminação de material genético entre produtores, regiões e países, com o mínimo de risco de introdução e/ou disseminação de doenças.

Entre as metodologias utilizadas para a congelação de embriões, predomina o processo lento conhecido como método clássico (Baril, et al., 1989; Le Gal, et al., 1993), onde são necessárias de uma a duas horas para diminuir, gradativamente, da temperatura ambiente até -35°C , quando são submetidos ao nitrogênio líquido a -196°C e estocados.

Embriões nos estádios mais avançados de desenvolvimento, isto é, blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido, suportam melhor a congelação/descongelação, bem como a bissecção em relação aos embriões jovens no estágio de mórula e mórula compacta (Chemineau et al., 1986; Rao et al., 1988; Li et al., 1990; Pegoraro-Rumpf, 1992; Fiéni et al., 1995; Nowshari & Holtz, 1995).

O mecanismo de criopreservação não está totalmente elucidado, mas se sabe que é impossível a criopreservação sem a presença de substâncias crioprotetores, capazes de viabilizar a sobrevivência celular após a congelação. Essas substâncias baixam o ponto de fusão da solução. Os autores citam que os crioprotetores interagem com a membrana celular, propiciando uma estabilidade que irá evitar o rompimento da membrana durante a congelação (Massip et al., 1987; Seidel, 1986). Durante a criopreservação existe a necessidade de remover o máximo de água das células antes da congelação intra-celular (Seidel, 1986), sendo esta uma função básica dos crioprotetores (Friedler et al., 1988; Leibo, 1986). Deve-se estar atento aos princípios osmóticos das membranas celulares, que são semi-permeáveis (Seidel, 1986).

De acordo com a permeabilidade à membrana celular, os crioprotetores são classificados em: intracelulares - glicerol, dimetilsulfóxido, 1,2-propanediol, etilenoglicol e outros álcoois; e extracelulares - sucrose, glucose e outros açúcares.

Grande avanço na criopreservação foi alcançado com a demonstração feita por Le Gal et al. (1993) e Fiéni et al. (1995), segundo os quais etilenoglicol é superior aos demais crioprotetores intracelulares para conservação da viabilidade do embrião após a congelação/descongelação. Em adição, a remoção do crioprotetor e a reidratação do embrião após a

descongelação têm sido facilitadas pela adição de sacarose, variando de 1,00M a 0,25M à solução de remoção do crioprotetor e, também, pela redução no número de passagem do embrião, de três para uma vez, na solução para remoção do crioprotetor e reidratação (Pendleton et al., 1986; Rao et al., 1988; Le Gal et al., 1993; Fiéni et al., 1995).

Método clássico de criopreservação

A criopreservação deve ser iniciada até duas horas após a colheita. Após a lavagem e classificação, os embriões são distribuídos em gotas e posteriormente colocados na palheta. A quantidade de embriões por palheta fica a critério do técnico, e depende da rotina do mesmo quanto à inovulação, ou seja, se um ou dois embriões serão inovulados por fêmea, se as transferências ocorrerão após o estro sincronizado ou natural etc. Este último ponto é levantado porque em estro natural um menor número de fêmeas será inovulado por dia, sendo coerente criopreservar, também, um menor número de embriões por palheta.

Desidratação dos embriões e congelação

Esta fase é realizada em três etapas através de banhos em soluções com concentrações crescentes de crioprotetor. Utilizando o etilenoglicol, as concentrações recomendadas são: 0,5M; 1,0M e 1,5M (anexo 4). Cada banho deve durar sete minutos. Aconselha-se fazer três gotas para cada concentração. Durante os sete minutos da última concentração de etilenoglicol - 1,5M os embriões devem ser envasados.

É importante identificar as palhetas antes de se iniciar a desidratação. Na palheta deve constar data da congelação, raça e número da doadora e do reprodutor, número de embriões, estágio de desenvolvimento e classificação dos embriões. Após o envase as palhetas são lacradas, utilizando-se uma pinça previamente aquecida. Simultaneamente à desidratação é realizado o preparo do isocriogen (anexo 5), ou de outro equipamento para se fazer a congelação.

A metodologia para uso do isocriogen, consiste em:

Adaptar o sensor do termômetro digital com fita crepe a uma palheta contendo o meio de congelação final - etilenoglicol a 1,5M e colocá-lo no

cilindro. A extremidade do sensor deve ficar na coluna correspondente àquela que contém o(s) embrião (es) nas palhetas a serem congeladas. Este conjunto constitui a palheta controle.

Colocar 6 cm de nitrogênio líquido no isocriogen. A garrafa térmica no interior do equipamento tem capacidade para 1,6 L.

Colocar as palhetas contendo os embriões no cilindro, com a extremidade que contém o lacre do fabricante para baixo. Anotar a temperatura inicial e, em seguida, introduzir o cilindro no isocriogen, posicionando-o rente ao nível do nitrogênio, sem tocá-lo. Controlar a altura do cilindro em relação ao nível do nitrogênio, de forma a propiciar uma queda da temperatura na velocidade de 1,0°C/min. Ao atingir -4,0°C, retira-se o cilindro da garrafa e o posiciona no poço de descanso.

Ao atingir -6,0°C, induzir a cristalização, isto é, o *seeding*, com o toque de uma pinça previamente resfriada em nitrogênio líquido, na extremidade que não contém os embriões da coluna central e na extremidade adjacente (anexo 6). Aguardar quatro a cinco minutos para ocorrer a estabilização.

Após verificada a cristalização, recolocar o cilindro na garrafa a 2-3cm acima do nível do nitrogênio. É bom verificar o nível do nitrogênio na garrafa antes de recolocar o cilindro. A velocidade de congelação passa a ser de 0,4°C/min. Caso a velocidade de congelação esteja a 0,3°C/min ou menos, descer o cilindro para mais próximo do nitrogênio líquido. Por outro lado, se a velocidade estiver rápida (por exemplo 0,6°C/min), deve-se elevar o cilindro. Esta curva de congelação é acompanhada até se atingir 35,0°C negativos, quando então as palhetas são transferidas diretamente para o nitrogênio e, em seguida, armazenadas em botijão criobiológico.

Descongelação e reidratação dos embriões

A descongelação é feita mergulhando-se as palhetas diretamente em água a 37,0°C por 20 segundos, logo após retirada do botijão criobiológico. Em seguida, os embriões são retirados da palheta e transferidos para banhos contendo as seguintes concentrações decrescentes de etilenoglicol: 1,0M; 0,5M; 0,3M e 0,0M, permanecendo cinco minutos em cada banho. Os três primeiros banhos contêm 0,25M de sacarose (anexo 7). Após o último banho, os embriões devem ser transferidos para fêmeas receptoras sincrônicas com a idade do embrião.

Inovulação por semi-laparoscopia

A técnica por laparoscopia ganhou espaço em relação à laparotomia, permitindo a transferência dos embriões para a junção útero-tubárica e minimizando a possível ocorrência de aderências. Estas são comuns quando a transferência é cirúrgica. Salles et al. (1996) descreveram a semi-laparoscopia como técnica alternativa e segura para a inovulação. Ressalte-se, no entanto, que somente a partir do uso da via transcervical para inovulação é que a transferência de embriões, como prática de manejo reprodutivo, ficará mais facilmente ao alcance do produtor.

A técnica de inovulação por semi-laparoscopia consiste na avaliação dos ovários através do endoscópio, objetivando definir a junção útero-tubárica a receber os embriões. Posteriormente, a junção útero-tubárica selecionada é tracionada através da incisão de passagem da pinça de manipulação e os embriões transferidos para esta. A pipeta de inovulação é composta por um tubo capilar acoplado a uma seringa de 1,0 mL. Os embriões ficam em PBS com albumina (0,4%), dentro do tubo capilar, até a inovulação.

Todos os processos necessários para realização do programa de transferência de embriões devem ser acompanhados através de fichas de escrituração (anexos 9 a 21).

Referências Bibliográficas

ANDRIOLI-PINHEIRO, A.; SALLES, H.O.; PINHEIRO, R.R.; MOURA SOBRINHO, P.A.; MORAES, J.B.; MARQUES, M.A.J.; SOARES, A.T. Controle da Artrite Encefalite Caprina a Vírus (CAEV) através da transferência de embriões (TE). In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15., 1996, Campo Grande. **Resumos...** Campo Grande: Associação Panamericana de Ciências Veterinárias, 1996. p. 391.

ARAÚJO, A.M. de; SIMPLÍCIO, A.A.; ELOY, A.M.X. Desempenho produtivo de cabras leiteiras Anglo-nubiana, Pardo Alpina e Saanen no semi-árido nordestino. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 2, n.1, p. 29-34, 1999.

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

BARIL, G.; CASAMITJANA, P.; PERRIN, J.; VALLET, J.C. Embryo production, freezing and transfer in Angora, Alpine and Saanen goats. **Zuchthygenie**, Hamburg, v.24, p.101-115, 1989.

BARIL, G.; BREBION, P.; CHESNÉ, P. **Manuel de formation pratique pour la transplantation embryonnaire chez la brebis et la chèvre**. Rome: FAO, 1993. 183p. (Étude FAO Production et Santé Animales, 115).

BOWEN, R.A.; HOWARD, T.H.; ELSDEN, R.P.; SEIDEL JUNIOR, G.E. Transfer of embryos from cattle infected with bluetongue virus. **Theriogenology**, v.19, n.1, p.115, 1983.

BROCK, K.V.; LAPIN, D.R.; SKRADE, D.R. Embryo transfer from donor cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus. **Theriogenology**, v.47, n. 4, p.837-844, 1997.

CHEMINEAU, P.; PROCUREUR, R.; COGNIÉ, Y.; LEFÈVRE, P.C.; LOCATELLI, A.; CHUPIN, D. Production, freezing and transfer of embryos from a bluetongue-infected goat herd without bluetongue transmission. **Theriogenology**, v.26, n.3, p.279-289, 1986.

CHAWLA, D.S.; BHATNAGAR, D.S. Reproductive performance of Alpine and Saanen does under intensive management. **Indian Journal of Animal Science**, v.54, n.8, p.789-792, 1984.

DE BEM, A.R.; RUMPF, R.; SOUSA, R.V. de; ROSAS, C. de A.; PEIXER, M.A.S.; EGITO, A.A. do; LIMA, V.F.M.H. de; PEGORARO-RUMPF, L.M.; FARINASSO, A. Manual sobre transferência e microanipulação de embriões nas espécies bovina e equina. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1993. 123p.

DIGIACOMO, R.F.; MCGINNIS, L.K.; STUDER, E.; EVERMANN, J.F. Failure of embryo transfer to transmit BLV in a dairy herd. **Veterinary Record**, v.127, n.18, p.496, 1990.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Caprinos. (Sobral, CE). **Descarte orientado de caprinos e ovinos tropicais**. Sobral, 1995. Folder.

FIÉNI, F.; BECKERS, J.P.; BUGGIN, M.; BRUYAS, J.F.; PERRIN, J.; DAUBIÉ, M.; TAINTURIER, D. Evaluation of cryopreservation techniques for goats embryos. **Reproduction Nutrition and Development**, v.35, n.4, p.367-373, 1995.

FOOTE, W.C.; CLARK, W.; MACIULIS, A.; CALL, J.W.; HOURRIGAN, J.; EVANS, R.C.; MARSHALL, M.R.; CAMP, M. de. Prevention of scrapie transmission in sheep, using embryo transfer. **Animal Journal of Veterinary Research**, v. 54, n. 11, p.1863-1868, 1993.

FRIEDLER, S.; GINDICE, L.C.; LAMB, E.J. Cryopreservation of embryos and ova. **Fertility and Sterility**, v. 49, n. 5, p. 743-764, 1988.

GILL, G.S.; DEV, D.S. Performance of two exotic breeds of goat under Indian conditions. **Indian Journal of Animal Production**, v. 3, n.4, p. 173-178, 1972.

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

GONZALEZ-STAGNARO, C. Control y manejo de los factores que afectan al comportamiento reproductivo de los pequeños rumiantes en el medio tropical. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON NUCLEAR AND RELATED TECHNIQUES IN ANIMAL PRODUCTION AND HEALTH, 1991., Viena. **Proceedings...** Viena: IAEA, 1991. p.405-421.

GONZALEZ STAGNARO, C.; GARCIA BETANCOURT, O.; CASTILLO MARTINEZ, J. Actividad sexual estacional y fertilidad en cabras de razas puras de una zona tropical de Venezuela. **Ciências Veterinárias**, v.4, n.4, p.223-248, 1974.

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. 4.ed. São Paulo: Manole, 1988. 720p.

LE GAL, F.; BARIL, G.; VALLET, J.C.; LEBOEUF, B. 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.

LEIBO, S.P. Cryobiology; preservation of mammalian embryo. In: EVANS, J.W.; HOLLANDER, A.(Eds.). **Genetic engineering of animal an agriculture perspective**. New York: Plenum Press, 1986. p.251-272.

LEITE, E.R.; ARAÚJO FILHO, J.A. de; MESQUITA, R.C.M. Forage resources in Northeast Brazil: their value and management. In: SHELTON, M.; FIGUEIREDO, E.A.P. de. **Hair sheep production in tropical and subtropical regions**: with reference to Northeast Brazil and the countries of the Caribbean, Central America and South America. Davis, CA: Embrapa-CNPC / SR-CRSP, 1990. P.59-67.

LI, R.; CAMERON, W.N.; BATT, P.A.; TROUNSON, A.O. Maximal survival of frozen goat embryos is attained at the expanded, hatching and hatched blastocyst stages of development. **Reproduction, Fertility and Development**, v.2, n.4, p.345-350, 1990.

MANNETJE, L.T. Problems of animal production from tropical pastures. In: HACKER, J.B. **Nutritional limits to animal production from pastures**. Farnham Royal: C.A.B.; 1981. p.67-85.

MASSIP, A.; VAN DER ZWALMEN, P.; ECTORS, F. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. **Theriogenology**, v. 27, n. 1, p. 69-79, 1987.

MOOR, R.M.; KRUIP, TH.A.M.; GREEN, D. Intraovarian control of folliculogenesis: limits to superovulation? **Theriogenology**, v.21, n.1, p.103-116, 1984.

MORAND-FEHR, P.; BRANCA, A.; SANTUCCI, P. Méthodes d'estimation de l'état corporel des chèvres reproductrices. In: SYMPOSIUM CEE - FAO, 1987., Vale de Santarém, Portugal. **Recueil des Communications...** Paris: EUR Publications, 1989. P.202-220.

NOWSHARI, M.A.; HOLTZ, W. In vitro culture of goat morulae to blastocysts before freezing. **Theriogenology**, v.44, n.7, p.983-988, 1995.

PEGORARO-RUMPF, L.M.; BEM, A.R. de; RUMPF, R.; PEIXER, M.A.S.; DESCHAMPS, J.C. Comparação de diferentes crioprotetores na congelação de embriões caprinos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE

BRASILEIRA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES, 7., 1992, Jaboticabal, SP. **Anais...** Jaboticabal: Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, 1992. p.95.

PENDLETON, R.J.; YOUNGS, C.R.; RORIE, R.W.; POOL, S.H.; MEMON, M.A.; GODKE, R.A. The use of glycerol and sucrose for frozen goat embryos. **Animal Science Research Report**, v.7, p.113-116, 1986.

RAO, V.H.; SARMAH, B.C.; AGRAWAL, K.P.; ANSARI, M.R.; BHATTACHARYYA, N.K. Survival of goat embryos frozen and thawed rapidly. **Animal Reproduction Science**, v.16, n.3/4, p.261-264, 1988.

RODRIGUES, A. **Características de reprodução, crescimento, mortalidade e produção de leite em caprinos Parda Alemã, Anglo-nubiana e Sem Raça Definida (SRD) nos cariris paraibanos**. Areia, PB: Universidade Federal da Paraíba, 1988. 92p. Tese Mestrado.

SALLES, H.O.; ANDRIOLI-PINHEIRO, A.; SOARES, A.T.; MOURA SOBRINHO, P.A.; MARQUES, M.A.J.; MORAES, J.B. Utilização da semi-laparoscopia na transferência de embriões em caprinos. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.24, supl. p.215, 1996.

SANTIAGO, A.A. Estudos sobre a cabra. Observação sobre o comportamento de caprinos de raças finas importadas comparativamente aos nacionais. **Indústria Animal**, v.8, p.71-83, 1946.

SANTOS, D.O.; SIMPLÍCIO, A.A.; MACHADO, R. **Guia prático do inseminador de caprinos e ovinos**. Sobral: Embrapa Caprinos, 1999. 32p. (Embrapa Caprinos, Documentos, 34).

SEIDEL JÚNIOR., G.E. Principles of cryopreservation of mammalian embryos. In: COURSE "TECHNIQUES FOR FREEZING MAMMALIAN EMBRYO", 1986. Fort Collins: Colorado State University, 1986. p.6-12.

SHISONG, C.; WRATHALL, A.E. The importance of the zona pellucida for disease control in livestock by embryo transfer. **British Veterinary Journal**, v.145, n.2, p.129-140, 1989.

SIMPLÍCIO, A.A. **Curso de caprinocultura: manejo reprodutivo e instalações.** Brasília: Associação Brasileira de Educação Agrícola Superior, 1994. 53p. (ABEAS. Curso de Caprinocultura. Módulo 5. Parte II. Manejo reprodutivo e instalações).

SIMPLÍCIO, A.A.; MACHADO, R.; ALVES, J.U. Manejo reprodutivo de caprinos em regiões tropicais. In: SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA. **Caprinocultura e ovinocultura.** Piracicaba: FEALQ, 1990. p.33-56.

SINGH, E.L. The disease control potential of embryos. **Theriogenology**, v.27, n.1, p.9-20, 1987.

SINGH, E.L.; DULAC, G.C.; HENDERSON, J.M. Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. XV. Failure to transmit bluetongue virus through the transfer of embryos from viremic sheep donors. **Theriogenology**, v.47, n.6, p.1205-1214, 1997.

SINGH, E.L.; THOMAS, F.C.; PAPP-VID, G.; EAGLESTOME, M.D.; HARE, W.C.D. Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. II The *in vitro* exposure of preimplantation bovine embryos to infectious bovine rhinotracheitis virus. **Theriogenology**, v.18, n.2, p.133-140, 1982.

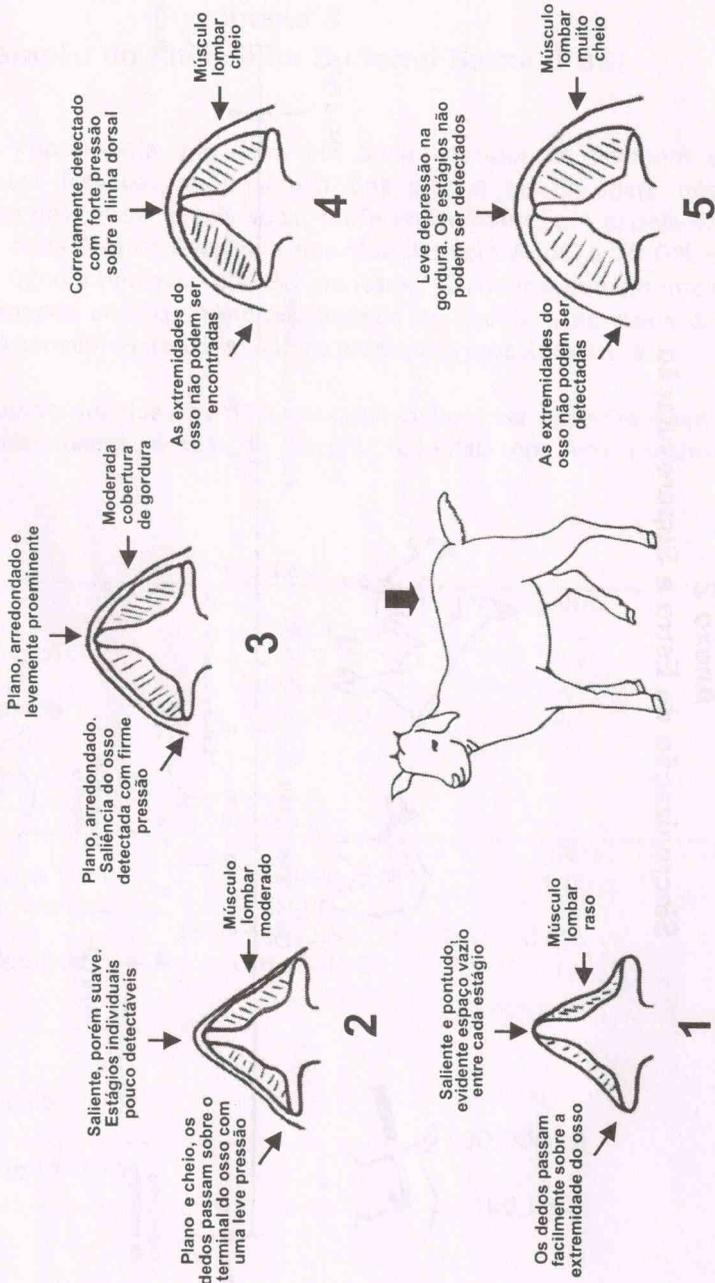
STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões.** 3.ed. Illinois: International Embryo Transfer Society, 1999. 180p.

SWENSON, M.J.S. **Dukes fisiologia dos animais domésticos.** 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1988. 799p.

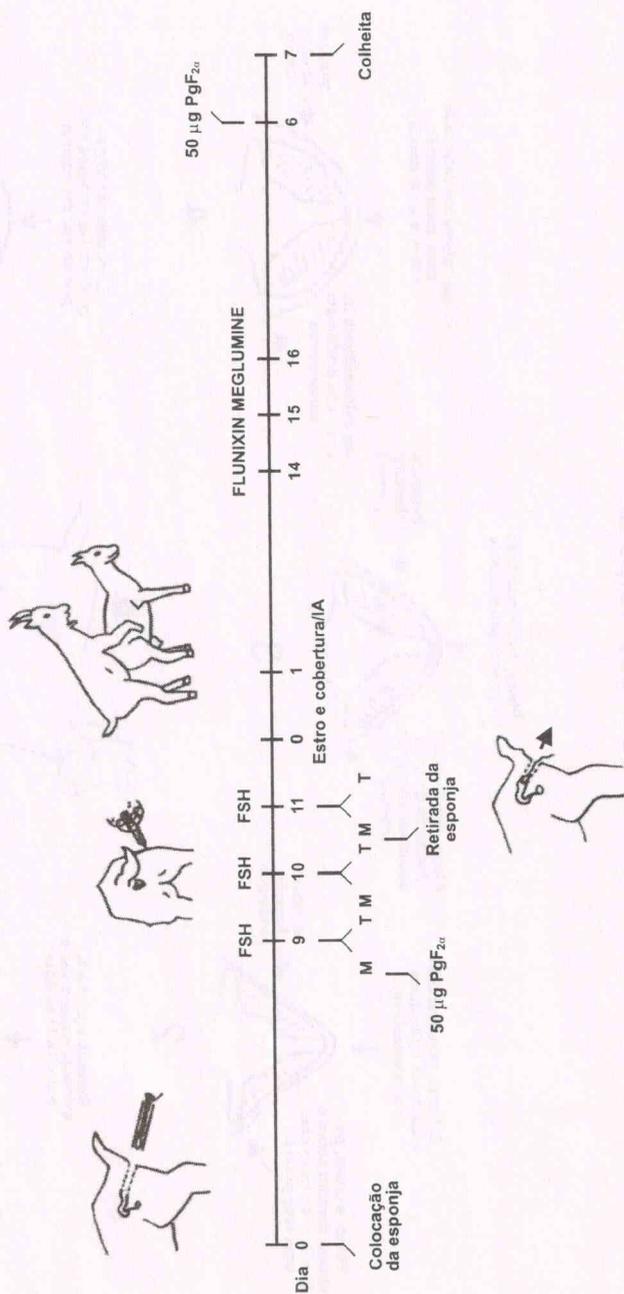
THOMAS, F.C.; SINGH, E.L.; HARE, W.C.D. Embryo transfer as a mean of controlling viral infections. III Non transmission of bluetongue virus from viremic cattle. **Theriogenology**, v.19, n.3, p.425-431, 1983.

ANEXOS

Anexo 1 Condição Corporal



Anexo 2 Sincronização do Estro e Superovulação



Anexo 3

Preparação do Phosphate Buffered Saline (PBS)

Ressalte-se a importância que deve ser dada ao rigor na lavagem e esterilização dos frascos, na pesagem dos sais e na filtragem das soluções. Estas devem ser preparadas, preferencialmente, em capela de fluxo laminar, precedida da limpeza e desinfecção com álcool a 70,0% e submetida à luz ultravioleta, por 30 minutos. Cuidados semelhantes devem ser tomados com os materiais usados na capela e as mãos do manipulador. Aconselha-se a utilização de luvas para procedimentos.

O PBS é composto por duas frações, as quais devem ser pesadas e pré-diluídas separadamente antes de serem reunidas em um mesmo recipiente.

Fração A

		g/litro
Cloreto de Sódio	NaCl	8,0
Cloreto de Potássio	KCl	0,2
Cloreto de Cálcio	CaCl ₂ .2H ₂ O	0,1
Cloreto de Magnésio	MgCl ₂ .6H ₂ O	0,1

Fração B

		g/litro
Fosfato Dibásico de Sódio	Na ₂ HPO ₄	1,15
Potássio Fosfato Monobásico	KH ₂ PO ₄	0,2
Piruvato de Sódio	C ₃ H ₃ O ₃ Na	0,036
Glicose Monohidratada	C ₆ H ₁₂ O ₆ .H ₂ O	1,0

Antibióticos

Penicilina G sódica

.....100.000 UI

Sulfato de estreptomicina

.....50,0mg

A característica padrão para o PBS é:

Osmolaridade..... 280 a 300m Osm
pH 6,8 a 7,2

Em geral, ao PBS usado para a colheita dos embriões adiciona-se 1,0% de Soro Fetal Bovino (SFB).

Anexo 4 Soluções para Congelação dos Embriões

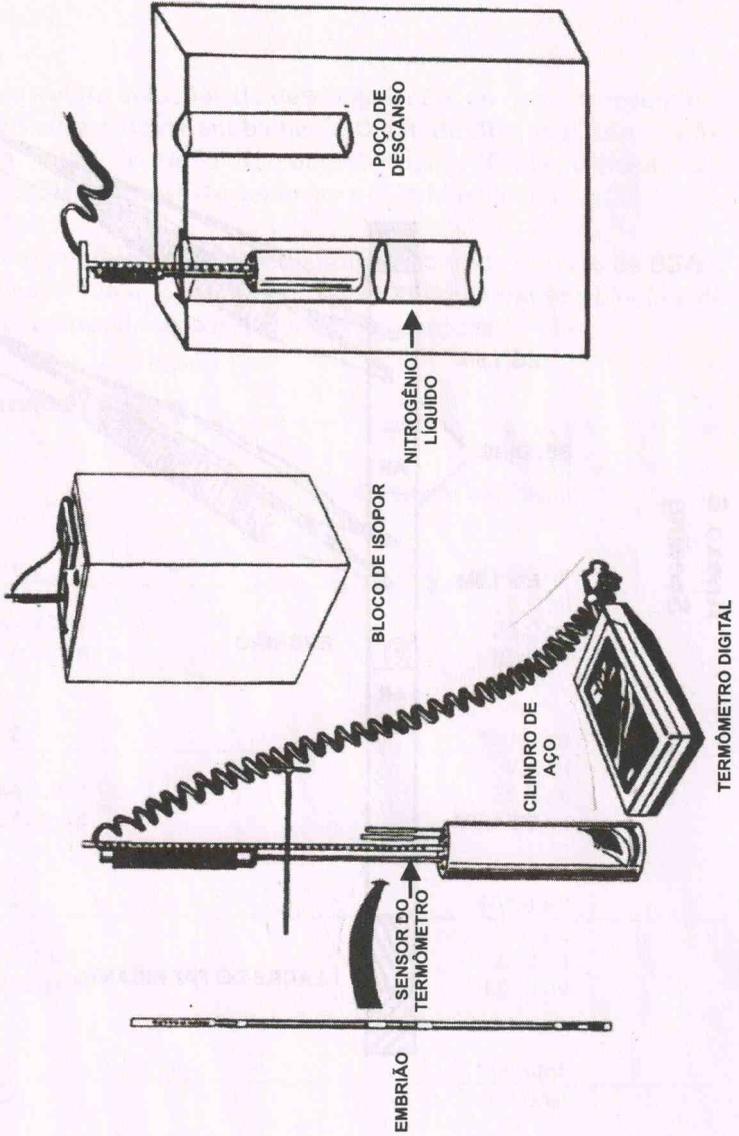
No preparo dessas soluções usa-se a solução de PBS, suplementada com 0,4% de albumina sérica bovina (BSA) e antibiótico.

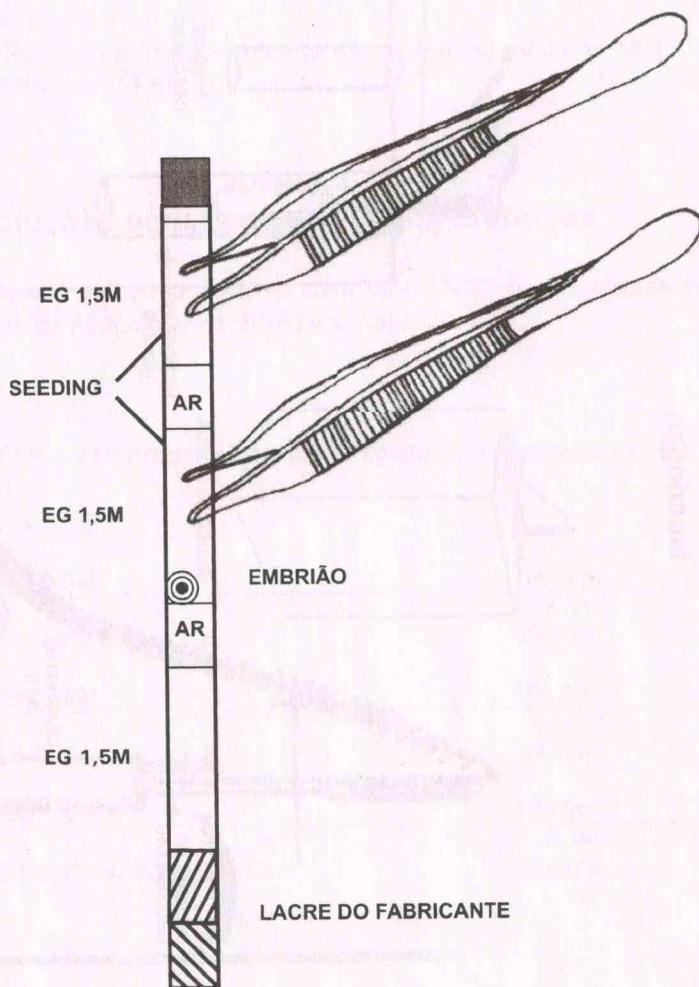
Crioprotetor:

ETILENOGLICOL - são preparadas três soluções de congelação a: 0,5M, 1,0M e 1,5M .

Solução 1 - EG 0,5M	100,0ml
Etilenoglicol	2,8ml
Solução PBS + 0,4% BSA, q.s.p.	100,0ml
Solução 2 - EG 1,0M	100,0ml
Etilenoglicol	5,6ml
Solução PBS + 0,4% BSA, q.s.p.	100,0ml
Solução 3 - EG 1,5M	100,0ml
Etilenoglicol	8,4ml
Solução PBS + 0,4% BSA, q.s.p.	100,0ml

Anexo 5
Isocriogen



**Anexo 6
Seeding**

Anexo 7

Solução de Descongelamento de Embriões

São preparadas quatro soluções de descongelamento, as quais apresentam: solução de PBS acrescida de antibiótico e 0,4% de BSA (solução 1 a 4); etilenoglicol a 1,0M (solução 1), etilenoglicol a 0,5M (solução 2), etilenoglicol a 0,3M (solução 3) e sacarose a 0,25M (solução 1 a 3).

Recomenda-se o preparo inicial de PBS com antibiótico e 0,4% de BSA e da solução de sacarose a 1,0M, para em seguida preparar as soluções de descongelamento, utilizando-as nas seguintes proporções:

Solução de Sacarose a 1 molar

Sacarose	34,23g
BSA	0,4g
PBS	Completar até 100ml

Solução D-EG 1

	100,0 ml
Etilenoglicol	5,6 ml
Sol. de Sacarose 1,0 M	25,0 ml
PBS + 0,4% BSA, q.s.p.	100, 0 ml

Solução D-EG 2

	100,0 ml
Etilenoglicol	2,8 ml
Sol. de Sacarose 1,0 M	25,0 ml
PBS + 0,4% BSA, q.s.p.	100, 0 ml

Solução D-EG 3

	100,0 ml
Etilenoglicol	1,7 ml
Sol. de Sacarose 1,0 M	25,0 ml
PBS + 0,4% BSA, q.s.p.	100, 0 ml

Solução D-EG 4

	100,0ml
PBS + 0,4% BSA	100,0ml

Anexo 8

Materiais Necessários para Transferência de Embriões

1. Solução PBS a 1,0% de SFB.
2. Solução de PBS a 10,0% de SFB.
3. Banho maria.
4. Placas de Petri.
5. Circuito fechado para colheita de embriões.
6. Brete de contenção.
7. Estereomicroscópio.
8. Micropipetas para manipulação e inovulação.
9. Laparoscópio e acessórios.
10. Mesa cirúrgica.
11. Material cirúrgico.

Anexo 11

LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA DE EMBRIÕES

Projeto: _____ Código: _____

Data: ___/___/___

Exame Clínico-Ginecológico

1. Espécie: _____
2. Raça: _____
3. N° de registro: _____
4. D. Nasc./Idade: _____
5. Brinco: _____
6. Pelagem: _____
3. Uso: _____
4. Origem: _____

A. Histórico	
1. Parto (nº, tipo, data do último,)	
2. Aborto	
3. Ciclo estral	
4. Fertilidade e prolificidade	
5. Infecções reprod.	
B. Estado Geral	
1. Sanitário	
2. Nutricional	
3. Comportamento	
C. Pelagem	
1. Aspecto/brilho	
2. Anormalidades	
D. Olhos	
1. Corrimentos	
E. Aparelho respiratório	
1. Corrimento	
2. Ruídos audíveis	
F. Aparelho digestivo	
1. Appetite	
2. Cav. Bucal e dentes	
G. Aparelho locomotor	
1. Membros/cascos	
H. Glândulas mamária	
1. Anormalidades	
I. Aparelho genital	
1. Vulva	
2. Vagina	
3. Cérvix	

EXAMES COMPLEMENTARES:1. Fezes: _____
_____2. Sangue: _____
_____3. Outros: _____
_____**DECISÃO:** selecionar o animal selecionar após tratamento descartar**OBSERVAÇÕES:**

RESPONSÁVEL: _____ **DATA:** ____ / ____ / _________
Nome_____
Assinatura

Anexo 12**LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA DE EMBRIÕES**

Projeto: _____ Código: _____

Data: ___/___/___

Receptoras - Estro Natural

Mês: _____

DIA	IDENTIFICAÇÃO DAS FÊMEAS EM ESTRO
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	
11	
12	
13	
14	
15	
16	
17	
18	
19	
20	
21	
22	
23	
24	
25	
26	
27	
28	
29	
30	
31	

Anexo 17

LABORATÓRIO DE BIOTECNOLOGIA DE EMBRIÕES

Projeto/Propósito: _____ Código: _____

Número do programa de transferência de embriões: _____ Data: ____/____/____

Curva de Congelação

Método de congelação:		Técnico:		Equipamento:		Nº de palhetas		Nº Globet		Nº Canister		Nº Boflão	
Doadora/Reprodutor (Raça)	Nº Total Embriões	Estádio (nº)	Classif (nº) Grau I Grau II	Tempo h:min	Temp (°C)	Temp h:min	Temp (°C)	Temp h:min	Temp (°C)	Temp h:min	Temp (°C)	Temp h:min	Temp (°C)
VAR.	VAR.	VAR.	VAR.	VAR.	VAR.	VAR.	VAR.	VAR.	VAR.	VAR.	VAR.	VAR.	VAR.
0:00	0:22	0:44	1:06	1:28	1:53	2:15							
0:01	0:23	0:45	1:07	1:29	1:54	2:16							
0:02	0:24	0:46	1:08	1:30	1:55	2:17							
0:03	0:25	0:47	1:09	1:31	1:56	2:18							
0:04	0:26	0:48	1:10	1:32	1:57	2:19							
0:05	0:27	0:49	1:11	1:33	1:58	2:20							
0:06	0:28	0:50	1:12	1:34	1:59	2:21							
0:07	0:29	0:51	1:13	1:35	2:00	2:22							
0:08	0:30	0:52	1:14	1:36	2:01	2:23							
0:09	0:31	0:53	1:15	1:37	2:02	2:24							
0:10	0:32	0:54	1:16	1:38	2:03	2:25							
0:11	0:33	0:55	1:17	1:39	2:04	2:26							
0:12	0:34	0:56	1:18	1:40	2:05	2:27							
0:13	0:35	0:57	1:19	1:41	2:06	2:28							
0:14	0:36	0:58	1:20	1:42	2:07	2:29							
0:15	0:37	0:59	1:21	1:43	2:08	2:30							
0:16	0:38	1:00	1:22	1:44	2:09	2:31							
0:17	0:39	1:01	1:23	1:45	2:10	2:32							
0:18	0:40	1:02	1:24	1:46	2:11	2:33							
0:19	0:41	1:03	1:25	1:50	2:12	2:34							
0:20	0:42	1:04	1:26	1:51	2:13	2:35							
0:21	0:43	1:05	1:27	1:52	2:14	2:36							

Embrapa

Caprinos