

CENTRO UNIVERSITÁRIO BRASILEIRO
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

FAUSTO RODRIGUES DE MELO NETO
FRANCISCO TAVARES DE MOURA SOBRINHO
VICTOR HUGO DOS SANTOS PEREGRINO

**PRODUÇÃO *IN VIVO* e *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE
CAPRINOS E OVINOS PARA TRANSFERÊNCIA DE
EMBRIÕES**

RECIFE-PE
JUNHO DE 2023

FAUSTO RODRIGUES DE MELO NETO
FRANCISCO TAVARES DE MOURA SOBRINHO
VICTOR HUGO DOS SANTOS PEREGRINO

**PRODUÇÃO *IN VIVO* e *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE
CAPRINOS E OVINOS PARA TRANSFERÊNCIA DE
EMBRIÕES**

Monografia apresentada ao Centro Universitário Brasileiro – UNIBRA, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária. Professora Orientadora: Dra. Sandra Silva Duarte.

RECIFE-PE
JUNHO DE 2023

Ficha catalográfica elaborada pela
bibliotecária: Dayane Apolinário, CRB4- 2338/ O.

M528p Melo Neto, Fausto Rodrigues de.
Produção in vivo e in vitro de embriões de caprinos e ovinos para
transferência de embriões/ Fausto Rodrigues de Melo Neto; Francisco
Tavares de Moura Sobrinho; Victor Hugo dos Santos Peregrino. - Recife: O
Autor, 2023.
27 p.

Orientador(a): Dra. Sandra Silva Duarte.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Centro Universitário
Brasileiro – UNIBRA. Bacharelado em Medicina Veterinária, 2023.

Inclui Referências.

1. Caprino. 2. Biotecnologia. 3. Embrião. 4. Ovino. 5. Reprodução. I.
Moura Sobrinho, Francisco Tavares de. II. Peregrino, Victor Hugo dos
Santos. III. Centro Universitário Brasileiro. - UNIBRA. IV. Título.

CDU: 619

Dedicamos esse trabalho a nossos pais, irmãos, esposas e filhos, que nos apoiaram durante toda jornada, vivendo nossas privações e suportando nossos lamentos durante os períodos de provas e trabalhos acadêmicos; aos nossos professores e orientadores de estágio, pela dedicação e presteza ao nos transmitir seus conhecimentos; e aos nossos colegas, pela troca de experiências e colaboração durante nossa vida acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Deus por nos ter dado força para superar as dificuldades;

À nossos pais por todo apoio e amor incondicional;

À nossa orientadora *Prof(a). Dra. Sandra Duarte*, pela prontidão, carinho e paciência em nos direcionar a conclusão do nosso objetivo final.

“A ignorância gera mais frequentemente confiança do que o conhecimento: são os que sabem pouco, e não aqueles que sabem muito, que afirmam de uma forma tão categórica que este ou aquele problema nunca será resolvido pela ciência.” (Charles Darwin)

TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES E PRODUÇÃO *IN VITRO* NA REPRODUÇÃO DE CAPRINOS E OVINOS

Fausto Rodrigues de Melo Neto
Francisco Tavares de Moura Sobrinho
Victor Hugo dos Santos Peregrino
Sandra Silva Duarte¹

Resumo: A caprino-ovinocultura possui grande importância econômica no cenário da pecuária mundial, sendo mais evidente em países em desenvolvimento e em condições edafoclimáticas desfavoráveis a outras criações. Nestas circunstâncias, a utilização de técnicas reprodutivas contribui com o melhoramento produtivo dos rebanhos, ao ponto de superar fatores que dificultariam sua dinâmica reprodutiva. Considerando que algumas técnicas existam a mais de meio século, se faz necessário constante evolução das biotecnologias reprodutivas como é o caso da Inseminação Artificial (IA), Transferência de Embrião (TE) e da Produção *in vitro* (PIV). Assim sendo, o presente trabalho, tem como objetivo realizar um levantamento bibliográfico sobre as biotécnicas de TE e PIV na reprodução de caprinos e ovinos, mostrando os benefícios das técnicas existentes e suas inovações. Para realização da revisão foram utilizadas fontes publicadas nos últimos 5 anos em sites como Google Acadêmico, Periódicos Capes, Scielo e PubMed, além de livros da área. Com o presente trabalho conclui-se que são necessárias mais pesquisas visando a atualização das técnicas e melhor conhecimento sobre o tema, para que os resultados obtidos na TE sejam mais elevados e estáveis, assim como para que os embriões produzidos *in vitro* sejam mais resistentes e os protocolos mais estáveis e repetíveis.

Palavras-chave: Caprino. Biotecnologia. Embrião. Ovino. Reprodução.

¹Professora da UNIBRA, Doutora em Ciência Animal. Email:sandra.duarte@grupounibra.com

EMBRYO TRANSFER AND IN VITRO PRODUCTION IN GOAT AND SHEEP REPRODUCTION

Fausto Rodrigues de Melo Neto
Francisco Tavares de Moura Sobrinho
Victor Hugo dos Santos Peregrino
Sandra Silva Duarte¹

Abstract: Goat and sheep farming has great economic importance in the world livestock scenario, being more evident in developing countries and in edaphoclimatic conditions unfavorable to other creations. In these circumstances, the use of reproductive techniques contributes to the productive improvement of herds, to the point of overcoming factors that would hinder their reproductive dynamics. Considering that some techniques have existed for more than half a century, it is necessary to constantly evolve reproductive biotechnologies, such as Artificial Insemination (AI), Embryo Transfer (ET) and *In Vitro* Production (IVP). Therefore, the present work aims to carry out a bibliographical survey on TE and IVP biotechniques in the reproduction of goats and sheep, showing the benefits of existing techniques and their innovations. To carry out the review, sources published in the last 5 years on sites such as Google Scholar, Periódicos Capes, Scielo and PubMed, in addition to books in the area, were used. With the present work, it is concluded that more research is needed aiming at updating techniques and better knowledge on the subject, so that the results obtained in ET are higher and more stable, as well as for the embryos produced *in vitro* to be more resistant and the most stable and repeatable protocols.

Keywords: Goat. Biotechnology. Embryo. Sheep. Reproduction.

¹Professora da UNIBRA, Doutora em Ciência Animal. Email: sandra.duarte@grupounibra.com

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Ovário com diferentes fases de desenvolvimento do folículo e corpo lúteo.	14
Figura 2.	Protocolo de múltipla ovulação para cabra e ovelha.....	21
Figura 3.	Correlação do aspecto de muco e o período de estro em cabras e ovelhas.....	23
Figura 4.	Classificação da disposição anatômica e conformação dos anéis cervicais, quanto ao sentido e o ponto máximo de penetração em inseminação artificial de ovinos.....	24
Figura 5.	Classificação relacionada à aparência externa da cérvix em ovelhas.....	25
Figura 6.	Coleta laparotômica em ovelha.....	26
Figura 7.	Coleta transcervical de embriões em cabra.....	27
Figura 8.	Embrião alocado em coluna central da palheta e curva de congelamento lento.....	29
Figura 9.	Recuperação folicular em procedimento de ovum pick-up guiada por laparoscopia LOPU.....	32
Figura 10.	Instrumentos para aspiração folicular.....	33

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Parâmetros desejados no sêmen fresco de bodes e carneiros.....	22
------------------	--	----

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	METODOLOGIA	13
3	DESENVOLVIMENTO	13
3.1	PRINCÍPIOS GERAIS PARA TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES (T.E.).	13
3.1.1	Fisiologia Hormonal da cabra e da ovelha.....	13
3.1.2	Estimulação ovariana e múltipla ovulação para Produção <i>in vivo</i> do embrião	16
3.1.3	Manejo sanitário e nutricional para escolha das fêmeas.....	17
3.1.4	Indução ovulatória das doadoras e sincronização com as receptoras para Programa de múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE).....	19
3.1.5	Fecundação da fêmea doadora de embriões.....	22
3.1.6	Coleta de embriões <i>in vivo</i>	26
3.1.7	Classificação e conservação dos embriões.....	28
3.1.8	Transferência dos embriões (TE).....	29
3.2	PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> (PIV).....	29
3.2.1	Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE).....	29
3.2.2	Protocolo de estimulação hormonal.....	31
3.2.3	Coleta/aspiração folicular.....	32
3.2.4	Classificação dos oócitos.....	34
3.2.5	Transferência de Embrião na PIV.....	34
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
	REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

As atividades pecuárias voltadas a caprino-ovinocultura vêm crescendo ano a ano, contando em 2020 com 20.628.699 cabeças de ovinos e 12.101.298 de caprinos, onde a região Nordeste do Brasil engloba 70,6% do rebanho nacional de ovinos e 95% do rebanho de caprinos (MAGALHÃES *et al.*, 2021).

Em condições normais na criação de caprinos e ovinos, o número de crias produzidas por fêmea/ano é de uma a duas, por tanto em sua vida reprodutiva uma fêmea produz de 6 a 8 descendentes. Naturalmente o potencial reprodutivo de cada espécie e de cada raça é um fator limitante para disseminação desse genótipo. Sendo aqui onde entra a Transferência de Embriões (TE) e a Produção *in vitro* (PIV), que são técnicas que resultam no aproveitamento do grande número de ovócitos que contém no ovário de uma fêmea, que não seriam fecundados em um ciclo fisiológico (GIBBONS e CUETO, 1995).

O zoólogo e embriologista britânico, Walter Heape, conhecido como o pai da embriologia moderna, no ano de 1891 evidenciou com sucesso a primeira TE a partir de coelhos. No procedimento, Heape coletou embriões de uma doadora da raça Angorá e na continuação dos trabalhos transferiu para uma fêmea receptora da raça Belgian Hare, logrando êxito ao final da gestação em obter descendentes Angorá, a partir de uma gestação de uma Belgian Hare (RODRIGUES e BERTOLINI, 2019).

Rodrigues e Bertolini (2019) contextualizam que com a evolução da técnica, embriões podem ser conservados a longo prazo através da criopreservação, onde, associada a transferência de embriões, permite uma utilização eficiente de receptoras, podendo ser transportado para outros lugares sem maiores problemas, melhorando a dinâmica do comércio de genética, inclusive a nível internacional.

As técnicas de Transferência de Embriões (TE) e Produção *in vitro* de embriões (PIVE) em pequenos ruminantes, possibilitam meios para rápida multiplicação de descendentes de uma determinada fêmea, para fins de pesquisa em desenvolvimento embrionário, para o progresso genético de uma determinada progênie e para redução do intervalo entre gerações, otimizando do processo produtivo (RAMOS e SILVA, 2018).

Com a evolução da colheita de embriões *in vivo*, o uso de TE e múltipla ovulação, é chegada a hora da PIVE, potencializando a produção de embriões por doadora, podendo reduzir os custos de produção e melhorar a genética dos

rebanhos de caprinos e ovinos. Tendo este trabalho o objetivo de fazer uma revisão bibliográfica acerca do tema, no que tange a transferência de embriões e a sua produção *in vitro*.

2 METODOLOGIA

O presente trabalho foi realizado entre os meses de março e junho de 2023, como requisito para graduação no Bacharelado em Medicina Veterinária, na forma de Revisão de Literatura, onde serviram como referência artigos científicos, monografias, teses, livros, sites como Google Acadêmico, Periódicos Capes, Scielo e PubMed, além de livros da área, e publicações em revistas científicas como Australian Veterinary Journal, Animal Reproduction Science e Animal Reproduction, no que concerne a reprodução de caprinos e ovinos com ênfase em transferência de embriões e produção *in vitro*. Predominando fontes literárias e científicas dos últimos 5 anos e usando nas buscas palavras como: transferência de embriões em cabras e ovelhas, produção *in vitro* de caprinos e ovinos, reprodução de caprinos e ovinos, superovulação em cabras e ovelhas, incluindo suas traduções para o inglês. As buscas resultaram em 120 estudos, dos quais 45 foram utilizados por obedecer aos critérios de elegibilidade, quanto ao melhor aproveitamento das técnicas, técnicas inovadoras, época em que foram realizados e bem estar animal.

3 DESENVOLVIMENTO

3.1 PRINCÍPIOS GERAIS PARA TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES (T.E.)

3.1.1 Fisiologia hormonal da cabra e da ovelha

As cabras e ovelhas são animais poliéstricos estacionais de dias curtos, apresentando estro em determinadas épocas do ano, em estações de reprodução com ciclos dividido em quatro fases, sendo estas o proestro, estro, metaestro e diestro, com duração média de 17 dias para as ovelhas e 21 dias para cabras (LEMES *et al.*, 2022), sendo regulado pelo fotoperíodo negativo, ocorrendo nos dias com menor incidência de luz solar (ROCHA *et al.*, 2011), embora que nos trópicos tenham comportamento poliéstrico contínuo, como ocorre no nordeste brasileiro,

onde apresentam estros em qualquer época do ano, sendo o efeito do fotoperíodo praticamente inexistente (MAIA e NOGUEIRA, 2019).

O fotoperíodo negativo é caracterizado pela responsividade a diminuição do período de intensidade de luz, onde é ativada a liberação de melatonina pela glândula pineal, iniciando as respostas fisiológicas da reprodução com a estimulação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (SILVA *et al.*, 2018).

A dinâmica reprodutiva das cabras e ovelhas é controlada por fatores fisiológicos individuais e ambientais, entre eles o hipotálamo, que modula a secreção de gonadotrofinas hipofisárias ou fatores de inibição, através da circulação sanguínea periférica, podendo influenciar no processo reprodutivo afetando glândulas endócrinas e exócrinas (MAIA e NOGUEIRA, 2019).

Segundo Vergani *et al.* (2020) os folículos antrais surgem em forma de ondas do córtex ovariano, tendo em cada onda folículos dominantes e subordinados, sendo comum em caprinos e ovinos a existência de mais de um folículo dominante, em um fenômeno denominado “codominância”. O crescimento inicial dos folículos antrais está associado ao aumento da concentração de FSH, seguindo com a seleção de um ou mais folículos dominantes que irão adquirir receptores de LH, nas células da granulosa, quando atingem o diâmetro $\geq 3,5$ mm, para seguir com o seu desenvolvimento que poderá culmina com a formação do CL, suprido por LH exógeno.

Na fisiologia da reprodução, a formação e o desenvolvimento dos folículos, e o advento da ovulação tornam-se completamente dependentes da ação combinada do hormônio folículo estimulante (FSH) e do hormônio luteinizante (LH), ficando dependente a seleção dos folículos dominantes, do nível de gonadotrofina sérica e de receptores hormonais dos folículos. O FSH é o regulador do desenvolvimento dos folículos, recrutando-os quando imaturos, estimulando a produção de estrógeno (E2) pelas células da granulosa, e equilibrando o recrutamento e a atresia folicular; enquanto que o LH comanda o desenvolvimento, a manutenção e a ovulação do folículo dominante, também auxiliando o FSH na secreção de estrógeno, e induzindo a apoptose de folículos menos desenvolvidos (LUO; WAHG; SUN, 2019) (Figura 1).

Figura 1. Ovário com diferentes fases de desenvolvimento do folículo e corpo lúteo.



Fonte: IFPE Campus Belo Jardim (2018).

- 1- Ovário com folículos antrais em crescimento; 2- Ovário com folículo pré-ovulatório; 3- Ovário pós-ovulação e início da formação de corpo hemorrágico; 4-Ovário com formação de corpo lúteo; 5- Ovário com corpo lúteo (em atresia).

O estradiol, que é o hormônio que regula os sinais e manifestações do cio, causando mudanças típicas de comportamento e no trato genital da fêmea, é produzido pelas células da granulosa do folículo ovariano, estimuladas pelo hormônio folículo estimulante, onde os altos níveis de E2 suprime a liberação de FSH e estimula a de LH, provocando respectivamente feedback negativo e positivo (PAZZIM, 2021).

O Corpo Lúteo (CL) se faz presente na fase do diestro, após a ovulação, que é a fase mais longa do ciclo estral, possuindo como uma das funções secretar progesterona, que é o hormônio encarregado por manter a gestação, baixando a resposta imune do útero, o que faz com que o embrião seja suportado, além de alterar as características do muco cervical, tornando-o mais espesso, e de induzir fechando a cérvix, o que diminui a possibilidade de invasão de patógenos (SILVA, 2020).

3.1.2 Estimulação ovariana e múltipla ovulação para Produção *in vivo* do embrião.

A técnica de superovulação tem como principal objetivo o maior aproveitamento dos folículos que normalmente não seriam aproveitados em um ciclo normal. Essa técnica é normalmente conseguida usando protocolos com hormônios gonadotróficos que promovem o desenvolvimento de folículos subordinados a ovular, ou com a imunização com inibina, que tem como finalidade a eliminação do mecanismo de bloqueio do folículo dominante, quanto a liberação de gonadotrofinas. Nos protocolos de estimulação ovariana várias preparações com gonadotrofinas (FSH e eCG) são praticadas para induzir a superovulação em ovelhas e cabras. Outros hormônios, como extratos da hipófise anterior do cavalo (HAP), gonadotrofina menopáusica humana (hMG), hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e gonadotrofina coriônica humana (hCG) também foram aplicados, embora com menos frequência (KHAN *et al.*, 2022).

O FSH é o hormônio mais comum a ser usado para induzir a superovulação em ovelhas e outros animais, sendo geralmente administrado por meio de injeções múltiplas (6 a 10) em intervalos de 12 horas, durante um período de 3 a 5 dias na fase folicular. A principal desvantagem do FSH injetado é sua meia-vida curta, necessitando administração diária. Além disso, múltiplas injeções são demoradas e estressantes para os animais, o que pode prejudicar o desempenho reprodutivo das fêmeas. Outros fatores limitantes do FSH são o potencial para regressão lútea prematura, variabilidade individual substancial nas respostas ovarianas e a baixa qualidade dos embriões recuperados (PANYABORIBAN *et al.*, 2018).

Bevilaqua *et al.* (2023), descrevem que, tradicionalmente, as doses totais de FSH administradas em protocolos de múltipla ovulação em caprinos e ovinos variavam entre 200 e 256mg, entretanto doses menores têm demonstrado bons resultados, fatos este que desonera o protocolo e evita consequências indesejáveis das doses mais altas, como a alteração dos pulsos hormonais e a liberação de prostaglandina endometrial, que resulta em luteólise prematura, que está associada a reduzidas taxas de recuperação embrionária, ocasionada por baixas concentrações de P4. De acordo com o estudo realizado, a luteogênese ovariana não é dose-dependente do FSH, onde foi aplicado 100, 133 e 200mg da gonadotrofina em protocolos decrescentes para múltipla ovulação, obtendo

resultados com números aproximados e satisfatórios, o que demonstra que a menor dose total (100mg) pode ser utilizada.

Já Menchaca *et al.* (2018) relatam que diferentes estudos realizados nos últimos anos mostraram que os protocolos de curta duração (short-term) com dispositivos de progesterona de aplicação intravaginal, resultam em vários benefícios em detrimento aos longos protocolos (long-term) utilizados anteriormente, resultando em melhor controle da resposta folicular e ovulatória, taxas de gestação aceitáveis, menores períodos de implementação e gerando a possibilidade de reutilização de dispositivos siliconados de liberação lenta de P4, reduzindo assim o custo do tratamento.

Em estudo realizado na Tailândia, com ovelhas doadoras das raças Corriedale e Bond, a eficácia de um protocolo de superovulação simplificado, onde uma dose de 180mg de FSH (Folltropin®-V, Bioniche Animal Health, Belleville, Canadá) é dissolvido em 10mg/ml de hialuronano (HA) ou ácido hialurônico 750 kDa (MAP-5®, Bioniche Animal Health, Vetrepharm, Canadá), como um fator de liberação lenta de FSH, em uma concentração final de 60mg/ml de HA-FSH, demonstrou bom aproveitamento na produção de embriões em comparação com as tradicionais injeções múltiplas de FSH, evitando um procedimento demorado e trabalhoso, bem como diminuindo o estresse dos animais. Este estudo concluiu que a liberação contínua de FSH em meio ao HA, estimulou os folículos a se desenvolverem, comprovando a eficácia consistente na indução ovariana, semelhante a convencional, com base no número de ovulações, fertilização e qualidade dos embriões *in vivo* (PANYABORIBAN *et al.*, 2018).

3.1.3 Manejo sanitário e nutricional para escolha das fêmeas

A atividade reprodutiva em cabras e ovelhas é caracterizada por uma sazonalidade influenciada por diversos fatores como fotoperíodo, latitude, temperatura, nutrição e raça, tendo o fotoperíodo e a condição nutricional como os principais fatores que influenciam na eficiência da produção de embriões nestes animais. A nutrição tem efeitos significativos em vários aspectos da reprodução, o que inclui a produção hormonal, a fertilização e o desenvolvimento inicial do embrião. A relação entre a nutrição e as respostas embrionárias não foi determinada de forma conclusiva, porém a desnutrição pode colocar em risco a dinâmica das

ondas foliculares, as secreções lúteas e o desenvolvimento embrionário (CIORNEI *et al.*, 2022).

O sucesso da TE não depende apenas da qualidade do embrião que foi transferido, mas também do estado nutricional e sanitário da fêmea caprina ou ovina que o receberá, levando-se ainda em consideração fatores edafoclimáticos e de integridade física da receptora, como traumatismos por exemplo (THIBIER e NIBART, 1992). Carneiro (2018) preceitua que a seleção das doadoras e receptoras deve ser criterioso no que concerne ao estado sanitário e nutricional, podendo levar ao insucesso da técnica utilizada.

Dentre os diversos fatores que influenciam a fertilidade da fêmea, a sanidade é de grande importância, onde a incidência de doenças é uma das razões para baixa dos resultados pretendidos nas taxas reprodutivas, devendo ter como objetivo a prevenção contra patógenos, com vacinação, higiene, combate a vetores e qualidade do que lhe é oferecido, evitando alterações fisiológicas que sejam prejudiciais (PINHEIRO *et al.*, 2021).

Para caprinos e ovinos são estabelecidas notas no escore de condição corporal (ECC), em escala de 1 a 5, onde 1 é magro e 5 é obeso, estando a eficiência reprodutiva diretamente influenciada pela condição corporal da fêmea, tendo esta dinâmica reduzida em escores <2, assim como >4, com menor taxa de fertilidade e percentual de estro (MAIA e NOGUEIRA, 2019). O escore de condição corporal (ECC) é um bom indicador para avaliar o indivíduo, em relação ao seu estado nutricional, não devendo levar em consideração apenas o peso, devido ao fato de que um animal que apresenta peso elevado pode estar em estado nutricional desfavorável (CARNEIRO, 2018).

Cabras e ovelhas que sejam doadoras ou receptoras, não poderão estar magras nem gordas, devendo apresentar ECC entre 2,5 e 3,5, recebendo volumoso de qualidade, acrescentado de concentrado em média de 150 a 200g/animal e água a vontade (CRISTINE, 2021), o que influencia nas taxas ovulação, prenhes e parição, devendo ser observado durante todo o processo reprodutivo (BOMFIM, 2021). Outro aspecto importante na seleção de doadoras e receptoras é a idade, que devem ter entre 3 e 6 anos, devido a melhores respostas das funções ovarianas (KHAN *et al.*, 2022).

3.1.4 Indução ovulatória das doadoras e sincronização com as receptoras para Programa de múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE)

Em estudo realizado por Ramos e Silva (2018), a dinâmica reprodutiva dos pequenos ruminantes pode ser controlada por diversos métodos e para várias finalidades como induzir o cio, programar os partos e melhoramento genético, entre outros, envolvendo administração de hormônios que modificam a cadeia fisiológica da fêmea, inclusive para aumentar a ovulação. Em pequenos ruminantes, um programa de múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE) tradicionalmente inclui a implantação de um dispositivo vaginal com análogos de progesterona (P4), como acetato de fluorogestona (FGA) ou acetato de medroxiprogesterona (MAP), ou mesmo a própria P4, usando um dispositivo interno de liberação controlada (CIDR).

Como descrito por Alkan *et al.* (2021), cabras Angorá selecionadas como doadoras, alimentadas com silagem de milho, feno, ração concentrada, sal mineral e água ad libidum, foram estimuladas a superovular com FSH (Bioniche Animal Health, Belleville, Canadá) durante o protocolo de sincronização. Onde o FSH foi injetado por via intramuscular em 6 doses decrescentes, em intervalos de 12h, após o 9º dia de protocolo. Um total de 200mg de FSH foi injetado na proporção de 50 e 50mg no dia 9; 30 e 30mg no dia 10; e 20 e 20mg no dia 11, onde os mesmos protocolos de sincronização foi utilizado nas receptoras.

Neste protocolo, para sincronização do cio, em ambas foi administrado por via intravaginal 0,33g de progesterona (CIDR, Zoetis Animal Health, Florham Park, NJ, EUA) no dia 0. No dia 9 foi administrado prostaglandina, PGF2 α (Dalmazin; Vetas, Istanbul, Turquia) em única dose por via intramuscular, na dosagem de 150 μ g por animal. A retirada da fonte de P4 foi realizada no 11º dia, sendo administrado um análogo ao GnRH (Receptal; Intervet, Boxmeer, Holanda) 24h após a retirada do dispositivo intravaginal (12º dia), na dose de 10 μ g por cabra, por via intramuscular. Em seguida as cabras doadoras foram inseminadas de 6 a 16h após a aplicação de GnRH (ALKAN *et al.*, 2021).

No estudo realizado por Alkan *et al.* (2021), mesmo com a incapacidade em prever as respostas a superovulação, por fatores diversos como raça, idade, condição geral da doadora, clima e manejo em geral, ficou comprovado a eficiência do FSH no protocolo de superovulação, com resultado positivo em 100% das cabras

no período reprodutivo, assim como na resposta a obtenção de sincronização com as receptoras utilizando o CIDR.

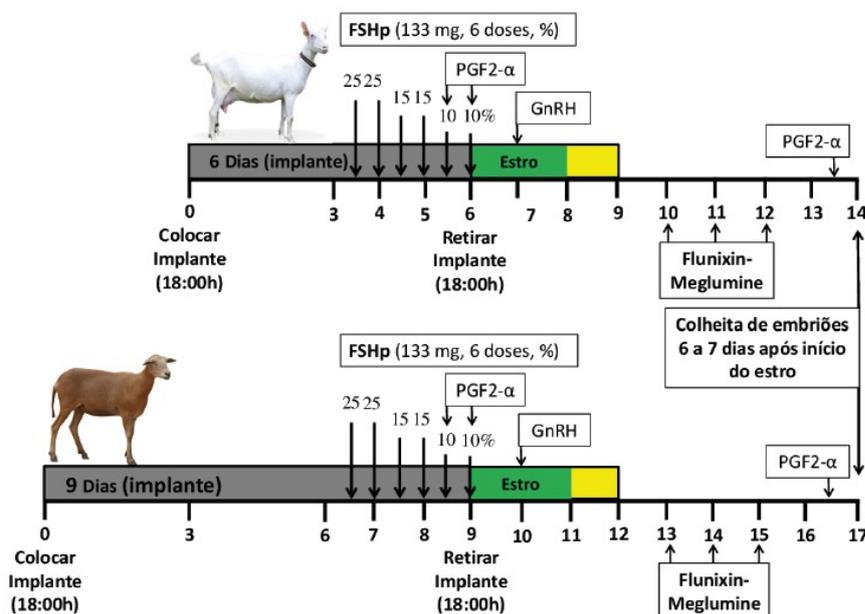
Em um outro protocolo com bom aproveitamento na superovulação em ovelhas, descreve que na manhã no dia 0 é implantado um dispositivo intravaginal (CIDR; Zoetis, Florham Park, NJ, EUA), contendo 0,33g de progesterona. No dia 7 os dispositivos CIDR são substituídos e as ovelhas recebem 0,25mg de um análogo da prostaglandina F₂ α (cloprostenol; Ovuprost; Bayer AustraliaLtd, Pymble, NSW, Aust) por via intramuscular. A partir do 11^o dia as fêmeas recebem 8 doses de Folltropin-V, na concentração de 20mg/ml (Vetoquinol Australia, Hamilton, QLD, Aust), a cada 12h, predefinidas em 50 e 40mg no dia 11; 40 e 40mg no dia 12; 30 e 20mg no dia 13; e 20 e 10 mg no dia 14, totalizando 250mg de FSH, por via intramuscular (KING, *et al.* 2022).

Sendo no dia 13 realizado a remoção dos dispositivos CIDR e as ovelhas recebem 400UI de eCG (Pregnecol; Vetoquinol Australia, QLD, Aust), por via intramuscular. As ovelhas receptoras com o estro sincronizado com as doadoras, receberam o implante intravaginal (CIDR) na manhã do dia 0 do tratamento, sendo este retirado no dia 13, recebendo 600UI de eCG por via intramuscular (KING, *et al.* 2022).

Já Fonseca e Oliveira (2020) descreveram um protocolo com aproveitamento de 50% dos animais, com ≥ 10 embriões, totalizando 80% dos produzidos, e manifestação de estro regular em 48h após extração do implante vaginal. O fracionamento das doses foi de 133mg de FSH, dividido em 6 aplicações a cada 12h, sendo 25 e 25%, 15 e 15%, 10 e 10%, em 10ml da diluição, onde as doses foram divididas em 2,5ml e 2,5ml, 1,5ml e 1,5ml, 1ml e 1ml, sendo aplicada rigorosamente a cada 12h.

A cobertura adotada nesse protocolo pode ser tanto por monta natural quando por Inseminação Artificial (IA), realizada a cada 12h do início do estro, sendo IA em 24h e 36h da retirada do dispositivo ou 12h e 24h do início do estro. Durante o período de 4 à 6 dias após a extração do implante vaginal, o agente antiluteolítico Flunixin-meglumine é aplicado em 1 dose por dia, por via intramuscular, durante 3 dias, para evitar a regressão do corpo lúteo. Em seguida é efetuada a coleta dos embriões entre o 6^o e o 7^o dia posterior ao início do estro (FONSECA E OLIVEIRA. 2020). (Figura 2).

Figura 2. Protocolo de múltipla ovulação para cabra e ovelha.



Fonte: EMBRAPA 2020

Protocolo superovulatório em cabras e ovelhas, com dose total de FSH (133mg), exibida em porcentagem (%), com dosificação decrescente em 6 aplicações; tratamento anti-prostaglandínico do 4° ao 6° dia da retirada da esponja de P4; e período de coleta de embriões entre 6 e 7 dias após a fecundação.

Em estudo realizado por Panyaboriban *et al.* (2018), ficou comprovada a eficácia de um protocolo de superovulação simplificado (split-single), com duas doses de FSH misturado ao hialuronano (HA-FSH), em intervalos de 48h, sendo aplicado no espaço subcutâneo, em substituição ao tradicional FSH de 12 em 12h em 6 ou 8 aplicações. Tal estudo, realizado em ovelhas, demonstrou competência embrionária condizentes aos protocolos usuais, com as vantagens de diminuir o estresse dos animais, devido ao menor manejo e emprego de mão de obra.

Figueira *et al.* (2020) argumentam que protocolos curtos podem ter resultados até melhores do que os longos, resultando em taxas de fertilização semelhantes e, por vezes melhores, tendo ainda as vantagens de menores efeitos residuais dos hormônios, menor ocorrência de perda do implante vaginal e menor incidência de CL persistente.

3.1.5 Fecundação da fêmea doadora de embrião

O exame andrológico dos machos é descrito em pesquisa de Maia e Nogueira (2019) como de grande importância para identificar distúrbios funcionais que alterem sua eficiência reprodutiva, tanto em monta natural como em inseminação artificial (AI) com o sêmen destes machos. A espermatogênese no bode e no carneiro tem um ciclo aproximado de dois meses, onde qualquer mudança em seu estado geral pode acarretar em alterações, incluindo infertilidade temporária, que só poderá ser restabelecida em um novo ciclo. Contrário ao ECC da fêmea, em se falando de ECC acima de 4, o maior peso corporal do macho tem boa relação com a qualidade espermática, estando a subnutrição relacionada à redução do diâmetro testicular, produzindo menos espermatozóides. Protocolos de análise seminal devem ser realizados para averiguar os padrões desejáveis que caracterizam boa fertilidade do macho (Quadro 1).

Quadro 1. Parâmetros desejados no sêmen fresco de bodes e carneiros.

Característica seminal	Carneiro	Bode
Volume (mL)	0,5–3,0	0,5–1,5
Cor	Branco ou marfim	Marfim ou amarelada
Concentração	1-3 x 10 ⁹ /mL	2-5 x 10 ⁹ /mL
Total de espermatozóides / ejaculado	3 a 5 x 10 ⁹	3 a 5 x 10 ⁹
Motilidade (%)	≥80	80 (70-90)
Vigor (0 a 5)	≥3	≥3
Motilidade massal (0-5)	≥3	≥4
Espermatozóides normais (%)	≥80	≥80

Fonte: EMBRAPA (2019)

Em atenção às fêmeas, o manual de Maia e Nogueira (2019) preceitua que 30 dias antes do início do período reprodutivo as fêmeas deverão ser avaliadas com especial atenção ao exame ginecológico, onde deverão ser observados casos de infecções genitais e mamárias, e o aspecto geral do animal, com vermifugação em caso de necessidade.

A inseminação natural das doadoras pode ser de forma livre, quando as doadoras são mantidas junto ao macho enquanto durar o estro, ou de forma

controlada, quando os acasalamentos são pontuais, direcionando as doadoras para o macho a cada 12h, por 2 a 3 vezes (ARRAIS, 2021), já a inseminação artificial requer conhecimento técnico e a instrumentação adequada para que seja eficiente a transferência do sêmen para o trato reprodutivo da fêmea (MAIA e NOGUEIRA, 2019).

Para Fonseca *et al.* (2011), o tipo de sêmen que será utilizado tem correlação com o início e o final do estro (Figura 3), onde o sêmen fresco requer tempo para que sofra capacitação espermática, possuindo, porém, maior longevidade em relação ao sêmen resfriado e o congelado. Tendo em vista que o estro de cabras e ovelhas dura de 24 à 42h e de 24 à 36h respectivamente, e a ovulação acontece no seu terço final, deve-se considerar o tipo de sêmen, a forma, o horário e o local de inseminação.

Figura 3. Correlação do aspecto de muco e o período de estro em cabras e ovelhas.



Fonte: Adaptado de Fonseca e Simplício (2008).

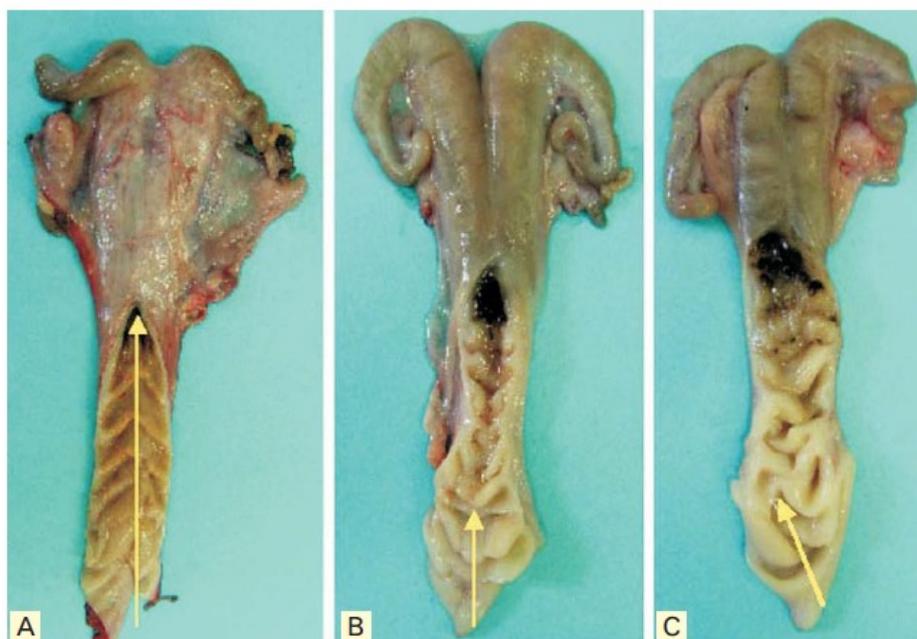
Demonstração do momento em que cada tipo de sêmen deve ser utilizado, relacionando o aspecto do muco cervical e levando em consideração o início da ovulação.

De acordo com Arrais (2021), quando da inseminação, principalmente em ovelhas, a deposição do sêmen deve ser feita diretamente no corno uterino, pela técnica laparoscópica, sendo a inseminação transcervical pouco utilizada por estar relacionada a falhas na fertilização, devido à dificuldade de transpor a cérvix e, em alguns casos, de sua deposição cervical, o que compromete o transporte

espermático. Agossou e Koluman (2018) afirmam que a eficácia com sêmen descongelado pode não alcançar índices satisfatórios de prenhes, por fatores que incluem crioprotetores, curva de resfriamento e descongelamento, sítio de deposição e estado fisiológico dos animais, porém para se obter uma boa taxa de fecundação deve ser observado os sinais de cio e fazer a monta ou IA nos momentos mais próximos da ovulação, independente da modalidade de inseminação.

As cabra e ovelhas possuem algumas particularidades anatômicas na cérvix, que podem limitar a aplicação de determinadas biotécnicas reprodutivas, tendo em vista que este é um canal fibromuscular com diferentes números de anéis, de tamanhos distintos, por vezes desencontrados e com formas irregulares, que, por esta razão, Kershaw *et al.* (2005) descreveram uma escala de graus de dificuldade em transpassá-los (Figura 4), contando ainda a disposição externa da cérvix (Figura 5), similar a um esfíncter, que possui distintas conformações que dificultam sua transposição, podendo variar de acordo com a espécie, raça, ciclo reprodutivo, histórico reprodutivo e idade da fêmea (CIORNEI *et al.*, 2022).

Figura 4. Classificação da disposição anatômica e conformação dos anéis cervicais, quanto ao sentido e o ponto máximo de penetração em inseminação artificial de ovinos.



Fonte: Kershaw *et al.* (2005)

Graus de complexidade para transposição da cérvix: (A) Grau 1 – a cérvix está com os anéis alinhados, sem interdigitações e convergindo para a abertura do lúmen; (B) Grau 2 – a cérvix está

com uma combinação de posicionamento dos anéis próximo ao meio do trajeto, que o obstrui parcialmente; (C) Grau 3 – a cérvix apresenta desalinhamento dos anéis e interdigitação prevalente.

Figura 5. Classificação relacionada à aparência externa da cérvix em ovelhas.



Fonte: Kershaw *et al.* (2005)

Classificação da cérvix: (A) bico de pato, (B) fenda, (C) rosa, (D) papila e (E) aba.

Para King, Osborn e Grupen (2022), o procedimento de eleição é a inseminação artificial por laparoscopia utilizando sêmen fresco ou descongelado, sendo a IA realizada de 38 à 40h após a remoção do CIDR, e repetida 6h após a primeira inseminação caso seja utilizado sêmen descongelado. As ovelhas são mantidas em jejum de pelo menos 20h, recebem sedação com xilazina e são posicionadas em maca, em decúbito dorsal, com angulação de 45° com a cabeça para baixo. É realizada tricotomia e assepsia com clorexidina 4% na região abdominal inferior. Duas pequenas incisões são realizadas em ambos os lados da linha média abdominal, em distância aproximada de 8 a 10 cm da glândula mamária, onde será perfurado por um trocar, que dará acesso ao laparoscópio e a pipeta de inseminação. É realizada a insuflação do abdômen com dióxido de carbono através da cânula laparoscópica, para melhor observação das estruturas. Para cada ovelha o sêmen é carregado em uma pipeta Robertson e depositada no lúmen de cada corno uterino, sendo as fêmeas liberadas para o pasto logo após se recuperarem da

sedação. Panyaboriban *et al.* (2018) enfatizam que o sêmen deve ser injetado no meio do corno uterino.

3.1.6 Coleta de embriões *in vivo*

A coleta de embriões em pequenos ruminantes pode ser realizada por lavagens dos cornos uterinos com a solução salina tamponada PBS, pelos métodos laparotômico e transcervical (ALKAN *et al.*, 2021).

Para King, Osborn e Grupen (2022), os embriões de ovelhas são recuperados 6 dias após a inseminação, por procedimento laparotômico (Figura 6), onde o útero é exteriorizado, por incisão médio-lateral e um cateter de Foley de 2 vias, nº 10, é utilizado para lavagem dos cornos uterinos, com meio próprio, a uma temperatura de 37°C e o lavado é recolhido em um pote com filtro coletor de embriões e posteriormente é analisado ao estereomicroscópio, com aumento de 10x, em uma placa Petri. Arrais (2021) enfatiza que a temperatura ideal do PBS é de 37° tanto para lavagem do útero, quanto dos cornos uterinos, e as cautelas pré-operatórias devem ser adotadas como jejum de 24h, acomodação em decúbito dorsal, em maca com inclinação de 45.

Figura 6. Coleta laparotômica em ovelha.



Fonte: Arquivo pessoal (2023).

Ovelha posicionada em maca com angulação de 45°, em procedimento de laparotomia com útero exposto na realização de coleta cirúrgica de embriões.

Fonseca *et al.* (2018a) argumentam que, com a intensificação das pesquisas voltadas ao desenvolvimento e adaptação de técnicas de Múltipla Ovulação e Transferência de Embriões (MOTE), os métodos não cirúrgicos em cabras e ovelhas tem evoluído com resultados de penetração transcervical para inseminação e recuperação de embriões (Figura 7), onde são usados protocolos de relaxamento cervical e seleção das doadoras, sendo estas aplicadas na espécie ovina, enquanto nas cabras, tendo em vista a relativa facilidade dos procedimentos de coleta transcervical, se torna dispensável o uso de medicação e dilatadores cervicais, onde para ter melhor aproveitamento pela técnica não cirúrgica em ovinos, o uso de estradiol-cloprostenol-oxitocina deve ser adotado.

Figura 7. Coleta transcervical de embriões em cabra.



Fonte: Arquivo pessoal (2023).

Cabra murciano-granadina em estação, contida em brete, em procedimento de coleta embrionária por via transcervical.

Pereira, Sohnrey e Holtz (1998) preconizam que para o procedimento de coleta não cirúrgica de embriões, a vagina é aberta com o auxílio de um espelho bico de pato, dando acesso à entrada da cérvix, que é fixada e tracionada com a ajuda de uma pinça allis. Pinçada pelo orifício cervical, a cérvix é transpassada e o útero é acessado por um cateter de 3,2mm semi-rígido, mas rígido o bastante para vencer a resistência dos anéis cervicais, porém flexível o suficiente para não perfurar a mucosa. O cateter pode ser direcionado para qualquer dos cornos uterinos com o

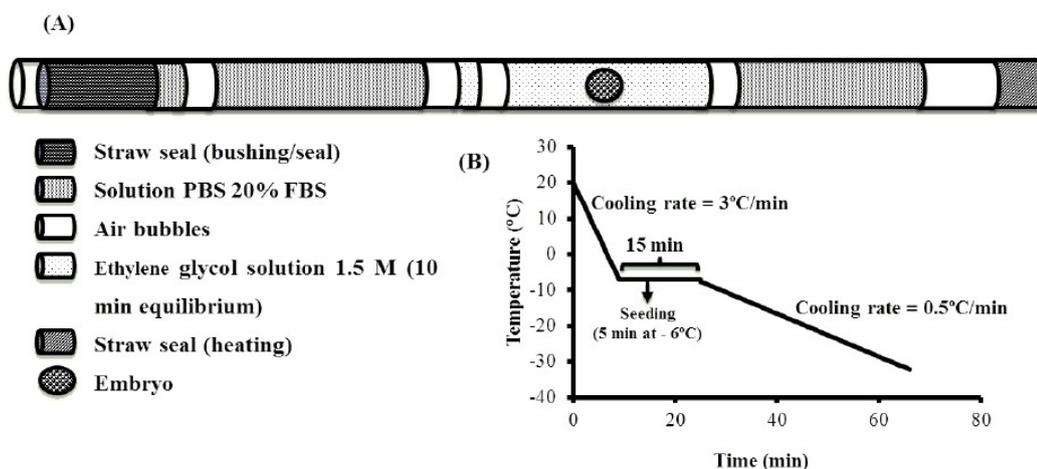
dedo posicionado na bifurcação cornual. As doadoras são levemente sedadas para que a coleta seja realizada com o animal em estação.

3.1.7 Classificação e conservação dos embriões

Todo o material recuperado é lavado, transferido para meio de cultura e analisado ao estereomicroscópio, com aumento de 40x, então as estruturas são avaliadas quanto ao desenvolvimento embrionário, utilizando os mesmos princípios aplicados em bovinos, graduando em I como excelente, II como bom, III como ruim e IV como degenerado (MAIA *et al.*, 2020), onde as mórulas e os blastocistos classificados de I a III são transferidos, e os de graus I e II estão aptos a serem congelados (ARRAIS, 2021).

Ferreira-Silva *et al.* (2021) descrevem que os embriões são selecionados quanto ao estágio de evolução (mórula, blastocisto inicial, blastocisto e blastocisto expandido), sendo utilizados os blastocistos e blastocistos expandidos, com classificação em graus I e II, os quais são imersos em solução TqC *Ethilene Glycol Freezer Plus* (Nutricell, Bioniche, EUA) durante 5min e em sequência são acomodados em palhetas de 0,25ml, onde Fonseca *et al.* (2018) enfatizam que os embriões devem ser alocados na coluna central da palheta, em solução crioprotetora, intercalado por bolhas de ar e solução PBS com 20% de soro fetal bovino, para proteção do embrião durante o congelamento (Figura 8). O congelamento lento é feito em congelador automático TK3000 (TK Tecnologia, Uberaba – MG, Brasil), em que a queda inicial da temperatura é de -1°, partindo de 20° até -6°, onde a semeadura é realizada após as palhetas estarem em -6° por 10 min., seguindo em curva lenta de -0,5°/min. até estabilizar em -32°, quando são despejadas dentro do nitrogênio líquido, permanecendo a -196° até sua utilização (FERREIRA-SILVA *et al.*, 2021).

Figura 8. Embrião alocado em coluna central da palheta e curva de congelamento lento.



Fonte: Fonseca *et al.* (2018)

A – Palheta demonstrando a alocação central do embrião em meio de solução de base fosfatada (PBS), soro fetal bovino (FBS) e etilenoglicol, em espaços intercalados por bolhas de ar; B – Curva de congelamento lento.

3.1.8 Transferência dos embriões (TE)

As fêmeas receptoras são sincronizadas em protocolo que se inicia um dia após o início do protocolo das doadoras, sendo a TE por laparotomia executada no sétimo dia após a detecção do estro, onde é realizada sedação com 0,05mg/kg de cloridrato de xilazina e após a visualização do corpo lúteo, então dois embriões são depositados com o auxílio de um cateter Tomcat, no corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo. (FERREIRA-SILVA *et al.* 2018).

3.2 PRODUÇÃO *IN VITRO* (PIV)

3.2.1 Produção *in vitro* de embriões (PIVE)

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma técnica utilizada para a produção de embriões em laboratório, sem a necessidade de inseminação natural ou artificial. Essa técnica envolve a maturação dos oócitos em laboratório, a fertilização dos oócitos em um ambiente controlado e o desenvolvimento dos embriões *in vitro*. Resumidamente, as principais etapas são: seleção e estimulação

das doadoras; coleta e maturação dos oócitos; capacitação dos espermatozóides; e fertilização *in vitro*, na qual os oócitos maduros são fertilizados com os espermatozóides em um meio de cultura adequado; e cultivo dos embriões em meios e atmosfera ideais (CORDEIRO *et al.*, 2014). Segundo Rocha e Camargo (2021), após a aspiração dos complexos cumulus-oócitos (CCO) e as fases já elencadas anteriormente, as etapas da PIV tem o objetivo de fazer com que o zigoto chegue ao estágio de blastocisto, adquirindo competência para ser transferido para a fêmea receptora ou criopreservado.

Procedimentos endoscópicos são aplicados em reprodução animal para avaliação das condições do útero e do ovário, para inseminação intra-uterina, recuperação e transferência de embriões e recuperação de ovócitos. Segundo Baldassarre (2021), em cabras e ovelhas a cirurgia ainda é a técnica usual para recuperação embrionária, porém a aspiração folicular por laparoscopia (LOPU) é menos invasiva e concede riscos mínimos de sequelas cirúrgicas, favorecendo o bem estar animal e permitindo que o procedimento seja repetido várias vezes, elevando potencial de doadora para um maior número de descendentes (WIECZOREK *et al.*, 2020)

Salvador (2019) comenta que a PIV é o procedimento que é realizado após a coleta, lavagem e seleção dos oócitos, que inicia com a maturação *in vitro* (MIV), onde é utilizado meio de maturação imerso sob óleo mineral, suplementado com LH, FSH, 17 β -estradiol, piruvato de sódio, cisteamina, gentamicina e soro fetal caprino/ovino (a depender da espécie) inativado pelo calor, que compõem o meio que proporciona desenvolvimento nuclear e aquisição de competência.

O ambiente de maturação é mantido a 38,5°C, com 5% de CO₂ em atmosfera umidificada, por um período de 24h. Após executada a maturação, para cabras é utilizado meio TALP de cultura, com soro fetal caprino inativado e, para ovelhas, meio SOF com soro fetal ovino inativado pelo calor, para que ocorra a FIV, em gotas sob óleo mineral, nas mesmas condições ambientais da MIV, por 20h, onde a origem do sêmen (fresco – resfriado – congelado) e processo de capacitação interferem bastante, além dos casos de polispermia pelo uso de altas concentrações. Dentre estes diversos fatores, sem ter uma receita certa, deve-se encontrar o equilíbrio para chegar ao resultado pretendido (SALVADOR, 2019).

Zhu *et al.* (2018) relataram que o procedimento da PIVE ainda é ineficiente, alcançando índices indesejáveis de 70 a 80% dos oócitos recuperados que passam

da prófase I a metáfase II, quando destes 50 a 80% são fertilizados e sofrem clivagem, pelo menos de duas células, de 24 a 48h após a inseminação, e destes apenas 20 a 50% atingem o estágio de blastocisto, ainda resultando em baixas taxas de implantação, natalidade e sobrevivência. Em estudo Munther, Mohammed e Majeed (2022) afirmaram que no CIV existe a influência de fatores ambientais e químicos que diminuem a competência oocitária, gerando problemas críticos na eficácia da FIV que certamente é devido à composição do meio de cultura e da ausência de antioxidantes que só existe no organismo vivo.

Após a FIV, a CIV é praticada em meio fetal ovino para ambas as espécies, acrescido aminoácidos essenciais, imenso sob óleo mineral, na mesma temperatura dos procedimentos anteriores, embora que a atmosfera mude para 5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂. As sucessivas divisões da clivagem devem acontecer na CIV, chegando ao estado de mórula e blastocisto, com 32 e 64 células, onde é simulado o ambiente da tuba uterina (SALVADOR, 2019). Para Ferreira-Silva *et al.* (2021), o protocolo de CIV está diretamente relacionado ao sucesso da produção *in vitro*, no que concerne ao metabolismo lipídico e a criotolerância, assim como o protocolo hormonal está para a múltipla ovulação.

3.2.2 Protocolo de estimulação hormonal

Como definido por Baldassarre (2021), o primeiro passo da PIVE se dá com a estimulação hormonal das fêmeas, procurando maximizar o número e a qualidade dos oócitos coletados por doadora, onde o tamanho folicular influencia na competência do seu desenvolvimento. Isso ocorre com o acúmulo de moléculas críticas durante o desenvolvimento folicular, partindo do estágio primordial até o estágio pré-ovulatório, onde algumas moléculas são biossintetizadas e outras são fornecidas pelas células do cumulus da granulosa, onde serão necessárias para o crescimento, na maturação e fertilização do oócito, bem como, posteriormente, para o desenvolvimento do embrião e ativação do seu genoma. Por conseguinte, é de suma importância o fornecimento de gonadotrofina exógena para o desenvolvimento folicular e aquisição de competência oocitária.

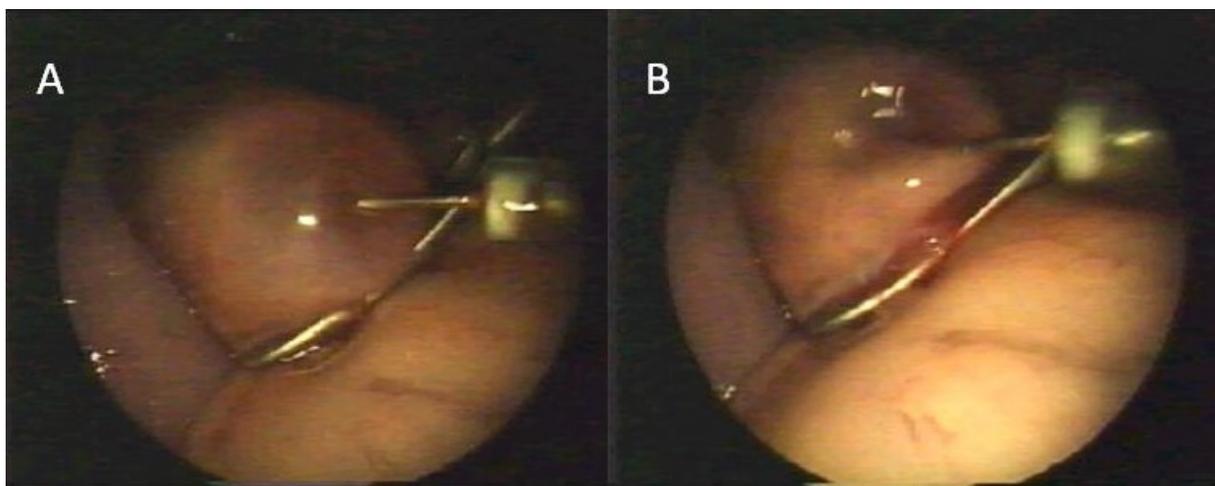
O protocolo já descrito por Panyaboriban *et al.* (2018) no assunto anteriormente tratado no tópico 3.2.2 desta revisão literária (Protocolo de Estimulação Hormonal) e confirmado em PIVE por Baldassarre (2021), atesta que o

tratamento superovulatório split-single, com duas doses de HA-FSH administrada por via subcutânea em um intervalo de 48h, tem sido usado com sucesso em cabras e ovelhas, incluindo ovelhas pré-púberes, obtendo resultados condizentes a outros protocolos consolidados, porém exigindo menos mão de obra e atribuindo menos estresse aos animais.

3.2.3 Coleta/Aspiração folicular

A recuperação embrionária laparoscópica em pequenos ruminantes é uma técnica minimamente invasiva, de um procedimento que extrai ovócitos (Figura 9) com boa integralidade, adequados para maturação e fertilização *in vitro*, entretanto a LOPU em caprinos e ovinos ainda é limitado, sendo sua eficácia variável e seus resultados não seguem um padrão certo de repetibilidade, mesmo com uso de técnicas diferentes nos dias atuais (WIECZOREK *et al.*, 2020).

Figura 9. Recuperação folicular em procedimento de LOPU.



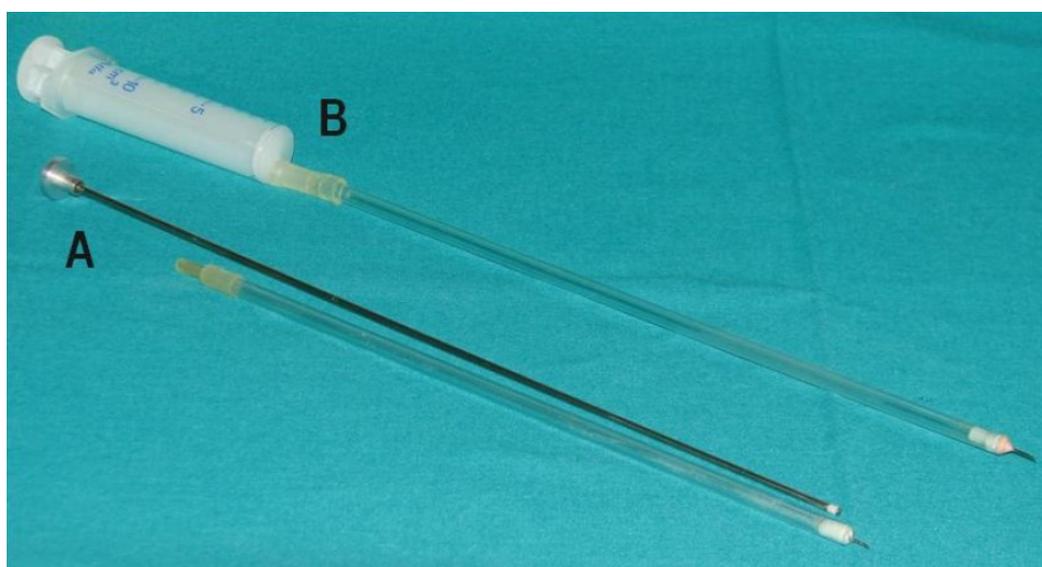
Fonte: Wieczorek *et al.* (2020)

Na figura (A) demonstra os folículo túrgido, antes da aspiração; a figura (B) apresenta o folículo já drenado.

O procedimento de LOPU é descrito por Baldassarre (2021), com protocolo anestésico de eleição, posicionamento da doadora em maca a 45° em posição dorsal, com a cabeça para baixo, tricotomia da área ventral cranial ao úbere e assepsia da mesma. Em ato contínuo são abertos três acessos com trocarte de

5mm, onde são fixadas três cânulas para manipulação do laparoscópio de 5mm/0°, por onde será visualizado as estruturas e realizadas manobras; uma pinça laparoscópica de apreensão atraumática, que fará a tração da mesossalpige em várias posições para expor as superfícies do ovário é introduzida em alguma das cânulas laterais; e como executado por Wieczorek *et al.* (2020), de forma prática, a usual seringa de aspiração de ovócitos foi substituída por um cateter acoplado a uma seringa de 10ml (Figura 10), utilizada para recuperação dos ovócitos, sendo inserida em outra cânula lateral, tendo mais aproveitamento do que uma bomba de vácuo.

Figura 10. Instrumentos para aspiração folicular.



Fonte: Wieczorek *et al.* (2020)

Instrumento adaptado para aspiração folicular, onde (A) representa uma seringa de 1ml para aspiração de ovócitos e (B) descreve uma adaptação de uma seringa de 10ml acoplada a um cateter de aspiração.

Mendes *et al.* (2018) reforçam os cuidados pós-aspiração, lavando os ovários que foram puncionados com uma solução salina (0,9%) a 37°, com heparina sódica (5UI/ml), para remover coágulos da superfície ovariana e diminuir a possibilidade de formação de aderências, aplicando ainda 20mg/kg de oxitetraciclina IM, como antibioticoterapia.

Tanto Wieczorek *et al.* (2020), quanto Baldassarre (2021), recomendam como meio de recuperação de oócitos o de TCM 199 HEPES modificado (Sigma-aldrich),

suplementado com heparina, porém Baldassarre (2021) utiliza 10 UI/ml de heparina, 25µg/ml de gentamicina e 0,1% de álcool polivinílico ou albumina de soro bovino (BSA), como meio de aspiração, onde folículos a partir de 2mm são aspirados.

De acordo com Souza-Fabjan *et al.* (2019), a técnica de *Laparoscopic Ovum Pick-up* (LOPU) ou aspiração folicular por laparoscopia é mais vantajosa em relação a laparotomia por ser um procedimento menos estressante e menos invasivo, levando a uma recuperação mais rápida, com procedimento mais célere, podendo ser concluído em 10 a 20 minutos, tendo ainda os benefícios de diminuir o sofrimento dos animais e não alterar o desenvolvimento do complexo cumulus oócito, não gerando também alterações como aderências e fibroses, dando a LOPU seu caráter minimamente invasivo.

3.2.4 Classificação dos oócitos

Em sequência descrita por Mendes *et al.* (2018), após o procedimento de aspiração, o líquido folicular com os CCO's é filtrado, lavado (2x) e mantido em solução PBS, com 25 UI/ml de heparina sódica a 37°C e depositado em placa Petri, que será visualizada ao estereomicroscópio. Após todo o procedimento de limpeza do aspirado, os CCO's são classificados quanto ao aspecto do citoplasma e as células do cumulus, da seguinte forma: Grau 1, cumulus compacto com múltiplas camadas e citoplasma oocitário finamente granulado; Grau 2, cumulus com 1 a 3 camadas de células e citoplasma finamente granulado; Grau 3, cumulus incompleto ou com células ausentes e citoplasma heterogêneo; e Grau 4, apresentando um oócito disforme e citoplasma heterogêneo, apresentando apoptose.

3.2.5 Transferência de Embrião pós PIV

Segundo o que foi preceituado por Baldassarre (2021), as técnicas de TE utilizadas na PIV ainda são rodeadas de controvérsias quanto à idade e o local de deposição do embrião, onde o embrião precoce (4 células) pode ser transferido para o oviduto, dois dias após serem fertilizados *in vitro*, ou embriões mais desenvolvidos (mórula/blastocisto) transferidos para o útero, após 6 dias de cultivo. Entretanto ainda é ponderado o melhor aproveitamento de uma cultura mais longa, que torna o

embrião mais apto à transferência, inclusive pós-criopreservação, onde no congelamentos blastocistos alcançam melhores taxas de preservação.

Para a implantação do embrião opta-se pela laparotomia, onde uma pequena incisão de 2cm serve para expor o corno uterino. Posteriormente uma agulha romba de 18G é usada para perfurar a estrutura e com um cateter Tomcat os embriões são liberados na luz do oviduto, para embriões precoces e, para embriões mais desenvolvidos, a transferência se faz na luz cornual, ipsilateral a presença de pelo menos um corpo lúteo, que deve ser observado com antecedência por laparoscopia (BALDASSARRE, 2021).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do que foi apresentado nesta revisão de literatura, observa-se que os protocolos hormonais e seus resultados encontram-se com muitas variações, contudo, em média, estes resultados tem se demonstrado satisfatórios, quanto às espécies envolvidas. No que concerne ao método de coleta de embriões, é comprovado que a indicação da coleta não cirúrgica em cabras é benéfica, por evitar ocorrência de problemas pós-cirúrgicos, como aderências, fibroses e riscos inerentes a cirurgias mais invasivas, além de possibilitar maior aproveitamento da doadora. Em decorrência das dificuldades em transpor a cérvix das ovelhas, este método requer mais estudos. Quanto a PIV, os resultados para caprino-ovinocultura carecem de mais investimentos e estudos para alcançar resultados mais estáveis e eficientes, melhorando a competência oocitária e embrionária, além de sua resistência a criopreservação.

REFERÊNCIAS

AGOSSOU, D. J.; KOLUMAN, N. Os efeitos da monta natural e inseminação artificial usando sêmen criopreservado no desempenho reprodutivo em cabras alpinas. **Arquivos Criação de Animais**, v. 61, n. 4, pág. 459, 2018.

ALKAN, K. K. *et al.* Multiple ovulation and embryo transfer during the breeding season in Angora goats: A comparison of fresh and vitrified-thawed embryo transfer. **Veterinary Reserch Forum**, v. 12, n. 2, p. 143-148, 2021.

ARRAIS, A. M. **Production and recovery of embryos by non-surgical method in Morada Nova ewes**. Thesis (Doctor in Veterinary Medicine). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021, 75p.

BALDASSARRE, H. Laparoscopic Ovum Pick-Up Followed by *In Vitro* Embryo Production and Transfer in Assisted Breeding Programs for Ruminants. **Animals**, v. 11, p.216, 2021.

BEVILAQUA, J. R. *et al.* Luteal Function, Biometrics, and Echotextural Attributes in Santa Inês Ewes Superovulated with Different Total Doses of Porcine Follicle-Stimulating Hormone. **Animals**, 2023.

BOMFIM, M. A. D., OVINOS DE CORTE – **NUTRIÇÃO DA MATRIZ**. 2021
<https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/criacoes/ovinos-de-corte/producao/nutricao-animal/nutricao-da-matriz>. Acessado em 12 de abril de 2023.

CARNEIRO, W. C. **Fatores que influenciam o desempenho reprodutivo e produtivo de um rebanho de caprinos leiteiros no semiárido**. Programa de Pós-Graduação em Zootecnoa – UFPB, 2018.

CIORNEI, S. G. *et al.* Ovarian response to P4-PGF-FSH treatment in Suffolk sheep and P4-PGF-PMSG synchronization in cross-bred ewes, for IVD and ET protocol. **Veterinary Medicine and Science**, v. 8, n. 2, p. 726-734, 2022.

CORDEIRO, M. F. *et al.* -Reproductive efficiency of adult and prepubertal goats subjected to repeated follicular aspiration. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 1, p. 137-144, 2014.

CRISTINE, S. **MANEJO NUTRICIONAL DE CAPRINOS E OVINOS**. 2021.
<https://www.vetjr.com/post/manejo-nutricional-de-ovinos-e-caprinos>. Acessado em 12 de abril de 2023.

FERREIRA-SILVA, J. C. *et al.* Evaluation of quality and gene expression of goat embryos produced *in vivo* and *in vitro* after cryopreservation. **Cryobiology**, v. 101, p. 115-124, 2021.

FERREIRA-SILVA, J. C. *et al.* Conceptus loss in Santa Inês ewes carrying twin pregnancies by natural mating or embryo transfer. **Theriogenology**, v. 15, n. 115, p. 94-98, 2018.

FIGUEIRA, L. M. *et al.* Preovulatory follicular dynamics, ovulatory response and embryo yield in Lacaune ewes subjected to synchronous estrus induction protocols and non-surgical embryo recovery. **Theriogenology**. 2020. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.11.004.

FONSECA, J. F. *et al.* **Técnica Embrapa de Inseminação Artificial Transcervical em Caprinos por Meio de Fixação Cervical**. EMBRAPA-CE, 2011.

FONSECA, J. F.; OLIVEIRA, M. E. F. Protocolos Embrapa para superovulação de cabras e ovelhas. **Comunicado Técnico**, n. 201, Sobral - CE, Embrapa, dez. 2020. 1ª edição. ISSN 1676-7675. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1128193>>. Acesso em: 12 Abril 2023.

FONSECA, J. F. *et al.* Freezing goat embryos at different developmental stages and quality using ethylene glycol and a slow cooling rate. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, p. 1489-1496, 2018.

FONSECA, J. F. *et al.* Non-surgical embryo transfer in goats and sheep: the Brazilian experience. **Reproduction Fertility and Development**., v. 31, n. 1, p. 17-26, 2018a.

GIBBONS, A.; CUETO, M.. Manual de inseminação artificial na espécie ovina. **INTA Bariloche** , 1995.

KHAN, S. U. *et al.* Towards Improving the Outcomes of Multiple Ovulation and Embryo Transfer in Sheep, with Particular Focus on Donor Superovulation. **Veterinary Science**, n. 9, p. 117. 2022. Doi: <https://doi.org/10.3390/vetsci9030117>

KERSHAW, C. M. *et al.* The anatomy of the sheep cervix and its influence of the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. **Theriogenology**, v. 64, p. 1225-1235, 2005.

KING, C. A. F. *et al.* Multiple ovulation and embryo transfer in sheep: Effects of embryo developmental stage and quality on viability *in vivo* under farm conditions, **Australian Veterinary Journal**, v. 100, n. 9, 2022.

LEMES, L. Q. *et al.* FISILOGIA REPRODUTIVA EM OVELHAS – BREVE REVISÃO. **Anais de Medicina Veterinária**, UCEFF, 2022.

LUO, J. *et al.* Research advances in reproduction for dairy goats. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 32, n. 8, p. 1284, 2019.

MAGALHÃES, K. A. *et al.* EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS. **Centro de Inteligência e Mercado de Caprinos e Ovinos**. CIM. Centro de Inteligência e Mercado de Caprinos e Ovinos, 2021. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/227322/1/CNPC-2021-Art-boletimCIM-16.pdf>. Acesso em: 12 de abril de 2023.

MAIA, A. L. R. S. *et al.* Embryo development is impaired in goats that are treated for hydrometra and subsequently subjected to superovulation. **Veterinary Record**, v. 187, n. 10, p. e88-e88, 2020.

MAIA, M. S.; NOGUEIRA, D. M. **Manejo reprodutivo de caprinos e ovinos em regiões tropicais – Petrolina, PE**: Embrapa Semiárido, 2019.

MENCHACA, A. *et al.* From reproductive Technologies to genome editing in small ruminants: na embryo's journey. **Animal Reproduction**. v. 15 p. 984-995. 2018 doi: 10.21451/1984-3143-AR2018-0022. PMID: 36249839; PMCID: PMC9536050.

MENDES, C. S. *et al.* Follicular response and oocyte production following variations in ovarian stimulation in goats. **Theriogenology**, v. 108, p. 88-96, 2018.

MUNTHER, A. A. *et al.* Effect of Culture Medium on *in vitro* Fertilization in Local Iraqi Ewes. **Arch Razi Institut.**, v. 77, n. 5, p. 1561-1567, 2022.

PANYABORIBAN, S. *et al.* simplified superovulation protocol using split-single administration of Folltropin®-V in hyaluronan: Application to purebred sheep. **Veterinary Medicine**. 2018.

PAZZIM, L. V. L. **Transferência de Embriões em Bovinos: Revisão de Literatura**. TCC-Graduação, UFSC, Florianópolis, 2021.

PEREIRA, R. J. *et al.* Nonsurgical embryo collection in goats treated with prostaglandin F2alpha and oxytocin. **Journal Animal Science.**, v. 76, n. 2, p. 360-3, 1998.

PINHEIRO, A. A. *et al.* **OVINOS DE CORTE – SANIDADE**. 2021.
<https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/criacoes/ovinos-de-corte/producao/sanidade>. Acessado em 12 de abril de 2023.

RAMOS, A. F.; SILVA, B. D. M. Hormonal protocols in small ruminants. In: BERGSTEIN-GALAN, T.G. *Reproduction Biotechnology in Farm Animals*. **AvidScience**, p.138-154, 2018.

ROCHA, E.; CAMARGO, L. S. A. **Produção *in vitro* de embriões bovinos, clonagem animal e apoptose**. 2021.
<https://www.alice.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1134682>. Acesso em: 12 de maio de 2023.

ROCHA, R. M. P. *et al.* Melatonina e reprodução animal: Implicações na fisiologia ovariana, **Acta Veterinária Brasileira**, v.5, n.2, p.147-157, 2011.

RODRIGUES, J. L.; BERTOLINI, M. Biotecnologias da reprodução animal: de Aristóteles à edição genética. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** , v. 43, n. 2, p. 204-208, 2019.

SALVADOR, D. F.. Quatro gerações de biotecnologias em reprodução animal. **Revista Educação Pública**, v. 19, nº 31, 26 de novembro de 2019. Disponível em: <https://educacaopublica.cecierj.edu.br/artigos/19/31/quatro-geracoes-de-biotecnologias-em-reproducao-animal>. Acesso em: 08 de maio de 2023.

SILVA, A. A. S. *et al.* Efeito do fotoperíodo sobre ruminantes. **Nutritime Revista Eletrônica**, v.15, n.3, 2018.

SOUZA-FABIAN, J. M. G. *et al.* *In Vitro* Culture of Embryos from LOPU-Derived Goat Oocytes. **Methods Molecular Biology**, p. 141-153, 2019.

TEIXEIRA, L. S. A. **Criopreservação lenta e vitrificação de oócitos ovinos na produção *in vitro* de embriões**. 2019. Dissertação de Mestrado, pelo programa de pós graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2019. Acesso em: 12 de maio de 2023. Disponível em: https://sucupira.capes.gov.br/sucupira/public/consultas/coleta/trabalhoConclusao/viewTrabalhoConclusao.jsf?popup=true&id_trabalho=7627327#

THIBIER, M.; NIBART, M. Clinical aspects of embryo transfer in some domestic farm animals. **Animal Reproduction Science**, v. 28, n. 1-4, p. 139-148, 1992.

VERGANI, G. B. *et al.* Luteotropic effects of human chorionic gonadotropin administered 7.5 days after synchronous estrous induction in Morada Nova ewes. **Animal Reproduction Science**, v..223, 2020.

WIECZOREK, J. *et al.* L-OPU in Goat and Sheep-Different Variants of the Oocyte Recovery Method. **Animals (Basel)**, v. 10, n. 4, p. 658. 2020.

ZHU, J. *et al.* Advances in *in vitro* production of sheep embryos. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 27, n. 6, 2018.