

**AVALIAÇÃO DA BISSECÇÃO DE EMBRIÕES COM O OBJETIVO DE  
ELEVAR A EFICÁCIA DA TÉCNICA DE TRANSFERÊNCIA DE  
EMBRIÕES NA ESPÉCIE CAPRINA**

**TATIANA PARENTE NAPOLEÃO DO RÊGO**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, Área de Concentração: Clínica Médico-Cirúrgica de Animais de Interesse Econômico.

Teresina  
Estado do Piauí – Brasil  
Setembro - 2005

**AVALIAÇÃO DA BISSECÇÃO DE EMBRIÕES COM O OBJETIVO DE  
ELEVAR A EFICÁCIA DA TÉCNICA DE TRANSFERÊNCIA DE  
EMBRIÕES NA ESPÉCIE CAPRINA**

**TATIANA PARENTE NAPOLEÃO DO RÊGO**

Médica Veterinária

Orientador: Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza

Co-orientador: Prof. Dr. Rômulo José Vieira

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, Área de Concentração: Clínica Médico-Cirúrgica de Animais de Interesse Econômico.

Teresina  
Estado do Piauí – Brasil  
Setembro - 2005

R343a Rêgo, Tatiana Parente Napoleão do  
Avaliação da bissecção de embriões com o objetivo de elevar a eficácia da técnica de transferência de embriões na espécie caprina. / Tatiana Parente Napoleão do Rêgo. Teresina: UFPI, 2005.  
90p.  
Dissertação (Mestrado) UFPI.  
1. Caprino-Reprodução. 2. Transferência de Embriões. 3. Bissecção. I Título

C.D.D. – 636.39

AVALIAÇÃO DA BISSECÇÃO DE EMBRIÕES COM O OBJETIVO DE  
ELEVAR A EFICÁCIA DA TÉCNICA DE TRANSFERÊNCIA DE  
EMBRIÕES NA ESPÉCIE CAPRINA

Tatiana Parente Napoleão do Rêgo

Dissertação aprovada em: 21/09/2005

---

Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza / UFPI  
Orientador

---

Prof. Dr. Rômulo José Vieira / UFPI  
Examinador interno

---

Prof. Dr. Alberto Lopes Gusmão / UFBA  
Examinador externo

## Por que viestes tão cedo?

Ainda era pequeno e indefeso, frágil e delicado. Chorava e muitas vezes eu não entendia. Pedia e muitas vezes não sabia como atendê-lo. Adoeceu e eu não tive como curá-lo. Tirou minhas noites de sono e saídas, mas passou a se acalantar em meu colo, a dormir em meus braços. Começou a sorrir quando me olhava, a ficar calmo quando de mim se aproximava, a me abraçar quando estava bem e a me abraçar também quando não estava. Sabia como me pedir socorro e mais ainda como retribuir, sabia que nossas vidas já eram uma só e que já éramos cúmplices das alegrias e preocupações que nos cercavam, já sabia que éramos *mãe e filho*.

Agora sim, José Neto, entendo porque viestes na hora certa

*Da mamãe que te ama*

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*A Deus, Supremo criador, por ter me guiado e dado sabedoria para concluir esta difícil etapa.*

*A minha mãe, Auristela Carvalho, por ser uma mãe maravilhosa e por tantas vezes, além de minha mãe, ter sido, também, mãe do meu filho. Sem você, mãe, este trabalho não existiria.*

*Ao meu pai, Joaquim Parente, exemplo de homem, profissional e, especialmente, de pai, pela dedicação, paciência, carinho e apoio incondicional.*

*Ao Alexandre, Andréa, Marina e Maristela, pela compreensão, incentivo e amizade que me fizeram conhecer desde tão cedo, o verdadeiro significado da palavra irmão.*

*Ao meu marido, Flávio Napoleão, por ser um pai fantástico, um grande amigo nos momentos difíceis e, principalmente, um homem tão carinhoso e amoroso em todos os momentos. Te amo.*

*As minhas avós, Maria Vaz Parente e Maria Carvalho, e, ao meu avô, Teobaldo Parente, que me ensinaram a importância de uma família.*

*Ao meu cunhado, Eduardo Lobão, e minha cunhada, Adriana Parente, que são para mim, verdadeiros irmãos.*

*A minha cunhada, Teresa Helena, pela atenção e apoio a mim dedicados.*

*A todos os meus cunhados, cunhadas, sobrinhos, sobrinhas e amigos que torcem por mim e se realizam com meu crescimento.*

## AGRADECIMENTOS

*Ao professor José Adalmir, meu orientador, profissional íntegro e dedicado, que me proporcionou oportunidades singulares de aprendizado.*

*Ao Regivaldo Vieira, técnico da Embrapa Recursos Genéticos-CENARGEN por me emprestar e ensinar com tanta paciência e gentileza a manipular o equipamento utilizado neste trabalho.*

*À Universidade Federal do Piauí, instituição onde concluí minha graduação, por mais esta oportunidade.*

*Ao CNPq pelo apoio financeiro.*

*Ao professor João Batista, por todas as vezes que o procurei e fui recebida com um sorriso e atenção- mesmo em momentos críticos. Meu muito obrigado.*

*Ao professor Rômulo Vieira pelos valiosos ensinamentos.*

*Ao Luís, secretário do Mestrado, que sempre me atendeu com paciência.*

*A Fazenda Santo Antônio, na pessoa do Sr. Valter Alencar e Valter Neto por aceitarem o desafio, terem acreditado nesta pesquisa, abrindo as portas de sua propriedade para realização deste trabalho.*

*Aos Médicos Veterinários Maria Vitória e Domingos Ribeiro, que me ajudaram em toda esta jornada, sem vocês tudo seria muito difícil.*

*A todos os funcionários da Fazenda Santo Antônio, que não mediram esforços para ajudar e participaram de forma incansável e dedicada neste trabalho.*

*Ao amigo Leonardo por me atender carinhosamente, ajudando a conseguir parte da literatura utilizada.*

*Ao amigo João Mendes por me ceder o material necessário para meu treinamento.*

*Ao Sinevaldo por me ajudar com a confecção das fotos apresentadas neste trabalho.*

*Aos colegas do Mestrado, em especial Dêmis, Paull, Raimundo, Rômulo, Ezequiel, Augusto, Clara e Aline, que com amizade e bom humor tornaram as horas de pesquisa mais agradáveis; e Sônia, Lidiana e Romualdo pela amizade.*

*Ao professor-amigo Nicodemos, pelo apoio e colaboração.*

*A todos os professores do Curso de Mestrado pelo aprendizado proporcionado.*

*Aos funcionários do CCA por tornarem esta casa melhor.*



*Devemos aprender durante  
toda a vida, sem imaginar  
que a sabedoria vem com a  
velhice.*

*Laquete*

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>xiii</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>xiv</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xv</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>19</b>
2.1. Transferência de embriões em caprinos .....	19
2.1.1. Seleção de doadoras e receptoras .....	21
2.1.2 Seleção de reprodutores.....	24
2.1.3. Sincronização do estro entre doadoras e receptoras.....	24
2.1.4. Superovulação das doadoras .....	27
2.1.5. Cobertura e fecundação das doadoras.....	30
2.1.6. Desenvolvimento embrionário.....	32
2.1.7. Colheita de embriões .....	34
2.1.7.1. Por laparotomia.....	35
2.1.7.2. Por laparoscopia .....	36
2.1.7.3. Por via transcervical.....	38
2.1.8. Avaliação das estruturas colhidas.....	40
2.1.9. Inovulação.....	42
2.1.10. Fatores que afetam a sobrevivência de embriões transferidos..	44

2.1.11. Diagnóstico de gestação.....	47
2.2. Bissecção de embriões.....	48
<b>3. CAPITULO ÚNICO .....</b>	<b>52</b>
3.1. Resumo.....	52
3.2. Abstract.....	53
3.3. Introdução.....	54
3.4. Material e Métodos .....	56
3.5. Resultados e Discussão .....	63
3.6. Conclusões .....	74
3.7. Referências Bibliográficas.....	74
<b>4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>78</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

**°C** - Graus Celsius

**CIDR** – Dispositivo Intravaginal de Droga Interna Controlada

**eCG** – Gonadotrofina Coriônica Eqüina

**FGA** - Acetato de Fluorogestona

**FSH** – Hormônio Folículo Estimulante

**FSHc** – Hormônio Folículo Estimulante de origem caprina

**FSHo** – Hormônio Folículo Estimulante de origem ovina

**FSHp** - Hormônio Folículo Estimulante de origem porcina

**g** - gramas

**GnRH** - Hormônio Liberador de Gonadotrofinas

**hCG** – Gonadotrofina Coriônica Humana

**IA** - Inseminação Artificial

**IETS** – Sociedade Internacional de Transferência de Embriões

**LH** – Hormônio Luteinizante

**MAP** - Acetato de Medroxiprogesterona

**MHz** - Megahertz

**mg** - Miligrama

**ml** – Mililitro

**mm** - milímetro

**n°** - Número

**PGF<sub>2α</sub>** - Prostaglandina F<sub>2α</sub>

**PMSG** – Gonadotrofina Sérica da Égua Prenha

**SRD** - Sem Raça Definida

**TE** – Transferência de Embriões

**UI** - Unidades Internacionais

**US** – Ultrassom

**χ<sup>2</sup>** – Qui-quadrado

**µg** - Micrograma

## LISTA DE TABELAS

### ❖ CAPÍTULO ÚNICO:

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1.</b> Ocorrência de gestação em receptoras inovuladas com embriões inteiros e biseccionados .....	64
<b>Tabela 2.</b> Ocorrência de gestação em receptoras inovuladas com embriões em estágio de mórula, inteiros e biseccionados	65
<b>Tabela 3.</b> Ocorrência de gestação em receptoras inovuladas com embriões em estágio de blastocisto, inteiros e biseccionados .....	66
<b>Tabela 4.</b> Número de produtos diagnosticados aos 30 – 45 dias de gestação a partir da inovulação de embriões inteiros e biseccionados .....	68
<b>Tabela 5.</b> Número de produtos diagnosticados aos 30 – 45 dias de gestação a partir da inovulação de embriões em estágio de mórula, inteiros e biseccionados .....	69
<b>Tabela 6..</b> Número de produtos diagnosticados aos 30 – 45 dias de gestação a partir da inovulação de embriões em estágio de blastocisto, inteiros e biseccionados .....	70
<b>Tabela 7.</b> Número de produtos diagnosticados aos 30 – 45 dias de gestação a partir da inovulação de embriões em estágio de blastocisto, biseccionados, qualidade 1 e 2. ....	71
<b>Tabela 8.</b> Influência da sincronização entre receptoras e doadoras sobre o desenvolvimento de embriões biseccionados e inteiros .....	72

## LISTA DE FIGURAS

### ❖ CAPITULO ÚNICO:

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Micromanipulador de embriões composto por dois braços apoiados sobre uma base adaptada a uma lupa estereomicroscópica.....	59
<b>Figura 2.</b> Detalhe dos braços do micromanipulador.....	59
<b>Figura 3.</b> Seqüência da confecção artesanal da micropipeta de sucção.....	60
<b>Figura 4.</b> Seqüência da bissecção de um embrião .....	61

## **AValiação DA Bisseção DE Embriões COM OBJETIVO DE ELevar A EFicácia DA TéCNICA DE TRANSFERêNCIA DE EMBRIões NA ESPéCIE CAPRINA**

Autor: TATIANA PARENTE NAPOLEÃO DO RÊGO

Orientador: Prof. Dr. JOSÉ ADALMIR TORRES DE SOUZA

### **RESUMO**

A bissecção de embriões permite produzir animais geneticamente idênticos. Em programas de transferência de embriões, possibilita elevar o número de embriões viáveis de doadores de alto valor genético. Objetivou-se, neste trabalho, avaliar a utilização da bissecção em programas de transferência de embriões em caprinos. Utilizou-se 17 doadoras, sincronizadas com progesterona e superovuladas com 250 UI de FSH/LH. Das 92 estruturas recuperadas, 48 (mórulas ou blastocistos) de grau de qualidade 1 ou 2 foram utilizadas. De cada três embriões obtidos de uma doadora, um foi bisseccionado e as metades inovuladas na mesma receptora. Embriões inteiros foram inovulados aos pares. Para bissecção, utilizou-se um micromanipulador composto por dois braços apoiados sobre uma base adaptada a uma lupa. Das 16 receptoras inovuladas com embriões inteiros, nove (56,25%) apresentaram prenhez, sendo três gestações duplas (37,50% do total dos embriões transferidos). Das 16 que receberam hemi-embriões, quatro (25,00%) apresentaram gestações simples e uma (6,25%) dupla (totalizando 37,50% dos embriões transferidos). Não foi evidenciado diferença estatística significativa entre os grupos. Embriões partidos em estágio de mórula, independente do grau de qualidade, não resultaram em gestação. Em estágio de blastocisto obteve-se índice de 100,00% para os de qualidade 1. Conclui-se que o estágio de mórula não é indicado para bissecção em caprinos e que quando bisseccionados embriões em estágio de blastocisto, qualidade 1 a técnica se mostrou eficaz para elevar os índices gestacionais em programas de transferência de embriões em caprinos.

**PALAVRAS-CHAVE:** bissecção, caprino, embrião

## EVALUATION OF EMBRYOS BISECTION SO AS TO INCREASE EFFICACY OF EMBRYO TRANSFER TECHNIQUE IN CAPRINE

Author: TATIANA PARENTE NAPOLEÃO DO RÊGO  
Coordinator: Prof. Dr. JOSÉ ADALMIR TORRES DE SOUZA

### ABSTRACT

The bisection of embryos makes it possible for genetically identical animals to be produced. In embryo transference programs it makes it possible to increase the number of viable embryos from high genetic value donators. The goal of this assignment was to evaluate the use of bisection in embryo transference programs in caprine. Seventeen donators were synchronized with progesterone and super ovulated with 250 UI of FSH/LH. From the 92 recovered structures, 48 (morula or blastocyst) of quality degree 1 and 2 were used. Of each three obtained embryos degree 1 or 2, one was bisected and the halves were put into the same recipient. Integral embryos were ovulated in pairs. For the bisection a micromanipulator was used composed with two arms fixed to a basis adapted to a magnifying glass. From the 16 recipients ovulated with entire embryos, nine (56.25%) got pregnant, three with two embryos (37.50% of the transferred embryos total). From the 16, which received hemi-embryos, four (25%) presented simple pregnancy and one (6.25%) presented double pregnancy (totalizing 37, 50% of the transferred embryos). There was no evidence of significant statistical difference amongst the groups. Parted embryos while morula, regardless of quality degree, did not result in pregnancy, but, while blastocyst, the obtained index was 100% for quality 1 structures ( $P < 0,05$ ). It can be concluded from the data that the morula stage is not indicated for bisection in caprine, and when bisected blastocyst degree 1, the technique proved to be efficient to raise the pregnancy index in embryo transference programs in caprine.

**Key words:** bisection, caprine, and embryo.



## 1. INTRODUÇÃO

O primeiro animal domesticado pelo homem capaz de produzir alimentos foi a cabra, há cerca de dez mil anos. Desde então, tem acompanhado a história da humanidade, conforme atestam os relatos históricos, mitológicos e até bíblicos, que mencionam os caprinos. Uma variedade de produtos é originada desta espécie, como: leite, carne, couro e esterco, além de sua utilização como animal de tração (RIBEIRO, 1997).

A caprinocultura é uma prática pecuária de grande importância em todo o mundo, principalmente em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento devido à capacidade de adaptação da espécie a diferentes condições ambientais e a situações edafoclimáticas adversas, permitindo que estes animais produzam, em locais onde outras espécies dificilmente sobreviveriam (GUSMÃO et al., 2003).

Na região Nordeste do Brasil, a caprinocultura é desenvolvida, basicamente, em sistema de criação extensivo. Esta criação representa uma das principais atividades econômicas das áreas mais secas da região, sendo a carne e o leite de caprinos, fontes de proteína animal para as populações de baixa renda. A venda de animais vivos e/ou peles constitui fonte adicional de recursos (MEDEIROS et al., 1994).

A criação de caprinos vem se desenvolvendo nos últimos anos a população mundial é da ordem de 783 milhões de cabeças, sendo o rebanho da América do Sul possuidor de 20,7 milhões de caprinos,

correspondendo a 2,7% da população mundial. O rebanho brasileiro é o maior, com 9,1 milhões de animais, seguido pela Argentina, com 4,2 milhões de cabeças e pelo Peru, com 1,9 milhões (FAOSTAT data, 2005).

O rebanho nacional tem predomínio numérico na região Nordeste que concentra 93% do efetivo em criação de caprinos, possuindo, a Bahia, o maior rebanho com 3.572.318 cabeças, seguida pelo Estado de Pernambuco com 1.511.906, e o Piauí com um efetivo de 1.427.556 animais (IBGE, 2003). Estes dados caracterizam a concentração destes animais em regiões secas, onde outras espécies têm dificuldades de adaptação.

Apesar do importante crescimento e de sua contribuição para o aumento da disponibilidade de produtos de origem animal, no Brasil, a maior parte do rebanho caprino é formada por animais sem raça definida (SRD), que apresentam baixa produtividade, caracterizada por uma deficiente capacidade reprodutiva e elevada mortalidade das crias. Estes fatores são agravados, ainda, pela dificuldade de investimento e/ou aceitação de tecnologias por parte dos produtores, além do uso de mão-de-obra desqualificada. Condições que limitam a exploração econômica desta espécie, levando a necessidade de intensificação dos sistemas de produção, que segundo Machado et al. (1996) deve-se associar melhoria nas condições criatórias ao uso de animais geneticamente superiores.

O uso de biotécnicas nas áreas de melhoramento genético, a adoção de um manejo mais eficiente na nutrição, na saúde, principalmente profilática, e na reprodução, que objetivem maximizar o potencial dos indivíduos, irão permitir que a espécie caprina melhor contribua para o desenvolvimento sócio-econômico regional, fornecendo carne, pele, leite e derivados de forma satisfatória, qualitativa e quantitativamente.

Dentre as biotécnicas disponíveis para acelerar o melhoramento genético, estão a inseminação artificial (IA), que associada ou não à sincronização do estro proporciona grande avanço genético, e a transferência de embriões (TE), que favorece a disseminação rápida de animais geneticamente superiores. A técnica, além de elevar a produtividade desses animais, quando associada a criopreservação e a bissecção de

embriões, disponibiliza a produtores, técnicos e à sociedade em geral, as possibilidades de vencer as barreiras do tempo e do espaço, tornando-se procedimento de grande importância (SIMPLÍCIO e SANTOS, 2000).

O domínio da transferência de embriões permitiu avançar para novas áreas da investigação científica, como as técnicas de micromanipulação e cultura de embriões, que possibilitam a obtenção de animais de interesse científico, econômico e zootécnico. A micromanipulação, oferece várias opções de pesquisa: transferência de genes para obtenção de animais transgênicos, estudo da relação entre núcleo e citoplasma, determinação do sexo, micromanipulação de blastômeros e bissecção de embriões, esta última, para a obtenção de gêmeos idênticos, é a opção mais viável (BEM et al., 1987).

A bissecção consiste na divisão de embriões, através de micromanipulação, obtendo-se produtos geneticamente iguais, chamados *gêmeos monozigóticos*, ou *gêmeos verdadeiros*. O nascimento de *gêmeos monozigóticos* é desejável, seja para aumentar o efetivo do rebanho ou para estudos experimentais em fisiologia da reprodução e genética, uma vez que possuem o mesmo patrimônio genético (BEM, 1989).

A perspectiva de utilização desta biotécnica é extremamente importante devido à capacidade de maximizar a eficiência em programas comerciais de TE, por permitir elevar o número de gestações por colheita.

Objetivou-se, com este trabalho, avaliar a capacidade de aumentar o número de produtos na espécie caprina a partir de embrião original, através da utilização da técnica de bissecção e transferência imediata dos hemi-embriões para as receptoras.

Este trabalho está apresentado como capítulo único, intitulado “Avaliação da bissecção de embriões visando elevar a eficácia da técnica de transferência de embriões na espécie caprina”.

O capítulo está redigido na forma de artigo científico com *resumo*, *summary*, *introdução*, *material e método*, *resultado e discussão* e *conclusão*, obedecendo às normas da Revista Brasileira de Reprodução Animal, à qual será submetido para publicação.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Transferência de embriões em caprinos**

A transferência de embriões (TE) é uma biotécnica que consiste na superovulação, retirada de embriões de fêmeas denominadas doadoras e sua transferência para animais de menor valor econômico e genético, as receptoras. (RIBEIRO, 1997).

O termo transferência de embriões engloba o conjunto de atividades necessárias para que os embriões sejam colhidos do útero das doadoras e depositados no útero das receptoras para completarem o período de gestação. Tem como principal finalidade aumentar o número de produtos de animais geneticamente superiores sem risco de transmissão de doenças infecto-contagiosas (REICHENBACH et al., 2002). Assume potencial similar para as espécies caprina, ovina e bovina, podendo ser utilizada na pesquisa, no melhoramento genético, na conservação de animais com risco de extinção, na produção de animais livres de patógenos, na formação de um banco de germoplasma e como base fundamental para o desenvolvimento de outras tecnologias (FOOTE et al., 1987).

A idéia de fazer uma fêmea desenvolver um embrião colhido de outra da mesma espécie é bastante antiga e os coelhos foram os animais selecionados por Heape em 1890 para realizar a primeira TE do mundo (REICHENBACH et al., 2002). Nos pequenos ruminantes domésticos, a TE foi realizada pela primeira vez na década de 30 por Warwick, Berry e

Horlacher (apud ANDRIOLI-PINHEIRO, 1993), ao estudarem a razão pela qual as coberturas entre caprinos e ovinos nunca resultaram em gestação a termo. Para isto, transferiram embriões caprinos para o útero de ovelhas e vice-versa e não obtiveram nascimentos.

No Brasil, as primeiras experiências em caprinos foram realizadas na década de 80, com embriões a fresco no estado de Minas Gerais (CHOW et al., 1986). Os autores transferiram cinco embriões da raça Branca Alemã para duas receptoras mestiças e obtiveram uma prenhez, mas que redundou no abortamento de dois fetos no 130º dia de gestação de uma receptora que havia recebido dois embriões. No entanto, o nascimento de animais viáveis de transferência a fresco só foi descrito no Brasil em 1989, no Estado do Paraná (SIMPLICIO e SANTOS, 2000).

Na Região Nordeste, o nascimento de crias caprinas oriundas de transferência a fresco foi registrado em Pernambuco por Wischral et al. (1989). Os autores utilizaram 11 cabras SRD, sendo quatro doadoras e sete receptoras. A colheita e inovulação foram realizadas pelo método cirúrgico. A média de embriões viáveis foi de  $7,75 \pm 4,99$ , sendo transferido um embrião para cada corno uterino das receptoras. Destas, três ficaram prenhes, resultando em dois cabritos saudáveis e um natimorto.

A técnica de TE tem um sentido bem mais amplo que a simples deposição do embrião no útero da receptora. A alteração em qualquer uma das etapas necessárias para sua realização, que vão desde a escolha do animal doador de embriões até sua inovulação no novo útero e posterior nascimento dos produtos, pode levar a resultados insatisfatórios.

Dentre os fatores que podem influenciar os resultados da TE estão: a raça; o manejo, em especial da nutrição, da saúde e reprodutivo; a variação individual de doadoras e receptoras à sincronização do estro e ovulação; a resposta dos ovários às gonadotrofinas; técnicas de colheita e inovulação, a habilidade profissional; o estágio de desenvolvimento embrionário; a regressão precoce de corpos lúteos; o número de embriões transferidos e de corpos lúteos da receptora; a condição reprodutiva da receptora; a sobrevivência embrionária (OLIVEIRA, 1992; PEGORARO-

RUMPH et al., 1992; ANDRIOLI-PINHEIRO, 1993; ARAUJO, 1994; TRALDI et al., 1995; LIMA et al, 1996; SIMPLÍCIO et al., 1998).

### **2.1.1. Seleção de doadoras e receptoras**

É um dos pontos críticos da TE devido a obrigatoriedade de utilizar-se animais sem distúrbios reprodutivos, com ciclo estral regular, bom estado nutricional e com avaliação clínico-geral realizada freqüentemente, para evitar a inclusão de animais com alterações no sistema locomotor, digestivo, linfático, urinário, e, principalmente, no trato reprodutivo (REICHENBACH et al., 2002).

As fêmeas a serem utilizadas como doadoras de embriões precisam ser avaliadas sob diversos aspectos, pois o programa acelera muito a reprodução das mesmas, tornando-se fundamental não apenas selecionar bem as doadoras para não reproduzir problemas, como também padronizar critérios de acompanhamento destes animais durante todo o processo. No que se refere às receptoras, o índice de nascimento de crias saudáveis por animal inovulado é um componente fundamental neste tipo de programa, o que as torna merecedoras de atenção especial, pois delas depende o sucesso final da transferência de embriões.

De acordo com Fernandes (1999), em programas de TE, geralmente, tem-se um cuidado extremado com as doadoras e relega-se as receptoras a um segundo plano, porém, um dos principais pontos de estrangulamento dessa tecnologia diz respeito a taxa de gestação das receptoras, após a transferência de embriões classificados como morfológicamente viáveis.

Animais púberes, que ainda não gestaram, podem ser incluídos em programas de transferência de embriões como doadoras desde que tenham adquirido massa muscular representativa de seu peso adulto e apresentem desenvolvimento anatomo-fisiológico que permita a realização dos procedimentos necessários para a colheita dos embriões. A utilização destes animais é estimulada porque reduz o intervalo entre gerações e

acelera o melhoramento genético. Deve-se atentar para a dificuldade em introduzir o cateter de colheita por via transcervical, que pode comprometer a eficiência da TE em algumas ocasiões (REICHENBACH et al., 2002).

Os aspectos zootécnicos, reprodutivos, nutricionais e sanitários devem ser minuciosamente observados quando da elaboração de um programa de TE, pois, tanto podem contribuir como prejudicar, em parte ou em conjunto, o desenvolvimento do procedimento.

O aspecto zootécnico é um parâmetro importante que necessita uma criteriosa avaliação no momento da seleção das doadoras, haja vista a influência genética que exercerão nas próximas gerações. Por ser a transferência de embriões uma atividade comercial, é fundamental proporcionar retorno ao capital investido na implantação do programa, fazendo-se necessário que as doadoras estejam dentro dos padrões determinados pelas associações das respectivas raças e possuam registro nas associações de criadores. Esses animais devem possuir produção média superior a da população, sendo dada atenção especial às características da raça e de sua aptidão (REICHENBACH et al., 2002).

O controle sanitário deve ser rigoroso. Tanto doadoras quanto receptoras devem ser oriundas de propriedades com rebanhos hígidos, sem relatos, pelo menos nos últimos seis meses, de doenças infecto-contagiosas e, ao chegarem na nova propriedade, devem ser vacinadas contra as doenças infecto-contagiosas existentes na região. Endo e ecto-parasitoses, devem ser combatidas (REICHENBACH et al., 2002). A avaliação do estado de saúde deve ser feita por exames clínicos e laboratoriais, quando da aquisição de animais, estes devem permanecer em quarentena antes de serem incorporados ao programa. Sempre que possível, o proprietário deve preparar seu próprio rebanho de receptoras, pois, assim, conhecerá seu histórico, evitando a introdução de novos animais e, conseqüentemente, de novas doenças.

O aspecto reprodutivo, pela sua importância, requer um exame ginecológico minucioso, atentando para possibilidade de infecções, inflamações e mal-formações do sistema reprodutor. Fatores como o

intervalo entre partos, a repetição ou mesmo, ausência deaios, abortos, ajudam a identificar possíveis enfermidades.

No que se refere ao aspecto nutricional, é importante frisar que nutrição e reprodução possuem estreitos laços em qualquer sistema de produção. A nutrição é responsável pela expressão e funcionamento de rotas metabólicas que permitirão ao animal expressar todo seu potencial produtivo e reprodutivo (FERNANDES, 2003).

A deficiência nutritiva em fêmeas reduz o aparecimento da puberdade, secreção de hormônios, incidência de estro, taxas de ovulação e prenhez (RHIND, 1992). Leite e Stuth (1995) afirmaram que a deficiência de proteína e/ou energia retarda o crescimento e a puberdade, reduzindo a fertilidade.

A correlação positiva entre a condição de nutrição das doadoras e receptoras sobre o desempenho reprodutivo foi comprovada por Oliveira (1992), ao evidenciar a importância da suplementação energético-proteica sobre o número de fêmeas que respondeu ao tratamento superovulatório e a taxa de ovulação. Mani et al. (1994) ressaltaram que a subnutrição das receptoras caprinas pode afetar negativamente a porcentagem de gestação e a sobrevivência dos embriões.

Para as receptoras são considerados os mesmos aspectos referidos às doadoras, à exceção do zootécnico/genético, por ser dispensável uma definição de padrão racial. Outros aspectos a considerar referem-se ao bom desempenho reprodutivo, habilidade materna, produção leiteira e ausência de defeitos nos aprumos e cascos (BONDURANT, 1986). Deve ser lembrado que os animais precisam ser identificados de forma clara, durável e visível para evitar manejo desnecessário dos mesmos.

Em razão de sua importância, merece ser enfatizado que as condições sanitárias das doadoras, das receptoras e do próprio embrião sobre os resultados de um programa de transferência de embriões, são reconhecidas em todo o mundo. No Brasil, Simplício e Santos (2000) relataram a eficácia desta técnica para o controle da introdução de doença em região indene ao usar embriões criopreservados.



### **2.1.2. Seleção de reprodutores**

Da mesma forma que as doadoras e receptoras, os reprodutores devem receber todos os cuidados sanitários e nutricionais. A escolha de um macho para a reprodução deve ser acompanhada de critérios rigorosos de seleção. Tal procedimento é fundamental, tendo em vista que as qualidades e os defeitos paternos são transmitidos aos descendentes, pois o macho participa em condição de igualdade com a fêmea na formação da carga genética (MEDEIROS et al., 1994).

O animal deve ser saudável, não possuir doenças que possam ser transmitidas pela cópula ou pelo sêmen, através da IA. Seus órgãos sexuais não devem apresentar qualquer anomalia. Os testículos devem ser morfofisiologicamente normais, não deve possuir lesões prepuciais ou penianas. Deve apresentar boa libido, cascos saudáveis, bons aprumos e ausência de defeitos hereditários. É importante atentar para uma boa caracterização própria da raça desejada e aspecto de masculinidade. Sempre que possível deve-se trabalhar com animais de boa capacidade reprodutiva e fertilidade comprovada através de exame andrológico (Ibidem).

Na prática da IA é indispensável a identificação do estro e a correta aplicação do sêmen, devendo ser realizada por técnico treinado, pois seu uso incorreto pode acarretar sérios riscos e insucessos como a redução da eficiência reprodutiva do rebanho, difusão de defeitos genéticos e de doenças da reprodução (MEDEIROS et al., 1994). É importante trabalhar com uma Central de Inseminação que ofereça material genético de animais de comprovada capacidade reprodutiva e que consigam transmitir aos seus descendentes os aspectos almejados (NUNES et al., 1997).

### **2.1.3. Sincronização do estro entre doadoras e receptoras**

A sincronização do estro consiste em intervir na atividade reguladora do ciclo estral. Pode ser obtida de modo natural, através do efeito provocado pela presença do macho e, artificialmente, através de tratamento

hormonal. Tem como finalidade a concentração de estros em um curto período e programação dos partos para as épocas mais convenientes, obtendo-se animais homogêneos para o abate e racionalizando o uso da mão-de-obra (MEDEIROS et al., 1994). Permite, também, aprimorar o uso de biotécnicas como a inseminação artificial e a transferência de embriões.

No que se refere a tecnologia de transferência de embriões, a sincronização objetiva adequar os estros de doadoras e receptoras, permitindo a realização de uma programação reprodutiva mais efetiva, por tornar correspondente o estado fisiológico destes animais. O controle do estro e da ovulação é um passo fundamental para a implementação de um programa de transferência de embriões, pois torna o ambiente uterino da receptora compatível com o da doadora e, quanto maior for esta sincronia, melhor para o embrião.

A sincronização do estro pode ser alcançada através de diferentes tratamentos (LIMA et al., 1997; SANTOS et al., 1999), entretanto, na cabra, deve ser dada preferência ao tratamento de duração curta, mediante o emprego de progesterona natural ou sintética por 9 a 11 dias em associação a administração de Prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) ou seus análogos sintéticos e de Gonadotrofina Coriônica Eqüina (eCG) 48 antes da retirada da progesterona.

Para sincronização do estro de cabras, têm sido usado com êxito algumas drogas e/ou hormônios exógenos: prostaglandina e seus análogos sintéticos, como o cloprostenol; progesterona e seus análogos, entre eles, o Acetato de Medroxiprogesterona (MAP), o acetato de fluorogestona (FGA), dispositivo intravaginal de liberação de droga interna controlada (CIDR), implante subcutâneo de norgestomet (Syncro-mate B e Crestar) (SOUSA, 1999). Além desses, são usados, adicionalmente, o eCG e a Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG).

Estes produtos apresentam mecanismos de ação distintos. É fundamental o seu conhecimento para que possam ser utilizados convenientemente. A prostaglandina F<sub>2α</sub> e seus análogos provocam contrações uterinas e são luteolíticos, permitindo uma programação

reprodutiva relacionada a época da ovulação. A progesterona e seus análogos atuam regulando a extensão do ciclo estral e preparando o trato reprodutivo para a implantação do zigoto. As gonadotrofinas hipofisárias folículo estimulante e luteinizantes (FSH e LH) têm atividade estimulante do crescimento folicular, secreção de estrógenos, e estimulante da ovulação e da função do corpo lúteo (HAFEZ, 2004).

Dentre as metodologias citadas, uma das mais utilizadas no Brasil para caprinos é o protocolo de curta exposição ao progestágeno, feito com esponjas intravaginais impregnadas com 50 mg de MAP por dez dias e aplicação intramuscular de 100µg de cloprostenol (prostaglandina sintética) e 200 UI de eCG no 8º dia (MACHADO e SIMPLÍCIO, 2001).

A resposta da sincronização do estro e da ovulação pode sofrer variação por influência de vários fatores, destacando-se dentre eles fatores climáticos, estado fisiológico da fêmea, estado de nutrição e saúde dos animais, período transcorrido entre o parto e a sincronização, horário de remoção da esponja e as drogas utilizadas, assim como, suas dosagens (SIMPLÍCIO et al., 1999).

A influência do tipo de progestágeno sobre a ovulação foi avaliada por Rabelo et al. (1999), ao compararem a taxa de ovulação em cabras SRD sincronizadas com esponjas intravaginais impregnadas com 50mg de MAP e com 0,3 mg de implante auricular de norgestomet. Concluíram não ter havido diferença significativa entre os grupos experimentais, podendo ambos os progestágenos serem utilizados em programas de sincronização do estro de cabras.

Greyling e Nest (2000) testaram a eficiência de diferentes doses de progestágeno intravaginal para sincronização do estro de cabras em estação de monta e observaram que a duração do estro foi significativamente mais curta no grupo controle, quando comparada aos grupos que receberam esponjas impregnadas com 60 ou 30mg de MAP por 14 dias, mas não houve diferença significativa na taxa de gestação entre os grupos estudados. Os autores concluíram que esponjas impregnadas com a

metade da dose de MAP (30mg) foram tão eficientes para sincronizar o estro quanto as esponjas que continham 60mg de MAP.

A eficiência dos progestágenos Synchro-mate-B e CIDR, novos ou reutilizados em combinação ou não com eCG e cloprostenol foi testada por Oliveira et al. (2001). Os autores evidenciaram que não é necessário a inclusão de eCG para indução e sincronização do estro em cabras cíclicas e que tanto o implante auricular como o dispositivo intravaginal podem ser reutilizados com eficiência pelo menos uma vez.

Motlomelo et al. (2002) compararam a eficiência do MAP, FGA e CIDR para sincronizar o estro de cabras e avaliaram a taxa de fertilidade. Os autores concluíram que os três progestágenos usados apresentaram eficiências semelhantes na sincronização do estro e que não houve diferença significativa quanto a sua duração. Também não foi verificada diferença significativa quanto a taxa de gestação.

Em fêmeas jovens que ainda não atingiram o peso adulto, os dispositivos intravaginais podem causar desconforto ou reações locais, que têm como consequência respostas inflamatórias. Nestes casos, deve-se dar preferência a implantes subcutâneos (HOLTZ, 2000).

É importante lembrar que todos os métodos de sincronização do estro têm custos financeiros associados a eles. Em adição a estes, pode ocorrer, também, uma redução na fertilidade e aumento nas perdas reprodutivas. Por outro lado, nem todas as fêmeas respondem a manipulação hormonal. Em cabras, o uso repetido de eCG em conjunto ao tratamento com progestágeno, resultou em redução na fertilidade nos anos subsequentes (SCHOENIAN, 1999).

#### **2.1.4. Superovulação das doadoras**

Fisiologicamente, a taxa média de ovulação em caprinos é de dois a três ovócitos por ciclo (PINEDA, 1989). Entretanto, o número de descendentes que uma fêmea pode produzir durante a vida pode ser

extremamente aumentado, permitindo que ela fique temporariamente prenhe por repetidas vezes, recolhendo-se os embriões no início da gestação e transferindo-os para os tratos reprodutivos de outras fêmeas que completarão a gestação. O processo pode ser ainda mais ampliado se a fêmea for superovulada (HAFEZ, 2004).

A superovulação aumenta a produção de embriões normais, porém, em todas as espécies existem variações individuais nas respostas superovulatórias. Muitas doadoras não produzem embrião normal, enquanto poucas produzem grande número de embriões sem defeitos (HAFEZ, 2004).

Os tratamentos superovulatórios são utilizados nos programas de transferência de embriões para aumentar os produtos de animais de mérito superior. A resposta ovariana e a produção de embriões viáveis após a superovulação são variáveis e quando se recuperam embriões anormais, é difícil determinar se o defeito primário ocorreu antes ou após o momento da ovulação (MILLER e ARMSTRONG, 1982).

Diversos são os protocolos existentes para superovular. Apesar de não depender apenas dos hormônios utilizados, atenção especial deve ser dada à gonadotrofina usada, quanto à origem, à conservação, à dose, à via de aplicação, à praticidade de uso no protocolo e ao custo. Dentre as gonadotrofinas, o hormônio folículo estimulante de origem caprina (FSH-c), ovina (FSH-o) ou suína (FSH-p), em doses decrescentes, por um período de três a quatro dias e a gonadotrofina coriônica eqüina (eCG), em dose única, têm sido as mais utilizadas (LIMA, 1989).

Baril et al. (1989) conduziram um experimento preliminar objetivando a superovulação em caprinos com FSH homólogo. Os autores concluíram que é possível a utilização do FSH caprino no tratamento de superovulação e que outros experimentos são necessários para obtenção da dose ótima e da freqüência de administração adequada.

Ao comparar a resposta superovulatória de cabras tratadas com uma única injeção de FSH (12 mg), combinada a baixas doses de eCG (200 UI) à resposta de cabras tratadas com regime superovulatório convencional, baseado em múltiplas doses decrescentes de FSH, Batt et al.

(1993) concluíram que o protocolo que utiliza injeção única de FSH combinado com eCG pode dar resultados similares ao regime convencional, facilitando, assim, o tratamento superovulatório.

De acordo com Guzik e Niemann (1995), fêmeas superovuladas podem apresentar um alto grau de variabilidade na resposta ovulatória e uma baixa taxa de fertilização. Esta variabilidade pode ser inerente às gonadotrofinas disponíveis para uso que são conhecidas por conterem uma variação alta nas quantidades de FSH e LH.

A obtenção de um número adequado de embriões geneticamente superiores depende da superovulação conseguida mediante o emprego de gonadotrofinas exógenas. É a partir do uso desses hormônios que se possibilita o desenvolvimento de um maior número de folículos ovarianos, levando a múltiplas ovulações (SIMPLÍCIO et al., 2002).

Os princípios para indução da superovulação em caprinos são os mesmos de bovinos e baseiam-se na administração de uma gonadotrofina folículo-estimulante. A primeira gonadotrofina mundialmente utilizada para superovulação foi a gonadotrofina sérica da égua prenha (PMSG), atualmente denominada gonadotrofina coriônica eqüina (eCG), administrada um a dois dias antes da remoção do progestágeno, em uma única injeção de 1000 a 2000UI, via intramuscular, devido a sua longa meia-vida *in vivo*. Com a alta incidência de folículos não ovulados e alterações nos eventos endócrinos que resultaram em uma baixa colheita de embriões de qualidade, seu uso tornou-se restrito (FREITAS, 2003).

Desde que as preparações de FSH tornaram-se acessíveis, vários estudos comparativos com eCG foram realizados. Nesses, o FSH mostrou-se superior ao eCG em termos de ovulação, taxa de fecundação e na produção de embriões de boa qualidade (FREITAS, 2003).

Doadoras caprinas tratadas com FSH de origem suína, apesar de mostrarem melhores respostas, quando o tratamento é repetido por várias vezes, apresentam diminuição na resposta quanto à taxa de ovulação e ao número de embriões viáveis, devido a produção de anti-

corpos anti-FSH. Em contrapartida, o FSH de origem caprina ou ovina, não desencadeia resposta imunológica em caprinos (SIMPLÍCIO et al., 2002).

Cognié et al. (2003) afirmaram que a variabilidade na resposta superovulatória às preparações de FSH está relacionada ao número de pequenos folículos antrais (2-3 mm) presentes no ovário, e que o número final de embriões transferíveis é afetado negativamente pela presença de grandes folículos (> 6 mm) no início do tratamento.

Outro problema observado em caprinos é a regressão prematura do corpo lúteo, cuja conseqüência é uma baixa recuperação embrionária e má qualidade dos embriões colhidos (FREITAS, 2003).

A regressão prematura dos corpos lúteos está associada a superovulação de cabras, ocorrendo em 27% das doadoras. A baixa taxa de recuperação dos embriões pode ser conseqüência do transporte anormal dos embriões na tuba uterina (ISHWAR e MEMON, 1996).

De acordo com Tervit et al. (1983); Armstrong e Evans (1984); Oliveira (1992); Andrioli-Pinheiro (1993), a presença de corpos lúteos regredidos em caprinos (coloração pálida e tamanho reduzido) acarreta diminuição da taxa de recuperação de embriões. Como a regressão precoce dos corpos lúteos ocorre nos primeiros cinco dias após o estro e as colheitas são realizadas entre o sexto e o sétimo dia, o transporte anormal dos embriões na tuba uterina, observado como conseqüência da regressão precoce dos corpos lúteos, dificulta a chegada dos embriões ao útero, ocasionando um sério prejuízo à TE em caprinos devido à diminuição do número de embriões recuperados.

### **2.1.5. Cobertura e fecundação das doadoras**

A fecundação é o ato fisiológico, no qual entram em contato e se fundem numa única célula o espermatozóide e o óvulo, dando origem ao zigoto. De acordo com Gonzales (2002), a fecundação de doadoras pode ser conseguida através de monta natural ou inseminação artificial, com deposição do sêmen via transcervical ou diretamente no útero.

Em transferência de embriões, as fêmeas destinadas a doar os embriões, devem ser observadas para a ocorrência de estro a partir de 12 horas após a remoção das esponjas ou implantes, podendo ser artificialmente inseminadas entre 18 a 24 horas após ter sido observado o início do estro ou serem cobertas durante o período de estro. A identificação da fêmea em estro pode ser realizada por observação direta dos animais, contudo o uso de rufiões é indicado para que não haja perda do momento certo de cobertura ou inseminação artificial (SIMPLÍCIO et al., 1999).

Recomenda-se realizar a cobertura em regime de monta controlada, 10 a 12 horas após o início do estro e repeti-la obedecendo ao mesmo intervalo até a não aceitação da monta. O reprodutor deve ter seus parâmetros zootécnicos, reprodutivos, nutricionais e sanitários devidamente avaliados antes da realização da cobertura (SIMPLÍCIO et al., 1999).

A inseminação artificial é uma técnica da reprodução em que a fêmea é fertilizada pela introdução do sêmen no sistema genital sem a participação direta do macho (MEDEIROS et al., 1994). É a técnica mais importante idealizada para o melhoramento genético de animais, pois permite que o sêmen de reprodutores selecionados tenha sua capacidade de utilização aumentada através da diluição e conservação, podendo inseminar milhares de fêmeas por ano (HAFEZ, 2004).

O sêmen caprino pode ser conservado sob refrigeração a 4°C, para ser utilizado em um curto espaço de tempo, congelado a -196°C em nitrogênio líquido, o que possibilita sua utilização por um longo período de tempo, e pode ser, ainda, utilizado a fresco imediatamente após a coleta, puro ou diluído (NUNES, 2002).

A deposição do sêmen pode ser feita na vagina, na cervix (deposição cranial ou caudal) e intrauterinamente, é mais recomendada para programas de TE, a inseminação no interior do útero, por laparoscopia, 18 a 24 horas após a fêmea ter manifestado estro (SIMPLÍCIO et al., 1999).

O sêmen fresco e resfriado apresentam fertilidade mais elevada; o congelado preserva-se por um período de tempo indefinido e é de



maior aplicabilidade quando comparado ao sêmen resfriado a 4°C, cuja viabilidade máxima é de 48 horas (NUNES et al, 1997).

De acordo com Nunes (2002), a colheita do sêmen é uma técnica simples e o ejaculado deve ser rigorosamente avaliado antes de ser utilizado. Características como volume, cor, aspecto, concentração, turbilhonamento, motilidade individual progressiva e morfologia espermática devem estar dentro dos padrões normais da espécie (CBRA, 1998).

Os índices de fecundação obtidos em um programa de inseminação artificial podem variar devido a alguns fatores, sendo os principais a fertilidade dos reprodutores utilizados, os cuidados na colheita, processamento e armazenamento do sêmen, a habilidade do técnico inseminador e o manejo das fêmeas inseminadas (HAFEZ, 2004). É fundamental um acompanhamento criterioso nestas etapas para que as taxas de fecundação sejam elevadas e, conseqüentemente, as de gestação.

Após tratamento hormonal para induzir a superovulação, o transporte e a sobrevivência dos espermatozóides nas vias genitais de doadoras podem ser alterados (EVANS e ARMSTRONG, 1984). Portanto, para qualquer método de fecundação utilizado, deve-se escolher machos de fertilidade alta, a fim de otimizar a taxa de fecundação dos ovócitos.

#### **2.1.6. Desenvolvimento embrionário**

Após a fecundação e, conseqüente formação do zigoto, inicia-se um processo de sucessivas divisões celulares, denominado clivagem. Estas divisões são sincrônicas de modo que ao término de cada clivagem ocorre uma duplicação do número de blastômeros, levando ao desenvolvimento do embrião. Todavia, durante a primeira semana de desenvolvimento é observado pequeno aumento no diâmetro embrionário atribuído ao volume dos blastômeros que diminui, praticamente pela metade após as clivagens, ao mesmo tempo em que ocorre aumento gradual da força de coesão intracelular (REICHENBACH et al., 2002).

Embriões caprinos permanecem na tuba uterina até o quarto dia após a cobertura. Este tempo é necessário para permitir ao útero preparar-se para a função nutritiva. Inicialmente, ocorre divisão do zigoto em dois blastômeros, continuando a segmentação durante todo o transporte do embrião no oviduto. Em geral, quando chegam ao útero encontram-se em estágio de 16 células, denominado mórula. Até este estágio, a força de coesão entre os blastômeros não é intensa, o que permite uma separação mecânica de cada blastômero em experimentos com embriões nessa fase de desenvolvimento (FREITAS E SIMPLÍCIO, 2002b).

Do quinto ao sexto dia, com as divisões e aumento da força de coesão intracelular, os blastômeros aproximam-se mais uns dos outros, dando um aspecto compacto ao embrião chamado, neste estágio, de mórula compacta. A partir de então, os blastômeros não podem mais ser identificados individualmente. Neste estágio, apesar do tamanho externo do embrião não ter sido alterado quando comparado ao tamanho do estágio de duas células, o material genético presente já tem um aumento bastante significativo (FREITAS E SIMPLÍCIO, 2002b).

No decorrer das divisões celulares, o tamanho dos blastômeros diminui. Entre o sexto e o sétimo dia tem início a formação da blastocele e o embrião é denominado blastocisto inicial, constituído por dois tipos celulares distintos: o embrioblasto, responsável pela formação feto e o trofoblasto, que originará os envoltórios fetais (REICHENBACH et al., 2002).

O desenvolvimento da blastocele com a proliferação dos blastômeros determinam aumento do diâmetro embrionário e diminuição do espaço perivitelineo. A diferenciação celular continua, a blastocele aumenta e o embrião é denominado blastocisto (REICHENBACH et al., 2002).

É importante lembrar que neste estágio de diferenciação, o conceito é muito susceptível a efeitos externos, como drogas, doenças, radiação, que podem interromper o processo de diferenciação e resultar em deformidades, anormalidades, abortos ou absorção (SILVEIRA, 2004).

A expansão da blastocele leva ao desaparecimento do espaço perivitelineo e ao aumento do embrião que passa a ser chamado

blastocisto expandido. Nesse estágio, o embrioblasto apresenta sua massa celular presente em um dos pólos do embrião e o trofoblasto localizado perifericamente à blastocele (REICHENBACH et al., 2002).

Como consequência da expansão da blastocele, a zona pelúcida torna-se delgada e sofre aumento da tensão superficial, culminando com seu rompimento e eclosão das células embrionárias, passando a ser chamado blastocisto eclodido (REICHENBACH et al., 2002).

Após ser liberado da zona pelúcida, o embrião aumenta rapidamente de tamanho para entrar em uma fase de alongamento, neste estágio, o trofoblasto sintetiza proteínas denominadas trofoblastinas que se opõem a atividade luteolítica da prostaglandina secretada pelo útero. Com a manutenção da síntese e secreção de progesterona, o embrião irá implantar-se na parede uterina entre o 14º e o 16º dia após a fecundação, sendo considerado o período embrionário até 34 dias, e o período fetal desta data até o término da gestação (FREITAS E SIMPLÍCIO, 2002b).

Através das proteínas produzidas, o embrião assinala a sua presença no sistema materno, necessário para a manutenção do corpo lúteo, produção de progesterona e para a continuação do desenvolvimento do endométrio, que permitem o estabelecimento de uma gestação. A implantação permite que o embrião e o endométrio atinjam contato íntimo para a troca de nutrientes e a comunicação endócrina. (HAFEZ, 2004).

Conhecer a estrutura embriológica em suas distintas fases de desenvolvimento é importante para a tomada de decisões, como é o caso da determinação do dia de colheita, fundamental para a micromanipulação dos embriões.

#### **2.1.7. Colheita de embriões**

Os embriões podem ser colhidos das trompas ou do útero. Nas trompas, permanecem por três a quatro dias após o estro, migrando então para o útero. Embriões uterinos, são colhidos com maior frequência

pois quando transferidos resultam em melhores índices de gestação e podem ser congelados com mais sucesso (NEWCOMB e ROWSON, 1975).

Existem, basicamente, três técnicas de colheita de embriões em caprinos descritas na literatura: laparotomia, laparoscopia e a colheita via transcervical. Estes métodos apresentam resultados diferentes quanto ao número de embriões recuperados e aos danos causados ao sistema genital da doadora (ANDRIOLI et al., 1999).

#### **2.1.7.1. Por laparotomia**

A laparotomia é um método cirúrgico utilizado para colheita de embriões, originalmente descrito por Hunter, Adams e Rowson (1955). Consiste em uma incisão na linha médio ventral, da cavidade abdominal que permite realizar a lavagem dos ovidutos e cornos uterinos, por introdução de uma agulha hipodérmica na junção útero-tubárica e administração de uma solução de lavagem, recolhida na base dos cornos uterinos com auxílio de uma agulha, sendo a perda da solução para o corpo do útero evitada através do bloqueio obtido por pressão realizada com os dedos. Com esse procedimento os autores obtiveram uma taxa de recuperação de embriões na lavagem dos ovidutos e cornos uterinos de 57,8 e 50%, respectivamente.

A colheita por laparotomia foi a primeira a ser empregada em caprinos e apresenta boa taxa de recuperação de embriões. Porém, pode acarretar aderências ao sistema genital, comprometendo, às vezes, a vida reprodutiva do animal, o que limita o uso de doadoras de alto valor genético em repetidas colheitas (ANDRIOLI et al., 1999).

No procedimento desta técnica, os animais devem ser mantidos em jejum sólido e hídrico a partir de 24 horas antes da colheita, pois serão submetidos à anestesia geral e permanecerão em decúbito dorsal, para realização de incisão sobre a linha médio-ventral, na região ventral do abdome, à frente das glândulas mamárias.

Para Baril et al. (1989), apesar da taxa de recuperação de embriões ser maior pela laparotomia do que quando se utiliza a laparoscopia

(85% e 62%, respectivamente), esta vantagem imediata tem importância reduzida em razão da ocorrência de aderências no trato reprodutivo.

De acordo com Bari et al. (2000), todos os métodos cirúrgicos de colheita de embriões geralmente garantem mais de 80% de recuperação na primeira lavagem. Entretanto, a formação de aderências pós-operatórias pode limitar a utilização desta técnica em animais valorizados geneticamente.

Ao comparar a taxa de recuperação de embriões pelos métodos cirúrgico e transcervical em programa de transferência de embriões em caprinos da raça Boer, Silva et al. (2003) colheram, pelo método cirúrgico, 350 embriões (21,87 embriões/doadora) e, por via transcervical, recuperaram 157 embriões (7,35 embriões/doadora). Os autores concluíram que a técnica de colheita pelo método cirúrgico apresentou índice de recuperação de embriões superior a técnica transcervical.

Em caprinos, o método de colheita mais utilizado é a laparotomia, mas devido às restrições causadas pelas aderências, o uso da doadora fica limitado a um número reduzido de vezes, o que tende a tornar a laparoscopia e a colheita pela via transcervical as técnicas de preferência (PEGORARO-RUMPF et al., 1992; ANDRIOLLI-PINHEIRO, 1993).

#### **2.1.7.2. Por laparoscopia**

Técnicas não-cirúrgicas de colheita de embriões, são desejáveis sob vários aspectos: reduzem as possibilidades de formação de aderências do trato reprodutivo da doadora, há menor risco decorrente da intervenção e maior probabilidade e praticidade na recuperação repetida em uma mesma doadora (HAFEZ, 2004). Entretanto, sua prática requer equipamentos específicos e treinamento profissional, nem sempre factíveis.

A técnica de colheita por laparoscopia, descrita por Mckelvey e Robinson (1984), consiste na realização de três incisões na região ventral do abdome: uma sobre a linha média, a cinco centímetros do úbere, e as outras duas a dez centímetros de úbere e equidistantes três centímetros da

linha média. Nas duas incisões eqüidistantes são introduzidos a pinça de manipulação e o laparoscópio. Na outra, é introduzida uma agulha, denominada, *agulha de Verres* utilizada para perfuração da base do corno uterino, fixado pela pinça de manipulação. No orifício perfurado é feito a introdução de um catéter de três vias, com um balão que, inflado, impede a passagem da solução de lavagem, introduzida e recuperada pelo próprio catéter. Os autores recuperaram dois embriões, um de cada uma das duas fêmeas que apresentavam um corpo lúteo.

Este tipo de técnica requer o uso de anestesia geral e os animais devem ser contidos com a cabeça em nível mais baixo e em decúbito dorsal, em uma mesa inclinada de 30 a 60 graus, para melhor visualização do trato genital. Para facilitar o manuseio interno, a cavidade abdominal deve ser inflada com CO<sub>2</sub>.

Ao comparar a colheita e inovulação de embriões por via transcervical e por laparoscopia em cabras, Flores-Foxworth et al. (1992) constataram que a técnica de colheita por laparoscopia teve uma taxa de recuperação significativamente mais alta, contudo não encontraram diferença na taxa de gestação ao inovular embriões pelas duas técnicas.

O procedimento laparoscópico supera o problema de aderências e oferece vantagens em termos de saúde animal, mas está associado a baixas taxas de recuperação de embriões e é tecnicamente mais difícil de executar, segundo Bari et al. (2000). Estes mesmos autores compararam o procedimento de lavagem pelo método laparoscópico original a uma versão modificada, onde duas alterações foram feitas: imediatamente antes da lavagem foi inserido 10ml da solução de lavagem no cateter de Foley, para se certificar que estaria com a extremidade desobstruída; a segunda modificação foi a introdução de um procedimento de lavagem ininterrupto usando inicialmente 30ml do meio de lavagem, posteriormente, 30ml de ar e, 30ml do meio, novamente. Os autores conseguiram um aumento na taxa de recuperação de embriões de 69% no método original, para 83% quando realizado o procedimento modificado.

Andriolli et al. (1999) compararam a eficiência e o efeito de consecutivas colheitas de embriões na espécie caprina pelos métodos de laparotomia, laparoscopia e transcervical. As taxas médias de recuperação de embriões foram 27,3, 81,1 e 57,1%, respectivamente, mostrando ser o método da laparoscopia o mais eficiente na recuperação de embriões. Com base nos danos causados ao sistema genital das doadoras após a segunda colheita, os autores concluíram que a técnica laparoscópica e a transcervical permitem o uso de doadoras em repetidas colheitas, o que não ocorre com a colheita por laparotomia que causa aderência no sistema genital e órgãos circunvizinhos em 100% dos casos.

### **2.1.7.3. Por via transcervical**

A colheita de embriões em cabras, que até recentemente era realizada predominantemente pelo método cirúrgico ou laparoscópico, limitando o número de vezes que uma doadora pudesse ser utilizada, devido ao estresse e formação de aderências, obteve um significativo avanço após a introdução da técnica de colheita transcervical (GUSMÃO et al., 2003).

Em caprinos, a primeira colheita de embriões pela via transcervical foi realizada por Bondurant et al. (1984). Os autores dilataram a cérvix das doadoras com um expansor cervical denominado Laminaria Japonica, utilizado em obstetrícia humana para curetagem uterina. O procedimento de lavagem foi realizado com os animais em estação, sob anestesia epidural. Nos oito animais testados, a passagem do cateter através da cérvix foi conseguida sem grandes dificuldades, mas embriões foram recuperados de apenas duas doadoras.

Com o objetivo de colher embriões em caprinos, minimizando as seqüelas da laparotomia, Oliveira et al. (1991) realizaram colheita pelo método transcervical, e recuperaram 68,5% das estruturas e 89,7% do líquido utilizado para lavagem, e concluíram que a colheita de embriões por via transcervical apresentou resultados satisfatórios.

Pereira et al. (1991) utilizando pinças de Allis para tracionar a cérvix até o vestíbulo vaginal, com o objetivo de facilitar a passagem do cateter de Foley, obtiveram uma taxa de recuperação embrionária de 39,6%.

Suyadi et al. (2000) realizaram colheitas de embriões pela via transcervical baseados na técnica descrita por Pereira et al. (1996), com algumas modificações: usaram um dispositivo para conter a doadora durante a lavagem, com cateter desprovido de balão e um orifício mais amplo foi feito para drenar o meio de lavagem, realizada de forma ininterrupta. Os autores fizeram uso de prostaglandina F<sub>2α</sub> em dois momentos distintos que antecederam a coleta: oito e 24 horas. Os resultados obtidos foram redução no número de pessoas necessárias para contenção das doadoras e minimização do estresse dos animais, assim como redução no tempo gasto para as colheitas e aumento na taxa de recuperação de embriões.

Segundo Suyadi et al. (2000), cabras nulíparas, mesmo apresentando desenvolvimento corporal máximo, mostram taxas de recuperação de embriões insatisfatórias em colheitas pela via transcervical.

O desenvolvimento de técnicas menos invasivas para colheita e inovulação de embriões, tornou-se uma necessidade devido às repetidas colheitas cirúrgicas no mesmo animal contribuírem para a redução da fecundação e da taxa de recuperação de embriões. Dessa forma, a colheita via transcervical tende a ampliar o uso da TE em caprinos tornando-se a técnica de preferência para a espécie (SIMPLÍCIO et al., 2002).

Visando melhorar a colheita embrionária por via transcervical em caprinos, Androukovitch et al. (2002) utilizaram uma sonda uretral humana. Os percentuais obtidos relativos à passagem da cérvix, embriões colhidos e volume de líquido recuperado foram 83,3%, 81,15% e 94,3% respectivamente. Os autores concluíram que a sonda uretral humana viabilizou o processo de colheita de embriões em cabras pluríparas, limitando-se sua utilização em fêmeas nulíparas ou primíparas.

Machado et al. (2002) realizaram colheitas de embriões por via transcervical em caprinos da raça Boer, utilizando sete doadoras em



duas colheitas sucessivas, recuperando uma média de 9,5 estruturas por doadora, e concluíram ser este um método prático e rápido.

Com o objetivo de verificar a taxa de recuperação embrionária por via transcervical em cabras da raça Saanen, Lima-Verde et al. (2003), superovularam 20 doadoras. A cérvix foi permeável em 61,5% das cabras e a taxa de recuperação embrionária foi de 53,2%. Os autores concluíram que a técnica mostrou-se prática e viável, contudo, deve-se buscar aperfeiçoar a passagem cervical para elevar a taxa de colheita.

### **2.1.8. Avaliação das estruturas colhidas**

Após a colheita, as estruturas devem ser avaliadas e classificadas em estereomicroscópio, utilizando-se uma pipeta para movê-las no meio de cultura a fim de examinar sua morfologia (HAFEZ, 2004).

Abe et al. (2002) afirmaram que a qualidade dos embriões é um fator determinante para o sucesso em um procedimento de transferência de embriões. Diversos métodos para avaliá-los têm sido relatados, como por exemplo: mensuração de atividade enzimática, dosagem de glicose, mancha de "live-dead", teste de exclusão de corante, que podem ser usados para prever a sobrevivência embrionária após a transferência, mas estes métodos requerem equipamento complexo e um período de cultivo prolongado do embrião *in vitro*. Desse modo, são pouco valorizados para transferência sob condições de fazenda.

Atualmente, o parâmetro morfológico, que envolve análise da forma, cor, tamanho dos blastômeros, do espaço perivitelíneo, número de células extrusadas e degeneradas tem sido amplamente usado para avaliar a qualidade dos embriões em programas de TE (ABE et al., 2002).

Como a avaliação dos embriões baseia-se em aspectos morfológicos, durante o exame, deve-se movê-los afim de observar todos os ângulos, pois alguma irregularidade pode passar despercebida em uma posição fixa do embrião (BREBION e CHESNÉ, 1995).

Etapa de suma importância, a avaliação e classificação dos embriões requer técnico bem treinado e qualificado, pois inovular embriões degenerados além de baixar o índice de prenhez, aumenta os custos da TE. Deve ser considerado, a condição da zona pelúcida, que deve estar íntegra, sem fissuras e perfeitamente esférica, garantindo a proteção do embrião. No que se refere ao dia da colheita, os embriões não devem apresentar atraso no seu desenvolvimento superior a 48 horas, caso contrário devem ser eliminados (BREBION e CHESNÉ, 1995).

Abe et al. (2002) afirmam que a classificação dos embriões, apesar de possuir nomenclatura definida, é o aspecto mais subjetivo e qualitativo de uma transferência, podendo variar de um técnico para outro.

Sistemas codificadores padronizados para uso na descrição do estágio de desenvolvimento e qualidade do embrião foram formulados e são recomendados de modo que o código para estágio de desenvolvimento é numérico, variando de 1 (oócito não fecundado ou embrião de uma célula) a 9 (blastocisto expandido eclodido). O código para a qualidade do embrião é também numérico e é baseado na integridade morfológica dos embriões, variando de 1 a 4, como segue (IETS, 1999):

# Embrião Grau 1 (Excelente ou Bom): esférico, blastômeros com forma bem definida, cor, tamanho e densidade uniformes. Embrião compatível com o estágio de desenvolvimento esperado, e com, pelo menos, 85% do material celular de massa embrionária intacta;

# Embrião Grau 2 (Regular): irregularidades moderadas na forma geral da massa embrionária ou no tamanho, cor e densidade das células individuais. Ao menos 50% do material celular deve compor uma massa embrionária viável e intacta;

# Embrião Grau 3 (Pobre): irregularidades maiores na forma da massa embrionária ou no tamanho, cor e densidade das células individuais. Ao menos 25% do material celular deve formar uma massa embrionária viável, intacta;

# Embrião Grau 4 (Morto ou Degenerado): embriões em degeneração, oócitos ou embriões de uma célula: não viáveis.

A avaliação quanto ao estágio de desenvolvimento segue as recomendações do Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS, 1999):

Embriões em qualquer estágio, de uma célula ao blastocisto eclodido, podem desenvolver-se a termo em seguida à transferência para um ambiente adequado. Porém, índices de sucesso podem ser mais baixos nos estágios iniciais ou muito tardios de desenvolvimento (HAFEZ, 2004).

Agrawal e Bhattacharyya (1982) ressaltaram que a colheita de embriões em caprinos deve ser realizada entre o 6º e o 8º dia do ciclo estral (dia do estro = dia zero) favorecendo a obtenção de embriões em estágio de mórula e blastocisto. Caso se destinem exclusivamente a criopreservação, devem ser colhidos entre o 6,5º e o 7º dia, pois a partir do 8º dia ocorre uma elevada incidência de blastocistos eclodidos, que é indesejável do ponto de vista sanitário (SIMPLÍCIO e SANTOS, 2000).

### **2.1.9. Inovulação**

Inovulação é uma palavra técnica proposta por BEATTY em 1950, que consiste na deposição do embrião no útero de uma receptora em circunstâncias semelhantes ao da doadora, por métodos cirúrgicos ou não (BEM, 1989).

Os embriões podem ser transferidos para o útero das receptoras via transcervical, por técnica de laparotomia, laparoscopia ou por semi-laparoscopia, no segundo caso, os animais devem ser anestesiados e o trato reprodutivo exteriorizado através de uma incisão na linha médio ventral que permita visualizar o corpo lúteo (ISHWAR e MEMON, 1996).

A inovulação laparoscópica foi testada inicialmente em cabras usando-se tubos de metal e de polietileno semelhantes aos usados em inseminação artificial, obtendo-se o nascimento de um cabrito a partir de seis embriões inovulados (OTSUKI e SOMA, 1964).

De acordo com Mckelvey et al. (1985), a exteriorização do trato reprodutivo para a transferência de embriões, envolve algum grau de

trauma cirúrgico e freqüentemente leva a formação de aderências pós-operatórias, com comprometimento do útero e/ou ovário. Estes fatores têm encorajado ao desenvolvimento de métodos não-cirúrgicos de transferência de embriões em receptoras, nas diversas espécies domésticas.

Em grandes ruminantes, a manipulação do trato genital pelo reto facilita a passagem do cateter contendo o embrião através do canal cervical para o útero, assim como a avaliação dos ovários. Em pequenos ruminantes, o trato genital não pode ser palpado pelo reto e a atividade ovariana não pode ser avaliada sem visualização dos ovários.

De acordo com Baril (1995) excetuando-se a transferência por via transcervical, cuja eficácia é baixa, as taxas de sucesso não diferem quando os embriões são inovulados por laparotomia ou sob controle laparoscópico. Todavia, a transferência de embriões por endoscopia é mais rápida e menos traumatizante que por laparotomia.

Baril (1995) afirmou que a taxa de sobrevivência embrionária e de parição são maiores ao inovular dois embriões por receptora quando comparado a um só, além de utilizar um menor número de receptoras.

Para Salles et al. (1996), a laparoscópica permite a visualização do ovário que contém o corpo lúteo e do local de deposição dos embriões. Os autores afirmaram, ainda, que a inovulação deve ser realizada no corno uterino ipsilateral ao ovário portador do corpo lúteo funcional, e que a técnica usada não influencia no percentual de gestação.

Para Freitas (2003), a inovulação, tem valorizado o uso de métodos não cirúrgicos por questão de bem-estar animal, além do que, o uso da semi-laparoscopia, onde apenas a parte do corno uterino que vai receber os embriões é exteriorizada, reduz o tempo para a transferência e a taxa de concepção é similar a obtida com a laparotomia.

Deve ser destacado que um dos fatores que afetam o resultado da TE é a sincronização entre o estágio de desenvolvimento do embrião e do trato reprodutivo da receptora. Em cabras, a taxa de gestação cai drasticamente se esta diferença for maior que 48 horas (HAFEZ, 2004).

Para Simplício e Santos (2000), a assincronia entre o estágio fisiológico da doadora com o da receptora não deve ser superior a 24 horas. Os autores ressaltaram, ainda, que a transferência de dois embriões por receptora resultou em maior sobrevivência que um ou três.

#### **2.1.10. Fatores que afetam a sobrevivência de embriões transferidos**

A taxa de sobrevivência dos embriões após a inovulação é próxima de 50%, porem vários parâmetros podem fazê-la variar (BARIL, 1995). Fatores como condição corporal, taxa de ovulação das receptoras, número de embriões inovulados por fêmea, inovulação uni e bilateral; qualidade morfológica dos embriões, local de inovulação e pelo sincronismo entre a idade dos embriões e a fase de preparação da receptora influenciam a sobrevivência embrionária (SIMPLÍCIO e SANTOS, 2000).

Condição corporal: É o melhor parâmetro de avaliação para definir se as fêmeas devem ou não ser submetidas à cobertura, inseminação artificial ou incorporadas a um programa de TE. A mensuração da condição corpórea consiste na atribuição de um escore, numa escala de 1 a 5, de acordo com o grau de distribuição do músculo e tecido adiposo ao longo de algumas partes do corpo (SIMPLÍCIO et al., 1999).

Animais que apresentam escores 1 e 5 devem ser descartados para fins reprodutivos, pelo menos, temporariamente, pois estas condições interferem com a fertilidade, sendo desejado para programas de TE, animais com escore corporal 3 e 4 (SIMPLÍCIO et al., 1999).

De acordo com Freitas e Simplício (2002b), a subnutrição em cabras submetidas a sincronização do estro retarda o aparecimento do estro, reduz a taxa de ovulação e influencia a sobrevivência embrionária. Mani et al. (1994) ressaltaram que a subnutrição das receptoras pode afetar negativamente a porcentagem de gestação e a sobrevivência dos embriões.

Taxa de ovulação das receptoras: A taxa de sobrevivência de embriões na raça Angorá é mais elevada quando a transferência é realizada para receptoras com dois corpos lúteos que com um só, pois, sabe-se que a

gestação da cabra é corpo lúteo dependente, isto é, a placenta não tem participação na manutenção da gestação e a presença de dois corpos lúteos acarreta no aumento nos níveis de progesterona, hormônio responsável pela manutenção da gestação. Deve-se considerar a qualidade dos corpos lúteos quanto à morfologia e à coloração (ARMSTRONG et al., 1983) .

Número de embriões inovulados por fêmea: É recomendável transferir dois embriões por receptora, sugerindo que haja um sinergismo entre os embriões, levando a um incremento nos sinais envolvidos com o processo do reconhecimento e/ou melhoria nas ações anti-luteolíticas, levando a manutenção do corpo lúteo (FREITAS E SIMPLÍCIO, 2002b).

Na época apropriada, o embrião produz proteínas para assinalar sua presença no sistema materno, necessário para a manutenção do corpo lúteo, produção de progesterona e continuação do desenvolvimento do endométrio, que permitem o estabelecimento da gestação, denominado reconhecimento materno da gestação. A fixação permite que o embrião e o endométrio atinjam um contato íntimo para troca de nutrientes e comunicação endócrina. Caso o conceito falhe em assinalar sua presença, a função do corpo lúteo termina pela ação luteolítica da prostaglandina do endométrio, fazendo com que a fêmea reinicie o ciclo. Acredita-se que a presença de dois embriões pode aumentar a quantidade de proteínas envolvidas com o reconhecimento da gestação, aumentando, assim, suas chances de sobrevivência (HAFEZ, 2004).

Inovulação uni e bilateral: Inovulação unilateral é o termo que define a transferência do(s) embrião(ões) para o mesmo corno uterino, enquanto na bilateral, há transferência de um embrião para cada um dos cornos. Esta última não contribui para a melhoria na porcentagem de sucesso em um programa de transferência de embriões, além de dificultar o processo. De acordo com Iswar e Memon (1996), a sobrevivência de embriões caprinos gêmeos transferidos é significativamente maior quando a inovulação é unilateral e que deve ser realizada no corno uterino ipsilateral ao ovário apresentando pelo menos um corpo lúteo funcional.

Qualidade morfológica dos embriões: Embriões que não possuem alteração morfológica, apresentam taxa de sobrevivência superior àquela de embriões com alterações na sua estrutura. Contudo, embriões que apresentam alterações morfológicas “leves” poderão ser transferidos a fresco (FREITAS E SIMPLÍCIO, 2002b).

Bari et al. (2003) avaliaram a influência da qualidade de embriões graus 1 a 4 transferidos a fresco, sobre a sobrevivência embrionária e concluíram que não houve diferença estatística entre a taxa de sobrevivência para embriões de qualidade 1 e 2, mas que embriões de graus de qualidade 3 e 4 tiveram taxa de sobrevivência inferior, diferindo estatisticamente quando comparados com embriões de qualidade 1 e 2.

Local de inovulação: Freitas e Simplício (2002b), ao considerarem o estágio de desenvolvimento, concluíram que embriões colhidos antes do estágio de mórula devem ser transferidos para as tubas uterinas, enquanto, aqueles com mais de 16 células devem ser inovulados no útero. Averil e Rowson (apud ISWAR E MEMON, 1996) relataram que nenhum embrião de duas células e somente 16% dos embriões ovinos de quatro células desenvolveram-se quando transferidos para o corno uterino.

Sincronismo entre a idade dos embriões e o estágio do ciclo das receptoras: Eventos associados a produção de progesterona pelo corpo lúteo e à produção de proteínas pelo embrião, resultam na inibição de PGF2 $\alpha$  pelo endométrio, fundamental para a manutenção da gestação. Portanto, quanto maior a sincronização entre o estágio fisiológico da receptora e a idade do embrião, maior será a probabilidade de sucesso da inovulação. Espera-se que ocorra um aumento na porcentagem de prenhez quando o momento do início do estro das doadoras coincide o mais próximo com o das receptoras (FREITAS E SIMPLÍCIO, 2002b).

Armstrong et al. (1982), demonstraram a importância da sincronização ao comparar a sobrevivência de embriões com a assincronia entre doadoras e receptoras. Os resultados mostraram não haver diferença quando o grau de assincronia do estro das receptoras não excedeu 24 horas, seja antes ou após o início do estro das doadoras.

### 2.1.11. Diagnóstico de gestação

O diagnóstico de prenhez dentro de um programa avançado de reprodução programada impõe-se como uma biotécnica muito importante, não apenas no aspecto zootécnico mas, também no tocante à avaliação dos custos. Existem vários métodos de diagnóstico aplicáveis aos pequenos ruminantes domésticos descritos na literatura. Entretanto, é reduzido o número dos métodos que permitem o diagnóstico precoce e, alguns são poucos práticos e exigem equipamentos sofisticados além de pessoal de alta qualificação técnico científica (SIMPLÍCIO et al., 2002).

Atualmente encontram-se a disposição vários procedimentos bioquímicos e físicos de eficácia reconhecida, dentre eles podem ser citados a biópsia vaginal, radiografia, laparotomia, laparoscopia, dosagem hormonal, determinação de antígeno específico da gestação, métodos ultra-sônicos. Existem, ainda, métodos clínicos mas não são considerados precoces, como, por exemplo, a palpação abdominal (FREITAS E SIMPLÍCIO, 2002a).

Segundo Brebion e Chesné (1995), os procedimentos que permitem o diagnóstico precoce de gestação representam um interesse especial para serem aplicados às receptoras de embriões. As tecnologias elaboradas para diagnosticar com maior certeza o estado de gestação e o número de fetos são indicadas em casos de receptoras de embriões.

Em caprinos, o diagnóstico de prenhez através da ultrassonografia (US) apresenta grande importância de ordem prática em função da limitação anatômica para a avaliação do sistema genital através da palpação retal (ANDRIOLLI et al, 1997), além de ser prático, eficaz e seguro, permite o diagnóstico já aos 21 dias após o último estro seguido da fecundação (SIMPLÍCIO et al., 2002).

Vieira (2001) realizou diagnóstico ultrassonográfico em cabras pluríparas aos 14, 21, 28 e 35 dias após a IA e concluiu ser possível visualizar a vesícula embrionária com 50% de sensibilidade aos 14 dias após a IA e identificar os batimentos cardíacos aos 21 dias e o feto aos 35 dias com 100% de sensibilidade.



Segundo Buckrell (1988), a eficiência da utilização da US para o diagnóstico de prenhez, depende: a) do tipo de transdutor (linear ou setorial); b) da frequência do transdutor (7,5; 5 ou 3,5MHz); c) do estágio da gestação; d) da região onde se realizou a varredura (retal, flanco, abdômen e inguinal); e) qualidade da imagem; e f) experiência do operador.

A introdução da US na reprodução animal, particularmente nas espécies eqüina e bovina, e, mais recentemente, caprina e ovina, permitiu o esclarecimento de muitos dos mecanismos que regulam a reprodução, tendo por base o estudo precioso da dinâmica do crescimento folicular. A utilização da US no diagnóstico de gestação e monitoramento da viabilidade do embrião e do feto, muito tem contribuído para aumentar a eficiência reprodutiva dos rebanhos. Com frequência, modernos aparelhos e acessórios são colocados à disposição dos profissionais, credenciando-os para um trabalho técnico de maior confiabilidade (NASCIMENTO, 2004).

## **2.2. Bisseccção**

Em espécies domésticas, o nascimento de gêmeos dizigóticos acontece quando mais de um óvulo é liberado sendo, então, fertilizados por diferentes espermatozóides, resultando no nascimento de gêmeos não idênticos. Casos em que um único óvulo fertilizado origina dois descendentes idênticos também podem ocorrer, levando ao nascimento dos chamados gêmeos monozigóticos (HAFEZ, 2004).

A incidência de gêmeos monozigóticos de forma natural é rara e encontra-se documentada em poucas espécies tais como a humana e a bovina; geralmente, os gêmeos monozigóticos originam-se após a implantação quando a massa celular interna diferencia-se em duas linhas primitivas, formando dois produtos idênticos (Ibdem).

A produção de gêmeos monozigóticos pode também ser atingida por micromanipulação dos embriões através de separação microcirúrgica, a partir de embriões de duas células (HAFEZ, 2004).

A micromanipulação de embriões inclui um conjunto de técnicas importantes que possibilitam obter animais de interesse científico, econômico e zootécnico. Dentro da técnica, várias são as opções de pesquisa: transferência de genes para obtenção de animais transgênicos, estudo da relação entre núcleo e citoplasma, determinação do sexo, micromanipulação de blastômeros e a bissecção de embriões, para a obtenção de gêmeos idênticos, é a opção mais viável (BEM et al., 1987).

A bissecção de embriões é a biotécnica através da qual, um embrião em estágio inicial de desenvolvimento, é mecanicamente dividido, preferencialmente em duas partes iguais. Para sua execução, é necessária uma seleção morfológica dos embriões visando identificar os que, potencialmente, sobreviverão ao processo da bissecção e da transferência das metades embrionárias para as receptoras (REICHENBACH et al., 2002).

De acordo com Brebion e Chesné (1995), esta biotécnica permite elevar o número de embriões disponíveis de uma doadora através da divisão em duas ou mais partes embriões em estágio de mórula compacta ou blastocisto, pois um dos principais fatores que limitam a eficácia da TE é o escasso número de embriões produzidos pela doadora.

A divisão de embriões foi realizada, inicialmente, em animais de laboratório. O primeiro relato de êxito com essa técnica foi citado por Nicholas e Rall em 1942 (apud MELO, 2004) utilizando no procedimento embriões de ratos. Mullen et al. (1970) publicaram o nascimento de gêmeos monozigóticos da espécie “*Mus musculus*” a partir da separação de blastômeros em embriões de duas células.

Em animais domésticos, os primeiros trabalhos de bissecção de embriões foram realizados com ovelhas (WILLADSEN, 1979) e bovinos (WILLADSEN e POLGE, 1981). Esses autores usaram técnicas complexas, selando as incisões feitas na zona pelúcida durante a micromanipulação com Agar gel e passando os hemi-embriões por hospedeiros intermediários.

Em eqüinos, os primeiros trabalhos surgiram na década de 80 (ALLEN e PASHEN, 1984). À época, a técnica de bissecção utilizava vários instrumentos e adotava a reintrodução dos hemi-embriões em

membranas pelúcidas e cultivo *in vitro* ou *in vivo* antes da transferência, o que limitava sua aplicação (SILVEIRA, 2004).

No Brasil, em 1986, foi transferido para uma vaca mestiça Chianina-Nelore, o primeiro par de hemi-embriões bovinos da América Latina, pela equipe EMBRAPA-CENARGEN, através da bissecção de um embrião originário da raça Indubrasil Vermelho. Como resultado nasceram, em 1987, dois bezerros machos, geneticamente idênticos (BEM, 1989).

Em 2001 nasceram, os primeiros caprinos gerados no Brasil com a técnica de bissecção. Foram partidos nove embriões e inovuladas duas metades por receptora. Das nove que receberam os hemi-embriões, duas deram origem a três crias (SALLES, 2001)

Segundo Bem et al. (1987), a bissecção de embriões, além de aumentar o número de produtos por embrião original, oriundo de doadores (machos e fêmeas) geneticamente desejáveis, é também importante para a pesquisa envolvendo a genética (herdabilidade, relação genótipo-fenótipo), fisiologia (endocrinologia, alimentação, terapêutica) e etologia (habilidade materna e comportamento sexual).

Através da bissecção e utilizando-se apenas embriões de boa qualidade, é possível atingir, com a transferência dos hemi-embriões, 100% de gestações, tendo em média 25% de possibilidade de haver, entre os nascidos, um par de gêmeos idênticos (REICHENBACH et al., 2002).

Uma simplificação importante do método de bissecção foi relatada por Voelkel et al. (1984), que, estudando bovinos, demonstraram que os hemi-embriões provenientes de mórula compactada ou blastocisto não têm necessidade de serem reinseridos em uma zona pelúcida para seu desenvolvimento *in vivo*.

Com a evolução da técnica, os pesquisadores simplificaram a metodologia da bissecção de embriões de bovinos (OZIL et al., 1982; LAMBERTH et al., 1983; OZIL, 1983, WILLIAMS et al., 1982). Nestes trabalhos ficou evidente que apenas 30 a 40% da massa celular total refaz um indivíduo normal, portanto, é possível, por micromanipulação dividir

embriões em duas ou mais partes, transferi-las para receptoras e obter gêmeos, trigêmeos ou quadrigêmeos.

No Brasil, o instrumental para bissecção foi simplificado, baseando-se na utilização de dois microinstrumentos artesanais: uma pipeta de aspiração fabricada com um bico de Bunsen, que serve para posicionar e manter o embrião imóvel; e um fragmento de lâmina que serve para dividir o embrião. Estes instrumentos devem ser adaptados ao braço de um micromanipulador, o que favorece a execução prática da técnica de bipartição embrionária (BEM, 1989).

A técnica de bissecção embrionária é de interesse para uma série de aplicações em programas de melhoramento animal: possibilita a retirada de células embrionárias no momento da bissecção, facilitando a realização do diagnóstico pré-implantativo, que permite identificar se o embrião é portador de alguma anomalia genética, verificar características genéticas desejáveis e sexar os embriões (REICHENBACH et al., 2002).

O uso de gêmeos idênticos pode permitir, ainda, uma melhor seleção de genótipos, através de investigações mais exatas sobre as interações genótipo e meio ambiente. O teste de progênie com gêmeos idênticos pode incrementar a seleção animal por aumentar a exatidão dos cálculos dos valores zootécnicos e diminuir o número de animais que teriam que ser testados, e conseqüentemente, o custo desta seleção, além do aumento da velocidade de seleção (Ibdem).

De acordo com Reichenbach et al. (2002), resultados estatísticos mais precisos podem ser alcançados com gêmeos idênticos, permitindo avanços mais rápidos e mais específicos na pesquisa de doenças genéticas. Os autores afirmaram, ainda, que as influências do meio ambiente para as diversas características dos animais poderiam ser determinadas com maior precisão. Do mesmo modo, estudos sobre a ação dos medicamentos e de seus efeitos colaterais poderiam ser melhor estudados com gêmeos idênticos.

### 3. CAPÍTULO ÚNICO

#### **AVALIAÇÃO DA BISSECÇÃO DE EMBRIÕES COM O OBJETIVO DE ELEVAR A EFICÁCIA DA TÉCNICA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES NA ESPÉCIE CAPRINA**

(Evaluation of embryos bisection so as to increase efficacy of embryo transfer technique in caprine)

RÊGO, T.P.N<sup>1</sup>; SOUZA, J.A.T<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Pós-graduanda do Curso de Mestrado em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí (UFPI)

<sup>2</sup> Prof. Dr. do Curso do Mestrado em Ciência Animal da UFPI. - adalmir@ufpi.br

#### **RESUMO**

Este trabalho teve por objetivo avaliar a utilização da técnica de bissecção visando elevar a eficácia da transferência de embriões em caprinos. Dezesete doadoras foram sincronizadas com progesterona natural durante 11 dias e superovuladas com 250 UI de FSH/LH. As receptoras foram sincronizadas com progestágeno por 11 dias e receberam 300 UI de eCG e 75µg de Cloprostenol no dia nove. As colheitas foram realizadas via transcervical, sete dias após a primeira cobertura. Das 92 estruturas recuperadas, 48 (mórulas ou blastocistos) de grau de qualidade 1 e 2 foram utilizadas. De cada três embriões obtidos graus 1 ou 2, um foi bissecionado

e as metades inovuladas na mesma receptora. Embriões inteiros foram inovulados aos pares. Das 16 receptoras inovuladas com embriões inteiros, nove (56,25%) apresentaram prenhez, sendo três com dois embriões (37,50% do total de embriões transferidos). Das 16 que receberam hemi-embriões, quatro (25,00%) apresentaram gestações simples e uma (6,25%) apresentou gestação dupla (totalizando 37,50% dos embriões transferidos). Embriões partidos em estágio de mórula, independente do grau de qualidade, não resultaram em gestação, já em estágio de blastocisto o índice obtido foi 100,00% para estruturas de qualidade 1 ( $P < 0,05$ ). Os dados permitem concluir que o estágio de mórula não é indicado para bissecção em caprinos, e que quando bisseccionados embriões em estágio de blastocisto, grau 1 a técnica se mostrou eficaz para elevar os índices gestacionais em programa de transferência de embriões em caprinos.

**PALAVRAS-CHAVE:** bissecção, caprino, embrião

### ABSTRACT

This assignment aimed to evaluate the use of bisection technique in order to enhance efficacy of embryo transfer in caprine. Seventeen donators were synchronized with natural progesterone during 11 days and super ovulated with 250 UI of FSH/LH. The recipients were synchronized progestogen for 11 days and received 300 UI of eCG and 75 $\mu$ g of cloprostenol on the eleventh day. The harvest was done transcervically, seven days after the first copulation. From the 92 recovered structures, 48 (morula or blastocyst) of quality degree 1 and 2 were used. Of each three obtained embryos degree 1 or 2, one was bisectioned and the halves were put into the same recipient. Integral embryos were ovulated in pairs. From the 16 recipients ovulated with entire embryos, nine (56.25%) got pregnant, three with two embryos (37.50% of the transferred embryos total). From the 16, which received hemi-embryos, four (25%) presented simple pregnancy and one (6.25%) presented double pregnancy (totalizing 37, 50% of the transferred embryos). Parted embryos while morula, regardless of quality degree, did not result in pregnancy, but, while blastocyst, the obtained index was 100% for quality 1 structures ( $P < 0, 05$ ). It can be concluded from the data that the morula stage is not indicated for bisection in caprine, and when bisectioned blastocyst degree 1, the technique proved to be efficient to raise the pregnancy index in embryo transference programs in caprine.

**Key words:** bisection, caprine, embryo.

## INTRODUÇÃO

A necessidade de elevar a produção animal exige que os contínuos avanços tecnológicos, em embriologia, promovam um melhoramento na eficiência da utilização de embriões. A incorporação da tecnologia de micromanipulação, especialmente a bissecção de embriões, tem permitido aumentar as taxas de gestação de produtos de doadoras específicas. Através da bissecção, pode haver uma propagação de animais desejados de forma mais rápida, levando a um grande progresso em programas comerciais de transferência de embriões (GRAY et al., 1991).

A bissecção é a biotécnica através da qual, com equipamento de micromanipulação apropriado, um embrião em estágio inicial de desenvolvimento, é mecanicamente dividido, preferencialmente em duas partes iguais. Para execução desta técnica, é necessária uma seleção morfológica dos embriões visando identificar os que, potencialmente, sobreviverão ao processo da bissecção e a transferência imediata das metades embrionárias para as receptoras (REICHENBACH et al., 2002).

Em bovinos, apresenta importância especial, pois além de possibilitar um aumento no efetivo do rebanho, evita o aparecimento do freemartinismo, característico da espécie, pois gêmeos oriundos de bissecção possuem o mesmo sexo o que impede esta ocorrência (MELO, 2004).

Tsunoda et al. (1984) dividiram embriões caprinos em estágio de mórula compacta e blastocisto inicial, cultivaram *in vivo* e transferiram para seis receptoras, das quais duas ficaram prenhes.

De acordo com Udy (1987), embriões de cabras são aparentemente mais frágeis e mais difíceis de serem manipulados quando comparados aos de outras espécies, como ovinos e bovinos. É provável que estas condições ocorram devido as aderências intercelulares mais fracas em estágio de mórula quando comparado o mesmo estágio em outras espécies e a zona pelúcida de embriões de cabras ser mais flexível o que torna sua bissecção relativamente difícil.

Ao avaliar a taxa de sobrevivência de embriões de ovelhas colhidos entre os dias cinco e oito, seccionados em duas partes e transferidos para um ou os dois cornos uterinos com ovário portador de corpo lúteo, Maurer (1988) concluiu que a sobrevivência de hemi-embriões é maior quando as metades são inovuladas em um mesmo corno uterino e que melhores resultados de gestação ocorrem com embriões colhidos nos dias sete e oito. Quando colhidos no dia cinco não sobrevivem a bissecção.

Mckinnon (1999) afirmou que, após a bissecção, comumente um gêmeo é usado como controle e o outro é destinado a um teste específico. A redução do número de animais experimentais, permitida pelo uso de gêmeos idênticos, diminui os custos e o uso excessivo de animais. Para o autor, outra importância da técnica, é o possível aumento no número de gestações a partir dos embriões originais, em bovinos; a técnica resulta em aproximadamente 50% a mais de prenhez quando comparada com a transferência de embriões inteiros.

Skrzyszowska e Smorag (1989) afirmaram que muitos fatores influenciam a viabilidade de embriões bisseccionados, como a qualidade e o estágio de desenvolvimento do embrião, o método de divisão e o número de hemi-embriões transferidos. Os autores, afirmaram, ainda, que embora teoricamente um hemi-embrião deva ter a metade do número de células do embrião original, na prática, este número é reduzido devido a perda de uma certa quantidade de células no processo de divisão. No caso de blastocistos, células do embrioblasto e do trofoblasto são perdidas.

Ao avaliar o percentual de perda celular após a bissecção em embriões de ratos, ovelhas e vacas, em estágio de blastocisto Skrzyszowska e Smorag (1989) encontraram uma média de 13,8%; 13,2% e 12,7% para embriões de ratos, ovelhas e vacas, respectivamente.

Para Wood e Trounson (2000), o sucesso na bissecção de embriões é maior quando se utiliza blastocisto que mórulas. Isto provavelmente ocorra, devido ao fato de existir maior quantidade de células neste estágio, que facilitam o desenvolvimento do embrião e o estabelecimento da gestação. Os autores afirmaram, ainda, que para



realização desta técnica, não se deve utilizar embriões de baixa qualidade, que tenham poucas células ou algum outro tipo de defeito celular, pois, após a transferência, terão poucas chances de resultar em gestação.

A incorporação da bissecção em programas comerciais de transferência de embriões reflete um grande entusiasmo nestes procedimentos que podem melhorar a eficiência reprodutiva de nossos rebanhos. Para utilização comercial da bissecção é importante avaliar a relação risco/benefício quando aplicada esta tecnologia. A sofisticação da tecnologia de bissecção embrionária, tem permitido, juntamente com o congelamento, a manutenção da metade da massa celular de um embrião para futuras avaliações de genótipo, e outras utilidades (GRAY et al., 1991).

De acordo com Yang e Anderson (1992), a combinação da bissecção de embriões com a biópsia para a sexagem e criopreservação de embriões favorecerão a utilidade comercial desses procedimentos.

A expectativa que tem gerado as informações divulgadas justificam a necessidade de dar continuidade às pesquisas nessa área de conhecimento. Objetivou-se, com este trabalho, avaliar a capacidade de aumentar o número de produtos a partir de embrião original na espécie caprina, através da utilização da técnica de bissecção de embriões colhidos, partidos em duas metades e transferidos imediatamente para as receptoras.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

O experimento foi realizado na Fazenda Santo Antônio, localizada no município de Campo Maior, Região Norte do Estado do Piauí, com latitude 04°49' 40"S e longitude 42°10'07"W, pluviometria média anual na região, da ordem de 1305mm e temperatura variando entre 28 a 35°C (CEPRO, 1990).

Foram utilizadas doze cabras da raça Boer e cinco da raça Anglonubiana, nulíparas ou pluríparas, com idade variando entre dez meses

e três anos, como doadoras de embriões e, como receptoras, 113 cabras mestiças Anglonubiana x Boer, Anglonubiana x Toggenburg, primíparas ou pluríparas. Dois machos da raça Boer e dois da raça Anglonubiana, de fertilidade comprovada foram utilizados como reprodutores.

Durante o período experimental, as doadoras foram mantidas, no turno da manhã, em piquetes com predominância de capim andropógon, capim mimoso e unha-de-gato. O resto do tempo permaneceram em baias apropriadas recebendo volumoso de feno de tifton e rama nativa (crioli), além de água e sal mineral<sup>1</sup> à vontade, e suplementação diária de 400g de ração composta de 40% de milho, 30% de soja, 20% de feno de tifton e 10% de farelo de trigo para cada doadora. As receptoras permaneceram em pastagem nativa durante o dia, recebendo como suplemento, 300g de ração por receptora, de composição semelhante à ração das doadoras, além de sal mineral<sup>1</sup> e água à vontade.

Nas doadoras a sincronização do ciclo estral foi obtida através de um dispositivo intravaginal contendo 0,33g de progesterona<sup>2</sup> por um período de 11 dias. Para superovulação utilizou-se 250 UI da associação FSH-LH<sup>3</sup>, administrada via intramuscular a partir do dia nove, considerando a colocação do implante de progesterona como dia zero, em seis doses decrescentes, a intervalos de 12 horas, por um período de três dias. No último dia de aplicação da gonadotrofina, administrou-se 100µg de cloprostenol<sup>4</sup> via intramuscular, sendo, então, monitoradas quanto ao início do estro, em intervalos de seis horas, utilizando-se rufiões vasectomizados.

Caracterizada a manifestação do estro, as doadoras foram cobertas até não mais aceitarem o macho. Doze horas após a última cobertura, foi reintroduzido o dispositivo intravaginal de progesterona<sup>2</sup>, afim de prevenir a ocorrência de regressão prematura de corpos lúteos. Os dispositivos foram removidos no dia anterior a colheita.

---

<sup>1</sup> Caprinofós – tortuga, Brasil.

<sup>2</sup> CIDR-Pharmacia, Brasil.

<sup>3</sup> Pluset- Calier S.A.,Espanha.

<sup>4</sup> Ciosin-Shering-Coopers, Brasil.

As receptoras tiveram o ciclo estral sincronizado através de esponjas intravaginais impregnadas com 60mg de acetato de medroxiprogesterona<sup>5</sup>, mantidas por 11 dias. No dia nove, considerando a data da colocação da esponja dia zero, administrou-se 300 UI de gonadotrofina coriônica eqüina<sup>6</sup> e 75µg de cloprostenol<sup>4</sup>, via intramuscular. A detecção do estro foi realizada por rufiões, apresentados a cada 12 horas.

A colheita dos embriões foi realizada por lavagem uterina utilizando-se, aproximadamente, 240ml de Solução Salina Fosfatada Tamponada (D-PBS)<sup>7</sup> por doadora, via transcervical, sete dias após a manifestação de estro. Os animais foram submetidos a jejum hídrico e sólido por 14 horas antes da colheita. Após tricotomia da região do períneo e vulva, o animal foi colocado em maca de contenção e a cauda suspensa por um funcionário. Com auxílio de uma pinça de *Pozzi* (24cm), a cérvix foi fixada e tracionada e um cateter de via única, desprovido de balão (Rusch, número 10 ou 12), guiado por um mandril de aço, foi introduzido no útero. Após introduzido o cateter, o mandril foi retirado e iniciou-se a lavagem uterina. Com o objetivo de facilitar o retorno do meio de lavagem, o cateter foi levemente movimentado para frente e para trás e o lavado uterino recolhido em filtro coletor<sup>8</sup>.

Ao término da lavagem, o filtro foi levado ao laboratório, o meio transferido para placa de *Petri* e observado em esteriomicroscópio com a finalidade de procurar as estruturas. Ao serem identificados, os embriões foram transferidos, com auxílio de um “tom cat” acoplado a uma seringa de 1ml, para uma nova placa, submetidos a três banhos consecutivos em D-PBS<sup>7</sup> e transferidos para outra placa contendo meio de manutenção<sup>9</sup>. Em seguida, foram avaliados e classificados de acordo com a Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS, 1999).

---

<sup>5</sup> Progespon – Syntex S.A. , Argentina.

<sup>6</sup>Folligon – Intervet, Brasil.

<sup>7</sup> Dulbecco Modificado- Cultilab Mat Cult Cel LTDA, Brasil.

<sup>8</sup> Coletor de embrião milipore estéril –Nutricell, Brasil.

<sup>9</sup> Holding 0,4% BSA – Cultilab Mat Cult Cel LTDA, Brasil.

Foram utilizados embriões em estágio de mórula e blastocisto, de graus de qualidade 1 e 2 segundo a IETS.

No processo de bissecção, utilizou-se um micromanipulador de embriões (Figura 1), modelo microtorno, composto por dois braços apoiados sobre uma base adaptada a uma lupa estereomicroscópica. Na extremidade de um dos braços, foi acoplada uma micropipeta de sucção e na extremidade do outro braço foi acoplada uma lâmina japonesa (Biocut-Fujihira Industry) utilizada para realizar o corte dos embriões (Figura 2).



Figura 1 – Micromanipulador de embriões composto por dois braços apoiados sobre uma base adaptada a uma lupa estereomicroscópica.



Figura 2. (A) Detalhe do braço do micromanipulador cuja extremidade é acoplada à lâmina para realizar o corte do embrião, (B) Detalhe do braço do micromanipulador cuja extremidade é acoplada à micropipeta de sucção.

A micropipeta de sucção foi produzida artesanalmente por estiramento de um capilar, em chama de lamparina. A curvatura e arredondamento da borda foram obtidas com chama de isqueiro à gás (Figura 3), cujo diâmetro interno estimado em aproximadamente a metade do diâmetro do embrião que é de cerca de 200 $\mu$ m em fase de blastocisto.

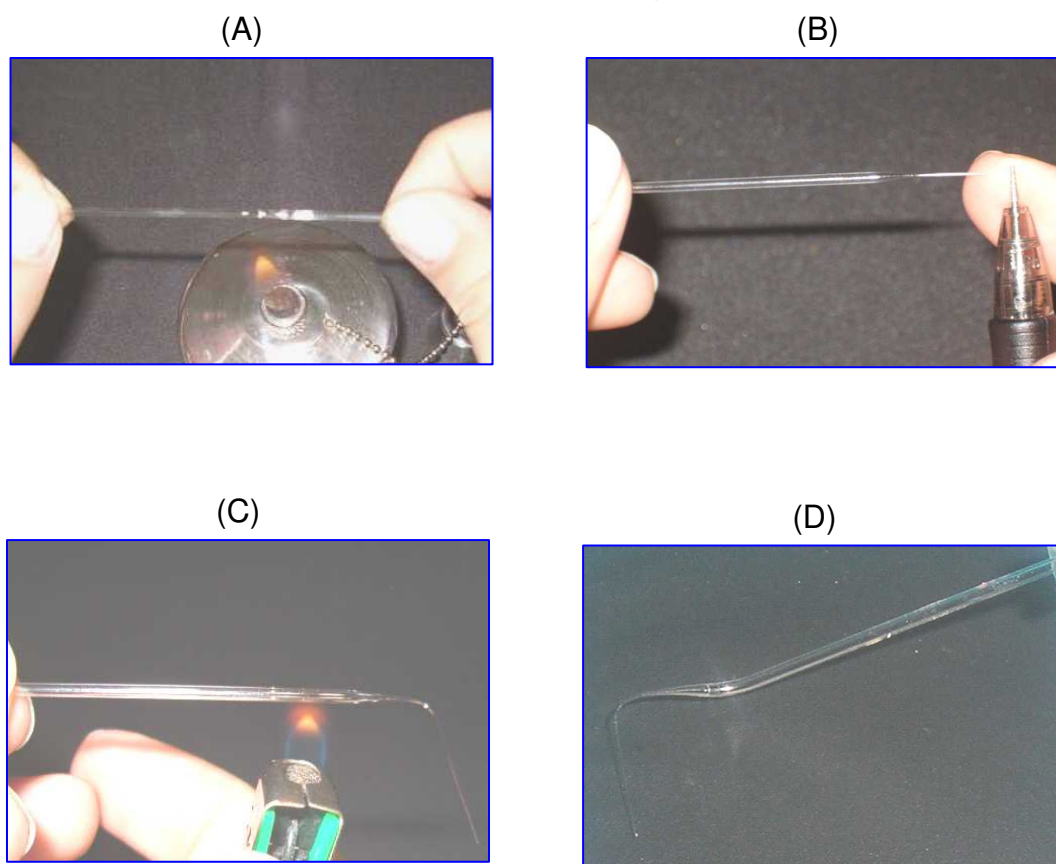


Figura 3 – Seqüência da confecção artesanal de uma micropipeta de sucção: (A) Estiramento em chama de lamparina, (B) corte do capilar com ponta de diamante, (C) Curvatura da micropipeta e (D) Micropipeta pronta.

Cada embrião destinado à bissecção foi colocado em uma placa de *Petri*, contendo D-PBS<sup>7</sup>, fixado e posicionado pela micropipeta de sucção através de pressão negativa, enquanto a lâmina era disposta central e dorsalmente ao embrião para proceder ao corte (Figura 4) em um único movimento para baixo até seu encontro com o fundo da placa. Em seguida, leves movimentos para frente e para trás foram realizados com a finalidade de separar os hemi-embriões.

Antes da secção o embrião era posicionado de modo que, no momento do corte, cada hemi-embrião ficasse com aproximadamente 50% do total de células. No momento do corte, a pressão exercida pela micropipeta era retirada, evitando-se que os hemi-embriões fossem sugados.

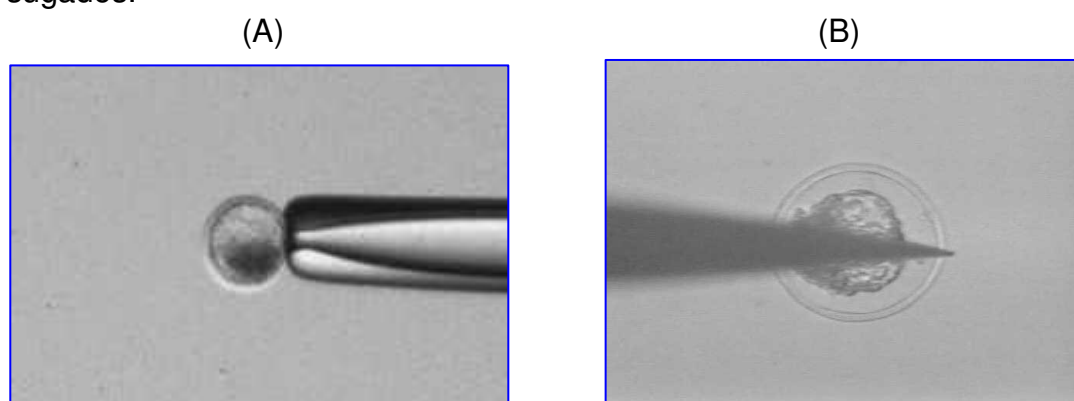


Figura 4 – Seqüência da bissecção de um embrião: (A) Fixação do embrião com a micropipeta de sucção, (B) Posicionamento da lâmina para realizar a secção do embrião.

Concretizada a separação das duas metades, era adicionado meio de manutenção<sup>9</sup> para que os hemi-embriões não ficassem aderidos na placa de petri, micropipeta ou lâmina.

Os hemi-embriões foram envasados em “tom cat” contendo meio de manutenção<sup>9</sup>, aspirando, pequena quantidade do meio, em seguida, pequena coluna de ar, pequena quantidade do meio contendo uma das metades, nova coluna de ar, nova coluna de meio contendo a outra metade, outra coluna de ar e a última coluna de meio, para serem inovulados.

No processo de inovulação de embriões inteiros foram utilizadas receptoras cuja assincronia com a doadora correspondente não foi superior a 24 horas. Para inovulação de hemi-embriões utilizou-se receptoras que manifestaram estro -12 a +36 horas após o início do estro das doadoras, mas, de acordo com Reichenbach et al. (2002), para obter-se um melhor percentual de gestação após a bissecção, deve-se utilizar receptoras que tenham iniciado estro 12 a 36 horas após à doadora correspondente, pois com a bissecção ocorre um atraso no desenvolvimento das metades embrionárias. Além disso, sendo a massa celular das duas

metades menor que a de embriões inteiros, existe necessidade de um período adicional para sua recuperação de aproximadamente 12 a 36 horas.

As receptoras foram submetidas a jejum hídrico e sólido por 24 horas antes das transferências. Para as inovulações, realizadas por semi-laparoscopia, as receptoras tiveram a região abdominal tricotomizada e higienizada. Utilizou-se para anestesia, uma associação de 250mg de cloridrato de ketamina a 5%<sup>10</sup> e de 20mg de cloridrato de xilazina à 2%<sup>11</sup> adicionado a 19ml de solução fisiológica. Foi aplicado 1ml da solução para cada 10Kg de peso vivo, por via endovenosa e em seguida, os animais foram colocados na maca de contenção para inovulação.

Na região tricotomizada, procedeu-se antissepsia com álcool iodado a 10%. Para facilitar a passagem dos trocateres, que permitiram a entrada da pinça de manipulação e da ótica do laparoscópio, realizou-se anestesia local com lidocaína a 2%<sup>12</sup> e uma pequena incisão de 2cm. Após a visualização do útero, os ovários foram avaliados, apenas receptoras que possuíam pelo menos um ovário portador de um corpo lúteo funcional foram utilizadas. Para inovular os embriões, o corno uterino ipsilateral ao ovário portador do corpo lúteo foi exteriorizado e um pequeno orifício foi feito, para introduzir a ponta do “tom cat” e injetar o meio contendo os embriões. Concluída a inovulação, realizou-se a sutura utilizando-se fio de nylon<sup>13</sup>.

O procedimento pós-operatório constou da administração de oxitetraciclina<sup>14</sup> e aplicação local por cinco dias de Ungüento Pearson<sup>15</sup>.

De cada três embriões obtidos em estágio de mórula ou blastocisto, grau 1 ou 2 de uma doadora, um foi bisseccionado e as metades inovuladas em uma mesma receptora, cuja assincronia com relação ao estro da doadora correspondente foi de -12 a +36 horas. Os embriões inteiros foram inovulados em número de dois em receptoras que apresentaram início do estro em intervalos de – 12 a + 24 horas.

---

<sup>10</sup> Ketamina 5% - F. A. Cristália, Brasil.

<sup>11</sup> Rompun – Bayer do Brasil – S.A.

<sup>12</sup> Anestésico L Pearson – Pearson Saúde Animal Ltda, Brasil.

<sup>13</sup> Linha de nylon – GRILON – Ltda-Brasil.

<sup>14</sup> Terramicina LA – Laboratório Pfizer Ltda, Brasil.

Após as inovulações, as receptoras utilizadas foram identificadas e permaneceram no sistema de manejo citado para as doadoras até a data do US. Os animais positivos, foram mantidos neste sistema, os demais soltos na propriedade.

O diagnóstico de gestação foi realizado através de ultrasonografia (Scanner 100 Piemedical com transdutor abdominal de 5 MHz) 30 a 45 dias após as inovulações.

A análise estatística dos resultados deste trabalho foi realizada através do teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 17 doadoras submetidas ao programa, duas não manifestaram estro, três apresentaram estro prolongado e em uma que manifestou estro e teve o útero lavado, não houve recuperação de estruturas. As demais, 11 doadoras permitiram a recuperação de 92 estruturas, o que perfaz uma média de 8,36 estruturas por doadora.

A transposição da cérvix foi obtida em 100% das tentativas de passagem, resultados estes superiores aos de Andriolli et al. (1999), Androukovitch et al. (2002) e Lima-Verde et al. (2003) que obtiveram permeabilidade cervical em 73,3; 83,3 e 61,5% das tentativas de ultrapassagem da cérvix, respectivamente.

Das 92 estruturas recuperadas, 48 embriões em estágio de mórula e blastocisto, graus 1 ou 2 foram utilizados. As demais estruturas não foram contabilizadas.

Do total de 48 embriões utilizados, 32 foram inovulados inteiros, aos pares, em 16 receptoras. Os demais foram seccionados em

---

<sup>15</sup> Ungüento Pearson – Pearson Saúde Animal Ltda-Brasil



duas metades, sendo inovuladas juntas as metades correspondentes a um embrião em um mesmo animal, totalizando, também, 16 receptoras.

A tabela 1 mostra que não houve diferença estatística significativa quando comparados os grupos de embriões inteiros e bisseccionados no que diz respeito a ocorrência de gestação.

Tabela 1 –Ocorrência de gestação em receptoras inovuladas com embriões inteiros e bisseccionados. Campo Maior-PI, 2005.

EMBRIÕES	GESTAÇÃO	
	Positiva	Negativa
Inteiros	9/16 (56,25%) <sup>a</sup>	7/16 (43,75%) <sup>a</sup>
Bisseccionados	5/16 (31,25%) <sup>a</sup>	11/16 (68,75%) <sup>a</sup>
Total	14/32 (43,75%)	18/32 (56,25%)

Percentuais seguidos da mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste  $\chi^2$  a 5% de probabilidade ( $P>0,05$ ).

A ocorrência de 56,25% (9/16) de gestação em embriões inteiros e 31,25% (5/16) em embriões bisseccionados são semelhantes aos relatados por Leibo e Rall (1987), que não encontraram diferença estatística significativa na taxa de gestação entre os dois grupos. Por outro lado, diferem dos resultados descritos por Maurer (1988), que ao comparar a taxa de sobrevivência de embriões inteiros e hemi-embriões obteve, 86,4% de gestação (44/51) para o primeiro e 41,8% (67/160) para o segundo grupo.

Diversos fatores podem afetar a sobrevivência de embriões transferidos. Para minimizar a influência desses fatores, foram utilizadas apenas receptoras de escore corporal 3 e 4, cujos ovários apresentavam um ou dois corpos lúteos funcionais, inovulando-se os embriões, classificados de grau de qualidade 1 ou 2, sempre aos pares, no mesmo corno uterino.

Apesar de não ter sido evidenciado diferenças estatísticas significativas entre as gestações em receptoras inovuladas com embriões inteiros e bisseccionados, uma aparente diferença em valores percentuais foi observada, que pode estar associada ao processo de bissecção. Williams et

al. (1984) afirmaram que a taxa de gestação em embriões bisseccionados é dependente do estágio de desenvolvimento embriogênico. Para Bredback (1995), o método de transferência dos hemi-embriões, as perdas celulares ocorridas com a divisão embrionária e o estágio de sincronia com a receptora podem afetar a viabilidade embrionária após a bissecção.

Beckett et al. (1999), relataram que a sobrevivência de embriões caprinos bisseccionados em receptoras é mais baixa que a de embriões inteiros, esta redução pode ser atribuída a perda da viabilidade celular após a bissecção, falha na capacidade de hemi-embriões emitirem sinais necessários a manutenção da gestação, ou estes fatores combinados.

Para que os possíveis fatores que afetam a sobrevivência embrionária pudessem ser melhor explicados, a tabela 1 foi desmembrada nas tabelas que se seguem.

A ocorrência de gestação quando comparados embriões em estágio de mórula inteiros e bisseccionados está apresentada na tabela 2, sendo observado diferenças estatísticas significativas.

Tabela 2 – Ocorrência de gestação em receptoras inovuladas com embriões em estágio de mórula, inteiros e bisseccionados. Campo Maior-PI, 2005.

EMBRIÕES	GESTAÇÃO	
	Positiva	Negativa
Mórulas inteiras	4/7 (57,14%) <sup>a</sup>	3/7 (42,86%) <sup>a</sup>
Mórulas bisseccionadas	0/7 (00,00%) <sup>b</sup>	7/7 (100,00%) <sup>b</sup>
Total	4/14 (28,57%)	10/14 (71,43%)

Percentuais seguidos de letras diferentes, na coluna, diferem estatisticamente entre si pelo teste  $\chi^2$  a 5% de probabilidade ( $P < 0,05$ ).

Pode ser observado que em 57,14% das fêmeas que receberam embriões em estágio de mórula, inteiros, ocorreu gestação, já nas receptoras inovuladas com embriões bisseccionados neste mesmo estágio de desenvolvimento não foi diagnosticado prenhez. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Tsunoda et al. (1985), que dividiram 22

embriões caprinos em estágio de mórula, mas não obtiveram gestação. O mesmo ocorreu com Maurer (1988), que observou que embriões colhidos e bisseccionados no dia cinco não sobreviviam após a inovulação.

Em bovinos, Williams et al. (1984) obtiveram 16 e 60% de gestação utilizando para bissecção embriões em estágio de mórula e blastocisto, respectivamente. Os autores mencionaram que a ruptura da zona pelúcida de embriões em estágio de mórula foi o fator principal para os baixos índices gestacionais encontrados.

Udy (1987) afirmou que a força de coesão intercelular de embriões caprinos, em estágio de mórula, é inferior quando comparado o mesmo estágio em outras espécies, causando maior perda celular no momento da bissecção, tendo como conseqüência menor quantidade de células para dar continuidade ao desenvolvimento embrionário e menor emissão dos sinais necessários ao reconhecimento materno da gestação.

Ao comparar a ocorrência de gestação em receptoras inovuladas com embriões em estágio de blastocisto, inteiros e bisseccionados, não foi evidenciada diferença estatística significativa conforme dados apresentado na tabela 3.

Tabela 3 – Ocorrência de gestação em receptoras inovuladas com embriões em estágio de blastocisto, inteiros e bisseccionados. Campo Maior–PI, 2005.

EMBRIÕES	GESTAÇÃO	
	Positiva	Negativa
Blastocistos inteiros	5/9 (55,55%) <sup>a</sup>	4/9 (44,45%) <sup>a</sup>
Blastocistos bisseccionados	5/9 (55,55%) <sup>a</sup>	4/9 (44,45%) <sup>a</sup>
Total	10/18 (55,55%)	8/18 (44,45%)

Percentuais seguidos da mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste  $\chi^2$  a 5% de probabilidade ( $P > 0,05$ ).

A ocorrência de igual número de gestações quando inovulados embriões em estágio de blastocisto, inteiros e bisseccionados,

sugere que neste estágio, hemi-embriões têm a mesma capacidade de se desenvolver que embriões inteiros.

Deve ser mencionado que a gestação em receptoras inovuladas tanto com blastocistos inteiros quanto bissecionados só ocorreu para embriões grau 1. De um total de seis receptoras inovuladas com blastocistos bisseccionados grau 1, cinco apresentaram gestação (83,33% das receptoras), sendo uma dupla, o que totaliza o desenvolvimento de 100% do número de embriões originais para este estágio e grau de qualidade, evidenciando que aqueles com melhor qualidade morfológica têm maior capacidade de desenvolvimento. Estes resultados, foram superiores aos obtidos por Széll e Hudson (1991), cujo percentual de receptoras gestantes após a inovulação de hemi-embriões nas mesmas condições, foi de 50% (58/115).

Armas et al. (1992) avaliaram o efeito da qualidade do embrião em estágio de blastocisto na viabilidade de hemi-embriões produzidos por bissecção e obtiveram maior taxa de gestação quando blastocistos de excelente qualidade (grau 1) foram utilizados (91,6% de gestação) quando comparados a blastocistos grau 2 (79,0% de gestação).

Das sete receptoras inovuladas com blastocistos inteiros, grau 1, cinco apresentaram gestação (71,42% das receptoras), sendo uma dupla. Este achado está de acordo com Freitas e Simplício (2002b), que ressaltam que a qualidade dos embriões no momento da inovulação afeta os índices de gestação, com taxa de sobrevivência superior inerente àqueles que não possuem alterações em sua morfologia.

O estágio de blastocisto apresenta uma maior quantidade de massa celular em comparação com o estágio de mórula. Quando consideradas as perdas ocorridas devido a bissecção, aproximadamente 14% (SKRZYSZOWSKA e SMORAG, 1989), terão maiores chances de desenvolvimento e se tiver excelente qualidade morfológica, o maior número de células viáveis favorecerão a implantação de uma gestação.

A tabela 4 compara o total de embriões inteiros e bisseccionados diagnosticados aos 30- 45 dias de gestação, mostrando não haver diferença estatística significativa entre os dois grupos.

Tabela 4 – Número de produtos diagnosticados aos 30 – 45 dias de gestação partir da inovulação de embriões inteiros e bisseccionados. Campo Maior–PI, 2005.

EMBRIÕES	PRODUTOS DIAGNOSTICADOS
Inteiros	12/32 (37,50%) <sup>a</sup>
Bisseccionados	6/16 (37,50%) <sup>a</sup>
Total	18/48 (37,50%)

Percentuais seguidos da mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste  $\chi^2$  a 5% de probabilidade ( $P>0,05$ ).

Apesar do índice gestacional de receptoras inovuladas com embriões bisseccionados em estágio de mórula ter sido zero, houve proporção equivalente aos produtos diagnosticados. No grupo de embriões inovulados inteiros, obteve-se 12 produtos de um total de 32 embriões (37,5%), enquanto no grupo bisseccionado obteve-se 6 produtos de um total de 16 embriões (37,5%). Diversos fatores influenciam na sobrevivência embrionária quando inovulados embriões inteiros, o mesmo ocorre com os bisseccionados, o que pode acarretar em índices pouco favoráveis.

Em termos práticos, apesar de existir uma tendência da taxa de gestações a partir da inovulação de hemi-embriões ser menor que quando inovulados embriões inteiros, a duplicação das chances de gestação compensam esta tendência (SIVEIRA, 2004). No presente estudo, se apenas embriões em estágio de blastocisto tivessem sido utilizados, haveria uma maior probabilidade da quantidade de produtos diagnosticados de embriões bisseccionados ser superior à de inteiros.

Os dados apresentados na tabela 5 mostram diferenças estatísticas significativas quando comparados os produtos diagnosticados após a inovulação de mórulas caprinas inteiras com bisseccionadas.

Tabela 5 – Número de produtos diagnosticados aos 30 – 45 dias de gestação a partir da inovulação de embriões em estágio de mórula, inteiros e bisseccionados. Campo Maior–PI, 2005.

EMBRIÕES	PRODUTOS DIAGNOSTICADOS
Mórulas inteiras	6/14 (42,85%) <sup>a</sup>
Mórulas bisseccionadas	0/7 (00,00%) <sup>b</sup>
Total	6/21 (28,57%)

Percentuais seguidos de letras diferentes, na coluna, diferem estatisticamente entre si pelo teste  $\chi^2$  a 5% de probabilidade ( $P < 0,05$ ).

Pode ser observado que, ao inovular mórulas inteiras, 42,85% (6/14) do total de embriões utilizados neste estágio foi diagnosticado aos 30-45 dias após a transferência. No que se refere a inovulação de embriões bisseccionados, neste mesmo estágio de desenvolvimento, o diagnosticado foi de 0% (0/7).

De acordo com Udy (1987), os índices gestacionais obtidos em caprinos são superiores quando se utiliza, para bissecção, embriões em estágio de blastocisto, evitando-se a utilização de mórulas. Segundo o autor, nesta espécie, as aderências intercelulares de embriões no referido estágio, são fracas em comparação com outras espécies, levando a uma maior perda celular como conseqüência da bissecção e uma maior dificuldade no estabelecimento da gestação. Outro problema citado pelo autor é uma maior flexibilidade da zona pelúcida de embriões desta espécie o que dificulta o corte, podendo promover o esmagamento do embrião.

Os resultados contidos na tabela 6 evidenciam não haver diferenças estatísticas significativas entre o total de produtos diagnosticados ao serem inovulados embriões em estágio de blastocisto, inteiros e bisseccionados.

Tabela 6 – Número de produtos diagnosticados aos 30 – 45 dias de gestação a partir da inovulação de embriões em estágio de blastocisto, inteiros e bisseccionados. Campo Maior-PI, 2005.

EMBRIÕES	PRODUTOS DIAGNOSTICADOS
Blastocistos inteiros	6/18 (33,34%) <sup>a</sup>
Blastocistos bisseccionados.	6/9 (66,66%) <sup>a</sup>
Total	12/27(44,45%)

Percentuais seguidos da mesma letra, na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste  $\chi^2$  a 5% de probabilidade ( $P>0,05$ ).

Mesmo não sendo observado diferença estatística significativa entre os grupos estudados, uma aparente diferença percentual foi encontrada, pois 33,34% (6/18) dos embriões inteiros inovulados em estágio de .blastocisto desenvolveram-se, enquanto 66,66% (6/9) dos embriões bisseccionados neste estágio, isto é, o dobro do obtido para embriões inteiros, foram diagnosticados positivos aos 30 – 45 dias após as transferências.

Estes resultados sugerem que a ocorrência de gestações não é um parâmetro completo quando se deseja avaliar a capacidade da técnica de bissecção gerar produtos a partir do embrião original. E, também, que blastocistos bisseccionados, principalmente os de grau de qualidade 1, podem resultar em uma maior quantidade de produtos quando comparados, em mesmo número, com a inovulação de embriões inteiros.

A tabela 7 faz referência aos produtos diagnosticados aos 30 – 45 dias de gestação, quando inovulados blastocistos bisseccionados graus 1 e 2, evidenciando a influência da qualidade do embrião no total de produtos.

Tabela 7 – Número de produtos diagnosticados aos 30 –45 dias de gestação a partir da inovulação de embriões em estágio de blastocisto, bisseccionados, qualidade 1 e 2. Campo Maior–PI, 2005.

EMBRIÕES	PRODUTOS DIAGNOSTICADOS
Blastocistos bisseccionados, 1	6/6 (100%) <sup>a</sup>
Blastocistos bisseccionados, 2	0/3 (00,00%) <sup>b</sup>
Total	6/9(66,66%)

Percentuais seguidos de letras diferentes, na coluna, diferem estatisticamente entre si pelo teste  $\chi^2$  a 5% de probabilidade ( $P < 0,05$ ).

Houve diferença estatística significativa quando comparados o total de produtos diagnosticados aos 30-45 dias de gestação, a partir do embrião original. Após a inovulação de embriões bisseccionados em estágio de blastocisto com diferentes graus de qualidade, não foi observado desenvolvimento naqueles grau 2 (0/3), enquanto o número de produtos obtidos quando utilizados apenas blastocistos grau 1 foi igual ao total de embriões originais bisseccionados, ou seja, foram obtidos seis produtos de um total de seis blastocistos partidos (6/6), mostrando um aproveitamento de 100% dos embriões. É importante lembrar que este total é proveniente de uma gestação dupla, além de quatro simples, uma vez que em um dos casos desse grupo estudado a prenhez não foi confirmada.

Ao considerar apenas o número de embriões de grau de qualidade 1 em estágio de blastocisto, a técnica de bissecção possibilitou um incremento de 100% no número de produtos obtidos. Isto demonstra que o sucesso da transferência de embriões em caprinos pode ser maximizado ao se utilizar a técnica de bissecção de embriões, desde que o estágio de desenvolvimento e a qualidade dos embriões destinados a bissecção sejam bem avaliados.

A tabela 8 mostra a influência da sincronização entre o estado fisiológico das receptoras em relação ao das doadoras, no total de produtos diagnosticados a partir de embriões bisseccionados e inteiros, nos estágios de mórula e blastocisto.



Tabela 8 - Influência da sincronização entre receptoras e doadoras sobre o número de produtos diagnosticados a partir de embriões bisseccionados e inteiros. Campo Maior-PI, 2005.

ASSINCRONIA (Horas)	EMBRIÕES BISSECCIONADOS		EMBRIÕES INTEIROS	
	Inovulados	Diagnosticados	Inovulados	Diagnosticados
- 12	4	0	4	0
0	0	0	0	0
+ 12	8	2	16	7
+ 24	14	4	8	6
24 +	2	0	0	0
Total	28	6	28	13

É importante a observação na tabela 8 de que tanto embriões inteiros quanto bisseccionados, quando inovulados em receptoras que manifestaram estro 12 horas antes da doadora correspondente, não apresentaram desenvolvimento (0/4) em ambos os grupos estudados. Quando a assincronia foi de 12 horas após o estro da doadora (+12), 25% dos embriões bisseccionados inovulados evoluíram (2/8), enquanto em embriões inteiros foi observado um desenvolvimento de 43,75% (7/16). Em receptoras que manifestaram estro até 24 horas (+24) após a doadora correspondente houve desenvolvimento de 28,60% (4/14) e 75% (6/8), para embriões bisseccionados e embriões inteiros, respectivamente. Desta forma, o intervalo de assincronia de 0 até + 24 horas, em ambos os grupos estudados, é o que concentra maior número de produtos diagnosticados. Além do total de inovações apresentado nesta tabela, mais quatro embriões inteiros e quatro bisseccionados foram inovulados em receptoras cuja assincronia foi de -24, mas não foi diagnosticado gestação em nenhum dos casos.

Estes resultados estão de acordo com Simplício e Santos (2000), quando afirmaram que a sobrevivência embrionária é influenciada,

entre outros fatores, pelo sincronismo entre idade dos embriões e estado fisiológico das receptoras, que não deve ser superior a 24 horas.

Armstrong et al. (1982), também relataram não haver diferença na sobrevivência de embriões inteiros quando o grau de assincronia do estro das receptoras com o das doadoras não excedeu 24 horas

Para Freitas e Simplício 2002b, ao utilizar-se embriões inteiros, quanto maior for a sincronização entre o estágio fisiológico da receptora e o estágio de desenvolvimento do embrião, maior será a probabilidade de sucesso após a inovulação. Segundo esses autores, o aumento na porcentagem de prenhez ocorre quando o momento do início do estro das doadoras coincide o mais próximo possível com o início do estro das receptoras

No que se refere a utilização de receptoras para inovulação de hemi-embriões, Reichenbach et al. (2002), afirmaram que para a transferência de embriões bisseccionados, pode-se obter melhores resultados de gestação se o estro das receptoras tiver ocorrido entre 12 e 24 horas após o das doadoras. Segundo esses autores, depois da bissecção, ocorre um atraso no desenvolvimento das metades embrionárias em decorrência das injúrias provocadas pela secção. Além disso, sendo a massa celular das metades embrionárias bem menores do que a de embriões intactos, existe a necessidade de um período adicional para a sua recuperação. O tempo necessário para que as metades embrionárias de boa qualidade atinjam uma velocidade de desenvolvimento normal é de aproximadamente 12 a 36 horas, variando em função da qualidade dos embriões.

Neste trabalho não foi realizado uma avaliação dos ovários das receptoras após as inovulações, não sendo possível identificar uma ocorrência de regressão nos corpos lúteos e, conseqüentemente, sua influência nas taxas de gestações encontradas.

## CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo permitem concluir que:

O estágio de desenvolvimento embrionário influenciou na taxa de gestação quando se utilizou embriões caprinos bisseccionados, sendo mais favoráveis os resultados obtidos após inovulação de hemi-embriões em estágio de blastocisto.

A qualidade do embrião influenciou na taxa de gestação quando se utilizou embriões caprinos bisseccionados, sendo superiores as taxas obtidas com estruturas de grau de qualidade 1.

O estágio de mórula, em caprinos, independente do grau de qualidade, não deve ser indicado para bissecção.

Embriões caprinos, em estágio de blastocisto com grau de qualidade 1, podem apresentar taxa de desenvolvimento embrionário após a bissecção, de até 100% a partir do embrião original.

Embriões inteiros e bisseccionados apresentaram melhores índices de desenvolvimento quando inovulados em receptoras cuja assincronia do estro com a doadora correspondente foi de +12 a +24 horas.

A técnica de bissecção exige habilidade e equipamento sofisticado, além de um maior número de animais para avaliação de sua eficácia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRIOLI, A.; SIMPLÍCIO, A.A.; SOARES, A.T.; VISINTIN, J.A. Eficiência da recuperação de embriões e os efeitos de consecutivas colheitas sobre o aparelho reprodutor de doadoras da espécie caprina. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** v. 36, n. 3, 1999.

ANDROUKOVITCH, J.L.; KOZICKI, L.E.; KOZEMJAKIM, D. A.; ABREU, R.M.; NUNEZ, C. Coleta de embriões caprinos com sonda uretral humana. **Archives of Veterinary Science**. V. 7, n. 1, p. 37-41, 2002.

ARMAS, R. de; SOLANO, R.; BERNAL, A.; GONZALEZ, F. Factores affecting in vitro and in vivo viability of bisected cattle embryos. **Theriogenology**. V. 37, n. 1, p.199, 1992.

ARMSTRONG, D. T.; PFITZNER, A.P.; SEAMARK, R. F. Ovarian responses and embryo survival in goats folling superovulation and embryo transfer. **Theriogenology**. v. 17, 1982.

BECKETT, D. M.; OPPENHEIM, S. M.; MOYER, A. L.; BONDURANT, R. H.; ROWE, J. D.; ANDERSON, G. B. Progestin implants can rescue demi-embryo pregnancies in goats: a case study. **Theriogenology**., v. 51, p. 1505-11, 1999.

BREDBACKA, P. Factors affecting cell viability during bisection of bovine embryos. **Theriogenology**. v. 44, p. 159-66, 1995.

FREITAS, V.J.F.; SIMPLÍCIO, A.A. Capítulo 9. Transferência de Embriões em Caprinos. IN: GONSALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R. de; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Varela, 2002b. p. 179-194.

FUNDAÇÃO CEPRO – **Atlas do Estado do Piauí**. Rio de Janeiro: IBGE, 1990, 26p.

GRAY, K.R.; BONDIOLI, K.R.; BETTS, C.L. The commercial application of embryo splitting in beef cattle. **Theriogenology**. v. 35, n. 1, p. 37-44, 1991.

LEIBO, S. P.; RALL, W. F. Increase in production of pregnancies by bisection of bovine embryos. **Theriogenology**. v. 27, n. 1, p. 245, 1987.

LIMA-VERDE, J.B.; LOPES JÚNIOR, E.S.; TEIXEIRA, N.R.O.;PAULA, A.A.; MEDEIROS, D.R.; FREITAS, V.J.F. Transcervical embryo recovery in Saanen goats. **South African Journal of Animal Science**. V. 33,p. 127-30, 2003.

MAURER, R.R. Embryo splitting and transfer in sheep. **Theriogenology**. v. 29, n. 1, 1988.

McKINNON, A.O. Breeding and Its Technology – Now And The Future. **World Trotting Conf Papers**. p. 1-24, 1999. Disponível em <<http://www.harness.org.au/99wldcon/PMCKINN5.HTM>>. Acesso em 23 de fevereiro de 2005.

MELO, L. F.; **Avaliação *in vitro* da micromanipulação de embriões bovinos produzidos *in vivo*, visando a bissecção e a identificação do sexo**. 2004. 60p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília. Brasília, 2004.

NICHOLAS, J.S. e HALL, B.V. Experiments on developing rats. II. The development of isolated blastomeres and fused eggs. **J. Exp. Zool.** v. 90, p. 441-59, 1942.

REICHENBACH, H.; OLIVEIRA, M. A.L. de; LIMA, P. F.de; SANTOS FILHO, A. S.; ANDRADE, J. C. O. Capítulo 8. Transferência e Criopreservação de Embriões Bovinos. IN: GONSALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R. de; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Varela, 2002. p. 127-177.

SILVEIRA, L.L.; **Avaliação da bipartição como alternativa para melhorar os índices de gestação na transferência de embriões em equinos**. 2004. 73p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília. Brasília, 2004.

SIMPLÍCIO, A.A.; SANTOS, D.O. Transferência de Embriões em Caprinos no Brasil: estágio atual e perspectivas. IN: **I Curso Nacional de Biotecnologia de Embriões**. Sobral, CE. 2000. 16p. (mimeo).

SKRZYSZOWSKA, M.; SMORAG, Z. Cell loss in bisected mouse, sheep and cow embryos. **Theriogenology**. v. 32, n. 1, p.115-21, 1989.

STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. 3ed. Illinois. Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. 1998. 180p.

SZÉLL, A. ; HUDSON, R. H. H. Factores affecting the survival of bisected sheep embryos in vivo. **Theriogenology**. v. 36, n. 3, p. 379-87, 1991.

TSUNODA, Y.; WAKASU, M.; YASUI, T.; SUGIE, T. Micromanipulation and freezing of goat embryos. In: International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, v. 10, Urbana, 1984. **Proceedings**. Urbana, University of Illinois, p. 249-50, 1984..

TSUNODA, Y.; TOKUNAGA, T.; SUGIE, T.;KATSUMATA, M. Production of monozygotic twins following the transfer of bisected embryos in the goats. **Theriogenology**, v.24: p. 337-43, 1985.

UDY, G. B. Commercial splitting of goats embryos. **Theriogenology**. V. 28, n. 6, p. 837-47, 1987.

WILLIAMS, T.J.; ELSDEN, R.P.; SEIDEL, G. E. Pregnancy rates with bisected bovine embryos. **Theriogenology**. v. 22, n. 5, p.521-31, 1984.

WOOD , E.C.; TROUNSON,A. Uses of embryo duplication in humans: Embryology and ethics. **Human Reproduction**. v. 15, n. 3, p. 497-501, 2000.

YANG, X. e ANDERSON, G.B. Micromanipulation of mammalian embryos: Principles, progress and future possibilities. **Theriogenology**. v. 38, p. 315-35, 1992.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, H.; MATSUZAKI, S.; HOSHI, H. Ultrastructural differences in bovine morulae classified as high and low qualities by morphological evaluation. **Theriogenology**, v. 57, p.1273-1283, 2002.

AGRAWAL, K.P.; BHATTACHARYYA, N.K. Non-surgical transplation of embryo in goats. **In: Intern Confer Goat Prod Disease**, 3., Tucson, 1982. Proceedings. Arizona Tucson, Scottsdale AZ, 1982. p. 340.

ALLEN, W.R. e PASHEN, R.L. Production of monozygotic twins by embryo micromanipulation. **J. Reprod. Fertil.** , Cambridge, v. 71(2), p. 607-13, 1984.

ANDRIOLLI, A.; BISCEGLI, C.L.;SOARES, A.T.; MOURA-SOBRINHO, P.A. Detector de renhez por efeito Doppler para caprinos. **Rev. Bras. de Reprod. Anim.**, v.21, p. 148-9, 1997.

ANDRIOLI, A.; SIMPLÍCIO, A.A.; SOARES, A.T.; VISINTIN, J.A. Eficiência da recuperação de embriões e os efeitos de consecutivas colheitas sobre o aparelho reprodutor de doadoras da espécie caprina. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** v. 36, n. 3, 1999.

ANDRIOLI-PINHEIRO, A. **Métodos de colheita e de inovulação de embriões caprinos (Capra hircus, LINNAEUS, 1758) e os efeitos de repetidas colheitas na vida reprodutiva de doadoras.** São Paulo: USP, FMVZ, 1993. 100p. Dissertação - (Mestrado).

ANDROUKOVITCH, J.L.; KOZICKI, L.E.; KOZEMJAKIM, D. A.; ABREU, R.M.; NUNEZ, C. Coleta de embriões caprinos com sonda uretral humana. **Archives of Veterinary Science**. V. 7, n. 1, p. 37-41, 2002.

ARAÚJO, A.A. de. **Viabilidade técnica da transferência de embriões congelados na espécie caprina em clima tropical**. Fortaleza: UECE, 1994. 52p. Dissertação - (Mestrado).

ARMAS, R. de; SOLANO, R.; BERNAL, A.; GONZALEZ, F. Factores affecting in vitro and in vivo viability of bisected cattle embryos. **Theriogenology**. V. 37, n. 1, p.199, 1992.

ARMSTRONG, D. T.; PFITZNER, A.P.; SEAMARK, R. F. Ovarian responses and embryo survival in goats folling superovulation and embryo transfer. **Theriogenology**. v. 17, 1982.

ARMSTRONG, D.T, et al. Endocrine responses of goats after induction of superovutation with PMSG and FSH. **Journ. Reprod. Fertil.**, v.63, p.395-401, 1983.

ARMSTRONG, D.T.; EVANS, G. Hormonal regulation of reproduction: induction of ovulation in sheep and goats with FSH preparations. In: **Proc. 10 th Int. Congr. Anom. Reprod. And AI**. Urbana, IL. p.8-15,1984.

BARI, F. et al. Effect of mating system, flushing procedure, progesterone dose and donor ewe age on the yield and quality of embryos within a MOET program in sheep. **Theriogenology**. v. 53, p. 727-42, 2000.

BARI, F.; KHALID, M.; HARESIGN, W.;MURRAY, A.; MERRELL, B. Factors affecting the survival of sheep embryos after transfer within a MOET program. **Theriogenology**. v. 59, p. 1265-75, 2003.

BARIL, B. et al. Embryo production, freezing and transfer in angora, alpine and saanem goats. **Zuchthygiene**, v.24, p.101-115, 1989.

BARIL, G.; Poosibilidades atuais da transferência de embriões em caprinos. Nouzilly: France. **Anais ... XI Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, 1995, p. 110-7.



BATT, P.A.; KILLEEN, I.D.; CAMERON, A.W.N. Use of single or multiple injections of FSH in embryo collection programmes in goats. **Reprod, Fertil. Der.**, v.5, p.49-56, 1993.

BECKETT, D. M.; OPPENHEIM, S. M.; MOYER, A. L.; BONDURANT, R. H.; ROWE, J. D.; ANDERSON, G. B. Progestin implants can rescue demi-embryo pregnancies in goats: a case study. **Theriogenology**, v. 51, p. 1505-11, 1999.

BEM, A. R. et al.,; Obtenção de gêmeos bovinos monozigóticos através da micromanipulação. In: Reun. An. Soc. Bras. Zoot., 1987, Brasília-DF. **Anais** . . . p. 356.

BEM, A. R. de. National position paper: embryo transfer technology for genetic improvement. In: **Global Worksh. Biotecnol. Appl. Anim. Prod & Health**. Beijing, China. 1989.

BONDURANT, R. H. Embryo transfer in sheep and goats. In: Morrow D.A. **Corrent therapy in Theriogenology**. Philadelphia, W. B. Saunders, v. 2, p. 63-6, 1986.

BONDURANT, R.H.et al. Nonsurgical collection of blastocysts from dairy goats. **Theriogenology**, v. 22, n. 4, p. 423-31, 1984.

BREBION, G.B.P.; CHESNÉ, P. **Manual de Formación práctica para el transplante de embriones en ovejas y cabras**. Estudio FAO Production y Sanidad Animal. p.123-34, 1995.

BREDBACKA, P. Factors affecting cell viability during bisection of bovine embryos. **Theriogenology**. v. 44, p. 159-66, 1995.

BUCKRELL, B.C. Applications of ultrasonography in reproduction in seep and goats. **Theriogenology**, v. 29, p. 71-84, 1988.

CBRA – **Colégio Brasileiro de Reprodução Animal**. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 2ed. 1998.

CHOW, L.A.; VALLE, M.A.G.; COELHO, S.G. Transferência de embriões em caprinos: relato de um caso. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 10, n.1, p.9-10,1986.

COGNIÉ, Y.; BARIL, G.; POULIN, N.; MERMILLOD, P. Corrent status of embryo technologies in sheep and goat. **Theriogenology**. V. 59, p. 171-88, 2003.

EVANS , C.; ARMSTRONG, D.T. Reproduction of sperm transport in ewes by superovulation treatment. **Jorn. Reprod. Fertil.** V.70, p.47-53, 1984.

FAOSTAT data, 2005. Disponível em <<http://faostat.fao.org>>. Last updated February 2005.

FERNANDES, C.A.C.; Aspectos nutricionais relacionados a doadoras e receptoras de embrião. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31, p.137-45, 2003.

FERNANDES, C.A.C. Inovulações não cirúrgicas e taxa de gestação de receptoras de embrião. **Arq. Bras. Méd. Vet. Zotec.**, v. 51, n. 3, p. 263-6, 1999.

FLORES-FOXWORTH, G.; McBRIDE, B.M.; KRAEMER, D.C.; NUTI, L.C. A comparison between laparoscopic and transcervical embryo collection and transfer in goats. **Theriogenology**. v. 37, n. 1, p.213, 1992.

FOOTE, W.C.; CALL, J.W.; BUNCH, T.D. The potential and limitations of embryo transfer in goats. **In: International Conference on goats**, 4., Brasília, v. 1, p. 611-621, 1987.

FREITAS, V.J.F.; SIMPLÍCIO, A.A. Capítulo 2. Diagnóstico de Gestação em Caprinos. IN: GONSALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R. de; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Varela, 2002a. p. 15-24.

FREITAS, V.J.F.; SIMPLÍCIO, A.A. Capítulo 9. Transferência de Embriões em Caprinos. IN: GONSALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R. de; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Varela, 2002b. p. 179-194.

FREITAS, V.J.V. Superovulation and embryo transfer in goats and sheep. **Acta Scientiae Veterinariae**. 31 (Suplemento). P.97-103, 2003.

FUNDAÇÃO CEPRO – **Atlas do Estado do Piauí**. Rio de Janeiro: IBGE, 1990, 26p.

GONZALEZ, F.H.D. **Introdução à Endocrinologia Reprodutiva Veterinária**, UFRGS, Porto Alegre, 2002.

GRAY, K.R.; BONDIOLI, K.R.; BETTS, C.L. The commercial application of embryo splitting in beef cattle. *Theriogenology*. v. 35, n. 1, p. 37-44, 1991.

GREYLING, J.P.C.; NEST, M. V. D. Synchronization of estrus in goats: dose effect of progestagen. **Small Ruminant Research**. v. 36, p. 201-207, 2000.

GUSMÃO, A.L.; MOURA, J.C.A.; CHALHOUB, M.; RIBEIRO FILHO, A.L. Colheita, avaliação e criopreservação de embriões caprinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 27, n. 2, p.115-9, 2003.

GUZIK, A.; NIEMANN, H. Superovulation and recovery of zygotes suitable for microinjection in different breeds of sheep. **Animal Reproduction Science**. v.40, n.3, p.215-227, 1995.

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 6.ed. São Paulo. Manole. 2004.

HOLTZ, W. Embryo transfer in goats in Europe: state of the art and future perspectives. I Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte. **Anais ... Paraíba-Brasil**. p. 163-8, 2000.

HUNTER, G.L.; ADAMS, C.E.; ROWSON, L.E. Inter-breed ovum transfer in sheep. **J. Agric. Sci.**, v. 46, p. 143-9, 1955.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Anuário Estatístico do Brasil**. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em 21 de junho de 2005.

ISHWAR, A.K.; MEMON, M.A. Embryo transfer in sheep and goats: a review. **Small Ruminant Research**. v. 19, p. 35-43, 1996.

LAMBERTH, V.A.; LOONEY, C.R.; VOELKEL, S.A.; JACKSON, D.A.; HILL, K.G.; GODKE, R.A. Microsurgery on bovine embryos at the morula stage to produce monozygotic twins calves. **Theriogenology**, v. 20, p. 85-98, 1983.

LEIBO, S. P.; RALL, W. F. Increase in production of pregnancies by bisection of bovine embryos. **Theriogenology**. v. 27, n. 1, p. 245, 1987.

LEITE, E.R.; STUTH, J.W. Fecal NIRS equations to assess diet quality of free-ranging goats. **Small Rumin. Res.**, v. 15, p. 223-30, 1995.

LIMA-VERDE, J.B.; LOPES JÚNIOR, E.S.; TEIXEIRA, N.R.O.; PAULA, A.A.; MEDEIROS, D.R.; FREITAS, V.J.F. Transcervical embryo recovery in Saanen goats. **South African Journal of Animal Science**. V. 33, p. 127-30, 2003.

LIMA, P.F. de. **Utilização de gonadotrofina hipofisária e extra-hipofisária na superovulação de caprinos**, Recife: UFRPE, 1989. 83p. (Dissertação).

LIMA, P.F. de et al. Eficiência de diferentes métodos de colheita embrionária em caprinos (resultados preliminares). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.20, n.2, p.63-68, 1996.

LIMA, F.R.G.; ARAÚJO, A.A.; FREITAS, V.J. de F.; Uso de diferentes tratamentos hormonais para sincronização do estro em cabras nativas do Nordeste do Brasil. **Ver. Brás. Reprod. Anim**, v. 21, n. 2, p. 136-9, 1997.

MACHADO, R.; SALLES, H. O.; SIMPLÍCIO, A.A. The application of reproductive technologies in the management of small ruminants genetic resources. In; IGA/FAO ROUND TABLE ON THE GLOBAL MANEGEMENT OF SMALL RUMINANTS GENETIC RESOURCES, 1996, Beijing. **Proceedings** . . . Bangkok: FAO Regional Office for Asia and Pacific, 1996. p. 85-101.

MACHADO, R.; SIMPLÍCIO, A.A. Avaliação de programas hormonais para a indução e sincronização do estro em caprinos. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v. 36, n. 1, p. 171-8, jan. 2001.

MACHADO, V.P.; PINHEIRO, J.L.T.; NUNES, J.F.; MEDEIROS, C.H.; GUERRA, F.F.; FIGUEIRÊDO, E.L. Colheita de embriões Caprinos Bôer por via transcervical. **Rev. Bras. Reprod. Anim. Supl.**, n. 5, p. 94-96, 2002.

MANI, A.U.; WATSON, E.D.; McKELVEY, W.A.C. The effects of subnutrition before or after embryo transfer on pregnancy rate and embryo survival. **Theriogenology**, Los Altos, v. 41, n. 6, p. 1673-1678, 1994.

MAURER, R.R. Embryo splitting and transfer in sheep. **Theriogenology**. v. 29, n. 1, 1988.

McKELVEY, W.A.C.; ROBINSON, J.J. Collection of embryos from ewes by laparoscopy. **Vet. Rec.**, v. 115, p. 230, 1984.

McKELVEY, W.A.C.; ROBINSON, J.J.; AITKEN, R.P. A simplified technouque for the transfer of ovine embryos by laparoscopy. **Veterinary Record**. v. 117, p. 492-94, 1985.

McKINNON, A.O. Breeding and Its Technology – Now And The Future. **World Trotting Conf Papers**. p. 1-24, 1999. Disponível em <<http://www.harness.org.au/99wldcon/PMCKINN5.HTM>>. Acesso em 23 de fevereiro de 2005.

MEDEIROS, L.P. et al. **Caprinos**: princípios básicos para sua exploração. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agropecuária do Meio-Norte. Teresina: EMBRAPA - CPAMN; Brasília: EMBRAPA - SPI, 1994.

MELO, L. F.; **Avaliação *in vitro* da micromanipulação de embriões bovinos produzidos *in vivo*, visando a bissecção e a identificação do sexo**. 2004. 60p. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília. Brasília, 2004.

MILLER, B.G. ARMSTRONG, D.T. Infertility in superovulated immature rats: role of ovarian steroid hypersecretion. **Biol. Reprod.** V.26, p.861-68, 1982.

MOTLOMELO, K. C.; GREYLING, L.P.C.; SCHWALBACH, L.M.J. Synchronisation of estrus in goats: the use of different progestagen treatments. **Small Ruminant Research.** v. 45, p. 45-9, 2002.

MULLEN, R. J.; WHUTTEN, W. K.; CARTER, S. C. Studies on chimeric mice and half embryos. In: Annual Report of the Jackson Laboratory, p. 67-8, 1970 apud Williams, T. J.; Elsdon, R. P.; Seidel J. R. G. E. Pregnancy rates with bisected bovine embryos. **Theriogenology**, Los Altos, 22(5): 521-31, 1970.

NASCIMENTO, I.M.R. do.; **Sincronização do estro com acetato e medroxiprogesterona, progesterona natural e norgestomet e inseminação artificial com sêmen congelado em cabras SRD.** 2004. 88p. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2004.

NEWCOMB, R.; ROWSON, L.E.A. Conception rate after uterine transfer of cow eggs in relation to synchronization of estrus and age of eggs. **J. Reprod. Fertil.** v. 43. 539p. 1975.

NICHOLAS, J.S. e HALL, B.V. Experiments on developing rats. II. The development of isolated blastomeres and fused eggs. **J. Exp. Zool.** v. 90, p. 441-59, 1942.

NUNES, J. F.; CIRÍACO, A.L.T.; SUASSUNA, U. **Produção e reprodução de caprinos e ovinos**, 2ed., Fortaleza: Gráfica LCR, 1997. 199p.

NUNES, J. F. Capítulo 7. Inseminação Artificial em Caprinos. IN: GONSALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R. de; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal.** São Paulo: Varela, 2002. p. 111-126.

OLIVEIRA, M. A.L.; GUIDO, S.I.; LIMA, P.F. Comparasion of different protocols used to induce and synchronize estrus cycle of Saanen goats. **Small Ruminant Research**, v. 40, p.149-153, 2001.

OLIVEIRA, V.S. de. **Efeitos do hormônio folículo estimulante (FSH) e da gonadotrofina da menopausa humana (hMG) como agentes superovulantes em cabras (*Capra hircus* LINNAEUS, 1758) utilizadas em transferência de embriões.** São Paulo: USP, 1992. 109p. Dissertação (mestrado).

OLIVEIRA, V.S.; VISINTIN, J.A.; GONZALEZ, C.I.M.; Colheita de embriões em cabras pelo método não-cirúrgico transcervical. FMVZ-USP. **Anais ... IX Congresso Brasileiro de Reprodução Animal.** 1991. p. 315.

OTSUKI, K.; SOMA, T. **Bulletin of the Nacional Institute of Animal Industry** (Aoba, Chiba, Japan) v. 6, p. 27, 1964.

OZIL, J. P. , HEYMAN, Y.; RENARD, J. P. Production of monozygotic twins by micromanipulation and cervical transfer in the cow. **Vet. Rec.**, v.110. p. 126-7, 1982.

OZIL, J. P. Production of identical twins by bisection of blastocysts in the cows. **J. Reprod Fertility** v. 69. p. 463-8, 1983.

PEGORARO-RUMPF, L.M. et al. Coleta de embriões caprinos pelo método cirúrgico: resultados finais. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, 7, 1992. **Anais . . . Jaboticabal, São Paulo: SBTE, p. 89, 1992.**

PEREIRA, R.J.A.; LIMA, P.F.; WISCHRAL, A. Colheita de embriões caprinos por via transcervical. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL**, 9., Belo Horizonte, 1991. Programas e resumos. Belo Horizonte, 1991. p.314.

PEREIRA, R.J.T.A. **In vitro Fertilization und nachfolgende in vitro Kuntur bei der Ziege sowie transzervikale Embryonegewinnung von nicht narkotisierten Ziegen**, Hannover. 171 p, 1996. Tese - Escola Superior de Medicina Veterinária De Hannover.

PINEDA, M.H. Reproductive patterns of sheep and goat. In: McDONALD, L.E.; PINEDA, M.H. **Veterinary endocrinology and reproduction.** 4.ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1989. P. 428-47.

RABELO, M.C.; PEREIRA, R.J.T.; GUERRA, M.M.P.; FALCÃO FILHO, M.C.; MERGULHÃO, F.C.C. Administração de diferentes progestágenos em receptoras caprinas sem raça definida (SRD). **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 23, n. 3, p.375-7, 1999.

REICHENBACH, H.; OLIVEIRA, M. A.L. de; LIMA, P. F.de; SANTOS FILHO, A. S.; ANDRADE, J. C. O.Capitulo 8. Transferência e Criopreservação de Embriões Bovinos. IN: GONSALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R. de; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Varela, 2002. p. 127-177.

RHIND, S.M. Nutrition: its effects on reproductive performance and its hormonal control in female sheep and goats. In: SPEEDY, A.W. **Progress in sheep and goat research**. Willingsdof: CAB, p. 25 -47, 1992.

RIBEIRO, S.D.A. **Caprinocultura**: Criação racional de caprinos. São Paulo: Nobel, 1997.

SALLES, H.O. **Bipartição de embriões em caprinos, uma técnica de fácil execução**. Disponível em <[www.ruralnet.com.br/artigos](http://www.ruralnet.com.br/artigos). Artigos de divulgação em site, 2001.

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. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES, 11. 1996. Canela, RS. **Anais . . .** Canela, RS: Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões, 1996, p. 215.

SANTOS, D.O.; SIMPLÍCIO, A.A.; MACHADO, R. **Manual do inseminador de caprinos e ovinos**. Sobral: Embrapa Caprinos, 1999. 33p. (Embrapa Caprinos. Documentos, . . . ).

SCHOENIAN, S. **An Update on Sheep Artificial Insemination**. Salisbury, Maryland. 1999. Disponível em : < [www.sheepandgoat.com/ai.html](http://www.sheepandgoat.com/ai.html)> acesso em 22 de junho de 2005.

SILVA, M.H.; MEDEIROS, L.R.D.; GOMES NETO, O.C.; PROCÓPIO, °C.S.; CÂMARA, D.R.; SILVEIRA FILHO, M.E.M.; CARNEIRO, G.F. Recuperação e



viabilidade embrionária pelos métodos cirúrgico e transcervical em programa comercial de transferência de embriões em caprinos da raça Boer. **Acta Scientiae Veterinariae**, p. 582, 2003.

SILVEIRA, L.L.; **Avaliação da bipartição como alternativa para melhorar os índices de gestação na transferência de embriões em equinos**. 2004. 73p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Brasília. Brasília, 2004.

SIMPLÍCIO, A.A. SALLES, H.O.; SANTOS, D.O. **Reprodução e Manejo Reprodutivo de Caprinos e Ovinos**. Sobral: Embrapa Caprinos. 23p. 1999

SIMPLÍCIO, A.A.; SALLES, H.O.; SANTOS, D.O. **O regime de manejo na sobrevivência embrionária e na taxa de prenhez em receptoras caprinas, no Nordeste do Brasil**. Arquivo da Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, v.26, n.1, p.368, 1998.

SIMPLÍCIO, A.A.; SANTOS, D.O. Transferência de Embriões em Caprinos no Brasil: estágio atual e perspectivas. **IN: I Curso Nacional de Biotecnologia de Embriões**. Sobral, CE. 2000. 16p. (mimeo).

SIMPLÍCIO, A.A.; SALLES, H.O.; SANTOS, D.O. Transferência de embriões nos pequenos ruminantes domésticos. **Rev. Bras. Reprod. Anim., Supl. 5**, p.17-22, 2002.

SKRZYSZOWSKA, M.; SMORAG,Z. Cell loss in bisected mouse, sheep and cow embryos. **Theriogenology**. v. 32, n. 1, p.115-21, 1989.

SOUSA, J.H.M. **Coleta de Embriões e Resposta Superovulatória Utilizando Diferentes Preparação de FSH em Ovelhas Deslanadas na Região Semi-Árida da Paraíba**. Areia: Paraíba, 1999. 56p. Dissertação – (Mestrado) Universidade Federal da Paraíba.

STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. 3ed. Illinois. Sociedade Internacional de Transferência de Embriões. 1998. 180p.

SUYADI, SOHNREY, B. HOLTZ, W. Transcervical embryo collection in Boer gotas. **Small Rum. Res.**, v. 36, p. 195-200, 2000.

SZÉLL, A. ; HUDSON, R. H. H. Factores affecting the survival of bisected sheep embryos in vivo. **Theriogenology**. v. 36, n. 3, p. 379-87, 1991.

TERVIT, H. R. et al. Embryo transfer in Angora goats. **N. Z. vet. J.**, v. 31, p. 67-70, 1983.

TRALDI, A.S. et al. Utilização de antiprostaglandinico na prevenção da regressão prematura de corpos lúteos em caprinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11, 1995, Belo Horizonte. **Anais** . . . Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1995. p. 244.

TSUNODA, Y.; WAKASU, M.; YASUI, T.; SUGIE, T. Micromanipulation and freezing of goat embryos. In: International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, v. 10, Urbana, 1984. **Proceedings**. Urbana, University of Illinois, p. 249-50, 1984..

TSUNODA, Y.; TOKUNAGA, T.; SUGIE, T.;KATSUMATA, M. Production of monozygotic twins following the transfer of bisected embryos in the goats. **Theriogenology**, v.24: p. 337-43, 1985.

UDY, G. B. Commercial splitting of goats embryos. **Theriogenology**. v. 28, n. 6, p. 837-47, 1987.

VIEIRA, V. E. **Reprodução programada em cabras utilizando Gonadotrofinas e Prostaglandinas, com diagnóstico ultrassonográfico da gestação e concentração sérica de progesterona**. 2001, 38p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2001.

VOEKEL, S.A. , HUMES, P.E.; GOODKE, R. A. Pregnancy rates resulting from non-surgical transfer of micromanipulated bovine embryos. **Int. Cong. Anim. Reprod. And I.A.**, Urbana. P. 251-3, 1984.

WISCHRAL, A.; LIMA, P.F.; OLIVEIRA, M.A.L.; RIBEIRO, V.M.F. **Transferência de embriões caprinos**. Revista do Centro de Ciências Rurais, v.19, p. 19, suplemento,1989.

WILLADSEN, S. M. A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. **Nature**, v. 277. p. 298-300, 1979.

WILLADSEN, S. M. e POLGE, C. Attempts to produce monozygotic quadruplets in cattle by blastomere separation. **Vet Rec.** v. 108. p. 211-3, 1981.

WILLIAMS, T.J.; ELSDEN, R.P.; SEIDEL, G. E. Pregnancy rates with bisected bovine embryos. **Theriogenology.** v. 22, n. 5, p.521-31, 1984.

WOOD , E.C.; TROUNSON,A. Uses of embryo duplication in humans: Embryology and ethics. **Human Reproduction.** v. 15, n. 3, p. 497-501, 2000.

YANG, X. e ANDERSON, G.B. Micromanipulation of mammalian embryos: Principles, progress and future possibilities. **Theriogenology.** v. 38, p. 315-35, 1992.