

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

DEISY JOHANA DIAZ SANCHEZ

**VIABILIDADE DA SUCESSIVA ESTIMULAÇÃO HORMONAL PARA
COLHEITA OOCITÁRIA POR LAPAROSCOPIA (COL) NA
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES EM CAPRINOS**

**FORTALEZA
2013**

DEISY JOHANA DIAZ SANCHEZ

VIABILIDADE DA SUCESSIVA ESTIMULAÇÃO HORMONAL PARA
COLHEITA OOCITÁRIA POR LAPAROSCOPIA (COL) NA PRODUÇÃO *IN*
VITRO DE EMBRIÕES EM CAPRINOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da
Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal

Linha de Pesquisa: Reprodução e Sanidade de Pequenos
Ruminantes

Orientador: Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas

FORTALEZA
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Estadual do Ceará
Biblioteca Central Prof. Antônio Martins Filho
Bibliotecária Responsável – Leila Sátiro – CRB-3 / 544

- S299v Sanchez, Deisy Johana Diaz
Viabilidade da sucessiva estimulação hormonal para Colheita Oocitária por Laparoscopia (COL) na produção *in vitro* de embriões caprinos/ Deisy Johana Diaz Sanchez. — 2013.
CD-ROM. 63f :il. (algumas color.) ; 4 ¾ pol.
“CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico, acondicionado em caixa de DVD Slin (19 x 14 cm x 7 mm)”.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Fortaleza, 2013.
Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.
Orientação: Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas.
1. Caprino. 2. Laparoscopia. 3. Oócito . I. Título.

CDD: 636.39

DEISY IOHANA DIAZ SANCHEZ

VIABILIDADE DA ESTIMULAÇÃO HORMONAL PARA COLHEITA
OOCITÁRIA POR LAPAROSCOPIA (COL) NA PRODUÇÃO *IN VITRO*
DE EMBRIÕES EM CAPRINOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da
Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências
Veterinárias.

Aprovada em: 20 / 09 / 2013

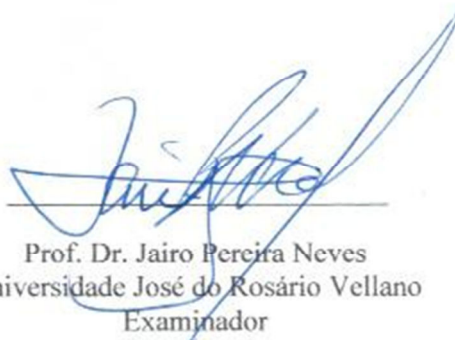
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas
Universidade Estadual do Ceará
Orientador



Prof. Dr. Airton Alencar de Araújo
Universidade Estadual do Ceará
Examinador



Prof. Dr. Jairo Pereira Neves
Universidade José do Rosário Vellano
Examinador

*À minha família
Pelo amor apoio e carinho*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Ceará (UECE) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV).

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de bolsas de pesquisa e pelo apoio financeiro ao projeto.

À minha família, por ser a minha principal motivação e por ter me apoiado em todos os momentos da minha existência.

Ao meu orientador Vicente José de Figueirêdo Freitas, pela paciência, ensinamentos e pela oportunidade de fazer parte da sua equipe de trabalho.

Ao meu namorado Antônio Carlos de Albuquerque Teles Filho, pelo apoio incondicional e o carinho em todo momento.

À minha família brasileira (Ritacy Azevedo, Antônio Cianfrone, Milena e Melissa Teles, Rivana Azevedo) pela companhia e apoio.

À minha amiga Alexsandra Fernandes Pereira, pela amizade, ensinamentos profissionais e pessoais (Grande exemplo de pessoa, amiga e Profissional).

À Dra Luciana Magalhães Melo, por ser um grande exemplo de pesquisadora. Ao meu pequeno amiguinho Caio pelas orações oferecidas pela minha saúde.

Aos meus grandes amigos Agostinho Soares de Alcântara Neto, Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista, Maria Cláudia dos Santos Luciano, Carlos Henrique Souza de Melo, e Carlos Francisco de Sousa pelos conselhos, momento felizes e palavras de apoio.

Aos amigos de laboratório Iana Sales Campelo, Joanna Maria Gonçalves de Souza-Fabjan, Dowglish Ferreira Chaves, Amanda Albuquerque Rocha, pela contribuição e apoio nos momentos difíceis.

Aos meninos de iniciação científica que ainda estão aqui e aqueles que já passaram muito obrigada pela ajuda durante estes dois anos de mestrado.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de sucessivos tratamentos hormonais de estimulação para Colheita de Oócitos por Laparoscopia (COL) sobre a produção quanti-qualitativa de oócitos e produção *in vitro* de embriões de cabras criadas nos trópicos. No Experimento 1, 12 cabras adultas cíclicas mestiças de Anglo-Nubiano, foram submetidas a 7 tratamentos de estimulação ovariana seguidos de COL. Esponjas intravaginais com 60 mg de MAP foram inseridas no início do tratamento (D0). No sétimo dia foi aplicada, por via i.m., 75 µg de cloprostenol. A superestimulação ovariana foi obtida pela administração de 180 mg de NIH-FSH-P1, divididos em 5 doses decrescentes no D7 a D9 do tratamento progestágeno. Durante este experimento foram verificados: número e tamanho dos folículos, número e qualidade dos CCOs recuperados e taxa de recuperação. No Experimento 2, o grupo de fêmeas tratadas sete vezes (as mesmas usadas no experimento 1) foi comparado com um grupo de fêmeas sem prévio tratamento hormonal/COL. Os CCOs de ambos grupos foram submetidos as etapas de MIV, FIV e CIV. Neste experimento, além das variáveis observadas no experimento 1, também foi verificado: taxa de clivagem, taxa de blastocisto e o número de blastômeros por embrião. No Experimento 1, um total de 1556 folículos foram puncionados ($18,5 \pm 6,8$ /doadora) e 1117 CCOs foram recuperados ($13,3 \pm 5,0$ /doadora). Não foi encontrada diferença ($P > 0,05$) para as variáveis: número de folículos puncionados, número de CCOs recuperados, e taxa de recuperação. Contudo, o percentual de folículos grandes foi diferente ($P < 0,05$) entre as COL 1 ($27,7 \pm 10,5$) e 7 ($12,4 \pm 12,1$). No Experimento 2, não foram verificadas diferenças ($P > 0,05$) entre os grupos de cabras] tratadas e não tratadas no que se refere a produção quanti-qualitativa dos oócitos. Contudo, a taxa de recuperação foi menor ($P < 0,05$) no grupo de cabras tratadas quando comparada a do grupo de não tratadas (68,5% vs 81,4% respectivamente). Não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) entre os grupos experimentais para as variáveis: taxa de clivagem, taxa de blastocisto (sétimo e oitavo dia), taxa de eclosão como também o número de blastômeros por embrião. Em conclusão, os dados obtidos no presente estudo indicam que é possível o uso repetido de tratamentos hormonais seguidos de COL em cabras criadas nos trópicos, sem afetar a qualidade dos CCOs recuperados e subsequente produção *in vitro* de embriões.

Palavras-chave: Caprino. Laparoscopia. Oócito.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of successive hormonal stimulation treatments followed by laparoscopic oocyte recovery (LOR) on the quantitative and qualitative production of oocytes and subsequent *in vitro* embryo production of goats raised in the tropics. In Experiment 1, 12 adult cyclic crossbred Anglo-Nubian goats, were treated seven times for ovarian stimulation followed by LOR. Intravaginal sponges with 60 mg MAP were placed at the start of treatment (D0). On the seventh day was applied intramuscularly, 75 mg of cloprostenol. The ovarian stimulation was achieved by the administration of 180 mg NIH-FSH-P1, divided into 5 decreasing doses from D7 to D9 progestagen treatment. During this experiment were recorded: number and size of follicles, number and quality of COCs recovered and the recovery rate. In a second experiment, the group of females treated seven times (the same used in experiment 1) was compared with a group of females without previous hormonal treatment/LOR. The COCs from both groups underwent the steps of IVM, IVF and IVC. In this experiment, besides the variables observed in experiment 1 was also observed: cleavage rate, blastocyst rate and the number of blastomeres per embryo. In experiment 1, a total of 1556 follicles were punctured ($18.5 \pm 6.8/\text{donor}$) and 1117 COCs were recovered ($13.3 \pm 5.0/\text{donor}$). Was no difference ($P > 0.05$) in the variables: number of punctured follicles, number of COCs recovered, and recovery rate. However, the percentage of large follicles was different ($P > 0.05$) between the COL 1 (27.7 vs 10.5) and 7 (12.4 vs 12.1). In experiment 2, there were no differences ($P > 0.05$) among groups of goats treated or not with regard to quantitative and qualitative production of oocytes. However, the recovery rate was lower ($P < 0.05$) in treated goats group in comparison with untreated group (68.5% vs 81.4%, respectively). There were no differences ($P > 0.05$) among the experimental groups for cleavage rate, blastocyst rate (seventh and eighth day), hatching rate as well as the number of blastomeres per embryo. In conclusion, the data obtained in this study indicate that repeated use of hormonal treatment followed by LOR in goats raised in the tropics is possible, without affecting the quality of COCs recovered and subsequent *in vitro* production of embryos.

Keywords: Goat. Laparoscopy. Oocyte

LISTA DE FIGURAS

Revisão de literatura

Figura 1 – (A) Colheita oocitária sob controle laparoscópico em pequenos ruminantes, (B) Punção folicular usando sistema WTA com agulha calibre 22 G. Fonte: LFCR..... 20

Capítulo 1

Figura 1 – Number of punctured follicles (PF), recovered COCs and recovery rate in goats raised in the tropics and subjected to seven sessions of hormonal treatment/LOR. No significant difference was found among sessions ($P > 0.05$)..... 46

Figura 2 – Percentage of small, medium and large follicles in goats raised in the tropics and submitted to seven sessions of hormonal treatment/LOR. Bars with different superscripts (a,b) are significantly different at $P < 0.05$ 47

Figura 3- Representative image of blastocysts on day 8 of culture and stained with Hoechst 33342 derived from goats treated (A, B) or untreated (C, D), respectively.....48

LISTA DE TABELAS

Revisão de literatura

Tabela 1 – Impacto do clima sobre o desempenho reprodutivo.....	24
---	----

Capítulo 1

Tabela 1 – Mean ($\pm$ SD) or percentage of some parameters observed in goats raised in the tropics, which received successive hormonal treatments/LOR (treated group) or not received previous treatment (untreated group).....	44
---	----

Tabela 2 – Embryo production in goats raised in the tropics, which received successive hormonal treatments/LOR (treated group) or not received previous treatment (untreated group).....	45
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% – Porcentagem

°C – Grau Celsius

µg – Micrograma

µL – Microlitro

µM – Micromolar

ANOVA – Análise de Variância

BSA – Albumina sérica bovina (*bovine serum albumin*)

CIV – Cultivo *in vitro*

COL – Colheita oocitária por laparoscopia

COC – Complexo *cumulus*-oócito (*Cumulus-oocyte complexes*)

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CO₂ – Dióxido de carbono

cm – Centímetro

D – Dia

Et al. – *Et alii* (e outros)

FCS – Soro fetal bovino (*foetal calf serum*)

FSH – Hormônio Folículo Estimulante (*follicle-stimulating hormone*)

FUNCAP – Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico

h – Hora

Hpi – Horas pós-inseminação (*hours post insemination*)

IA – Inseminação Artificial

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICSI – Injeção intracitoplasmática de espermatozoide (*Intracytoplasmic sperm injection*)

ITU- Índice de temperatura de umidade

IVF – Fecundação *in vitro* (*in vitro fertilization*)

IVM – Maturação *in vitro* (*in vitro maturation*)

IVP – Produção *in vitro* (*in vitro production*)

kg – Quilograma

LOR – Laparoscopic Oocyte Recovery

LH – Hormônio luteinizante (*luteinizing hormone*)

m – Massa

M – Mitose

MAP – Acetato de Medroxiprogesterona (Medroxiprogesterone acetate)

MCI – Massa celular interna

min – Minuto

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mM – Milimolar

mmHg – Milímetro de mercúrio

MOTE- Multiple Ovulation and Transference of Embryo

Na/K; Na/K ATPase – Sódio/potássio ATPase

Na⁺ – Sódio

NaCl – Cloreto de sódio

No. – número

ng – Nanograma

O₂ - Oxigênio

PGF₂ ∞ – Prostaglandina F_{2α}

PIVE- Produção *In Vitro* de Embriões

PPGCV – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

Prof. – Professor

TNCS – Transferência Nuclear de Células Somáticas (*Somatic cell nuclear transfer*)

SD – Desvio padrão (*standard deviation*)

SOF – Fluido Sintético de Oviduto (Sintetic Oviduct Fluid)

TCM-199 – Meio de Cultivo Tecidual 199 (Tissue Culture Medium 199)

TE – Trofotoderma

U – unidade

UI- unidade internacional

USA – Estados Unidos da América (*United States of America*)

vs – *versus*

V/v – Volume/volume (*volume/volume*)

ZP – Zona pellucida (*zona pellucida*)

α – Alfa

β – Beta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Produção <i>in vivo</i> de embriões caprino	17
2.1.1 Superovulação	17
2.1.2 Fecundação das doadoras e regressão luteal	18
2.1.3 Colheita de embriões	19
2.2 Produção <i>in vitro</i> de embriões	19
2.2.1 Fonte de oócitos	20
2.2.2 Maturação <i>in vitro</i> (MIV)	21
2.2.3. Fecundação <i>in vitro</i> (FIV)	22
2.2.4 Cultivo <i>in vitro</i> (CIV)	23
2.3 Métodos de avaliação da qualidade do embrião	23
2.4 Efeitos do estresse térmico sobre os parâmetros reprodutivos	24
3 JUSTIFICATIVA	26
4 HIPÓTESE CIENTÍFICA	27
5 OBJETIVOS	28
5.1 OBJETIVO GERAL	28
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
6 CAPÍTULO 1	29
7 CONCLUSÕES	29
8 PERSPECTIVAS	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
APÊNDICE	62

1 INTRODUÇÃO

O Nordeste brasileiro é região com a maior população de caprinos do país, apresentando aproximadamente 8,7 milhões de animais, o que corresponde a 91% do rebanho nacional (IBGE, 2007). A caprinocultura no Brasil, é uma atividade que desempenha um papel importante na sociedade e na economia das populações especialmente da região Nordeste, por ser uma alternativa de subsistência para as famílias do semiárido, através da produção de carne, leite e couro, contribuindo com o sustento familiar (SOUZA et al., 2007).

No Brasil, a demanda por carne e lácteos provenientes da espécie caprina aumentou significativamente nos últimos anos, contudo ainda existe a necessidade de melhorar a produção no que diz respeito à qualidade e quantidade dos produtos. Ante esta realidade, torna-se indispensável o melhoramento do material genético dos rebanhos através da utilização de reprodutores e matrizes capazes de produzir uma progênie que atenda tais exigências de mercado.

Adicionalmente, é necessário aumentar o rebanho geneticamente superior. Para tanto, o uso de biotécnicas reprodutivas tem sido proposto tais como: Inseminação Artificial (IA), Múltipla Ovulação e Transferência de Embriões (MOTE) e a Produção *in vitro* de embriões (PIVE). Esta última quando comparada com outras técnicas como a MOTE apresenta algumas vantagens, como a possibilidade de produzir mais eficientemente um maior número de descendentes de cabras geneticamente valiosas. Além disso, a PIVE pode contornar problemas como a variabilidade da resposta superovulatória, baixas taxas de fecundação e a ocorrência de regressão prematura do corpo lúteo (COGNIÉ et al., 2003), além dos altos custos relativos à procedimentos cirúrgicos para a colheita e transferência dos embriões produzidos (BALDASSARRE e KARATZAS, 2004). Por outro lado, a PIVE também oferece a possibilidade de produzir descendência em situações em que não é possível utilizar a MOTE, tal como em animais pré-púberes, gestantes, puérperas e em animais idosos (BALDASSARRE et al., 2002).

A Colheita de Oócitos por Laparoscopia (COL) tem sido amplamente utilizada na espécie caprina para a recuperação de oócitos de qualidade utilizados posteriormente em programas de PIVE. Esta técnica proporciona nas doadoras uma rápida recuperação pós-operatória por tratar-se de uma técnica pouco invasiva (BALDASSARRE et al., 2002). Além disso, apresenta riscos mínimos para o desenvolvimento de aderências, permitindo a realização de sucessivas colheitas.

Para o sucesso da PIVE associada à COL, é importante a manutenção da resposta ovariana das doadoras, para a obtenção de um elevado número de oócitos de boa qualidade a serem utilizados. Para tanto, torna-se importante avaliar a resposta oocitária após sucessivos tratamentos hormonais seguidos de COL para posterior produção de *in vitro*, além da avaliação da qualidade dos embriões produzidos, visando a sua utilização em programas de melhoramento genético do rebanho em condições tropicais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Produção *in vivo* de embriões caprinos

A produção *in vivo* de embriões consiste em se obter um elevado número de embriões a partir de uma única doadora após as etapas de estimulação ovariana, fecundação e colheita embrionária (BARIL, 2006). Para muitos pesquisadores a MOTE é uma das tecnologias reprodutivas mais frustrantes, devido a uma alta variabilidade dos resultados obtidos (COGNIÉ et al., 1999; BALDASSARRE e KARATZAS, 2004). Dentre os fatores que contribuem com a imprevisibilidade desta técnica existem: a variabilidade da resposta superovulatória, baixa taxa de fecundação associada a um número elevado de ovulações e a ocorrência de regressão prematura de corpo lúteo (COGNIÉ et al., 1999; COGNIÉ et al., 2003). Em um programa bem sucedido de MOTE uma doadora poderia produzir de seis a oito embriões transferíveis, porém os resultados podem variar entre 0 a 30 embriões transferíveis por doadora. Tais variações (25 a 50% das doadoras) podem vir através de falhas na resposta com falhas na fecundação ou casos de regressão prematura de corpo lúteo (BALDASSARRE e KARATZAS, 2004). Contudo, muitos fatores como raça, idade, nutrição e estação reprodutiva podem interferir nessa resposta (BARIL et al., 1993; COGNIÉ, 1999; COGNIÉ et al., 2003).

2.1.1 Superovulação

A superovulação é um processo baseado na quebra da dominância folicular, tendo como resultado o recrutamento, seleção e consequente ovulação de um número maior de folículos do que o naturalmente estabelecido para um ciclo estral normal. A primeira gonadotrofina amplamente usada para tal propósito foi a Gonadotrofina Coriônica equina (eCG). Durante muito tempo a eCG era fornecida em uma única injeção variando de 1000 a 2000 UI, um ou dois dias antes da remoção do progestágeno, devido à sua longa meia-vida (COGNIÉ et al., 1999). Com o aparecimento comercial do Hormônio Folículo Estimulante (FSH), originário de extrato hipofisário, vários estudos foram realizados comparando a eficiência entre o eCG e FSH (ARMSTRONG et al., 1983; MAHMOOD et al., 1991). Nesses estudos, o uso do FSH demonstrou resultados superiores em termos de taxas de ovulação, de fecundação e qualidade de embriões produzidos.

Os protocolos tradicionais de superovulação incluem um tratamento progestágeno de 12 a 18 dias para mimetizar uma fase luteal, com aplicações de FSH começando dois dias

antes da remoção da fonte de progesterona (HOLTZ, 2005; MENCHACA et al., 2009). O tratamento de FSH, por sua vez consiste em seis a oito injeções administradas em doses decrescentes duas vezes ao dia, as quais poderiam ser associadas a uma dose moderada de eCG (MENCHACA et al., 2009).

Diversas tentativas têm sido realizadas com o objetivo de melhorar a resposta e de simplificar o protocolo reconsiderando alguns aspectos dos conhecimentos adquiridos sobre dinâmica folicular ovariana nos últimos anos (RUBIANES e MENCHACA, 2003; MENCHACA et al., 2009). Alguns autores recomendam que o início do tratamento superovulatório seja concomitante com a emergência de uma nova onda folicular após a ovulação (na ausência de um folículo dominante). Esta estratégia proporciona um crescimento homogêneo de pequenos folículos melhorando a resposta ovariana e a produção de embriões (COGNIÉ et al., 1999; COGNIÉ et al., 2003; MENCHACA et al., 2007; MENCHACA et al., 2009). A realização de repetidos tratamentos de superovulação em programas de MOTE tem resultado em queda de fertilidade e consequente queda na produção de embriões. Esta situação tem sido atribuída ao aparecimento de anticorpos neutralizantes de gonadotrofinas exógenas (REMY et al., 1991; ROY et al., 1999; DRION et al., 2001).

2.1.2 Fecundação das doadoras e regressão luteal

Basicamente, doadoras caprinas de embriões podem ser fecundadas por três métodos: monta natural, IA transcervical ou IA intra-uterina guiada por laparoscopia (BARIL, 2006). A falha na sincronização de ovulações após a retirada do dispositivo em fêmeas tratadas com FSH é umas das possíveis causas de falhas na fecundação (COGNIÉ et al., 2003). Esta falha pode ser devido também a distúrbios no transporte espermático (EVANS e ARMSTRONG, 1984).

Em programas de MOTE a regressão prematura de corpo lúteo pode afetar até 30% das doadoras (PINTADO et al., 1998). O mecanismo deste fenômeno ainda não é totalmente esclarecido, sendo acompanhado por uma baixa taxa de colheita embrionária e qualidade dos embriões colhidos (COGNIÉ et al., 2003). Algumas das hipóteses planteadas incluem, que a regressão prematura de corpo lúteo em cabras superovuladas é o resultado da ativação luteolítica e liberação de $\text{PGF}_{2\alpha}$ devido a elevadas concentrações de estradiol (SAHARREA et al., 1998). A administração de anti-inflamatórios não esteroides, como o Flunixin Meglumine, conseguiu inibir a regressão de corpos lúteos em cabras superovuladas (BATTYE et al., 1988; LOPES-JUNIOR et al., 2004), sendo que o mecanismo de ação está ligado à inibição da

cicloxigenase e assim agindo como um potente inibidor da biossíntese de prostaglandinas (ODENSVIK, 1995).

2.1.3 Colheita de embriões

Em caprinos, a colheita embrionária pode ser realizada através da técnica de laparotomia (cirúrgica), laparoscopia (semi-cirúrgica) ou por via transcervical (não-cirúrgica) (BARIL, 2006). A colheita por via cirúrgica é um dos métodos mais utilizados em pequenos ruminantes, pois é um método eficaz no que se refere às taxas de colheita. Contudo, em razão ao aparecimento de aderências com órgãos adjacentes ao trato reprodutivo, este método não pode ser praticado sucessivas vezes em uma mesma doadora, inviabilizando a denominação “doadora permanente” (HOLTZ et al., 2005; PARAMIO et al., 2010).

A colheita de embriões por via cirúrgica é realizada de seis a oito dias após a fecundação (BARIL, 2006; PARAMIO et al., 2010) e implica a exteriorização do trato reprodutivo para lavagem do interior dos cornos uterinos com meio de colheita.

A colheita de embriões por laparoscopia é um método menos invasivo, e permite a realização de sucessivas colheitas (BARIL et al., 1996). Contudo, esta técnica requer mão-de-obra qualificada e o uso de equipamentos de alto custo (endoscópio, fonte de luz fria, etc.).

Outra alternativa para a colheita de embriões em caprinos é a colheita não cirúrgica ou por via transcervical. Em caprinos, a cérvix é uma estrutura complexa e consistente que se estreita à medida que se aproxima do lúmen uterino dificultando a passagem de instrumentos que permitem o acesso ao útero por via transcervical como é requerido na IA e na colheita de embriões (GUSMÃO et al., 2009; FONSECA et al., 2012). Em vista disso, a administração de prostaglandinas e seus análogos têm sido utilizados para promover o relaxamento cervical e viabilizar a colheita de embriões pelo canal cervical (PEREIRA et al. 1998; LIMA VERDE et al., 2003).

2.2 Produção *in vitro* de embriões caprinos

A produção *in vitro* de embriões em pequenos ruminantes fornece alternativas para aumentar o número de embriões de fêmeas de alto valor genético como a colheita de oócitos de fêmeas pré-pubescentes, prenhes e até mesmo recém-abatidas. Além disso, fornece uma excelente fonte de embriões a relativo baixo custo para a pesquisa básica (PARAMIO et al., 2010). Em paralelo, também auxilia na aplicação de biotécnicas emergentes, tais como: a transferência nuclear de células somáticas e a transgênese (BALDASSARRE et al., 2002).

A PIVE possui quatro etapas principais: colheita dos oócitos, maturação de oócitos de folículos antrais, fecundação de oócitos maturados e por último, o cultivo dos presumíveis zigotos até transferência para receptoras ou criopreservação para posterior uso (COGNIÉ et al., 2003; PARAMIO et al., 2010).

2.2.1 Fonte de oócitos

A fonte de oócitos se apresenta como uma das etapas fundamentais na PIVE. A aspiração do conteúdo folicular em ovários de abatedouro é uma fonte de oócitos de menor custo e mais abundante para a produção de embriões caprinos, providenciando de 1,2 a 2 CCOs de qualidade aceitável por ovário (COGNIÉ et al., 1999). Contudo, seu uso em programas de melhoramento genético é limitado, visto que o histórico e estado sanitário são geralmente desconhecidos (ARMSTRONG et al., 1997). Vale ressaltar ainda que, em caprinos, a disponibilidade de ovários é escassa, visto que o abate de fêmeas, em algumas regiões, é limitado.

A colheita de oócitos em animais vivos pode também ser realizada por laparotomia. No entanto, o uso frequente diminui o rendimento devido à formação de aderências no trato reprodutivo da doadora com tecidos e órgãos circunvizinhos. Outra técnica aplicável em animais vivos é a colheita de oócitos por laparoscopia (COL) (Figura 1). Snyder & Dukelow (1974), foram os primeiros a descrever a técnica na espécie ovina. Anos mais tarde consolidou-se como uma técnica eficiente para a recuperação de oócitos em ovinos (BALDASSARRE et al., 1994) e caprinos (BALDASSARRE et al., 2002; PIERSON et al., 2004; AVELAR et al., 2012).

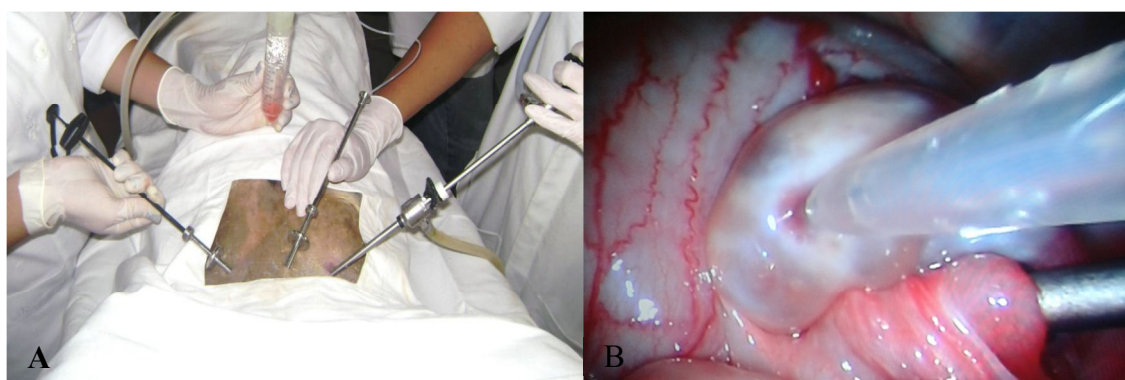


Figura 1. (A) Colheita oocitária sob controle laparoscópico em pequenos ruminantes, (B) Punção folicular usando sistema WTA com agulha calibre 22 G. Fonte: LFCR.

A COL permite a realização de colheitas repetidas em curtos períodos de tempo sem afetar a produção e a qualidade das estruturas colhidas (STANGL et al., 1999; PIERSON et al., 2005; MORTON et al., 2005; GIBBONS et al., 2007). A COL também pode ser utilizada para o fornecimento de oócitos destinados para uso em clonagem (PEREIRA et al., 2013) e transgênese (BALDASSARRE et al., 2002).

O procedimento de COL pode ser realizado sem um tratamento de estimulação ovariana onde é possível conseguir em torno de quatro a seis oócitos por cabra em cada sessão (AGUILAR et al., 2002). Atualmente, diversos estudos com o objetivo de maximizar o potencial desta técnica, propõem testar diferentes protocolos de estimulação ovariana (GIBBONS et al., 2007; AVELAR et al., 2012). Para a produção de um elevado número de oócitos, doadoras são sincronizadas e superestimuladas com o uso de gonadotrofinas. Isto normalmente inclui, múltiplas injeções de FSH ou o chamado regime “one-shot” onde é administrada uma única dose de FSH em combinação com eCG administrado 36 h antes da COL. Avelar et al. (2012) obtiveram uma média de 15,1 folículos puncionados e 11,3 oócitos colhidos por doadora, resultando em uma taxa de recuperação total de 74,5%.

Outro método utilizado para a colheita de oócitos em caprinos é a via transvaginal guiada por ultrassonografia (GRAFF et al., 1999). Com este método, os autores obtiveram uma taxa de colheita média de 68%. Embora muito pouco invasivo, este método não é muito utilizado na espécie caprina, possivelmente devido à dificuldade da visualização dos folículos ovarianos.

2.2.2 Maturação *in vitro* (MIV)

A MIV representa uma das mais importantes fases da PIVE. A maturação oócitaria é a última fase da oogênese, onde o oócito cresce e adquire a capacidade para ser ovulado e, posteriormente, fecundado. Acontecem diversos eventos no oócito que o torna apto para a fecundação. Dois eventos principais se apresentam durante este processo: a maturação nuclear e a citoplasmática. O primeiro se caracteriza pela extrusão do primeiro corpúsculo polar, ou seja, a habilidade do oócito para alcançar o estágio da segunda divisão meiótica (metáfase II), que se dá entre 16 e 24 horas após o início da maturação (COGNIE et al., 2003). A meiose é então reiniciada em resposta a um estímulo específico da espécie, sendo a quebra da vesícula germinativa (GVBD) o primeiro sinal de progressão da meiose. Em seguida, a meiose progride até metáfase I (MI) ou II (MII). Quanto ao processo de maturação citoplasmática, este pode dividir-se em três eventos principais: a) redistribuição das organelas

citoplasmáticas; b) dinâmica dos filamentos do citoesqueleto e c) maturação molecular. Já está bem estabelecido que, durante a maturação oocitária, inúmeras modificações ultraestruturais podem ser observadas nas organelas citoplasmáticas, tanto no que se refere à morfologia quanto à redistribuição (FERREIRA et al., 2009). A maturação molecular corresponde às fases de crescimento e maturação do oócito e é assim definida por se tratar da transcrição, armazenamento e processamento dos mRNAs expressos pelos cromossomos, que serão, posteriormente, traduzidos em proteínas pelos ribossomos. As proteínas derivadas desses mRNAs estão envolvidas tanto na maturação, quanto nos eventos celulares subsequentes: fecundação, formação dos pro-núcleos e embriogênese inicial (SIRARD, 2006). O sistema usado comumente para maturação fora do folículo é o meio contendo TCM 199, suplementado com hormônios e 10% de soro inativado de cabra em estro à temperatura de 38,5°C e 5% de CO₂ durante 24 h (BALDASSARRE et al., 2002).

2.2.3 Fecundação *in vitro* (FIV)

Em mamíferos, oócitos são rodeados por duas camadas: células do *cumulus* e a zona pelúcida. Normalmente um único espermatozoide penetra essas duas camadas atingindo e interagindo com a membrana plasmática do oócito, resultando na fusão e posterior formação do zigoto (KATSKA-KNAZKIEWICZ et al., 2004).

Para a fecundação devem ser selecionados espermatozoides viáveis e móveis provenientes de sêmen fresco ou congelado-descongelado. As técnicas usualmente utilizadas são: gradiente de *Percoll* ou swim-up (PARAMIO et al., 2010). O primeiro consiste na centrifugação do sêmen através da passagem por diferentes gradientes para permitir a separação dos espermatozoides potencialmente férteis dos demais constituintes do sêmen, baseado na diferença de densidade e o segundo onde os espermatozoides potencialmente férteis são separados pela motilidade ascendente (GONÇALVES et al., 2002). Um sistema ideal de FIV inclui uma alta taxa de penetração com uma baixa incidência de polispermia. Especificamente em caprinos, a concentração espermática normalmente usada nos laboratórios é de 1×10^6 espermatozoides/mL (KATSKA-KNAZKIEWICZ et al., 2004) ou 2×10^6 (PAWSHE et al., 1994). Após a capacitação, o sêmen é adicionado à gota de fecundação (50 µL) numa concentração final de 1×10^6 espermatozoides/mL e incubado à temperatura de 38,5°C em atmosfera umidificada de 5% de CO₂ durante 16-20 h (COGNIE et al., 2003).

2.2.4 Cultivo *in vitro* (CIV)

Em relação ao cultivo *in vitro*, alguns sistemas de cultivo são rotineiramente utilizados para produção *in vitro*: a) cocultivo com células somáticas, b) condições semidefinidas no meio para suprir os requerimentos embrionários (FREITAS e MELO, 2010). O cocultivo de embriões caprinos é geralmente realizado em meio TCM199 suplementado com soro fetal bovino (SFB) (COGNIE et al., 2003). Para os dois sistemas, logo após o tempo de inseminação e interação espermatozoide-oócito, os presumíveis zigotos são desnudados, com sucessivas pipetagens, para posterior lavagem e cultivo em microgotas de fluido sintético de oviduto (SOF) suplementado com albumina sérica bovina (BSA) durante sete dias a 38,5° C em estufa de três gases (5% de CO₂, 5% de O₂, 90 % de N₂) (FREITAS e MELO, 2010).

2.3 Métodos de avaliação da qualidade do embrião

Em qualquer das espécies estudadas, o melhor método de comprovação da qualidade embrionária é a habilidade do embrião para o estabelecimento de uma prenhez e a posterior produção de crias viáveis (LONERGAN et al., 2003). No entanto, métodos alternativos de avaliação da qualidade do embrião tem sido propostos, incluindo, avaliação morfológica, contagem de células, criotolerância e estudos de expressão gênica, além de análises ultraestruturais, as quais oferecem uma avaliação mais precisa das alterações da estrutura celular (CROSIER et al., 2000).

Os exames microscópicos de morfologia, pelo uso da estereomicroscopia, é o método mais comumente utilizado para avaliação embrionária e está bem estabelecidos para várias espécies (STRINGFELLOW e SEIDEL, 1998)

A contagem do número de células providencia informação relativamente restrita sobre a qualidade embrionária (COSTA et al., 2010). Esta técnica consiste na fixação do embrião, seguida da utilização do corante Hoeschst 33342. Esta técnica também tem sido utilizada em embriões criopreservados, comprovando que as lesões ocasionadas no processo de criopreservação são responsáveis pela diminuição do número de células trofoblásticas (KAIDI et al., 1999).

Está bem demonstrado na espécie bovina que o conhecimento dos genes que são expressos durante o período pré-implantacional permite a elucidação dos mecanismos moleculares que controlam a sobrevivência embrionária inicial contribuindo para melhorar a baixa taxa de produção e qualidade dos embriões produzidos *in vitro* (EL-SAYED et al.,

2006). Assim, alguns genes já foram relacionados com a qualidade embrionária (BADR et al., 2007). Estes autores também discutem o efeito do sistema *in vitro* em fenômenos semelhantes à apoptose.

2.4 Efeitos do estresse térmico sobre os parâmetros reprodutivos

A produção animal em países tropicais é limitada principalmente pelo estresse térmico (FUQUAY, 1981; SILANIKOVE et al., 2000). Crescimento, produção de leite e reprodução são parâmetros consideravelmente comprometidos sob condições de estresse térmico como resultado de mudanças drásticas nas funções biológicas (SILANIKOVE et al., 2000). Alguns dos parâmetros reprodutivos que podem ser afetados pelas altas temperaturas ambientais estão listados na Tabela 1. O estresse térmico afeta o crescimento e competência do oócito em bovinos por alterar a secreção de progesterona, LH e FSH (AL-KATANANI et al., 2002). Diversos estudos têm sido realizados avaliando os efeitos do estresse térmico sobre as concentrações plasmáticas desses hormônios (WOLFENSON et al., 1997). Alterações nos padrões de crescimento folicular têm sido associadas com o incremento das concentrações plasmáticas de FSH (ROTH et al., 2000), e a diminuição da produção de estradiol pelas células da granulosa em folículos de tamanho médio (ROTH et al., 2001).

Tabela 1. Impacto do clima sobre o desempenho reprodutivo

Caraterística reprodutiva	Efeito	Referência
Puberdade	Estresse térmico atrasa a puberdade em machos e fêmeas.	Fuquay (1986) Abdalla (1996)
Ciclo estral e ovulação	Estresse térmico diminui a duração e intensidade do estro	Lucy (2002)
Fecundação e Taxa de Concepção	Estresse térmico após o início do estro ou durante ou imediatamente após a monta prejudica a fertilização e o desenvolvimento embrionário	Putney et al., (1989) Lucy (2002)
Gestação	Estresse térmico durante o terço médio e final da gestação resultou em menores taxas de parição.	Ealy et al., (1993) Fuquay (1986)

Fonte: Khalifa et al., 2003

Em caprinos, o estresse térmico diminui as concentrações plasmáticas de estradiol e concentrações de estradiol no folículo, como também a atividade da aromatase e receptores de LH, produzindo retardo na ovulação (OZAWA et al., 2005). Assim, conclui-se que no verão, o folículo dominante se desenvolve em um ambiente pobre de LH com a redução da secreção de estradiol pelo folículo dominante, levando a uma deficiente expressão do estro e consequentemente diminuição na fertilidade (RENSIS et al., 2003). O ambiente intrauterino também é afetado durante o estresse térmico, diminuindo o fluxo sanguíneo e incrementando a temperatura no trato uterino (ROMAN-PONCE et al., 1977). Estas alterações incrementam a perda embrionária e reduzem o sucesso das inseminações.

Em ambiente tropical, o gado *Bos indicus* possui melhor desempenho reprodutivo quando comparado com outras subespécies. CAMARGO et al., (2007) na espécie bovina, comparou o desenvolvimento *in vitro* e expressão de genes relacionados com estresse térmico em oócitos oriundos de gado *Bos. indicus* e *Bos. tauros* criados em ambiente tropical. Os autores concluíram que oócitos de *Bos indicus* apresentam maior capacidade de desenvolvimento até o estágio de blastocisto. Além disso, oócitos de *Bos. indicus* apresentaram diferenças na expressão de genes relacionados com estresse térmico. Isto pode ser associado com uma elevada capacidade de adaptação de algumas raças a condições climáticas adversas. Estudos de competência oocitária associada à expressão gênica podem ajudar a entender mecanismos usados por raças termotolerantes para manter a eficiência reprodutiva em ambientes tropicais (CAMARGO et al., 2007).

3 JUSTIFICATIVA

A caprinocultura brasileira é uma atividade que desempenha um papel importante na sociedade e na economia das populações, especialmente na região Nordeste. Nos últimos anos a demanda por carne e lácteos provenientes da espécie caprina tem incrementado significativamente. Para tanto, é requerida a utilização de reprodutores e matrizes com potencial genético capaz de produzir uma progênie que atenda às exigências do mercado atual.

Para atender a demanda descrita acima torna-se necessário a utilização de modernas biotécnicas da reprodução, tais como a PIVE, pois esta pode otimizar a utilização dos gametas de ambos os sexos a partir de indivíduos geneticamente superiores. O uso da PIVE, associada à COL, quando comparadas com outras técnicas como a MOTE, apresenta algumas vantagens, como a possibilidade de produzir um maior número de descendentes de cabras geneticamente valiosas. Adicionalmente, devido à COL ser um procedimento menos traumático, menos invasivo, e apresentar uma recuperação pós-operatória mais rápida em quando comparada ao procedimento padrão cirúrgico, torna-se viável que uma mesma fêmea possa ser submetida à aspiração folicular consecutivas vezes, viabilizando a utilização do termo “doadora permanente”, ou seja, uma fêmea geneticamente superior, pode passar por diferentes sessões de colheita oocitária.

Vários autores já demonstraram que a COL pode ser realizada várias vezes em uma mesma doadora sem que ocorra uma diminuição da resposta dessas fêmeas (AGUILAR et al., 2002; BALDASSARRE et al., 2002; GIBBONS et al., 2007). No entanto, nenhum desses estudos foi realizado em condições tropicais. Diversos estudos tem demonstrado efeitos do clima sobre o desempenho reprodutivo em animais de produção criados em condições tropicais (FUQUAY et al., 1986). Tem sido demonstrado que elevadas temperaturas afetam o desenvolvimento folicular, competência oocitária e posterior desenvolvimento embrionário (ROTH et al., 2001; AL-KATANANI et al., 2002; OZAWA et al., 2005). Assim, torna-se interessante verificar a resposta de cabras criadas em clima tropical e submetidas a sucessivos tratamentos de estimulação ovariana no intuito de obter oócitos de boa qualidade a serem utilizados para a posterior produção de blastocistos em um sistema *in vitro*.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

O uso sucessivo de estimulação hormonal associada à COL não afeta a produção quanti-qualitativa de oócitos para uma posterior produção *in vitro* de embriões em caprinos criados em clima tropical.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do uso sucessivo de estimulação hormonal e COL sobre a produção de oócitos e posterior produção *in vitro* de embriões em caprinos criados em clima tropical.

5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Investigar o efeito de sucessivos tratamentos hormonais e COL sobre o número de folículos ovarianos.
- Avaliar a influência da repetição do tratamento hormonal e da COL sobre a taxa de colheita oocitária e a qualidade dos oócitos colhidos.
- Comparar a produção de blastocistos em cabras submetidas a sucessivos tratamentos hormonais seguidos de COL com fêmeas sem tratamento prévio.
- Investigar o efeito do clima tropical sobre a produção quanti-qualitativa de oócitos e posterior produção *in vitro* de embriões.

**The effect of repeated ovarian stimulation treatment and laparoscopic oocyte recovery
on *in vitro* embryo production in goats raised in the tropics**

Deisy J.D. Sanchez, Carlos H.S. Melo, Joanna M.G. Souza-Fabjan, Francisco C. Sousa,
Amanda A. Rocha, Iana S. Campelo, Dárcio I.A. Teixeira, Alexsandra F. Pereira, Luciana M.
Melo, Vicente J.F. Freitas*

Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução, Faculdade de Veterinária, Universidade
Estadual do Ceará, 60714-903, Fortaleza-CE, Brazil.

*Corresponding author: Vicente José de Figueirêdo Freitas

Universidade Estadual do Ceará-Faculdade de Veterinária

Av. Dedé Brasil, 1700 – 60714-903

Fortaleza-CE, Brazil

E-mail: vicente.freitas@uece.br

Phone: +55 85 3101-9861

Fax: +55 85 3101-9840

ABSTRACT

The objective of this study was i) to evaluate the response of oocyte donor goats undergo several hormonal treatments (Experiment 1), and ii) to compare the *in vitro* production of embryos (IVP) in goats previously treated for several times to females without previous treatments (Experiment 2). In Experiment 1, twelve goats were submitted to seven hormonal treatments and laparoscopic oocyte recovery (LOR) and it was verified: number and size of follicles, number of recovered complexes *cumulus*-oocyte (CCOs), recovery rate and CCOs quality. In the Experiment 2, it was used the same goats of the Experiment 1 and other ten without previous hormonal treatments. In this step, in addition to variables observed in the Experiment 1, it was also verified: cleavage and blastocyst rates and the number of blastomeres per embryo. In the Experiment 1 no significant difference ($P > 0.05$) was verified for the variables: number of punctured follicles, number of recovered COCs and recovery rate. However, the percentage of large follicles was different ($P < 0.05$) between LOR 1 (27.7 ± 10.5) and 7 (12.4 ± 12.1). In this Experiment 2, no differences ($P > 0.05$) were verified between treated and untreated groups concerning the quanti-qualitative oocyte production. However, the recovery rate was lower ($P < 0.05$) in the treated compared to untreated group (68.5% vs 81.4%). No significant difference ($P > 0.05$) was observed between the experimental groups for: cleavage rate, blastocyst rate at days 7 and 8, hatching rate as well as number of blastomeres per embryo. In conclusion, in goats raised in tropical climate, the IVP of embryos from oocytes obtained by LOR, proved to be an efficient and suitable method for the rapid propagation of genetically superior animals. Donor goats raised in the tropics, even after repeated hormonal treatments followed by successive LOR, maintained the response, both for the production of oocytes and embryos, becoming close to reality the term "permanent donor oocytes".

Keywords: Goat; Hormonal treatment; Oocyte; Embryo; *In vitro*

1. Introduction

Goats occupy a very important niche in regions of the world where scarce environmental resources and infrastructure abound. Compared to cattle, goats require lower investment, have relatively shorter reproduction cycles, higher growth rate potential, and adapt better to the general environment. In the Northeast Brazil, where 93% of the goat population is concentrated, the herd still has low productivity rates (Sousa et al., 2011). In order to obtain the genetic improvement of this herd, it is essential the use of male and female gametes of genetically superior specimens, which will produce a progeny that can supply the demands of the productive system. For this purpose, reproductive biotechnologies may be used, for example, artificial insemination (AI), multiple ovulation and embryo transfer (MOET) and *in vitro* production of embryos (IVP). In the case of IVP, the great advantage is the use of both sexes gametes without the inconveniences observed in the use of MOET, as for example: low ovulation rate, premature regression of corpus luteum and low fertilization rate as result of problems associated with sperm transport (Cognié, 1999; Cognié et al., 2003).

The method of IVP of embryos involves three main steps: i) maturation of oocytes from antral follicles, ii) fertilization of the matured oocytes with frozen-thawed semen and, iii) culture of putative embryos until formation of blastocysts that can be transferred to recipients or cryopreserved for future use (Cognié et al., 2003).

To perform the IVP successfully is necessary to launch obtaining a large number of good quality oocytes. One possibility is the use of laparoscopic oocyte recovery (LOR). This procedure is less traumatic than surgical embryo recovery and is more predictable than multiple ovulation (Baldassarre and Karatzas, 2004).

Initially, donors must be stimulated by use of gonadotrophins, in order to produce a large number of oocytes per LOR session (Abdullah et al., 2008; Avelar et al., 2012). However, to

make true the term "permanent donor oocytes", it is essential the maintenance of the donor ovarian response, even after several hormonal treatments followed by LOR. Several studies in goats, raised in temperate climate, showed that females show no decrease in oocyte production after several hormonal treatments/LOR (Pierson et al., 2004; Gibbons et al., 2007). However, it is widely known that the reproductive activity as well as the response of the female to the use of reproductive biotechnologies may be strongly influenced by the climatic conditions and heat stress (Nardone et al., 2006; Hansen, 2009). To our knowledge, there are no studies that evaluate the response of goats after several hormonal treatment/LOR sessions, under weather conditions and with the genetic material found in the tropics. Thus, this study aims; firstly, to verify the response of oocyte donor goats undergo several hormonal treatments followed by LOR sessions, and; secondly, to compare the IVP in goats previously treated for several times to females without previous treatments.

2. Materials and methods

2.1. Local and climate characterization

The experiment was conducted in the facilities of the Laboratory of Physiology and Control of Reproduction (Faculty of Veterinary, State University of Ceará) located in Fortaleza, Brazil, at 3°47'38"S and 38°33'29"W. According to Köppen's classification, the climate is Aw, which is characterized by low rainfall values and high temperatures. The data of temperature (T) and relative humidity (RH) were recorded daily throughout the experiment. The data were obtained from the meteorological station installed in the Graduate Program in Physical Sciences Applied Ceará Foundation for Meteorology and Water Resources (FUNCEME) during the period August / November of the year 2012 to April / July of the year 2013. During the experimental period, the mean values for temperature and humidity

were 27.5 ± 2.6 °C and $78.9 \pm 8.5\%$, respectively. The thermal discomfort was assessed by the temperature and humidity index (THI) and calculated according to the formula defined by Thom, 1959: $THI = 0.8 \times T + (RH/100) \times (T - 14.4) + 46.4$. The calculated value for THI was 77.8 considered as a moderate heat stress according to the scale of Fuquay (1982).

2.2. *Experimental animals*

As oocyte donors, it was used a total of twenty-two crossbred Anglo-nubian goats, pluriparous, cyclic assessed by ultrasound and with a mean ($\pm$ SD) live weight of 39.2 ± 6.2 kg and 3.2 ± 0.3 of body condition score). All animals were housed and maintained in a semi-intensive system, receiving Tifton (*Cynodon dactylon*) hay in pens and having 4 h of daily access to pasture. In addition, animals were supplemented with commercial concentrate (minimum of 20% crude protein) and free access to water and minerals. All procedures were designed to minimize stress for subjects, according to the current guidelines for the ethical use of animals in research (Association for the Study of Animal Behaviour, 2006).

2.3. *Experimental design*

This study was divided in tow experiments. In experiment 1, twelve goats were submitted to seven successive hormonal treatments for ovarian stimulation followed by LOR. In this step, the variables evaluated were: number and size of punctured follicles, number of recovered complexes *cumulus*-oocyte (CCOs), recovery rate and CCOs quality. In the experiment 2, it was used the same goats of the experiment 1 (treated group) and other ten goats without previous hormonal treatments (untreated group). In this step, in addition to variables observed in the experiment 1, it was also verified: cleavage and blastocyst rates and the number of blastomeres per embryo.

2.4. Chemicals, reagents and media

Except were otherwise indicated, chemicals were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). When necessary, for all media, the pH and osmolarity were adjusted to 7.2 to 7.4 and 280 to 300 mOsm/L, respectively.

2.5. Hormonal treatment for ovarian stimulation

The estrous cycle of goats was synchronized using sponges (Progespon, Syntex, Buenos Aires, Argentina) impregnated with 60 mg medroxyprogesterone acetate inserted intravaginally for 10 days. On day 7, a 75- μ g D-cloprostenol (Prolise, ARSA S.R.L., Buenos Aires, Argentina) injection was given intramuscularly, along with the onset of the ovarian stimulation, which was carried out using 180 mg pFSH (Folltropin-V, Vetrepfarm, Ontario, Canada) distributed in five intramuscular injections (40/40, 35/35 and 30 mg), 12 h apart.

2.6. Anesthesia and LOR

Ovarian follicles were punctured just after sponge removal using LOR procedures. Briefly, goats were fasted for 36 h from food and 24 h from water prior to LOR. Anesthesia was induced with 2.5% thiopental (Tiopentax, Cristália, São Paulo, Brazil) intravenously and maintaining a deep anesthetic plane with 3% isoflurane (Isoforine, Cristália, São Paulo, Brazil). Follicles were punctured using a system comprised for a 5-mm Hopkins laparoscope (Karl Storz, Tuttlingen, Germany) associated to a 22-G needle and a vacuum pump (WTA, Cravinhos, Brazil). The vacuum pressure was regulated to 35 mmHg and the collection medium used was HEPES buffered TCM199 (Nutricell, Campinas, Brazil) supplemented with 20 IU/mL heparin (Hepamax-S, Blausiegel, São Paulo, Brazil) and 40 μ g/mL gentamicin sulphate. The punctured follicles were classified as small (< 3 mm), medium (3-4 mm) or large (> 4 mm). Once the LOR was completed, each ovary was gently flushed with a

heparinized saline solution, which was warmed to 37 °C. Finally, for each LOR, the reproductive tract was evaluated macroscopically to verify the occurrence of adhesions, which as classified as mild, moderate and severe.

2.7. Assessment of COCs quality and in vitro maturation (IVM)

A stereomicroscope (SMZ800, Nikon, Tokyo, Japan) was used to graded COCs from GI to GIV that were defined as follows: GI (multilayered compact *cumulus* cells and finely granulated oocyte cytoplasm); GII (one to three layers of *cumulus* cells and finely granulated oocyte cytoplasm); GIII (incomplete or no cellular vestment); and GIV (oocyte with abnormal shape and heterogeneous oocyte cytoplasm or apoptotic oocytes in jelly-like *cumulus*-corona cells vestment). The selected COCs (GI to GIII) were washed four times and transferred to maturation medium consisting of HEPES-buffered TCM 199 supplemented with 10% (v/v) fetal calf serum (FCS; Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 10 ng/mL Epidermal Growth Factor (EGF), 100 µM cysteamine, 20 µg/mL FSH/LH (Pluset, Hertape-Calier, Barcelona, Spain), 1 µg/mL estradiol-17β, 40 µg/mL gentamicin sulphate and 10% (v/v) estrus goat serum in four well petri dishes (Nunc, Roskilde, Denmark) with each well containing 40-50 oocytes in 500 µL of maturation medium. COCs were incubated 22 to 24 h at 38.5 °C in in humidified atmosphere of 5% CO₂ in air.

2.8. In vitro fertilization (IVF) and in vitro culture (IVC)

Frozen/thawed semen obtained from a particular male of proven fertility was used throughout the experiment. Mobile sperm was separated by centrifugation (700 × g for 15 min) on Percoll gradient (45/90%). After, the supernatants were discarded and the pellet was overlaid with 600 µL of HEPES-buffered synthetic oviductal fluid (SOF) supplemented with 40 µg/mL gentamicin sulphate. Spermatozoa were centrifuged at 200 × g for 5 min and supernatant was

discarded. The final concentration was adjusted to 2×10^6 spermatozoa/mL. Groups of 40-50 oocytes were transferred into four-well petri dishes with 450 μ L SOF medium supplemented with 5 μ g/mL heparin (Calbiochem, Irvine Sci., Santa Ana, CA, USA), 40 μ g/mL gentamicin sulphate and 10% estrus goat serum. Sperm and oocytes were co-incubated for 20 h at 38.5 °C in humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. After fertilization, the *cumulus* cells were removed by several pipetting. The putative zygotes were washed four times in culture medium (SOF supplemented with 3 mg/mL BSA) and transferred to four well petri dishes containing 25 μ L drops of culture medium covered with mineral oil. The putative zygotes were incubated for eight days at 38.5 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂, 5% O₂ and 90% N₂. After 48 h post-insemination, 10% FCS was added to the culture droplets. In order to determine the number of blastomeres, embryos that reached hatching blastocyst stage were stained with Hoechst 33342 and observed under inverted fluorescence microscopy (TE2000, Nikon, Kawasaki, Japan).

2.9. Statistical analysis

All data were expressed as the mean ($\pm$ SD) or percentage. It was used one-way ANOVA followed by Tukey's post-test, unpaired *t* test or chi-squared test according to the studied variable. A value of $P < 0.05$ was considered to be statistically significant. All analyses were performed using Graph Pad 3.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

3. Results

3.1. Experiment 1

The ovarian response of goats submitted to seven successive hormonal treatments followed by LOR is presented in the Fig. 1. During this step of experiment a total of 1556 follicles were punctured (18.5 ± 6.8 /donor) and 1117 COCs were recovered (13.3 ± 5.0 /donor). Thus, the

total recovery rate was 71.8%. When compared the LOR sessions, no significant difference ($P > 0.05$) was verified for the variables: number of punctured follicles, number of recovered COCs and recovery rate.

Concerning the distribution of follicle size (Fig. 2), no significant difference was observed for almost all comparisons performed among the sessions. However, the percentage of large follicles was significantly different ($P < 0.05$) when the comparison was made between LOR 1 (27.7 ± 10.5) and 7 (12.4 ± 12.1). The percentage of oocytes usable to IVM (GI to GIII) ranged between 40 and 100%. Statistical differences ($P < 0.05$) were found between LOR 1 (79.6%), LOR 2 (81.1%) and LOR 3 (80.4%) vs LOR 6 (95.4%) and LOR 7 (90.5%). Finally, at the end of seventh LOR, the macroscopic evaluation of the reproductive tract identified only three donors (25%) that showed mild adhesions of the omentum to the abdominal wall. All other donor goats did not show any evidence of adhesion, even if mild.

3.2. Experiment 2

In this experiment, no significant differences ($P > 0.05$) were verified between groups (treated vs untreated) for the number of punctured follicles, recovered COCs and the percentage of oocytes usable to IVM (Table 1). However, the recovery rate was lower ($P < 0.05$) in the treated group compared to untreated females (68.5% vs 81.4%).

Regarding the IVP of embryos, one of the three sessions was not completed due to the problems during the culture. Therefore, the results presented are from two sessions. Thus, in the Table 2 are presented the results for IVP in goats treated several times between females that have never received hormonal treatments or LOR. No significant difference ($P > 0.05$) was observed between the experimental groups for the several variables: cleavage rate, blastocyst rate (at days 7 and 8), hatching rate as well as number of blastomeres per embryo.

In the Fig. 3 is shown a representative figure of the blastocysts obtained by IVP in both experimental groups (treated vs untreated goats).

4. Discussion

This study realized in a tropical climate, in an environmental condition indicative of mild to moderate stress probably did not affect the response to treatment with similar response to that observed in animals raised in temperate regions (Baldassarre et al., 2002; Pierson et al., 2004; Gibbons et al., 2007), moreover takes into account that that anglonubian animals are very thermotolerant being well adapted to the tropical climate.

The number of follicles punctured and COCs recovered by LOR were similar in both experiments (1 and 2). These values were also similar to those reported previously in goats in both temperate (Baldassarre et al., 2003; Koeman et al., 2003) and tropical climate (Avelar et al., 2012). Although occasional adhesions of the omentum to the abdominal wall were observed after LOR, no moderate or severe adhesions that could adversely affect further LOR were verified. This is in agreement with the results of Teixeira et al. (2011), who reported that repeated (nine) LOR in sheep had minimal surgical adhesions. These authors reported that no lesions were observed on the internal reproductive system (uterine body, horns and oviduct) and similarly, no lesions were detected in the ovaries during the surgical procedures and after ovariectomy. In this study with sheep, only two ewes exhibited small areas of scarring tissue and mononuclear infiltrate, possibly on the locations of follicular punctures. During the Experiments 1 and 2, the COCs recovery rate was a parameter with low variability. The mean observed was very close to the results of other authors working with goats (Baldassarre et al., 2003; Koeman et al., 2003; Pierson et al., 2004; Avelar et al., 2012). However, in the Experiment 2 there was a lower recovery rate in the treated group (68.5%) compared to the

untreated group (81.4%). This result was possibly due to the effects of follicular punctures on the ovary as described by Teixeira et al. (2011).

In our study, we observed a decrease in the percentage of large follicles when compared the first to the seventh LOR. According to Crozet et al. (1995), there is a positive correlation between the follicular diameter and the competence to embryo development until the blastocyst stage. However, in our study, the competence to development (cleavage, blastocyst and hatching rates) was similar between oocytes recovered in goats previously treated for seven times and those that never received hormonal treatment or LOR. The IVP of embryos in goats is still a process in development and with very variable results according to the laboratory. However, recent results have demonstrated that a good blastocyst rate can be achieved from oocytes derived from abattoir (38-54%; Souza et al., 2013) or in live animals recovered by LOR (34%; Leoni et al., 2009). Additionally, the embryos produced in both experimental groups showed similar quality and development, as seen by the number of nuclei per blastocyst. In goats, Baril et al. (1996) found a number ranging from 109 to 270 nuclei per blastocyst. This number was very close to that observed in our study.

Repeated oocyte recovery followed by IVM, IVF and IVC has the potential for producing more offspring from genetically valuable goats than traditional MOET procedures (Baldassarre et al., 2002). Thanks to its less invasive nature, the procedure can be repeated more times than laparotomy, normally used for embryo recovery in goats. In addition, it is an interesting approach to overcome problems verified in more than 30% of donors submitted to MOET (Cognié et al., 2003).

In conclusion, in goats raised in tropical climate, the IVP of embryos from oocytes obtained by LOR, proved to be an efficient and suitable method for the rapid propagation of genetically superior animals and affecting the genetic improvement of herd. Even submitted to moderate

stress, and after repeated hormonal treatments/LOR, the goats maintained the quantitative response, becoming close to reality the term "permanent donor oocytes".

Acknowledgments

The authors are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasília, Brazil) for the financial support. Deisy Sanchez conducted their post-graduation studies under the auspices of Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP, Fortaleza, Brazil).

References

- Abdullah, R.B., Liow, S.L., Rahman, A.N., Chan, W.K., Wan-Khadijah, W.E., Ng, S.C., 2008. Prolonging the interval from ovarian hyperstimulation to laparoscopic ovum pick-up improves oocyte yield, quality, and developmental competence in goats. *Theriogenology* 70, 765–771.
- Association for the Study of Animal Behaviour. 2006. Guidelines for the treatment of animals in behavioral research and teaching. *Anim. Behav.* 71, 245–253.
- Avelar, S.R.G., Moura, R.R., Sousa, F.C., Pereira, A.F., Almeida, K.C., Melo, C.H.S., Teles-Filho, A.C.A., Baril, G., Melo, L.M., Teixeira, D.I.A., Freitas, V.J.F., 2012. Oocyte production and *in vitro* maturation in Canindé goats following hormonal ovarian stimulation. *Anim. Reprod.* 9, 27–32.
- Baldassarre, H., Karatzas, C.N., 2004. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83, 255–266.

- 295 Baldassarre, H., Wang, B., Kafidi, N., Keefer, C., Lazaris, A., Karatzas, C.N., 2002.
 296 Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum
 297 pick-up and *in vitro* embryo production technologies. *Theriogenology* 57, 275–284.
- 298 Baldassarre, H., Wang, B., Kafidi, N., Gauthier, M., Neveu, N., Lapointe, J., Sneek, L.,
 299 Leduc, M., Duguay, F., Zhou, J.F., Lazaris, A., Karatzas, C.N., 2003. Production of
 300 transgenic goats by pronuclear microinjection of *in vitro* produced zygotes derived from
 301 oocytes recovered by laparoscopy. *Theriogenology* 59, 831–339.
- 302 Baril, G., Pougard, J.L., Freitas, V.J.F., Leboeuf, B., Saumande, J., 1996. A new method for
 303 controlling the precise time of occurrence of the preovulatory gonadotropin surge in
 304 superovulated goats. *Theriogenology* 45, 697–706.
- 305 Cognié, Y., 1999. State of the art in sheep and goat embryo transfer. *Theriogenology* 15,
 306 105–116.
- 307 Cognié, Y., Baril, G., Poulin, N., Mermillod, P., 2003. Current status of embryo technologies
 308 in sheep and goat. *Theriogenology* 59, 171–188
- 309 Crozet, N., Ahmed-Ali, M., Dubos, M.P., 1995. Developmental competence of goat oocytes
 310 from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture in
 311 vitro. *J. Reprod. Fertil.* 103, 293–308.
- 312 Farooq, U., Samad, H.A., Shehzad, F., Qayyum, A., 2010. Physiological responses of cattle to
 313 heat stress. *World Appl. Sci. J.* 8, 38–43.
- 314 Fuquay, J.W., 1981. Heat stress as it affects animal production. *J. Anim. Sci.* 52, 164–169.
- 315 Gibbons, A., Pereyra-Bonnet, F., Cueto, M.I., Catala, M., Salamone, D.F., Gonzalez-Bulnes,
 316 A., 2007. Procedure for maximizing oocyte harvest for in vitro embryo production in small
 317 ruminants. *Reprod. Domest. Anim.* 42, 423–426.

- 318 Hansen, P.J., 2009. Effects of heat stress on mammalian reproduction. *Phil. Trans. R. Soc. B*
 319 364, 3341–3350.
- 320 Koeman, J., Keefer, C.L., Baldassarre, H., Downey, B.R., 2003. Developmental competence
 321 of prepubertal and adult goat oocytes cultured in semi-defined media following laparoscopic
 322 recovery. *Theriogenology*. 60, 879–889.
- 323 Leoni, G.G., Succu, S., Satta, V., Paolo, M., Bogliolo, L., Bebbere, D., Spezzigu, A.,
 324 Madeddu, M., Berlinguer, F., Ledda, S., Naitana, S., 2009. *In vitro* production and
 325 cryotolerance of prepubertal and adult goat blastocysts obtained from oocytes collected by
 326 laparoscopic oocyte-pick-up (LOPU) after FSH treatment. *Reprod. Fertil. Dev.* 21, 901–908.
- 327 Nardone, A., Ronchi, B., Lacetera, N., Bernabucci, U., 2006. Climatic effects on productive
 328 traits in livestock. *Vet. Res. Commun.* 30, 75–81.
- 329 Pierson, J., Wang, B., Neveu, N., Sneek, L., Côté, F., Karatzas, C.N., Baldassarre, H., 2004.
 330 Effects of repetition, interval between treatments and season on the results from laparoscopic
 331 ovum pick-up in goats. *Reprod. Fertil. Dev.* 16, 795–799.
- 332 Sousa, W.H., Ojeda, M.D.B., Facó, O., Cartaxo, F.Q., 2011. Genetic improvement of goats in
 333 Brazil: experiences, challenges and needs. *Small Rum. Res.* 98, 147–156.
- 334 Souza, J.M.G., Duffard, N., Bertoldo, M.J., Locatelli, Y., Corbin, E., Fatet, A., Freitas, V.J.F.,
 335 Mermillod, P., 2013. Influence of heparin or the presence of cumulus cells during fertilization
 336 on the *in vitro* production of goat embryos. *Anim. Reprod. Sci.* 138, 82–89.
- 337 Teixeira, P.P.M., Padilha, L.C., Oliveira, M.E.F., Motheo, T.F., da Silva, A.S.L., Barros,
 338 F.F.P.C., Coutinho, L.N., Flôres, F.N., Lopes, M.C.S., Bandarra, M.B., Silva, M.A.M.,
 339 Vasconcelosa, R.O., Rodrigues, L.F.S., Vicente, W.R.R., 2011. Laparoscopic ovum collection
 340 in sheep: gross and microscopic evaluation of the ovary and influence on oocyte production.
 341 *Anim. Reprod. Sci.* 127, 169–175.

342 Thom, E.C., 1959. The discomfort index. *Weatherwise*. 12, 57–60.

343

344 **Table 1.**

345 Mean ($\pm$ SD) or percentage of some parameters observed in goats raised in the tropics, which received successive hormonal treatments/LOR
 346 (treated group) or not received previous treatment (untreated group).

Group	n	Punctured follicles (n)	Recovered COCs (n)	% recovery rate	% usable oocytes ¹ (n)
Treated	12	18.0 $\pm$ 5.8 ^a (216)	12.3 $\pm$ 3.7 ^a (148)	68.5 ^a	96.6 ^a (143)
Untreated	10	19.4 $\pm$ 7.8 ^a (194)	15.8 $\pm$ 7.7 ^a (158)	81.4 ^b	93.7 ^a (148)

347 a, b: means with in a row with different superscripts are different ($P < 0.05$).

348 ¹: oocytes that were submitted to IVM (grade I to III).

349

350 **Table 2.**

351 Embryo production in goats raised in the tropics, which received successive hormonal treatments/LOR (treated group) or not received previous
 352 treatment (untreated group).

353

Group	Oocytes	Cleavage rate	Blastocyst rate at		Hatching rate ¹	Number of blastomeres per embryo
	(n)	(n)	day 7 (n)	day 8 (n)		
Treated	86	68.6 (59)	27.9 (24)	27.9 (24)	33.3	252.9 ± 39.6
Untreated	88	67.0 (59)	31.8 (28)	34.1 (30)	53.3	229.8 ± 123.6

354 No significant difference was found between groups ($P > 0.05$).

355 ¹: (hatched blastocysts at day 8/total blastocysts at day 8) × 100.

356

Figure Captions

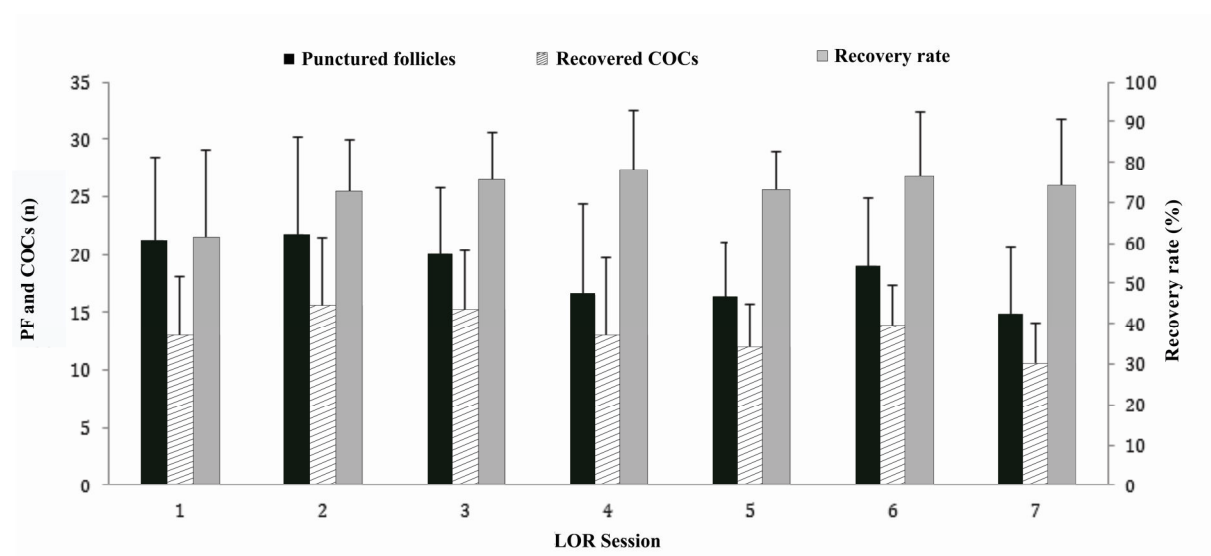


Fig. 1. Number of punctured follicles (PF), recovered COCs and recovery rate in goats raised in the tropics and subjected to sessions of hormonal treatment/LOR. No significant difference was found among sessions ($P > 0.05$)

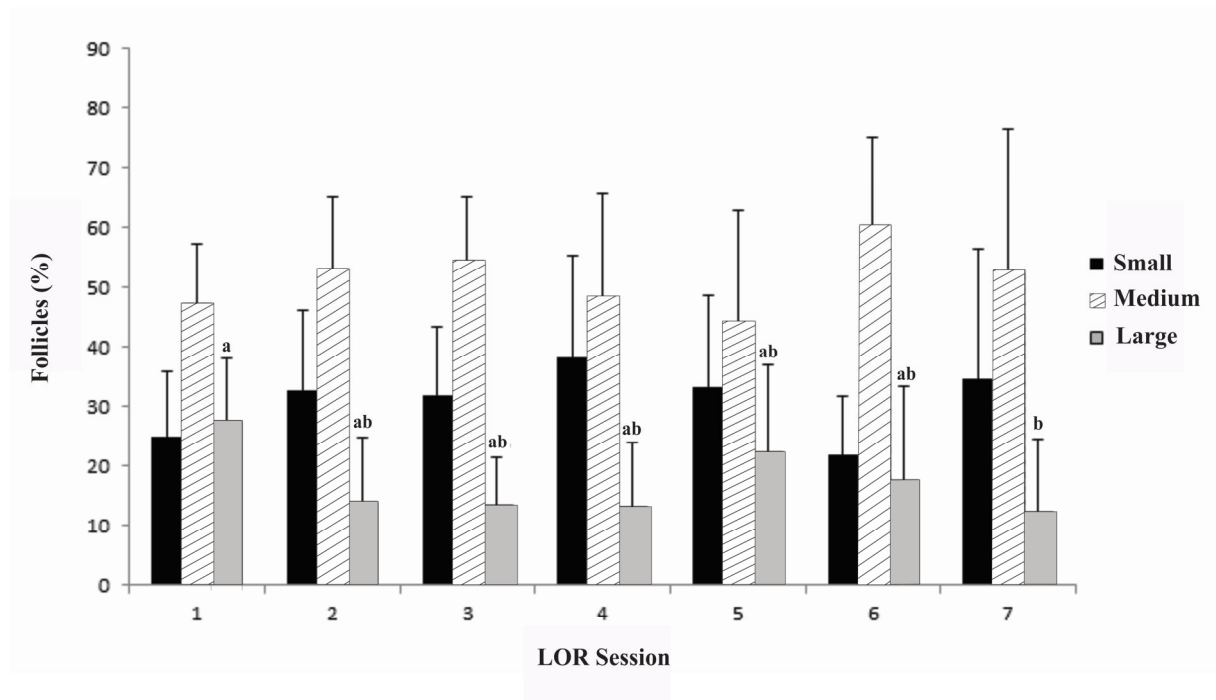
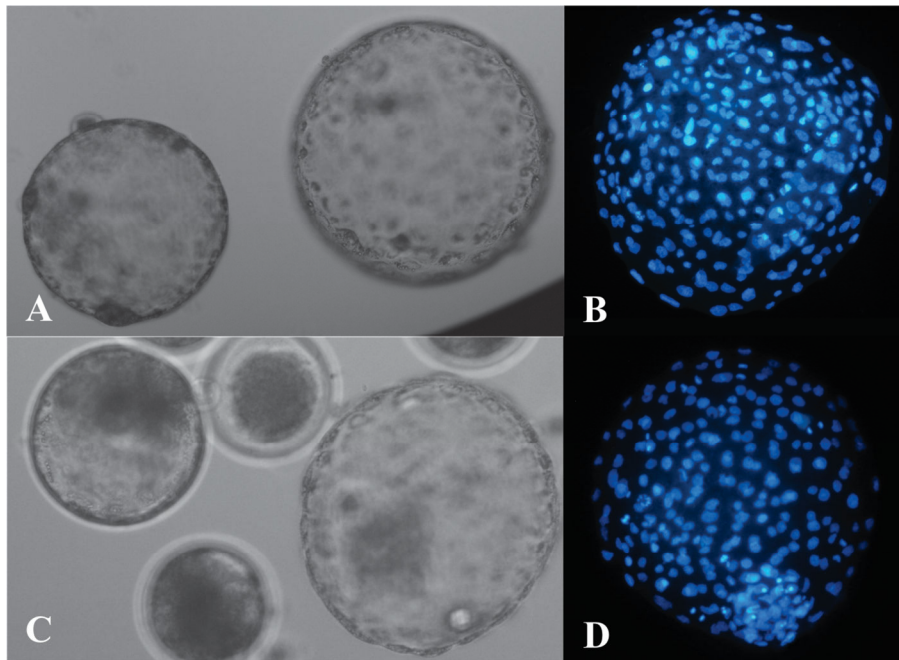


Fig. 2. Percentage of small, medium and large follicles in goats raised in the tropics and submitted to seven sessions of hormonal treatment/LOR. Bars with different superscripts (a,b) are significantly different at $P < 0.05$.



369

370 **Fig. 3.** Representative image of blastocysts on day 8 of culture and stained with Hoechst

371 33342 derived from goats treated (A, B) or untreated (C, D), respectively.

7 CONCLUSÕES

A PIV de embriões a partir de oócitos obtidos de COL em caprinos criados em clima tropical, pode ser um método eficiente e adequado para a rápida propagação de animais geneticamente superiores, contribuindo com o melhoramento genético do rebanho.

Ainda que submetidas a uma condição favorável para a ocorrência de estresse térmico leve a moderado, as cabras mestiças de Anglonubiana depois de repetidos tratamentos hormonais/COL mantiveram a resposta quanti-qualitativa, tornando-se próximo da realidade, o termo "doadora permanente de oócitos".

8 PERSPECTIVAS

Após a verificação da resposta ovariana de cabras submetidas a sucessivos tratamentos/COL na produção quanti-qualitativa de oócitos, bem como a produção *in vitro* de embriões, outros experimentos são necessários para a confirmação do potencial desses embriões na produção de crias nascidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA E.B. Effect of season and surgical deviation of penis on semen characteristics and peripheral testosterone concentration in a Awassi rams. In: Proceedings of the 9th Annual Conference of Animal Production. v. 371-378, 1996.

ABDULLAH, R.B.; LIOW, S.L.; RAHMAN, A.N.; CHAN, W.K.; WAN-KHADIJAH, W.E.; NG, S.C. Prolonging the interval from ovarian hyperstimulation to laparoscopic ovum pick-up improves oocyte yield, quality, and developmental competence in goats. *Theriogenology*, v.70, p.765–771, 2008.

AGUILAR, B.; ROCHE, A.; OLIVERA, J.; FOLCH, J.; ALABART, J.L. Oocyte retrieval after repeated ovum pick-up in unstimulated sheep and goat. Proceedings of the 18th Meeting of Association Européenne de Transfert Embryonnaire (AETE), p. 130, 2002.

AL-KATANANI, Y.M; PAULA-LOPES, F.F,; HANSEN, P.J. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *Journal Dairy Science*, v. 85, p. 390–6, 2002.

ARMSTRONG, D.T.; KOTARAS, P.J.; EARL, C.R. Advances in production of embryos in vitro from juvenile and prepubertal oocytes from the calf and lamb. *Reproduction Fertility and Development*, v.9, p.333-339, 1997.

ARMSTRONG, D.T.; PFITZNER, A.P.; WARNES, G.M.; SEAMARK, R.F. Superovulation treatments and embryo transfer in Angora goats. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.67, p. 403-410, 1983.

ASSOCIATION FOR THE STUDY OF ANIMAL BEHAVIOUR. Guidelines for the treatment of animals in behavioral research and teaching. *Animal Behaviour*, v.71, p. 245–253, 2006.

AVELAR, S.R.G; MOURA, R.R.; SOUSA, F.C.; PEREIRA, A.F.; ALMEIDA, K.C.; MELO, C.H.S.; TELES FILHO, A.C.A.; MELO, L.M.; TEIXEIRA, D.I.A.; FREITAS, V.J.F. Oocyte production and *in vitro* maturation in Canindé goats following hormonal ovarian stimulation. *Animal Reproduction*, v.9, p.27-32, 2012.

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

BALDASSARRE, H.; DE MATOS, D.G.; FURNOS, C.C.; CASTRO, T.E.; FISCHER, E.C. Technique for efficient recovery of sheep oocytes by laparoscopic folliculocentesis. *Animal Reproduction Science*, v.35, p.145-150, 1994.

BALDASSARRE, H.; WANG, B.; KAFIDI, N.; GAUTHIER, M.; NEVEU, N.; LAPOINTE, J.; SNEEK, L.; LEDUC, M.; DUGUAY, F.; ZHOU, J.F.; LAZARIS, A.; KARATZAS, C.N. Production of transgenic goats by pronuclear microinjection of *in vitro* produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy. *Theriogenology*, 59, 831–339, 2003.

BADR, H.; BONGIONI, G.; ABDOON, A.S.; KANDIL, O.; PUGLISI, R. Gene expression in the *in vitro*-produced preimplantation bovine embryos. *Zygote*, v.15, p.355-367, 2007.

BALDASSARRE, H.; WANG, B.; KAFIDI, N.; LAZARIS, A.; KARATZAS, C.N. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pickup and *in vitro* embryo production technologies. *Theriogenology*, v.57, p.275-284, 2002.

BARIL, G. Produção *in vivo* de embriões caprinos e ovinos. In: Freitas, V.J.F. *Biotechnology da reprodução em pequenos ruminantes: produção de embriões por transferência nuclear (clonagem)*. 1ed., Fortaleza: Multicor, cap. 1, p. 7-20. 2006.

BARIL, G.; LEBOEUF, B.; SAUMANDE, J. Synchronization of estrus in goats: the relationship between time of occurrence of estrus and fertility following artificial-insemination. *Theriogenology*, v.40, p.621-628, 1993.

BARIL, G.; POUGNARD, J.; FREITAS, V.J.F.; LEBOEUF, B.; SAUMANDE, J. A new method for controlling the precise time of occurrence of the preovulatory gonadotropin surge in superovulated goats. *Theriogenology*, v.45, p. 697-706. 1996.

BATTYE, K.M.; FAIRCLOUGH, R.J.; CAMERON, A.W.; TROUNSON, A.O. Evidence for prostaglandin involvement in early luteal regression of the superovulated nanny goat (*Capra hircus*). *Journal of Reproduction and Fertility*, v.84, p. 425-430, 1988.

CAMARGO, L.S.A.; VIENNA, J.H.M.; RAMOS, A.A.; SERAPE, R.V.; SA, W.F.; FERREIRA, A.M.; GUIMARÃES, M.F.M.; VALE FILHO, V.R. Developmental competence and expression of the Hsp 70.1 gene in oocytes obtained from *Bos indicus* and *Bos Taurus* dairy cows in a tropical environment. *Theriogenology*, v.68, p. 626–632, 2007.

CD, LU. Effect of heat stress on goat production. *Small Ruminant Research*, v.2, p. 151-162, 1989.

COGNIE, Y. State of art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*, v.51, p.105-116, 1999.

COGNIE, Y.; BARIL, G.; POULIN, N.; MERMILLOD, P. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*, v.59, p.171-188, 2003.

COSTA E.P.; LOPES F.G.; PEREIRA, E.C.M.; QUEIROZ, V.L.D.; MACEDO, G.G.; ALMEIDA NETO, J.R.M.; COSTA, A.H.A. Nova técnica para contagem do número de células de blastocistos. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.62, p.1507-1510, 2010.

CROSIER, A.E.; FARIN, P.W.; DYKSTRA, M.J.; ALEXANDER, J.E.; FARIN, C.E. Ultrastructural morphometry of bovine compact morulae produced in vivo or in vitro. *Biology of Reproduction*, v.62, p.1459-1465, 2000.

CROZET, N.; AHMED-ALI, M.; DUBOS, M.P. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture in vitro. *Journal Reproduction Fertily*, v. 103, p. 293–308, 1995.

DRION, P.V.; FURTOS, V.S.; BARIL, G., MANFREDI, E.; BOUVIER, F.; POUGNARD, J.L.; BERNELAS, D.; CAUGNON, P.; MCNAMARA, E.M.; REMY, B.; SULON, J.; BECKERS, J.F.; BODIN, L.; LEBOEUF, B. Four years of induction/synchronization of estrus in dairy goats: effect on the evolution of eCG binding rate in relation with the parameters of reproduction. *Reproduction, Nutrition and Development*. v.41, p.401-412, 2001.

EALY R.J.; MCBRIDE B.W.; VATNICK L. & BELL W. Chronic heat stress and prenatal development in sheep: II Placental cellularity and metabolism. *Journal Animal Science*, v. 69, p.3610-3616, 1993.

EL-SAYED, A.; HOELKER, M.; RINGS, F.; SALILEW, D.; JENNEN, D.; THOLEN, SIRARD, M. A.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE, D. Large-scale transcriptional analysis of bovine embryo biopsies in relation to pregnancy success after transfer to recipients. *Physiology Genomics*, v.28, p.84-96, 2006.

EVANS, G.; ARMSTRONG, D.T. Reduction of sperm transport in ewes by superovulation treatments. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.70, p.47-53, 1984.

FAROOQ, U.; SAMAD, H.A.; SHEHZAD, F.; QAYYUM, A. Physiological responses of cattle to heat stress. *World Applied. Science Journal*, v. 8, p.38–43, 2010.

FERREIRA, E.M.; VIREQUE, A.A.; ADONA, P.R.; MEIRELLES, F.V.; FERRIANI, R.A.; NAVARRO, P.A.A.S. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. *Theriogenology*, v.71, p.836-848, 2009.

FONSECA, J.F., ESTEVES, L.V., BRANDÃO, F.Z., PEIXOTO, M.G.C.D.; VERNEQUE, R.S.; SIQUEIRA, L.G.B.; VIANA, J.H.M. Viable offspring after successful non-surgical embryo transfer in goats. *Proceedings of the 11th International Conference on Goats (IGA)*, p. 30, 2012.

FREITAS V.J.F.; MELO, L.M. *In vitro* embryo production in small ruminants. Revista Brasileira de Zootecnia, v.39, p.409-413, 2010.

FUQUAY, J.W. Heat stress as it affects animal production. Journal Animal Science, v. 52, p. 164–169, 1981.

GIBBONS, A.; BONNET, F.P.; CUETO, M.I.; CATALA, M.; SALAMONE, D.F.; GONZALEZ-BULNES, A. Procedure for maximizing oocyte harvest for *in vitro* embryo production in small ruminants. Reproduction in Domestic Animals, v.42, p.423-426, 2007.

GONÇALVES, P.B.D.; VISINTIN, J.A.; OLIVEIRA, M.A.L.; MONTAGNER, M.M.; COSTA, L.F.S. Produção *in vitro* de embriões. In: Gonçalves, P.B.D.; Figueiredo, J.R.; Freitas, V.J.F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. São Paulo: Varela, p.195-226, 2002.

GRAFF, K.J.; MEINTJES, M.; DYER, V.W.; PAUL, J.B.; DENNISTON, R.S.; ZIOMEK, C.; GODKE, R.A. Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval following FSH stimulation of domestic goats. Theriogenology, v.51, p.1099-1119, 1999.

GUSMÃO, A.L.; SILVA, J.C.; BITTENCOURT, T.C.C.; MARTINS, L.E.P.; GORDIANO, H.D.; BARBOSA, L.P. Coleta transcervical de embriões no Brasil. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. v.61, n.2, p.313-318. 2009.

HANSEN, P.J. Effects of heat stress on mammalian reproduction. Philosophical Transactions of the Royal Society, v.364, p. 3341–3350, 2009.

HOLTZ, W. Recent developments in assisted reproduction in goat. Small Ruminant Research, v. 60, p.95-110, 2005.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da pecuária municipal 2007. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 05 de outubro 2012.

KAIDI, S.; DOMAY, I.; VAN LANGENDONCKT, A.; DESSY, F.; MASSIP, A.

Comparison of two coculture systems to assess the survival of in vitro produced bovine blastocysts after vitrification. *Animal Reproduction Science*, v.52, p.39-50, 1998.

KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L.; RYNSKA, B.; GAJDA, B.; SMORAG, Z. Effect of donor stimulation, frozen semen and heparin treatment on the efficiency of in vitro embryo production in goats. *Theriogenology*, v.62, p.576-586, 2004.

KHALIFA, H.H. Bioclimatology and adaptation of farm animals in a changing climate Al-Azhar University, Faculty of Agriculture, Animal production Department, 11884, Nasr City, Cairo. 2003.

KOEMAN, J.; KEEFER, C.L.; BALDASSARRE, H.; DOWNEY, B.R. Developmental competence of prepubertal and adult goat oocytes cultured in semi-defined media following laparoscopic recovery. *Theriogenology*, v.60, p. 879–889, 2003.

LEONI, G.G.; SUCCU, S.; SATTA, V.; PAOLO, M.; BOGLIOLO, L.; BEBBERE, D.; SPEZZIGU, A.; MADEDDU, M.; BERLINGUER, F.; LEDDA, S.; NAITANA, S. *In vitro* production and cryotolerance of prepubertal and adult goat blastocysts obtained from oocytes collected by laparoscopic oocyte-pick-up (LOPU) after FSH treatment. *Reproduction Fertility and Development*, v. 21, p. 901–908, 2009.

LIMA VERDE, J.B.; LOPES JÚNIOR, E.S.; TEXEIRA, D.I.A.; PAULA, N.R.O.; FREITAS, V.J.F. Transcervical embryo recovery in Saanen goats. *South African Journal of Animal Science*, v.33, p.127-130, 2003.

LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M.P. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression. *Reproduction in Domestic Animals*, v.38, p.259-267, 2003.

LOPES-JUNIOR, E.S.; TEIXEIRA, D.I.A.; LIMA-VERDE, J.B.; CORDEIRO, M.F.; PAULA, N.R.O.; ARRUDA, I.J.; RONDINA, D.; FREITAS, V.J.F. Uso do flunixin meglumine na prevenção da regressão lútea prematura em cabras submetidas a tratamento superovulatório. *Vet News*, v.68, p.7-8, 2004.

LUCY M.C. Reproductive loss in farm animal during heat stress. In: Proc. 15th Conf. Biometeorol. Aerobiol, p.50-53. 2002

MAHMOOD, S.; KOUL, G.L.; BISWAS, J.C. Comparative efficacy of FSH-P and PMSG on superovulation in Pashmina goats. Theriogenology, v.35, p.1191-1196, 1991.

MENCHACA, A.; VILARIÑO, M.; CRISPO, M.; PINCZAK, A.; RUBIANES, E. Day 0 protocol: superstimulatory treatment initiated in the absence of a large follicle improves ovarian response and embryo yield in goats. Theriogenology, v.68, p.1111-1117, 2007.

MENCHACA, A.; VILARIÑO M.; PINCZAK, A; KMAID, S.; SALDAA, J.M. Progesterone treatment, FSH plus eCG, GnRH administration, and Day 0 protocol for MOET programs in sheep. Theriogenology, v.72, p.477-483, 2009.

MORTON, K.M.; DE GRAAF, S.P.; CAMPBELL, A.; TOMKINS, L.M.; MAXWELL, W. M.; EVANS, G. Repeat ovum pick-up and in vitro embryo production from adult ewes with and without FSH treatment. Reproduction in Domestic Animals, v.40, p.422-428, 2005.

NARDONE, A.; RONCHI, B.; LACETERA, N.; BERNABUCCI, U. Climatic effects on productive traits in livestock. Veterinary Research Communications, v.30, p. 75–81, 2006.

ODENSVIK, K.H. Pharmacokinetics of flunixin and its effect on prostaglandin F2 α metabolite concentrations after oral and intravenous administration in heifers. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, v. 18, p.254-259, 1995.

OZAWA, M.; TABAYASHI, D.; LATIEF, T. A.; SHIMIZU, T.; OSHIMA, I. & KANAI, Y. Alterations in follicular dynamics and steroidogenic abilities induced by heat stress during follicular recruitment in goats. Reproduction, v.129, p. 621–630, 2005.

PARAMIO, M.T. In vivo and *in vitro* embryo production in goats. Small Ruminant Research, v.89, p.144-148, 2010.

PAWSHE, C.H.; TOTEY, S.M.; JAIN, S.K. Methods of recovery of goat oocytes for in vitro maturation and fertilization. *Theriogenology*, v.42, p.418-423, 1994.

PEREIRA, A.F.; FELTRIN, C.; ALMEIDA, K.C.; CARNEIRO, I.S.; AVELAR, S.R.G.; ALCÂNTARA NETO, A.S.; SOUSA, F.C.; MELO, C.H.S.; MOURA, R.R.; TEIXEIRA, D.I.A.; BERTOLINI, L.R.; FREITAS, V.J.F.; BERTOLINI, M. Analysis of factors contributing to the efficiency of the in vitro production of transgenic goat embryos (*Capra hircus*) by handmade cloning (HMC). *Small Ruminant Research*, v.109, p.163-172, 2013.

PEREIRA, R.J.T.A.; SOHREY, B.; HOLTZ, W. Nonsurgical embryo collection in goats treated with prostaglandin F2 α and oxytocin. *Journal of Animal Science*, v.76, p.360-363, 1998.

PIERSON, J.; WANG, B.; NEVEU, N.; SNNEK, L.; COTE, F.; KARATZAS, C.; BALDASSARRE, H. Effects of repetition, interval between treatments and season on the results from laparoscopic ovum pick-up in goats. *Reproduction, Fertility and Development*, v.16, p.795-799, 2005.

PINTADO, B.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ LLANO, B. Superovulatory response of Murciana goats to treatments based on PMSG/anti-PMSG or combined FSH/PMSG administration. *Theriogenology*, v. 50, p. 357-364, 1998.

PUTNEY D.J.; MULLINS S.; THATCHER W.W.; DROST M. & GROSS T.S. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperature between the onset of estrus and insemination. *Animal Reproduction Science*, v.19, p.37-51, 1989.

RENSIS, F.; SCARAMUZZI, R.J. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow a review. *Theriogenology*, v. 60, p.1139–1151, 2003.

ROMAN-PONCE, H., W. W. THATCHER, D. E. BUFFINGTON, C. J. WILCOX AND H. H. VAN HORN. Physiological and production responses of dairy cattle to a shade structure in a tropical environment. *Dairy Science*, v. 60, p. 424, 1977.

REMY, B.; BARIL, G.; VALLET, J.C.; DUFOUR, R.; CHOUVET, C.; SAUMANDE, J.; CHUPIN, D.; BECKERS, J.F. Are antibodies responsible for a decreased superovulatory response in goat which have been treated repeatedly with pFSH?. *Theriogenology*, v.36, p.389-399, 1991.

ROCHA, D.R.; ARAÚJO, A.A.; MOURA, A.A.A.N.; SALES, M.G.F. Avaliação de estresse térmico em vacas leiteiras mestiças (*Bos taurus* x *Bos indicus*) durante os períodos chuvoso e seco no Estado do Ceará. In: Proceedings of 45th Reunião Annual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, p. 101–103, 2008.

ROTH, Z.; MEIDAN, R.; BRAW-TAL, R. & WOLFENSON, D. Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma FSH and inhibin concentration in cows. *Journal Reproduction Fertility*, v. 120, p. 83–90, 2000.

ROTH, Z.; MEIDAN, R.; SHAHAM-ALBALANCY, A.; BRAW-TAL, R.; WOLFENSON, D. Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-sized and preovulatory ovine follicles. *Reproduction*, v. 121, p. 745–51, 2001.

ROY, F.; MAUREL, M.C.; COMBES, B.; VAIMAN D., CRIBIU, E.P.; LANTIER, I.; POBEL, T.; DELETANG, F.; COMBARNOUS, Y.; GUILLOU F. The negative effect of repeated equine chorionic gonadotropin treatment on subsequent fertility in Alpine goats is due to a humoral immune response involving the major histocompatibility complex, *Biology of Reproduction*, v.60, p.805-813, 1999.

RUBIANES, E.; MENCHACA, A. The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. *Animal Reproduction Science*, v.78, p.271-287, 2003.

SAHARREA, A.; VALENCIA, J.; BALCÁZAR, A.; MEJÍA, O.; CERBÓN, J.L.; CABALLERO, V.; ZARCO, L. Premature luteal regression in goats superovulated with PMSG: effect of hCG or GnRH administration during the early luteal phase. *Theriogenology*, v.50, p.1039-1052, 1998.

SNYDER, D.A.; DUKELOW, R. laparoscopic studies of ovulation, pregnancy diagnosis and follicle aspiration in sheep. *Theriogenology*, v.2, p.143-148, 1974.

SILANIKOVE, N. Effects of heat stress on the welfare of extensively managed domestic ruminants. *Livestock Production Science*, v. 67, p.1–18, 2000.

SIRARD, M.A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology*, v.65, p.126-136, 2006.

SOUZA, J.M.G.; DUFFARD, N.; BERTOLDO, M.J.; LOCATELLI, Y.; CORBIN, E.; FATET, A.; FREITAS, V.J.F.; MERMILLOD, P. Influence of heparin or the presence of cumulus cells during fertilization on the in vitro production of goat embryos. *Animal Reproduction Science*, v.138, p.82–89, 2013.

SOUSA, W.H.O. Agronegócio da caprinocultura de corte no Brasil. *Tecnologia e Ciência Agropecuária*. v.1, p.51-58. 2007.

SOUZA, E.D.; SOUZA, B.B.; SOUZA, W.H.; CÉZAR, M.F.; SANTOS, J.R.S.; TAVARES, G.P.. Determinação dos parâmetros fisiológicos e gradientes térmicos de diferentes grupos genéticos de caprinos no semi-árido. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 29, p. 177-184. 2005

STANGL, M.; KTIHHOLZER, B.; BESENFELDER, U.; BREM, G. Repeated endoscopic ovum pick-up in sheep. *Theriogenology*, v.52, p.709-716, 1999.

STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M. Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões: um guia de procedimento e informações gerais para uso em tecnologia de transferência de embriões enfatizando procedimentos sanitários. Illinois: Savoy, 1998. 180p.

TEIXEIRA, P.P.M.; PADILHA, L.C.; OLIVEIRA, M.E.F.; MOTHEO, T.F.; DA SILVA, A.S.L.; BARROS, F.F.P.C.; COUTINHO, L.N.; FLÔRES, F.N.; LOPES, M.C.S.; BANDARRA, M.B.; SILVA, M.A.M.; VASCONCELOSA, R.O.; RODRIGUES, L.F.S.;

VICENTE, W.R.R. Laparoscopic ovum collection in sheep: gross and microscopic evaluation of the ovary and influence on oocyte production. *Animal Reproduction Science*, 127, 169–175, 2011.

WOLFENSON, D.; LEW, B. J.; THATCHER, W. W., GRABER, Y. & MEIDAN, R. Seasonal and acute heat stress effects on steroid production by dominant follicles in cows. *Animal Reproduction Science*, v. 47, p. 9–19, 1997.

APÊNDICE A

RESUMO PUBLICADO: *Animal Reproduction*, 346, 2013.

EFFECT OF THE USE OF SUCCESSIVE HORMONAL STIMULATION AND
LAPAROSCOPIC OOCYTE RECOVERY ON QUANTI-QUALITATIVE OOCYTE
PRODUCTION IN GOATS RAISED IN THE TROPICS

D.J.D. Sanchez; C.H.S. Melo; F.C. Sousa; A.A. Rocha; A.S. Alcântara Neto; I.S. Campelo;
A.F. Pereira; D.I.A. Teixeira; L.M. Melo; V.J.F. Freitas

Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução, Universidade Estadual do Ceará,
Faculdade de Veterinária, Brazil

Keywords: goat; laparoscopy; oocyte.

The laparoscopic oocyte recovery (LOR) can be an excellent tool for the multiplication of genetically superior goats when associated with *in vitro* embryo production (IVEP). However, for a more efficient technique it is important that it can be performed several times in the same donor. This study aimed to verify the effect of the successive use of hormonal treatment followed by LOR on the quantitative and qualitative production of oocytes in goats raised in the tropics. For this purpose, 12 adult crossbred Anglo Nubian goats, cyclical, were submitted to five successive hormonal treatments for ovarian stimulation. Intravaginal sponges impregnated with 60 mg of medroxyprogesterone acetate (Progespon, Syntex, Buenos Aires, Argentina) were inserted at the beginning of the treatment (D0). On D7 75 µg of cloprostenol (Prolise, ARSA, Buenos Aires, Argentina) was given i.m. The stimulation was obtained by the administration of 180 mg pFSH (Folltropin-V, Bioniche, Belleville, Canada), divided into 5 decreasing doses with an interval of 12 h from D7 to D9 of the progestagen treatment. Thirty-six hours before LOR, goats were fasted and LOR was performed using volatile anesthesia, starting with i.v. injection of 20 mg / kg thiopental (Tiopentax 2.5% Cristália, Sao Paulo, Brazil) and maintained with isoflurano (Isoforine, Cristália, São Paulo, Brazil). Under laparoscopic control, the follicles were visualized and classified as small (<3 mm), medium (3-4 mm) and large (> 4 mm). The cumulus-oocyte complexes (COCs) were aspirated with the help of a vacuum system (WTA, Cloves, Brazil) and in classified in Grades I to IV. The

results were expressed as mean $\pm$ SEM and analyzed by ANOVA (repeated measures) followed by Tukey test (5%). A total of 1149 follicles (19.1 ± 2.6 follicles / donor) was punctured and 822 oocytes were collected (13.7 ± 1.6 oocytes / donor) which resulted in a total harvest rate of 71.5%. There were no statistical differences in the number of punctured follicles and oocytes collected during the five sessions LOR, respectively ($21,3 \pm 2,1$ and $12,9 \pm 1,5$ vs $21,8 \pm 3,4$ and $15,6 \pm 1,7$ vs $20,0 \pm 1,7$ and $15,2 \pm 1,5$ vs $16,5 \pm 2,3$ and $12,9 \pm 2,0$ vs $16,3 \pm 1,4$ e $11,9 \pm 1,1$; $P > 0,05$). However, the number of large follicles observed in session 1 was different when compared to sessions 2 and 4 (5.8 ± 0.7 vs 2.8 ± 0.6 and 2.0 ± 0.4 , $P < 0.05$). Regarding to harvest rate, , there was no statistical difference between the sessions, averaging 61.4, 72.6, 75.5, 71.7 and 73.2% ($P > 0.05$) for sessions one to five, respectively. Only 17% of oocytes collected were classified as degenerated (Grade IV) and 83% viable (GI-III). In conclusion, five successive hormone treatments followed by LOR did not affect the quantitative and qualitative production of oocytes in goats raised in the tropics, and may be a useful tool for genetic improvement in goats.