

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

SUELY RENATA GAYA AVELAR

**DIFERENTES PROTOCOLOS DE ESTIMULAÇÃO OVARIANA PARA
A PRODUÇÃO DE OÓCITOS EM CABRAS DA RAÇA CANINDÉ**

**FORTALEZA-CE
2009**

SUELY RENATA GAYA AVELAR

DIFERENTES PROTOCOLOS DE ESTIMULAÇÃO OVARIANA PARA
A PRODUÇÃO DE OÓCITOS EM CABRAS DA RAÇA CANINDÉ

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
2009

A948d Avelar, Suely Renata Gaya

Diferentes protocolos de estimulação ovariana para a produção de oócitos em cabras da raça Canindé/ Suely Renata Gaya Avelar. __ Fortaleza, 2009.

67p.; il.

Orientador: Prof. Dr. Vicente José de Figueiredo Freitas

Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) –

Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

1.Caprino. 2. Oócito. 3. Laparoscopia. 4. Maturação *in vitro*. I. Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

CDD: 636.089

SUELY RENATA GAYA AVELAR

DIFERENTES PROTOCOLOS DE ESTIMULAÇÃO OVARIANA PARA
A PRODUÇÃO DE OÓCITOS EM CABRAS DA RAÇA CANINDÉ

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: 01/ 12/ 2009

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Dárcio Ítalo Alves Teixeira
Universidade Estadual do Ceará
Co-orientador / Examinador

Prof. Dr. Marcelo Bertolini
Universidade de Fortaleza
Examinador

Dedico.
À minha mãe por todo amor, educação e dedicação.
Meu exemplo de força e coragem!

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela concessão de bolsa de estudos durante o período do mestrado.

A Deus, pelo dom da vida, por ter me dado força e saúde para realizar este sonho.

Aos meus pais, Ana Gaya Avelar e Osmar Barbosa Avelar (*in memoriam*), pelo amor incondicional.

À minha irmã, Nara Avelar e meu cunhado, Daniel Brito pela amizade e incentivo.

À família Gaia, incluindo tios, primos, especialmente Celita, Júnior, Mara, Marcos e Mayara, por todos os momentos de alegria e pelo apoio nos momentos de dificuldades.

À minha madrinha, Maria Gaia, por ser minha grande incentivadora e por acreditar em meu potencial.

À vovó Dazinha (*in memoriam*) e ao meu tio-avô Madico, que me ensinaram a ter amor pelos animais e a descobrir minha profissão.

À família Avelar, em especial minha adorável avó, pelas orações e por todo amor.

Ao meu namorado, Paulo Costa, pela paciência, pelo companheirismo e pelos momentos de felicidade.

Ao Prof. Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas, pela dedicação, paciência, amizade e por seus ensinamentos, fundamentais para minha vida profissional.

À Dra. Luciana Melo, pela amizade e pelo auxílio com sugestões que me ajudaram no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Dárcio Ítalo, pela amizade e por todos os ensinamentos e ajuda disponibilizada neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcelo Bertolini, pelo apoio e sugestões disponibilizadas em experimentos de COL e pela participação na avaliação deste trabalho.

À Karlliely Almeida, minha grande e eterna amiga, em quem sempre pude confiar. Obrigada por todos esses anos de convivência repletos de alegrias e superações.

À M.Sc. Raylene Moura, uma amiga que esteve presente em todos os momentos, disponibilizando-me atenção para ouvir meus desabafos e preocupações. Ela é uma pessoa extraordinária.

À M.Sc. Alexsandra Pereira, pela dedicação, pela amizade e por ser um grande exemplo de pesquisadora.

Ao B.Sc. Carlos de Sousa, a quem considero um irmão. Exemplo de inteligência e competência.

Aos meus amigos do Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução (LFCR), B.Sc. Victor Hugo, Agostinho, Antônio Carlos, Carlos Henrique, Érica, Hayanne,

Claudia, Talles, Jefferson, Maiara, Eudislane, por todos os momentos de descontração, trabalhos e amizade.

À Denise Caldeira e Diogo Leal, pela ajuda e pela idéia de desenvolver um simulador de laparoscopia, que foi essencial para meu treinamento de COL.

Aos amigos (ex-alunos e ex-estagiários do LFCR), Suyanne Cruz, Sabrina Tainah, Camilla Rebouças, Daniel Holanda, Karina Busato, Felipe Braga, Caio Brito, Gabrielly, Batista Cajazeiras, Juliana Luz e Lécio Leoni, por contribuírem direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

Aos amigos, Helena Evangelista, Nádia Marlóvia, Renan Malheiros, Fernanda, Ródney, Ricardo, Sônia e Rosinei meus sinceros agradecimentos.

Aos amigos de mestrado, pelo companheirismo e amizade. Sou muito grata a todos!

Aos professores e funcionários da FAVET e PPGCV, pelo profissionalismo, respeito e simpatia.

Aos funcionários e amigos César, Selmar e Cícero pelo apoio, pela amizade e pelo carinho.

RESUMO

Este estudo analisou o efeito de diferentes tratamentos hormonais de estimulação ovariana sobre a quantidade e a qualidade dos complexos cumulus-oócitos (CCO) recuperados por laparoscopia e sua posterior maturação *in vitro* (MIV) oriundos de cabras Canindé em risco de extinção. Dezoito cabras Canindé cíclicas receberam o tratamento que consistiu de uma esponja intravaginal impregnado com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona por 11 dias, juntamente com uma única injeção de 50 µg de d-cloprostenol no oitavo dia de tratamento, em adição a um dos seguintes regimes de tratamento adicionais: i) múltiplas doses (MD), em um total de 120 mg de NIH-FSH-P1, em cinco injeções em intervalos de 12 h; ii) três doses (TD), em um total de 120 mg de NIH-FSH-P1 em três injeções em intervalos de 24 h, e iii) one-shot (OS), recebendo 70 mg de NIH-FSH-P1 e 200 UI de eCG administrada 36 h antes da remoção da esponja. Foram realizadas três sessões de tratamento hormonal/recuperação de oócitos e em cada sessão, com as cabras sendo alocadas em um grupo diferente para evitar o efeito de repetição do tratamento. Os oócitos foram colhidos por laparoscopia, no mesmo momento da retirada das esponjas, e submetidos à maturação *in vitro* foi observada. Cada cabra apresentou uma média de $15,1 \pm 0,7$ folículos puncionados e $11,3 \pm 0,8$ COCs recuperados, resultando em uma taxa de recuperação total de 74,5%. Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos hormonais para o número médio de folículos visualizados e puncionados. A média do número de COCs obtidos por cabra não diferiram estatisticamente ($P > 0,05$) entre os tratamentos. Estes números foram de $12,4 \pm 1,0$; $10,7 \pm 1,0$; $10,8 \pm 1,0$ para os tratamentos MD, TD e OS, respectivamente. No entanto, a menor ($P < 0,05$) taxa de recuperação foi verificada no tratamento TD (67,9%) quando comparado ao MD (84,1%) e ao OS (72,4%). Após a MIV, a menor ($P < 0,05$) taxa de maturação foi observada em oócitos do tratamento TD, (32,1%), enquanto que a taxa para o grupo MD foi de 49,1% e para o grupo OS de 46,2%. Portanto, o tratamento TD foi o menos eficaz tanto para a recuperação de oócitos quanto para as taxas de MIV. Embora o tratamento OS tenha produzido uma resposta similar ao tratamento MD, o tratamento OS tem a vantagem de ser mais prático, podendo ser utilizado em futuros programas de conservação da raça Canindé, empregando a técnica de laparoscopia para a obtenção de oócitos para uso em reprodução por métodos avançados de biotecnologia.

Palavras-chave: Caprino; Oócito; Laparoscopia; Maturação *in vitro*.

ABSTRACT

This study analyzed the effect of different hormonal ovarian stimulation treatments on the quantity and quality of the cumulus-oocyte complexes (COCs) recovered by laparoscopy and their subsequent in vitro maturation (IVM) in endangered Canindé goats. Eighteen cyclic Canindé goats received treatment consisting of an intravaginal sponge containing 60 mg of medroxyprogesterone acetate for 11 days together with a single injection of 50 µg of d-cloprostenol on the eighth day of treatment, along with the following additional treatment regimens: i) multiple doses (MD), receiving 120 mg of NIH-FSH-P1 in five injections at 12-hour intervals; ii) three doses (TD), receiving 120 mg of NIH-FSH-P1 in three injections at 24-hour intervals; and iii) one-shot (OS), receiving 70 mg of NIH-FSH-P1 and 200 iu of eCG administered 36 hours before removal of the sponge. There were three sessions of hormone treatment/oocyte recovery and in each session the goats were allocated in a different group to avoid the effect of treatment repetition. The oocytes were collected by laparoscopy at the time the sponges were removed, and their in vitro maturation was monitored. Each goat produced an average of 15.1 ± 0.7 punctured follicles and 11.3 ± 0.8 recovered COCs, resulting in a total recovery rate of 74.5%. No significant differences were observed among the hormonal treatments for the average number of visualized and punctured follicles. The average number of COCs obtained per goat did not differ statistically ($P > 0.05$) among the treatments. These numbers were 12.4 ± 1.0 , 10.7 ± 1.0 and 10.8 ± 1.0 for the MD, TD and OS groups, respectively. However, the lowest ($P < 0.05$) recovery rate was verified in TD group (67.9%) when compared to MD (84.1%) and OS group (72.4%). After the IVM, the lowest ($P < 0.05$) maturation rate was observed in oocytes from the TD group, at 32.1%, while the rate for the MD group was 49.1% and that for the OS group 46.2%. Therefore, the TD treatment was the least effective both for oocyte recovery and IVM rates. Although the OS treatment produced a similar response to the MD treatment, it has the advantage of being more practical and can be used in future programs for preservation of the Canindé breed employing laparoscopic technique to obtain oocytes for use in reproduction through advanced biotechnology methods.

Keywords: Goat; Oocyte; Laparoscopy; In vitro maturation.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1 – Exemplares da raça Canindé: macho (A) e fêmea (B).....	19
Figura 2 – Colheita oocitária sob controle laparoscópico em pequenos ruminantes.....	25
Figura 3 – Exemplares representativos de oócitos caprinos de grau I(A), II (B), III (C) e IV (D).....	26
Figura 4 – Influência do tamanho do folículo puncionado e da estação reprodutiva sobre o desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i> de caprinos.....	28
Figura 5 – Porcentagem média de zigotos e blastocistos após MIV, em líquido folicular, na presença de EGF com cisteamina, ou <i>in vivo</i>	29

Capítulo 1

Figura 1 – Typical <i>cumulus</i> -oocyte complexes (COCs) recovered from Canindé goats receiving different hormonal treatments for ovarian stimulation. COCs are classified in grade I (A), II (B), III (C) and IV (D).....	43
Figura 2 – Distribution of various quality grades of cumulus-oocyte complexes (COCs) recovered from Canindé goats receiving different hormonal treatments for ovarian stimulation. Good quality oocytes (grades I and II). The numbers above the columns indicate the amount of COCs recovered in each treatment. Letters (a, b) denote that differences between treatments are significant in the grade IV class ($P < 0.05$).....	44

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

Tabela 1 – Classificação oocitária de acordo com a quantidade de células do <i>cumulus oophorus</i> e aspecto do citoplasma.....	26
Tabela 2 – Número médio ($\pm$ desvio padrão) de folículos puncionados e oócitos colhidos por laparoscopia em cabras doadoras adultas e pré-púberes (3-5 meses de idade).....	27
Tabela 3 – Diferenças na colheita, maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário de oócitos derivados de cabras Sarda adultas e pré-púberes após estimulação com múltiplas doses de FSH (três repetições).....	27

Capítulo 1

Table 1 – Criteria for grading cumulus-oocyte complexes (COCs) recovered from Canindé goats.....	41
Table 2 – Effect of different hormonal treatments for ovarian stimulation on the number of visualized and punctured follicles (mean $\pm$ SEM) and cumulus-oocyte complexes (COCs) recovery rate in Canindé goats.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACOSC – Associação dos criadores de ovinos e caprinos do sertão do Cabugi
ASCCOPER – Associação dos criadores de caprinos e ovinos de Petrolina e região
BGA – Bancos de germoplasma animal
BSA - Bovine Serum Albumin (Albumina Sérica Bovina)
CIDR – Controlled Internal Device Release (Dispositivo Interno de Liberação Controlada)
CIV – Cultivo *in vitro*
CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CCO – Complexo *cumulus*-oócito
cm – Centímetro
COL – Colheita oocitária por laparoscopia
CO₂ – Dióxido de carbono
DNA - Deoxyribonucleic acid (Ácido Desoxiribonucléico)
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
eCG – Equine Chorionic Gonadotrophin (Gonadotrofina Coriônica Eqüina)
EGF – Epidermal Growth Factor (Fator de Crescimento Epidermal)
FGA – Fluorogestone Acetate (Acetato de Fluorogestona)
FIV – Fecundação *in vitro*
FSH – Follicle Stimulating Hormone (Hormônio Folículo Estimulante)
G - Gauge
GnRH – Gonadotrophin Releasing Hormone (Hormônio Liberador de Gonadotrofina)
h – Hora
IA – Inseminação Artificial
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Kg – Quilograma
LH – Luteinizing Hormone (Hormônio Luteinizante)
LFCR – Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução
µg – Micrograma
µL – Microlitro
µM – Micromolar

MAP – Medroxyprogesterone acetate (acetato de medroxiprogesterona)

mg – Miligrama

mL – Mililitro

MIV – Maturação *in vitro*

mmHg – Milímetro de mercúrio

ng – Nanogramas

N₂ - Nitrogênio

O₂ - Oxigênio

PGF_{2α} – Prostaglandina F_{2α}

PIV – Produção *in vitro*

PO – Puro de Origem

RNA – Ribonucleic acid (Ácido Ribonucléico)

SOF – Synthetic Oviduct Fluid (Fluido Sintético de Oviduto)

SPRD – Sem Padrão Racial Definido

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

UI – Unidade Internacional

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 RAÇA CANINDÉ.....	18
2.2 UTILIZAÇÃO DE BIOTÉCNICAS REPRODUTIVAS PARA PRESERVAÇÃO DE RAÇAS NATURALIZADAS.....	20
2.2.1 INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL.....	20
2.2.2 BANCOS DE EMBRIÕES.....	21
2.2.2.1 PRODUÇÃO <i>IN VIVO</i> DE EMBRIÕES.....	21
2.2.2.2 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES.....	23
3 JUSTIFICATIVA.....	31
4 HIPÓTESE CIENTÍFICA.....	32
5 OBJETIVOS.....	33
5.1 Objetivo geral.....	33
5.2 Objetivos específicos.....	33
6 CAPÍTULO 1.....	34
7 CONCLUSÕES.....	50
8 PERSPECTIVAS.....	51
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
APÊNDICE A.....	61
APÊNDICE B.....	63
APÊNDICE C.....	65

1 INTRODUÇÃO

A exploração de caprinos no Nordeste brasileiro destaca-se pelo seu efetivo que consta de, aproximadamente, 8,7 milhões de animais, o que corresponde a 91% do rebanho nacional (IBGE, 2007). Este rebanho é composto por animais sem padrão racial definido (SPRD), de raças exóticas e raças naturalizadas. Estes últimos são caracterizados por uma elevada adaptabilidade às condições ambientais (EGITO et al., 2002).

Para as condições de semi-árido, as raças naturalizadas possuem um interessante material genético para utilização em determinados sistemas de produção. As principais raças/tipos raciais naturalizadas são a Moxotó, Canindé, Repartida e Marota (EGITO et al., 2002). Dentre elas, a Canindé destaca-se pela sua aptidão leiteira superior às demais raças mencionadas.

Além de sua importância como recurso biológico dotado de grande variabilidade genética, estes animais desempenham um papel fundamental para a região Nordeste, quanto à fixação do homem no campo e por serem fonte de proteínas para as populações de baixa renda (RIBEIRO, 1999). No entanto, a utilização desordenada em cruzamentos com raças exóticas ocasionou um processo de degeneração destas raças (ACOSC, 2008).

O aumento da produtividade bem como a conservação do material genético destes animais, pode ser alcançado com o uso biotecnologias reprodutivas para a formação, por exemplo, de bancos de germoplasma. Estes por sua vez, colaboram para a conservação por meio, principalmente, da criopreservação de sêmen, oócitos e embriões (ANDRABI & MAXWEL, 2007).

Atualmente, a produção *in vitro* (PIV) de embriões têm-se apresentado como uma importante ferramenta para a propagação de material genético de espécies ameaçadas de extinção (LOCATELLI et al., 2006). A colheita de oócitos por laparoscopia (COL) tem sido amplamente realizada em caprinos para a recuperação de oócitos de qualidade para posterior PIV. A COL é um método caracterizado como sendo pouco invasivo (BALDASSARRE et al., 2002), permitindo que fêmeas tenham uma rápida recuperação. Adicionalmente, esta técnica apresenta riscos mínimos para o desenvolvimento de aderências, possibilitando colheitas repetidas no mesmo animal em um menor espaço de tempo (BARIL, 2006).

No que se refere ao sucesso da COL, a resposta ovariana é um dos principais fatores limitantes (COGNIE et al., 2003), o que torna necessário a melhoria nos protocolos de estimulação ovariana em animais que podem ter seu patrimônio genético ameaçado de extinção. Desta forma, este método pode ser utilizado para a formação de bancos de germoplasma, contribuindo para a conservação de raças naturalizadas que já são bem adaptadas às condições adversas do semi-árido.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 RAÇA CANINDÉ

Os caprinos da raça Canindé estão dentre as principais raças naturalizadas do Nordeste do Brasil já que se trata de uma raça homologada. Acredita-se que esta raça tenha se originado no vale do Canindé, no Estado do Piauí e que em sua formação tenha a participação da raça Grisone Negra da Suíça (INFORME EMBRAPA, 2003).

O nome Canindé significa faca pontuda, usada principalmente no sertão cearense ou também pode significar pedras ou lascas rochosas que serviam para afiar lâminas ou peixeiras no sertão do Piauí (ASCCOPER, 2008). Outros afirmam que é oriundo de “calindé” que era o nome designado à tanga branca, de algodão rústico, usada pelos escravos. Neste sentido, era a cabra que simbolizava, de certa forma, o escravo, pois usava a calindé (fazendo alusão à parte baixa do corpo de cor branca, mantendo-se o restante de cor preta) e tinha lágrimas na face (pequena faixa branca sobre os olhos). Além disso, os escravos ganhavam a cabra calindé quando conseguiam a alforria (CASTRO, 1984).

Quanto ao seu padrão racial (Figura 1), animais da raça Canindé apresentam a pelagem preta com o ventre e as pernas de tonalidades vermelho-amarelada a branca. Os pêlos são curtos e brilhantes. A cabeça é preta com mancha baia de tamanho variado na região do pescoço. Uma faixa branca estreita percorre a arcada orbitária pelo lado cranial descendo até os lacrimais, ou pouco mais. Os pêlos da parte externa da orelha são pretos e claros na parte interna e nos bordos. O focinho é preto. É comum encontrar animais com pelagem preta e vermelha ao invés de preta e baia. A fronte deve ser semi-convexa, com sulco vertical, paralelamente aos chifres. Nas fêmeas, os chifres são largos e achatados na base, seguindo paralelamente para cima até cerca da metade do percurso total, voltando-se levemente para fora, podendo terminar para cima. Admitem-se os chifres direcionados para trás em suave curva, desde a base. Nos machos, os chifres são largos e achatados na base, seguindo para cima e para trás, depois acentuadamente para fora, podendo terminar para cima, espiralando ou não. A barba é bem desenvolvida nos machos e menor nas fêmeas, quando presente. A linha branca ventral tem início na base do peito, seguindo pelas axilas, passando pela região inguinal e pelas nádegas, chegando até à base da inserção da cauda, onde os pêlos das bordas inferiores são claros. Os membros dianteiros e traseiros são pretos na frente e brancos

atrás, com exceção dos joelhos que são brancos, tanto na frente como atrás. Os cascos são sempre pretos.

Apresentam peso corporal médio de 35 kg a 40 kg e altura aproximada de 55 cm (ASCCOPER, 2008). A prolificidade da Canindé varia de 1,29 a 1,43 e a mortalidade de 15,0 a 18,6% para animais de até um ano de idade. Para animais com essa idade, o peso apresenta-se em torno de 15,7 Kg (RIBEIRO, 1999).

Dentre suas aptidões, estes animais destacam-se em relação às outras raças naturalizadas pela sua superior produção leiteira (INFORME EMBRAPA, 2003). Segundo Santana et al. (2000), a cabra Canindé pode produzir aproximadamente 1,5 litros de leite por dia.

Uma das razões da redução do número de animais dessa raça é o cruzamento com raças exóticas (Mariante & Egito, 2002), visando a obtenção de animais com maior potencial leiteiro. O rebanho estimado em mestiçagem é de 50.000 cabeças. Calcula-se que existam cerca de 25.000 cabeças classificáveis como "puras de origem" (PO), as quais são aptas para receberem um Certificado de Fundação (Central do Campo).

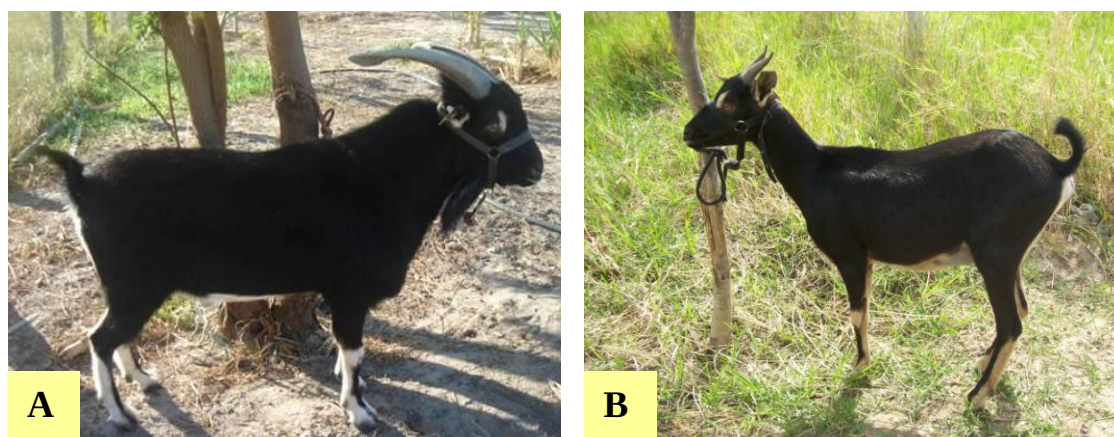


Figura 1: Exemplos da raça Canindé: macho (A) e fêmea (B). Fonte: LFCR.

O baixo número de exemplares da raça impõe um risco de extinção. Ações que objetivem a preservação destes animais serão importantes para que não seja perdido este material genético de forma definitiva. Estas ações poderiam ser baseadas, sobretudo nas modernas biotécnicas reprodutivas.

2.2 UTILIZAÇÃO DE BIOTÉCNICAS REPRODUTIVAS PARA PRESERVAÇÃO DE RAÇAS NATURALIZADAS

As biotécnicas reprodutivas tais como a inseminação artificial (IA), a múltipla ovulação e transferência de embriões, criopreservação de gametas e a produção *in vitro* (PIV) de embriões têm ajudado na diminuição da fragmentação das populações e na propagação do material genético de espécies domésticas e raças em vias de extinção (COMIZZOLLI et al., 2000). Neste sentido, colaborando com a preservação, distribuição da diversidade genética, além de conservar genes e/ou genomas individuais (LOPES-JÚNIOR et al., 2006), as biotecnologias reprodutivas são apresentadas como novas soluções para facilitar a gestão genética de espécies ameaçadas de extinção, tais como o desenvolvimento de bancos de recursos genéticos (PUKAZHENTHI & WILDT, 2004; PUKAZHENTHI et al. 2006).

2.2.1 Inseminação artificial

A IA é a biotécnica reprodutiva mais amplamente aplicada, por ser bastante simples e muito importante para a conservação de recursos genéticos (ANDRABI & MAXWEL, 2007). A IA permite a propagação do material genético de machos selecionados evitando a depressão genética causada pela diminuição do número de indivíduos oriunda do processo de extinção. No entanto, o uso descontrolado da IA foi um dos fatores que contribuíram para a quase extinção de um grande número de raças locais por facilitar a miscigenação entre os animais de raças exóticas e naturalizadas (PEREIRA & ALMEIDA, 2005).

Dentre as vantagens apresentadas pela IA para as espécies ameaçadas de extinção está a possibilidade de intercâmbio de material genético entre diferentes populações, por meio de sêmen congelado, minimizando os problemas com consangüinidade, evitando também a transmissão de doenças entre os indivíduos (ROLDAN et al., 2006), além de permitir que o sêmen de um reprodutor possa ser utilizado no rebanho após sua morte, ou para o aproveitamento de reprodutores inutilizados para a monta natural por defeitos físicos adquiridos.

A IA envolve várias etapas que vão desde a preparação dos animais, a escolha da técnica de colheita e utilização do sêmen, bem como sua aplicação conforme o local de

deposição na fêmea. Quanto à utilização do sêmen, este pode ser *in natura*, diluído, resfriado ou congelado-descongelado. A técnica de inseminação em pequenos ruminantes pode ser realizada por via transcervical ou intra-uterina. O melhor momento da IA quando o estro é natural é aquele com intervalo entre 12 e 18 h após a detecção do estro (GONZALES et al., 2002). Deste modo a IA tornou-se indispensável para sua utilização em trabalhos de preservação de espécies em vias de extinção (PUKAZHENTHI & WILDT, 2004).

2.2.2 Bancos de embriões

O objetivo da conservação animal é a manutenção da biodiversidade, pois a remoção de uma única espécie pode afetar o funcionamento do ecossistema (COMIZZOLLI et al., 2000). A formação de bancos de germoplasma animal (BGA) é de grande importância na preservação do patrimônio genético animal, por meio da conservação *ex situ* através da criopreservação de sêmen, embriões, oócitos, tecidos, células somáticas ou DNA de animais em vias de extinção (ANDRABI & MAXWELL, 2007). A principal vantagem dos BGAs é a manutenção da diversidade genética de uma determinada espécie por muitos anos e a utilização deste recurso até mesmo após a morte do animal (ROLDAN et al., 2006). Os embriões utilizados nos BGAs podem ser oriundos de produção *in vivo* ou *in vitro*.

2.2.2.1 Produção *in vivo* de embriões

Esta biotécnica consiste em obter um elevado número de embriões a partir de uma única doadora após as etapas de estimulação ovariana, fecundação e colheita embrionária, a fim de transferí-los para receptoras que completem o período de gestação.

A múltipla ovulação e transferência de embriões é uma importante ferramenta que pode ser utilizada não somente no melhoramento genético, mas também em programas de conservação de espécies domésticas em vias de extinção (BARIL, 2006). O sucesso da múltipla ovulação e transferência de embriões depende, dentre outros fatores, do manejo em geral dos animais, nutrição e sanidade das doadoras e receptoras, taxa de ovulação das doadoras, porcentagem da fecundação, condição em que os

embriões estão sendo transferidos (frescos ou criopreservados), grau de sincronia entre as receptoras e a idade dos embriões, além do método de colheita e experiência técnica do responsável para avaliação morfológica dos embriões (FREITAS & SIMPLICIO, 2001).

Todas as exigências utilizadas como parâmetro na seleção de doadoras e receptoras em um programa de múltipla ovulação e transferência de embriões comercial são levadas em consideração quando um efetivo populacional permite descarte. No entanto, ao se trabalhar com conservação de recursos genéticos, há necessidade de uma maior flexibilidade no que diz respeito à seleção desses animais, mesmo quando não se observa parâmetros ideais, pois o importante é que tais animais apresentem características que por si só justifiquem sua inclusão num programa de múltipla ovulação e transferência de embriões, objetivando sua multiplicação e também a criopreservação deste material (RUMPF et al., 2006).

A múltipla ovulação e transferência de embriões é uma técnica imprevisível por apresentar uma grande variabilidade de resultados (BALDASSARRE & KARATZAS, 2004) no que diz respeito à resposta superovulatória, taxas de fecundação e regressão prematura do corpo lúteo (COGNÍÉ et al., 2003).

A variação da resposta superovulatória pode estar relacionada com a população folicular presente no momento do início do tratamento (GONZALEZ-BULNES et al., 2002), que não é controlada por um protocolo padrão de superovulação. Várias estratégias têm sido sugeridas para o aumento de pequenos folículos no momento do tratamento com hormônio folículo estimulante (FSH), evitando ao mesmo tempo a presença de folículos dominantes (BALDASSARRE & KARATZAS, 2004).

A múltipla ovulação e transferência de embriões tem início com a sincronização do estro das doadoras e receptoras, geralmente com o uso de esponjas vaginais impregnadas com acetato de fluorogestona (FGA), medroxiprogesterona (MAP) ou dispositivos vaginais (CIDR) impregnados com progesterona (MOTLOMELO et al., 2002). Esta impregnação com progestágenos ou progesterona é escolhida de acordo com a disponibilidade no mercado nacional. O tratamento progestágeno dura 11 dias e durante sua permanência é associado à administração de análogo de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) 48 h antes do final do tratamento (FREITAS et al., 1997).

Quanto ao tratamento de superovulação, a primeira gonadotrofina utilizada foi a gonadotrofina coriônica equina (eCG), na dose de 1000-2000 UI, administrada um ou

dois dias antes da retirada do progestágeno (MOOR, 1985). A eCG apresenta meia-vida longa, no organismo que pode resultar na alta incidência de folículos anovulatórios e altas concentrações de estradiol, podendo prejudicar o transporte dos gametas pelo trato reprodutivo da fêmea (COGNÍÉ, 1999). Atualmente, a superovulação é feita através do uso do FSH. Porém, esta gonadotrofina apresenta meia vida curta (110 minutos) (KNIGHTS et al., 2003). Assim, para manter os níveis de atividade biológica, a sua administração é feita a cada 12 h, durante três a quatro dias em doses decrescentes (D’ALESSANDRO et al., 2001) e a cobertura ou IA é realizada 12 e 24 h após o início da manifestação do estro. Alguns grupos de pesquisa têm adicionado o hormônio liberador de gonadotropina (GnRH) nos protocolos de superovulação, o qual atua como controlador do momento da ovulação (BALDASSARE et al., 2004).

Com relação à cobertura das doadoras, duas técnicas podem ser utilizadas: a monta natural ou a IA transcervical ou por laparoscopia. Em qualquer um dos casos, faz-se necessária a utilização de machos de fertilidade comprovada. A colheita dos embriões em caprinos é realizada por meio de lavagem dos cornos uterinos entre o 7º e o 8º dias após o início do estro (dia 0), através de laparotomia, laparoscopia ou via transcervical (LIMA-VERDE et al., 2003; BARIL, 2006). A transferência dos embriões colhidos é feita preferencialmente pelo método semi-cirúrgico, no corno uterino correspondente ao ovário com pelo menos uma ovulação de qualidade (FREITAS & SIMPLÍCIO, 2001).

2.2.2.2 Produção *in vitro* (PIV) de embriões

A PIV de embriões de pequenos ruminantes torna possível o melhoramento genético dos rebanhos através da propagação e conservação de genes desejáveis de valores individuais em curto prazo (COGNÍÉ et al., 2004). Além disso, trata-se de uma biotécnica alternativa para a multiplicação de recursos genéticos animais (RUMPF et al., 2006), bem como para o resgate de espécies ameaçadas de extinção (PTAK et al., 2002), por meio de formação de bancos de embriões criopreservados.

Os procedimentos *in vitro* são capazes de fornecer oócitos maturados e embriões que podem ser utilizados tanto para fins de pesquisa básica em fisiologia da reprodução como aplicação de outras biotécnicas, tais como a injeção intracitoplasmática de

espermatozóides (POPE, 2000) e transferência nuclear de células somáticas (KEEFER et al., 2001) que podem contribuir também para a conservação de recursos genéticos.

A PIV de embriões apresenta como principais etapas: a colheita e maturação oocitária, fecundação e cultivo dos embriões *in vitro* até a formação de blastocistos que poderão ser transferidos para receptoras ou criopreservados para uso futuro (COGNIÉ & POULIN, 2006).

A PIV inicia com a colheita de oócitos ou complexos *cumulus*-oócito (CCOs), necessitando de métodos eficientes para obter maiores taxas de recuperação. Em caprinos, é essencial para o sucesso da técnica que a fonte de oócitos utilizada produza um considerável número de oócitos de qualidade. Estes podem ser obtidos a partir de punção folicular de ovários provenientes de abatedouros ou, *in vivo*, de animais vivos (BARIL, 2006).

Os ovários provenientes de abatedouros podem não constituir uma fonte confiável de CCOs devido ao fato do histórico nutricional e sanitário dos animais não serem conhecidos, podendo afetar de forma negativa o processo de maturação oocitária. Como método alternativo, pode-se destacar a colheita oocitária guiada por laparoscopia (COL) para a recuperação de oócitos em animais vivos com manejo e valor genético conhecidos (COX & ALFARO, 2007). O método é relativamente simples, pouco invasivo e rápido, reduzindo o estresse do animal, pois dura, geralmente, de 15 a 20 min por doadora de oócito. Segundo Cognié et al. (2004), a taxa de colheita é semelhante àquela observada por uso de laparotomia.

A boa contenção e perfeita distribuição dos equipamentos para a COL (Figura 2), auxiliam no sucesso da mesma no que se refere ao tempo de execução e taxa de colheita oocitária (BARIL, 2006).



Figura 2: Colheita oocitária sob controle laparoscópico em pequenos ruminantes. Fonte: LFCR.

Repetidas COL associadas à fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo dos zigotos até o estágio de blastocisto possibilitam a obtenção de um grande número de embriões e conseqüente aumento na progênie de fêmeas de interesse quando comparado à produção de embriões *in vivo*. Essas técnicas permitem produzir, em tempo relativamente curto, mais embriões a partir de uma mesma fêmea. A punção folicular também é menos invasiva e mais simples que a colheita de embriões dos cornos uterinos e é eficiente em diferentes estádios fisiológicos (pré-puberdade ou início da gestação) em que a produção *in vivo* de embriões é menos viável. Em especial na espécie caprina, essa abordagem permite a eliminação do problema da regressão prematura dos corpos lúteos encontrada em uma porcentagem elevada em fêmeas superovuladas (COGNIÉ & BARIL, 2002).

Diferentes estudos já foram desenvolvidos objetivando aperfeiçoar a técnica de COL (TERVIT, 1996; COGNIÉ et al., 2004). Rodríguez et al. (2006) observaram que os dispositivos utilizados na COL, tais como, tipo e tamanho da agulha e o fluxo de aspiração, estão relacionados com a recuperação e qualidade oocitária. Segundo Cognié et al., (2004), com o objetivo de manter a adesão das células do *cumulus* ao oócito de ovelhas e cabras, a utilização de agulhas 18 G adaptadas a tubos de silicone realizando a aspiração sobre pressão de vácuo de 25 mmHg resultou em uma taxa de recuperação de oócitos de 50 a 60%.

O número e a qualidade dos oócitos obtidos durante a aspiração folicular são de fundamental importância. Morfologicamente, a qualidade do oócito é avaliada basicamente pela quantidade de células do *cumulus oophorus* e aspecto do citoplasma (Tabela 1, Figura 3). Durante o processo de obtenção dos CCOs, a retirada das células do *cumulus* torna os oócitos menos competentes aos fenômenos da maturação, uma vez que, *in vivo*, estas células contribuem para o ambiente intra-folicular de desenvolvimento do oócito (COGNIÉ et al., 2004).

Tabela 1: Classificação oocitária de acordo com a quantidade de células do *cumulus oophorus* e aspecto do citoplasma. Fonte: Baldassarre et al. (2003).

Grau	Características
I	Oócito com três ou mais camadas de células do <i>cumulus</i> e citoplasma uniformemente granulado
II	Oócito apresentando uma ou duas camadas de células do <i>cumulus</i> e citoplasma uniformemente granulado
III	Oócito desnudo com citoplasma heterogêneo
IV	Oócito degenerado ou com zona pelúcida rompida

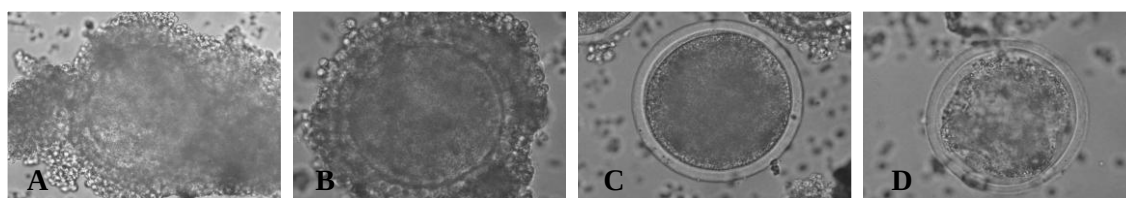


Figura 3: Exemplos representativos de oócitos caprinos de grau I (A), II (B), III (C) e IV (D). Fonte: LFCR.

O procedimento de COL pode ser realizado sem um tratamento de estimulação ovariana em que pode se conseguir em torno de quatro a seis oócitos por cabra por sessão (AGUILAR et al., 2002). Há uma diversidade de trabalhos que relatam um aumento neste rendimento, após o tratamento hormonal prévio para estimulação ovariana. As taxas de recuperação obtidas por este método variam entre 75 e 85% em cabras submetidas à superestimulação ovariana com FSH ou eCG, obtendo-se uma

média de 13,5 oócitos por doadora, além de permitir o uso de animais jovens ou pré-púberes como doadoras de oócitos (BALDASSARRE & KARATZAS, 2004). Após avaliar o efeito de repetidos tratamentos hormonais em cabras e ovelhas, Gibbons et al., (2007) não observaram diferenças no número de folículos puncionados, oócitos recuperados, bem como, sobre a qualidade destas estruturas.

A fim de reduzir a quantidade de aplicações de gonadotrofinas em protocolos de superestimulação ovariana para colheita de oócitos, vários estudos vêm utilizando uma única aplicação de FSH e eCG 36 h (BALDASSARE et al., 2003; PIERSON et al., 2004; BALDASSARRE et al., 2007) ou 24 h antes da COL (GIBBONS et al., 2007). Cabras pré-púberes estimuladas com esta combinação de gonadotrofinas 36 h antes da COL, apresentaram um número mais elevado de oócitos colhidos em relação ao de cabras adultas (Tabela 2). No entanto, os embriões oriundos de tais oócitos apresentam baixa viabilidade após fecundação *in vitro* (BALDASSARRE et al., 2002). O mesmo foi observado por Leoni et al. (2009) quando trabalharam com fêmeas caprinas pré-púberes e adultas após repetidas estimulações com FSH em múltiplas doses (Tabela 3).

Tabela 2: Número médio ($\pm$ desvio padrão) de folículos puncionados e oócitos colhidos por laparoscopia em cabras doadoras adultas e pré-púberes (3-5 meses de idade)

Tipo de doadora	Nº de fêmeas	Folículos	Oócitos	Taxa de colheita (%)
Pré-púbere	23	39,0 $\pm$ 4,5 ^a	28,4 $\pm$ 3,5 ^a	73
Adulta	21	19,0 $\pm$ 1,4 ^b	15,9 $\pm$ 1,5 ^b	84

a, b: $p < 0,01$. Fonte: Koeman et al., 2003.

Tabela 3: Diferenças na colheita, maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário de oócitos derivados de cabras Sarda adultas e pré-púberes após estimulação com múltiplas doses de FSH (três repetições)

Doadora	N	Total de CCOs (CCOs/fêmea)	Oócitos			Blastocistos
			Maturados	Fecundados	Clivados	
Pré-púbere	12	1076 (89,67 $\pm$ 18,30) ^a	700 (65,06%) ^a	536 (76,57%) ^a	298 (55,59%) ^a	72 (24,16%) ^c
Adulta	13	347 (26,69 $\pm$ 3,66) ^b	299 (85,30%) ^b	269 (90,87%) ^b	189 (70,26%) ^b	64 (33,86%) ^d

a, b: ($P < 0,01$), c v. d ($P < 0,05$).

Após a colheita e avaliação da qualidade dos oócitos, estes podem ser utilizados para a maturação *in vitro* (MIV). Esta etapa visa a maturação citoplasmática e nuclear dos oócitos (TIBARY et al., 2005). Somente uma pequena proporção de oócitos maturados *in vitro* pode completar a maturação citoplasmática, conferindo assim habilidade para suportar o desenvolvimento embrionário inicial (CROZET et al., 1995). Nesse sentido, a qualidade oocitária é considerada o fator chave que influencia a PIV de embriões (KATSKA-KSIAZKIEWICZ et al., 2007).

Outros fatores importantes para melhorias na taxa de maturação oocitária são o tamanho folicular e oocitário, os quais influenciam a progressão meiótica. Aparentemente oócitos maiores têm maior capacidade de retomar a meiose (SHIRAZI & SADEGHI, 2007). A competência oocitária é adquirida durante a fase de crescimento, quando ocorre a síntese e armazenamento de proteínas e RNAs, o que implica na habilidade não somente para a maturação nuclear, mas também em mudanças citoplasmáticas (ANGUITA et al., 2007). Tais mudanças servem como suporte para que ocorra uma fecundação de sucesso além de serem necessárias para manter o desenvolvimento embrionário. Na cabra, os oócitos de folículos maiores que cinco milímetros de diâmetro têm maior competência para o desenvolvimento após fecundação na estação sexual do que no período de anestro estacional ou do que aqueles oriundos de folículos de menor tamanho (Figura 4).

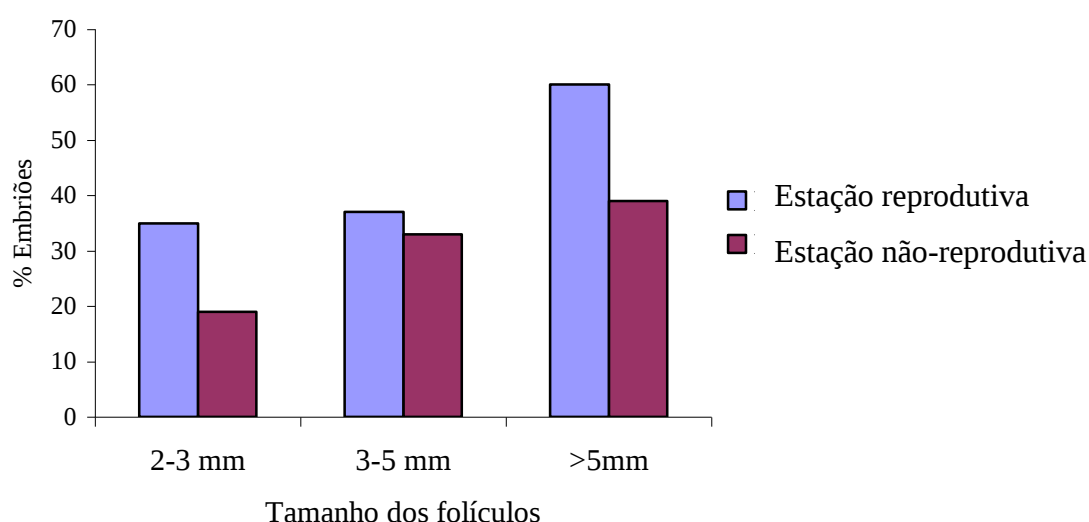


Figura 4: Influência do tamanho do folículo puncionado e da estação reprodutiva sobre o desenvolvimento embrionário *in vitro* de caprinos. Fonte: Cognié & Baril, 2002.

No que se refere aos meios utilizados para a MIV, muitos protocolos já foram desenvolvidos com taxas de maturação consideráveis (KATSKA-KSIAZKIEWICZ et al., 2007). Normalmente utiliza-se na MIV o TCM-199 em conjunto com FSH, LH e estradiol, fatores de crescimentos, soro de cabra em estro, soro fetal bovino, albumina sérica bovina e cisteamina e geralmente é realizada em gotas de 50 µL de meio a 38,5°C, em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ por 24-27 h (COGNIÉ & POULIN, 2006). Estudos conduzidos em alguns laboratórios parecem indicar que o fluido folicular pode ser substituído com sucesso por um meio definido contendo 10 ng/mL de fator de crescimento epidermal (EGF) e 100 µM de cisteamina que estimula a síntese da glutatona implicada, após a fecundação, na descondensação da cabeça do espermatozóide e formação do pronúcleo masculino. Rodríguez-Dorta et al. (2007) utilizaram para a espécie caprina o meio TCM 199 suplementado com 10 ng/mL de EGF, acrescido de 100 µM de cisteamina, obtendo sucesso na PIV de embriões nesta espécie. Nessas condições de maturação, após a FIV e sete dias de cultivo, em média 50% dos oócitos caprinos se desenvolvem até blastocisto (Figura 5).

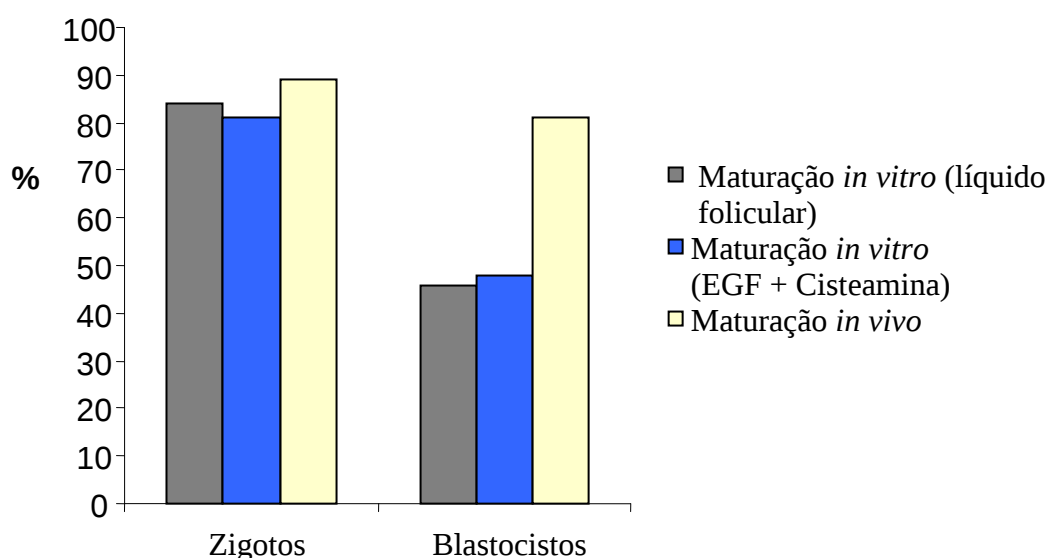


Figura 5: Porcentagem média de zigotos e blastocistos após MIV, em líquido folicular, na presença de EGF com cisteamina, ou *in vivo*. Fonte: Cognié & Baril, 2002.

Além da composição do meio de maturação utilizado, fatores tais como temperatura, atmosfera gasosa e período de incubação apresentam importância

fundamental nos resultados finais do processo (COGNIE & POULIN, 2006). Contudo, há muito ainda a se elucidar sobre as condições ideais para a realização da MIV na espécie caprina, necessitando-se verificar o sistema de cultivo mais adequado para suportar a maturação oocitária.

A FIV dos oócitos maturados é um processo complexo que depende do sucesso entre a interação destes com espermatozóides móveis e capacitados. A FIV pode ser realizada com sêmen fresco ou congelado. A partir do relato de sucesso e da praticidade do uso de sêmen congelado, o mesmo foi incluído na maioria dos protocolos de FIV. Em caprinos o método mais comum utilizado para a seleção de espermatozóides móveis é o gradiente descontínuo de percoll (45/90%) (VELLILA et al., 2005). Os espermatozóides devidamente capacitados e os oócitos previamente maturados são então cultivados em meio de fecundação sob uma atmosfera de 5% de CO₂, a 38,5°C, por 17 h (COGNIE et al., 2003). A etapa de cultivo *in vitro* (CIV) é ainda uma limitante na PIV de embriões caprinos e ovinos. Atualmente, três sistemas de cultivo têm sido utilizados: o co-cultivo com suporte de células somáticas, o cultivo em condições semi-definidas e desenvolvimento *in vivo* no oviduto. O cultivo em condições semi-definidas mais comumente utilizada é o fluido sintético do oviduto (SOF). O SOF pode ainda ser enriquecido com aminoácidos e albumina sérica bovina (BSA) entre outros aditivos. O cultivo embrionário poder ser realizado a 38,5°C em 5% de CO₂, 5% O₂ e 90% N₂ em atmosfera umidificada (COGNIE & POULIN, 2006).

A produção *in vitro*, utilizando oócitos colhidos por laparoscopia a partir de doadoras de interesse, apresenta um potencial para a obtenção de melhores resultados quando comparados àqueles obtidos a partir da produção *in vivo* de embriões. Contudo, a produção *in vitro* de embriões ainda não é tão eficiente devido à interferência de fatores limitantes que afetam os resultados de cada etapa deste processo. Recentes melhorias na maturação oocitária e no desenvolvimento embrionário têm conduzido a um progresso substancial dos sistemas de produção *in vitro* de embriões caprinos (Cognie et al., 2004). Apesar dos avanços na produção embrionária e biotecnologias aplicadas aos pequenos ruminantes, as limitações são grandes, muitas vezes devido ao alto custo de equipamentos utilizados que reflete diretamente no custo benefício destas técnicas e na consequente aplicabilidade. Desta maneira, são necessários estudos que visem a diminuição dos custos com esta a biotécnica, tornando mais viável sua utilização em programas de conservação de recurso genético.

3 JUSTIFICATIVA

A diversidade genética dentro das espécies domésticas está refletida na variedade de tipos e raças que existem e na variabilidade presente dentro de cada uma. Neste sentido, a perda de um único tipo ou raça compromete o acesso a seus genes e combinações genéticas únicas que podem ser úteis no futuro (EGITO et al., 2002). Deste modo, a formação de bancos de germoplasma é uma alternativa de extrema importância para a conservação destes materiais genéticos.

Estes bancos de germoplasma têm na produção de embriões sua principal fonte de material a ser preservado. Tais embriões podem ser obtidos a partir da produção *in vivo* ou *in vitro*.

Em caprinos, a produção *in vitro* de embriões torna-se mais viável a partir de oócitos colhidos de animais vivos (com histórico reprodutivo e nutricional conhecido) e submetidos a protocolos de estimulação ovariana.

Portanto, a fim de maximizar a eficiência da produção de embriões *in vitro* melhorias nos protocolos hormonais são necessárias. A redução do número total de injeções de FSH pode simplificar o procedimento, diminuir o estresse animal bem como reduzir os custos associados a esta biotécnica. Tais melhorias poderão proporcionar uma maior eficiência na produção de oócitos para a implementação de bancos genéticos de raças naturalizadas, sendo a raça Canindé uma peça de extrema importância, tendo em vista seu elevado grau de prolificidade e adaptabilidade ao ambiente semi-árido.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

Tratamentos hormonais simplificados de estimulação ovariana promovem uma resposta de desenvolvimento folicular, em cabras da raça Canindé, semelhante ou superior aos tratamentos tradicionais utilizados.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Desenvolver protocolos de estimulação hormonal em cabras da raça Canindé para produção de oócitos.

5.2 Objetivos Específicos

- Comparar a resposta ovariana e taxa de colheita de oócitos em cabras Canindé submetidas a três diferentes protocolos de estimulação;
- Verificar a qualidade oocitária e posterior maturação *in vitro* em cabras Canindé após diferentes tratamentos de estimulação ovariana.

6 CAPÍTULO 1

Efeito de diferentes tratamentos hormonais de estimulação ovariana sobre a produção oocitária e maturação *in vitro* em caprinos em risco de extinção

(The effect of different hormonal ovarian stimulation treatments on oocyte production and in vitro maturation in endangered goats)

Periódico: Small Ruminant Research (submetido em outubro de 2009).

Fator de Impacto: 1,193

Resumo:

Este estudo analisou o efeito de diferentes tratamentos hormonais de estimulação ovariana sobre a quantidade e a qualidade dos complexos cumulus-oócitos (CCO) recuperados por laparoscopia e sua posterior maturação *in vitro* (MIV) oriundos de cabras Canindé em risco de extinção. Dezoito cabras Canindé cíclicas receberam o tratamento que consistiu de uma esponja intravaginal impregnado com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona por 11 dias, juntamente com uma única injeção de 50 µg de d-cloprostenol no oitavo dia de tratamento, em adição a um dos seguintes regimes de tratamento adicionais: i) múltiplas doses (MD), em um total de 120 mg de NIH-FSH-P1, em cinco injeções em intervalos de 12 h; ii) três doses (TD), em um total de 120 mg de NIH-FSH-P1 em três injeções em intervalos de 24 h, e iii) one-shot (OS), recebendo 70 mg de NIH-FSH-P1 e 200 UI de eCG administrada 36 h antes da remoção da esponja. Foram realizadas três sessões de tratamento hormonal/recuperação de oócitos e em cada sessão, com as cabras sendo alocadas em um grupo diferente para evitar o efeito de repetição do tratamento. Os oócitos foram colhidos por laparoscopia, no mesmo momento da retirada das esponjas, e submetidos à maturação *in vitro* foi observada. Cada cabra apresentou uma média de $15,1 \pm 0,7$ folículos puncionados e $11,3 \pm 0,8$ COCs recuperados, resultando em uma taxa de recuperação total de 74,5%. Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos hormonais para o número médio de folículos visualizados e puncionados. A média do número de COCs obtidos por cabra não diferiram estatisticamente ($P > 0,05$) entre os tratamentos. Estes números foram de $12,4 \pm 1,0$; $10,7 \pm 1,0$ e $10,8 \pm 1,0$ para os tratamentos MD, TD e OS, respectivamente. No entanto, a menor ($P < 0,05$) taxa de recuperação foi verificada no tratamento TD (67,9%) quando comparado ao MD (84,1%) e ao OS (72,4%). Após a

MIV, a menor ($P < 0,05$) taxa de maturação foi observada em oócitos do tratamento TD, (32,1%), enquanto que a taxa para o grupo MD foi de 49,1% e para o grupo OS de 46,2%. Portanto, o tratamento TD foi o menos eficaz tanto para a recuperação de oócitos quanto para as taxas de MIV. Embora o tratamento OS tenha produzido uma resposta similar ao tratamento MD, o tratamento OS tem a vantagem de ser mais prático, podendo ser utilizado em futuros programas de conservação da raça Canindé, empregando a técnica de laparoscopia para a obtenção de oócitos para uso em reprodução por métodos avançados de biotecnologia.

The effect of different hormonal ovarian stimulation treatments on oocyte production and in vitro maturation in endangered goats

S.R.G. Avelar^a, R.R. Moura^a, F.C. Sousa^a, A.F. Pereira^a, K.C. Almeida^a, A.C.A. Teles-Filho^a, L.M. Melo^a, D.I.A. Teixeira^a, G. Baril^b, V.J.F. Freitas^{a*}

^a Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Av. Dedé Brasil 1700, Fortaleza-CE, 60740-903, Brazil

^b Unité de Physiologie de la Reproduction et des Comportements, INRA, Nouzilly, 37380, France

ABSTRACT

This study analyzed the effect of different hormonal ovarian stimulation treatments on the quantity and quality of the cumulus-oocyte complexes (COCs) recovered by laparoscopy and their subsequent in vitro maturation (IVM) in endangered Canindé goats. Eighteen cyclic Canindé goats received treatment consisting of an intravaginal sponge containing 60 mg of medroxyprogesterone acetate for 11 days together with a single injection of 50 µg of d-cloprostenol on the eighth day of treatment, along with the following additional treatment regimens: i) multiple doses (MD), receiving 120 mg of NIH-FSH-P1 in five injections at 12-hour intervals; ii) three doses (TD), receiving 120 mg of NIH-FSH-P1 in three injections at 24-hour intervals; and iii) one-shot (OS), receiving 70 mg of NIH-FSH-P1 and 200 iu of eCG administered 36 hours before removal of the sponge. There were three sessions of hormone treatment/oocyte recovery and in each session the goats were allocated in a different group to avoid the effect of treatment repetition. The oocytes were collected by laparoscopy at the time the sponges were removed, and their in vitro maturation was monitored. Each goat produced an average of 15.1 ± 0.7 punctured follicles and 11.3 ± 0.8 recovered COCs, resulting in a total recovery rate of 74.5%. No significant differences were observed among the hormonal treatments for the average number of visualized and punctured follicles. The average number of COCs obtained per goat did not differ statistically ($P > 0.05$) among the treatments. These numbers were 12.4 ± 1.0 , 10.7 ± 1.0 and 10.8 ± 1.0 for the MD, TD and OS groups, respectively. However, the lowest ($P < 0.05$) recovery rate was

verified in TD group (67.9%) when compared to MD (84.1%) and OS group (72.4%). After the IVM, the lowest ($P < 0.05$) maturation rate was observed in oocytes from the TD group, at 32.1%, while the rate for the MD group was 49.1% and that for the OS group 46.2%. Therefore, the TD treatment was the least effective both for oocyte recovery and IVM rates. Although the OS treatment produced a similar response to the MD treatment, it has the advantage of being more practical and can be used in future programs for preservation of the Canindé breed employing laparoscopic technique to obtain oocytes for use in reproduction through advance biotechnology methods.

Keywords: Goat; Oocyte; Laparoscopy; In vitro maturation.

1. Introduction

Goat herd in Northeast Brazil is of great socioeconomic importance for the region. Among other aspects, this activity stands out for the size of the herds, which number about 8.7 million animals, corresponding to 91% of the national herd (IBGE, 2007). That herd is made up of undefined breed animals along with imported breeds of high milk production (Saanen, Alpine, etc.) and naturalized breeds that are highly adapted to the region's prevailing semi-arid conditions. The naturalized breeds (Canindé and Moxotó) play an important role in subsistence stock raising. But the disordered crossing of these breeds with imported ones has caused a process of degeneration, placing the naturalized breeds at risk of extinction (Mariane and Egito, 2002).

Modern reproductive biological techniques, such as artificial insemination, embryo transfer and in vitro production of embryos (IVP) have great potential to preserve endangered species (Andrabi and Maxwell, 2007; Long, 2008). The IVP method involves three main steps: in vitro maturation (IVM) of primary oocytes collected from antral follicles, fertilization of matured secondary oocytes and culture of probable embryos until blastocyst stage, which can be transferred to recipients or frozen for future use (Cognié et al., 2003). In this process, two factors are of key importance: obtaining high-quality oocytes and their successful IVM (Cognié et al., 2003; Zhou et al., 2008).

To obtain high-quality oocytes, laparoscopic oocyte recovery (LOR) has been widely used on goats (Baldassarre et al., 2003; Cox and Alfaro, 2007; Gibbons et al.,

2007). LOR is minimally invasive, permitting the females to recover quickly after oocyte collection. Additionally, it poses low risks for development of adherence, enabling repeated collections from the same animal in a short time frame (Pierson et al., 2004).

Hormone treatment for ovarian stimulation has been used prior to LOR to increase the number of puncturable follicles (Baldassarre et al., 2003; Pierson et al., 2004). Without this treatment, the number of follicles available and the subsequent number of cumulus-oocyte complexes (COCs) recovered is substantially reduced (Aguilar et al., 2002). However, in goats the best ovarian stimulation treatment before LOR is still not yet defined. Furthermore, for Brazilian naturalized goat breeds there is no information in the literature on the use of hormonal treatments for ovarian stimulation. Therefore, the aim of this study was to compare three such treatments by observing their effect on the number of follicles available for puncture, the number and quality of COCs recovered and the subsequent IVM rate of oocytes in naturalized goats of the Canindé breed.

2. Materials and methods

2.1. Location and experimental animals

The experiment was conducted in the Laboratory of Physiology and Control of Reproduction (LFCR), located in Fortaleza-CE, Brazil, at 3°47'38"S and 38°33'29"W. A total of 18 cyclic Canindé goats (mean live weight $\pm$ SEM, 32.9 $\pm$ 0.5 kg) were selected as oocyte donors. All animals were maintained in a semi-intensive system, receiving Tifton (*Cynodon dactylon*) hay in pens and having daily access for six hours to pasture of this grass. In addition, the animals were supplemented with commercial concentrate (minimum of 20% crude protein) and had free access to water and mineral salt. All procedures were performed in accordance with the guidelines of animal care (Van Zutphen and Balls, 1997).

2.2. Chemicals, reagents and media

All chemicals and media used were from Sigma-Aldrich (USA) unless otherwise stated. When necessary, for all media, the pH and osmolarity were adjusted to 7.2–7.4 and 280–300 mOsm/kg, respectively.

2.3. Hormonal treatments

All oocyte donors received intravaginal sponges containing 60 mg medroxyprogesterone acetate (Progespon, Syntex, Argentina) for 11 days combined with an intramuscular injection of 50 µg d-cloprostenol (Ciosin, Coopers, Brazil) at day 8 of progestagen treatment. For ovarian stimulation, goats were distributed in one of the following experimental groups: i) multi-doses (MD) with 120 mg NIH-FSH-P1 (Folltropin-V, Vetrepahrm, Canada) distributed in five intramuscular injections (30/30; 20/20 and 20 mg) at 12 h intervals; ii) three-doses (TD) with 120 mg NIH-FSH-P1 administered in three intramuscular injections (60; 40 and 20 mg) at 24 h intervals; iii) one-shot (OS) with 70 mg NIH-FSH-P1 plus 200 iu eCG (Novormon, Syntex, Argentina) administered intramuscularly 36 h before sponge removal. The pFSH injections, in MD and TD groups, started in 8th day of progestagen treatment. The pFSH doses were established based on studies carried out by our group of superovulation in goats of naturalized breeds (Souza et al., 2008; Moura et al., 2009), while the dose of the OS treatment was based on previous studies with goats by other researchers (Baldassarre et al., 2003). There were three successive hormonal treatment/LOR sessions at intervals of 14 days. For each session the goats were allocated in a different experimental group to avoid the effect of treatment repetition.

2.4. Anesthesia and LOR

The females were deprived of food for 36 h and water 24 h prior to laparoscopy. Animal suffering was avoided by proceeding under general anesthesia with 0.5 mg/10 kg of xylazine hydrochloride (Coopazine, Coopers, Brazil) and 25 mg/10 kg of ketamine hydrochloride (Ketamina Agener, União Química, Brazil). Furthermore, local anesthesia was applied in the surgical field (Anestésico L Pearson, Eurofarma, Brazil). The LOR procedure was performed just after the sponge removal and by using a 5-mm laparoscope (Karl Storz Endoscopes GmbH & Co., Germany) attached to a video system. The laparoscope was inserted into the abdominal cavity through a trocar, cranial to the udder and to the left side of the midline. An atraumatic grasper was inserted into the right side of the abdomen. The ovary was held by the grasper and ovarian follicles were individually punctured and aspirated by 22 gauge needle (Watanabe, Brazil), which was connected to an aspiration and flushing system (Biosystem, Biocom, Brazil).

The vacuum pressure was set at 30 mmHg, generating a fluid flow of 7–7.5 mL/min. All the follicles with a size higher than 2 mm were aspirated. The collection medium was TCM 199 supplemented with HEPES (10 mM), heparin (20 iu/mL) and gentamicin (40 µg/mL). Once LOR was completed, each ovary was gently flushed, with heparinized saline solution (25 ui/mL) at 37°C for prevention of possible adhesions. Finally, the trocar orifices were treated with a local antibiotic cicatrizing solution (Terra-cortril spray, Pfizer, Brazil).

2.5. Assessment of quality COCs and IVM

Assessment of quality of COCs was based on visual criteria with the use of a stereomicroscope (SMZ 800, Nikon, Japan), according to different grades (I to IV) and based in our experience with Brazilian naturalized breeds (Table 1). Grades I and II were classified as good quality COCs for IVM. The selected COCs were washed four times in IVM medium, which consisted of TCM199 supplemented with cysteamine (100 µM), Epidermal Growth Factor (EGF, 10 ng/mL) and gentamicin sulfate (40 µg/mL). Good quality COCs were incubated in 500 µL of IVM medium at 38.5°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ in air for 24 h. After the IVM period, the COCs were visualized under an inverted microscope (TE2000, Nikon, Japan) and the cumulus cells were carefully removed with successive pipetting. Denuded oocytes were assessed for maturation. Oocytes with a visible first polar body were considered as mature and meiotically competent.

2.6. Statistical analyses

Statistical treatment of data concerning differences in mean number of visualized/punctured follicles and recovered COCs were analyzed by one-way ANOVA. The recovery and IVM rates were compared with chi-square test. Results were expressed as mean ± SEM and the statistical significance was accepted from $p < 0.05$. All analysis was performed using The Statistica Advanced DX 7.0 software (Statsoft, USA).

Table 1

Criteria for grading cumulus-oocyte complexes (COCs) recovered from Canindé goats.

Characteristics	Grade
Multilayered compact cumulus and finely granulated oocyte cytoplasm	I
One to three layers of cumulus cells and finely granulated oocyte cytoplasm	II
Incomplete or no cellular investment or heterogeneous oocyte cytoplasm	III
Oocyte with abnormal shape and heterogeneous oocyte cytoplasm or apoptotic oocytes in jelly-like cumulus-corona cells investment	IV

3. Results

Just after the first LOR, one of the goats in the MD group died. Therefore, in the subsequent sessions the number of experimental animals declined to five in the TD group (second session) and in the OS group (third session). At the end of the three hormonal treatment/LOR sessions a total of 881 follicles had been visualized and 772 of them punctured (those longer than 2 mm). An average of 15.1 ± 0.7 punctured follicles and 11.3 ± 0.8 COCs were obtained from each donor goat, resulting in an overall recovery rate of 74.5%.

Table 2 contains a summary of the results of ovarian stimulation. There were no significant differences observed among the hormonal treatments tested with respect to the mean number of follicles visualized and punctured, in each ovary and in the total. The mean number of COCs recovered per donor did not statistically differ ($P > 0.05$) among treatments and was 12.4 ± 1.0 , 10.7 ± 1.0 and 10.8 ± 1.0 for the MD, TD and OS groups, respectively. However, the recovery rate from the TD group was lower (67.9%) than for the MD group (84.1%) and OS group (72.4%) ($P < 0.05$).

Table 2

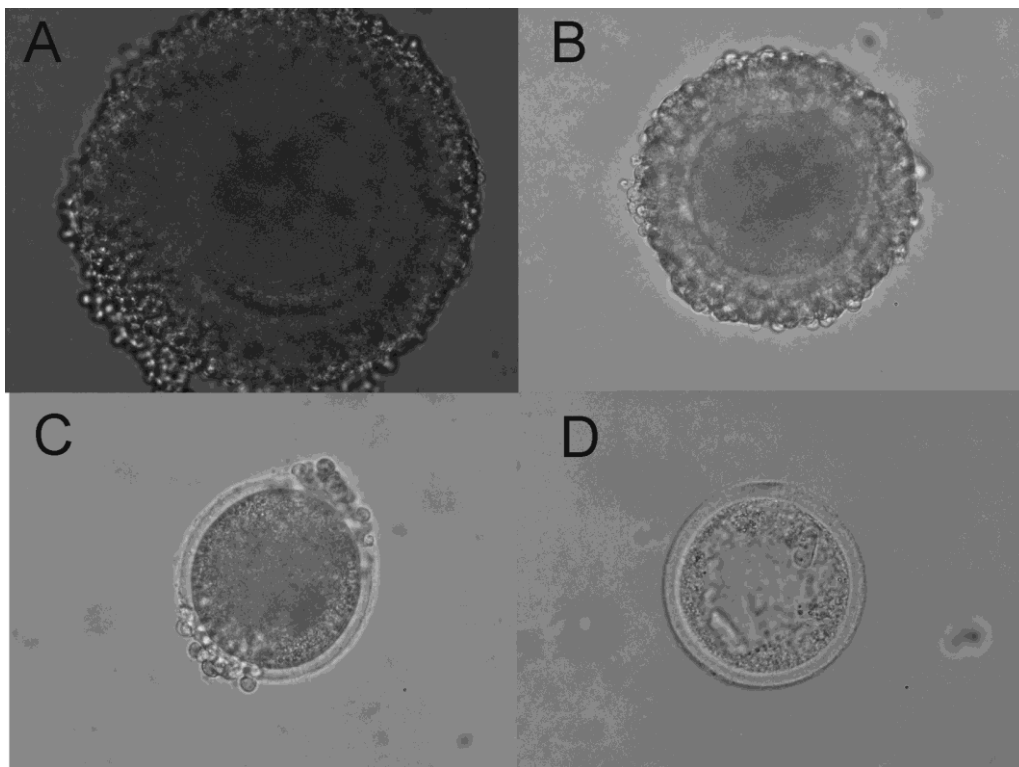
Effect of different hormonal treatments for ovarian stimulation on the number of visualized and punctured follicles (mean $\pm$ SEM) and cumulus-oocyte complexes (COCs) recovery rate in Canindé goats.

Hormonal treatment	n	Visualized follicles in			Punctured follicles in			Recovery rate (%)
		right ovary	left ovary	total	right ovary	left ovary	total	
MD	18	8.5 $\pm$ 0.8 ^a	8.3 $\pm$ 0.9 ^a	16.8 $\pm$ 1.5 ^a	7.1 $\pm$ 0.7 ^a	7.6 $\pm$ 0.8 ^a	14.8 $\pm$ 1.3 ^a	84.1 ^a
TD	17	8.5 $\pm$ 0.8 ^a	8.5 $\pm$ 0.9 ^a	17.1 $\pm$ 1.5 ^a	8.1 $\pm$ 0.7 ^a	7.6 $\pm$ 0.8 ^a	15.7 $\pm$ 1.3 ^a	67.9 ^b
OS	17	7.4 $\pm$ 0.8 ^a	9.6 $\pm$ 0.9 ^a	17.0 $\pm$ 1.5 ^a	6.6 $\pm$ 0.7 ^a	8.3 $\pm$ 0.8 ^a	14.9 $\pm$ 1.3 ^a	72.4 ^a

a, b: values within the same column with different supercripts differ significantly ($p < 0.05$).

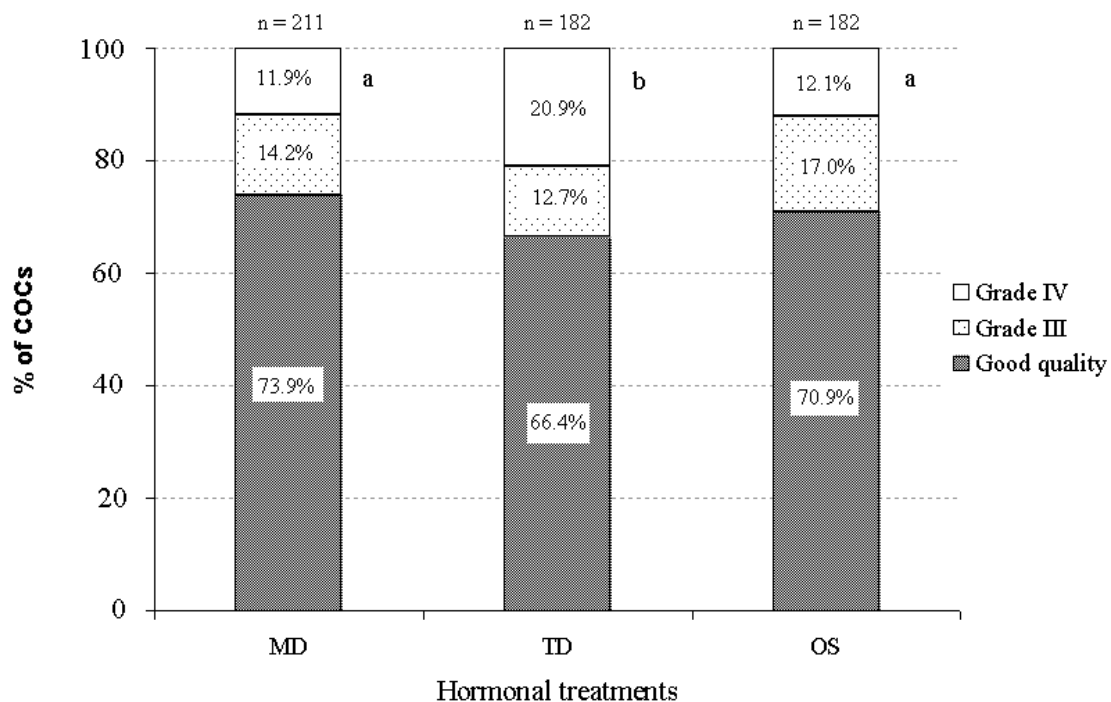
After oocyte recovery and morphological evaluation of the COCs (Fig. 1), they were classified into different grades (I to IV). There was no statistical difference ($P > 0.05$) among the ovarian stimulation treatments except for the grade IV COCs, which were more frequently observed ($P < 0.05$) in the TD group (Fig. 2). For the viable COCs (grade I and II) there was no statistical difference among the treatments. The percentages of oocytes classified as viable and thus used in the IVM step were 73.0%, 66.5% and 70.9% for the MD, TD and OS groups, respectively.

Fig. 1. Typical cumulus-oocyte complexes (COCs) recovered from Canindé goats receiving different hormonal treatments for ovarian stimulation. COCs are classified in grade I (A), II (B), III (C) and IV (D).



Approximately half of the COCs of each group were removed for use in another experiment in the laboratory. This was done respecting the proportion of the different quality grades into the three groups. Therefore, the number of COCs of grade I and II subjected to IVM from the each group was 108 (MD), 84 (TD) and 91 (OS). After the IVM, there were statistical differences ($P < 0.05$) for the maturation rate in the different treatments. The lowest rate was in oocytes from the TD group (32.1%), compared to the maturation rates of the MD (49.1%) and OS (46.2%) groups.

Fig. 2. Distribution of various quality grades of cumulus-oocyte complexes (COCs) recovered from Canindé goats receiving different hormonal treatments for ovarian stimulation. Good quality oocytes (grades I and II). The numbers above the columns indicate the amount of COCs recovered in each treatment. Letters (a, b) denote that differences between treatments are significant in grade IV class ($P < 0.05$).



4. Discussion

LOR followed by IVM and in vitro fertilization (IVF) offers the possibility of producing offspring from genetically important individuals where traditional multiple ovulation and embryo transfer (MOET) procedures are not applicable (prepubertal,

gestating, puerperal animals, animals with deformations and adhesions). In small ruminants, previous studies have shown that the number of oocytes recovered in one session can be increased when donor females are hormonally stimulated (Morton et al., 2005). However, these hormone treatments are still not well established in goats, and we found no information in the literature for naturalized breeds in Brazil. In the present study we demonstrated that hormonal ovarian stimulation treatments followed by LOR and IVM of the oocytes recovered can be used to preserve valuable genetic material from naturalized goats. To the best of our knowledge, this is the first paper to report the reduction-to-practice of the application of the LOR platform to preserve endangered goat breeds.

The yields obtained in the present study using LOR after administration of the hormonal gonadotrophin treatments were similar to those previously described using single or multiple dose regimens. These studies, as in our study, have reported outputs from 12 to 20 follicles and 8 to 15 COCs per donor (Pierson et al., 2004; Gibbons et al., 2007; Abdullah et al., 2008).

In studies of the use of LOR in goats, various authors have described an oocyte recovery rate between 25 and 70% (Graff et al., 2000; Gibbons et al., 2007; Abdullah et al., 2008). Our results are more similar to those obtained by Baldassarre et al. (2003), who reported rates above 80%. LOR is a technique that has the advantage of being repeatable when used by different research groups (Gibbons et al., 2007). However, its success can be strongly influenced by the operator's experience (Morton et al., 2005). In the present study, the lowest recovery rate occurred in the TD group. Although we did not measure the size of the follicles punctured, we estimated that there was a higher frequency of small follicles (2 mm) in the goats receiving the TD treatment. Therefore, the presence of small follicles may have impaired correct puncture and thus reduced the subsequent recovery rate. The quality of the COCs (greater frequency of grade IV) was also lowest in the TD group. The treatment regimen of the TD group was established based on earlier experiments by our group with naturalized goats (unpublished results). However, the long interval (24 h) between injections of FSH apparently impaired the follicular development and subsequent morphological quality of the COCs punctured from these follicles. In cattle it is well established that large follicles contain oocytes with greater potential to develop than small ones (Lonergan et al., 1994). In goats, Cognié and Baril (2002) reported that oocytes aspirated from follicles greater than 5

mm are more likely to develop in vitro into blastocysts than are those from follicles of 2-3 mm, with maturation rates of 60% and 35%, respectively.

The developmental potential of an embryo depends on the developmental potential of the oocyte from which it originates. The process of oocyte maturation is critical for the efficient application of biotechnologies such as IVP and mammalian cloning. However, the overall efficiency of IVM remains low because oocytes matured in vitro have lower developmental competence than oocytes matured in vivo (reviewed by Lonergan et al., 2003).

The maturation rates obtained in this study for the two best treatments (MD and OS) were similar to those reported by Graff et al. (2000), but not as good as the most recent reports in the literature for goats (Baldassarre et al., 2007; Abdullah et al., 2008; Leoni et al., 2009). Therefore, additional studies are being undertaken in our laboratory to improve the IVM rates and subsequent in vitro production of goat embryos.

It is already reported that FSH requires multiple doses due to its shorter half-life, when compared to eCG (Monniaux et al., 1983). Thus, in despite of the use of the same amount of FSH in both treatments (MD and TD), we hypothesized that the intervals between the injections of FSH were too long in the TD group. In this case, it is possible that the inadequate gonadotrophin stimulation could decrease the oocyte meiotic competence in recovered COCs.

Although the performance of MD and OS treatments was similar, they have some practical differences. The eCG is inexpensive and requires less veterinary input because it requires a single injection. FSH is much more expensive and requires multiple injections.

In conclusion, the TD treatment was the least effective, both from a standpoint of oocyte recovery and IVM rate. While the MD and OS treatments performed similarly, the OS treatment is more practical and can be used in future programs to preserve the Canindé breed using LOR to obtain oocytes for use in advanced reproduction techniques. However, further experiments are necessary to verify the both IVF and blastocyst development rates of matured oocytes obtained from these treatments.

Acknowledgments

The authors are grateful to the staff of LFCR for assistance during oocyte recovery and animal care. Suely R.G. Avelar is a recipient from a grant of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil) and Vicente J.F. Freitas is recipient of CNPq research scholarships.

References

- Abdullah, R.B., Liow, S.L., Rahman, A.N., Chan, W.K., Wan-Khadajah, 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.
- Aguilar, B., Roche, A., Oliveira, J., Folch, J., Alabart, J.L., 2002. Oocyte retrieval after repeated ovum pick-up in unstimulated sheep and goat. In: Proc. 18th Meet. Assoc. Europ. Transfert Emb., Rudolc, pp. 130.
- Andrabi, S.M.H., Maxwell, W.M.C., 2007. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. *Anim. Reprod. Sci.* 99:223–243.
- 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., 2003. Production of transgenic goats by pronuclear microinjection of in vitro produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy. *Theriogenology* 59:831–839.
- Baldassarre, H., Rao, K.M., Neveu, N., Brochu, E., Begin, I., Behboodi, E., Hockley, D.K., 2007. Laparoscopic ovum pick-up followed by in vitro embryo production for the reproductive rescue of aged goats of high genetic value. *Reprod. Fertil. Dev.* 19:612–616.
- Cognié, Y., Baril, G., 2002. Le point sur la production et le transfert d'embryons obtenus in vivo et in vitro chez la brebis et la chèvre. *INRA Prod. Anim.* 15:199–207.
- Cognié, Y., Baril, G., Poulin, N., Mermillod, P., 2003. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology* 59:171–188.

- Cox, J.F., Alfaro, V., 2007. In vitro fertilization and development of OPU derived goat and sheep oocytes. *Reprod. Dom. Anim.* 42:83–87.
- Gibbons, A., Bonnet, F.P., Cueto, M.I., Catala, M., Salamone, D.F., Gonzales-Bulnes, A. 2007. Procedure for maximizing oocyte harvest for in vitro embryo production in small ruminants. *Reprod. Dom. Anim.* 42:423–426.
- Graff, K.J., Meintjes, M., Han, Y., Reggio, B.C., Denniston, R.S., Gavin, W.G., Ziomek, C., Godke, R.A., 2000. Comparing follicle stimulating hormone from two commercial sources for oocyte production from out-of-season dairy goats. *J. Dairy Sci.* 83:484–487.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da pecuária municipal 2007. <<http://www.ibge.gov.br>>.
- Leoni, G.G., Succu, S., Satta, V., Paolo, M., Bogliolo, L., Bebbere, D., Spezzigu, A., Madeddu, M., Berlinguer, F., Ledda, S., Naitana, S., 2009. In vitro production and cryotolerance of prepubertal and adult goat blastocysts obtained from oocytes collected by laparoscopic oocyte-pick-up (LOPU) after FSH treatment. *Reprod. Fertil. Dev.* 21:901–908.
- Lonergan, P., Monaghan, P., Rizos, D., Boland, M.P., Gordon, I., 1994. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization and culture in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 37:48–53.
- Lonergan, P., Rizos, D., Gutierrez-Adan, A., Fair, T., Boland, M.P., 2003. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod. Domest. Anim.* 38:259–267.
- Long, J.A., 2008. Reproductive biotechnology and gene mapping: tools for conserving rare breeds of livestock. *Reprod. Domest. Anim.* 43:83–88.
- Mariante, A.S., Egito, A.A., 2002. Animal genetic resources in Brazil: result of five centuries of natural selection. *Theriogenology* 57, 223–235.
- Monniaux, D., Chupin, D., Saumande, J., 1983. Superovulatory response of cattle. *Theriogenology* 19:55–81.
- Morton, K.M., de Graaf, S.P., Campbell, A., Tomkins, L.M., Maxwell, W.M., Evans, G., 2005. Repeat ovum pick-up and in vitro embryo production from adult ewes with and without FSH treatment. *Reprod. Domest. Anim.* 40:422–428.
- Moura, R.R., Lopes-Junior, E.S., Teixeira, D.I.A., Serova, I.A., Andreeva, L.E., Melo, L.M., Freitas, V.J.F., 2009. Pronuclear embryo yield in Canindé and Saanen goats

for DNA microinjection. *Reprod. Domest. Anim.* DOI: 10.1111/j.1439-0531.2009.01530.x

- Pierson, J., Wang, B., Neveu, N., Sneek, L., Côté, F., Karatzas, C.N., Baldassarre, H., 2004. Effects of repetition, interval between treatments and season on the results from laparoscopic ovum pick-up in goats. *Reprod. Fertil. Dev.* 16:795–799.
- Souza, A.L., Galeati, G., Almeida, A.P., Arruda, I.J., Govoni, N., Freitas, V.J., Rondina, D., 2008. Embryo production in superovulated goats treated with insulin before or after mating or by continuous propylene glycol supplementation. *Reprod. Domest. Anim.* 43, 218–221.
- Van Zutphen, L.F.M., Balls, M., 1997. *Animal Alternatives, Welfare, and Ethics*, Elsevier., Amsterdam, 1260 pp.
- Zhou, P., Wu, Y.G., Li, Q., Lan, G.C., Wang, G., Gao, D., Tan, J.H., 2008. The interactions between cysteamine, cystine and cumulus cells increase the intracellular glutathione level and developmental capacity of goat cumulus-denuded oocytes. *Reproduction* 135:605–611.

7 CONCLUSÕES

Em conclusão, os três diferentes tratamentos hormonais foram eficientes na produção de folículos puncionáveis para a COL.

O tratamento três doses (TD) foi o menos eficiente no que se refere à taxa de colheita oocitária e à taxa de MIV dos oócitos.

Finalmente, os tratamentos múltiplas doses (MD) e one-shot (OS) mostraram resultados semelhantes para todos os parâmetros avaliados, sendo que, por razões práticas o tratamento OS pode ser indicado para uso na estimulação ovariana de cabras da raça Canindé com o objetivo de uso na COL associada à MIV.

8 PERSPECTIVAS

Após a verificação da produção quanti-qualitativa de oócitos, bem como a taxa de MIV dos mesmos, outros experimentos são necessários para verificar as etapas posteriores de produção *in vitro* de embriões, ou seja, a FIV e posterior CIV dos possíveis embriões.

Após o domínio destas etapas, ficará mais viável a formação de BGA de raças caprinas naturalizadas contribuindo para evitar o desaparecimento das mesmas.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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. 765-77, 2008.

ACOSC. Associação dos criadores de ovinos a caprinos do sertão do Cabugi. Disponível em <<http://www.acosc.org.br/acosc/acosc/acosc.jsp>>. Acesso em 10 de setembro de 2009.

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

ANDRABI, S. M. H.; MAXWELL, W. M. C. A review on reproductive biotechnologies for conservation of endangered mammalian species. *Animal Reproduction Science*, v. 99, p. 223-243, 2007.

ANGUITA, B.; JIMENNEZ-MACEDO, A. R.; IZQUIERDO, D.; MOGAS, T.; PARAMIO, M. T. Effect of oocyte diameter on meiotic competence, embryo development, p34 (CDC2) expression and MPF activity in prepubertal goat oocytes. *Theriogenology*, v. 67, p. 526-536, 2007.

ASCCOPER. Associação dos Criadores de Caprinos e Ovinos de Petrolina e Região. Disponível em: <www.ascoper.com.br/exibe.jsp?id=104&tipo=Racas>. Acesso em 10 de setembro de 2009.

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

BALDASSARRE, H.; WANG, B.; KAFIDI, N.; GAUTHIER, M.; NEVEU, N.; LAPOINTE, J.; SNEEK, L.; LEDUC, M.; DUGUAY, F.; ZHOU, J. F., KEEFER, C.; LAZARIS, A.; KARATZAS, C. N. Production of transgenic goats by pronuclear microinjection of *in vitro* produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy. *Theriogenology*, v. 59, p. 831-839, 2003.

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

BALDASSARRE, H.; WANG, B.; GAUTHIER, M.; NEVEU, N.; LAZARIS, A.; KARATZAS, C. N. Effect of GnRH injection timing in the production of pronuclear-stage zygotes used for DNA microinjection. *Zygote*, v. 12, p. 257-261, 2004.

BALDASSARRE, H.; RAO, K. M.; NEVEU, N.; BROCHU, E.; BEGIN, I.; BEHBOODI, E.; HOCKLEY, D. K. Laparoscopic *ovum pick-up* followed by *in vitro* embryo production for the reproductive rescue of aged goats of high genetic value. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 19, p. 612-616, 2007.

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

CASTRO, A. *A Cabra*. 3ed., Rio de Janeiro, Freitas Bastos. 372p., 1984.

COGNIÉ, Y. State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*, v. 51, p. 109-116, 1999.

COGNIÉ, Y.; BARIL, G. Le point sur la production et le transfert d'embryons obtenus *in vivo* e *in vitro* chez la bebris e la chèvre. *INRA Productions Animales*, v. 15, p. 199-207, 2002.

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

COGNIÉ, Y.; POULIN, N.; LOCATELLI, Y.; MERMILLOD, P. State-of-the-art production, conservation and transfer of *in-vitro*-produced embryos in small ruminants, *Reproduction, Fertility and Development*, v. 16, p. 437-445, 2004.

COGNIÉ, Y.; POULIN, N. Produção *in vitro* de oócitos maduros e embriões em caprinos e ovinos. In: Freitas, V. J. F. *Biotecnologia da reprodução em pequenos ruminantes: produção de embriões por transferência nuclear (clonagem)*. 1ed., Fortaleza: Multicor, cap. 4, p. 46-60, 2006.

COMIZZOLLI, P.; MERMILLOD, P.; MAUGET, R. Reproductive biotechnologies endangered mammalian species. *Reproduction Nutrition Development*, v. 40, p. 493-504, 2000.

COX, J. F.; ALFARO, V. *In vitro* fertilization and development of OPU derived goat and sheep oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 42, p. 83-87, 2007.

CROZET, N.; AHMED-ALI, M.; DUBOS, M. P.; Developmental competence of goat oocyte from follicle of different size categories following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 103, p. 293-298, 1995.

D'ALESSANDRO, A. G.; MARTEMUCCI, G.; COLONNA, M. A.; BORGHESE, A.; TERZANO, M. G.; BELLITTI, A. Superovulation in ewes by a single injection of pFSH dissolved in polyvinylpyrrolidone (PVP): effects of PVP molecular weight, concentration and schedule of treatment. *Animal Reproduction Science*, v. 65, p. 255-264, 2001.

EGITO, A. A.; MARIANTE A. S.; ALBUQUERQUE M.S.M. Programa brasileiro de conservação de recursos genéticos animais. *Arquivos de Zootecnia*, v. 51, p. 39-52, 2002.

FREITAS, V. J. F.; BARIL, G.; SAUMANDE, J. Estrus synchronization in dairy goats: use of fluorogestone acetate vaginal sponges or norgestomet ear implants. *Animal Reproduction Science*, v. 46, p. 237-244, 1997.

FREITAS, V. J. F.; SIMPLICIO, A. A. Transferência de embriões em caprinos. In: GONSALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. 1ed., São Paulo: Varela, cap. 9, p. 179-194, 2001.

FREITAS, V. J. F. *Biotechnologia da reprodução em pequenos ruminantes: produção de embriões por transferência nuclear (clonagem)*, v. 1, p. 30-45, 2006.

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.

GONZALEZ-BULNES, A.; SANTIAGO-MORENO, J.; COCERO, M. J.; SOUZA, C. J. H.; GROOME, N. P.; GARCIA-GARCIA, R. M. Measurement of inhibinA and follicular status predict the response of ewes to superovulatory FSH treatments. *Theriogenology*, v. 57, p. 1263-72, 2002.

GONZALES, I. M.; SOARES, A. T.; GOMES, M. G. G.; SOUSA, W. H. *Reprodução Assistida em Caprinos*. Paraíba, p. 11-42, 2002.

GRAFF, K. J.; MEINTJES, M.; HAN, Y.; REGGIO, B. C.; DENNISTON, R. S.; GAVIN, W. G.; ZIOMEK, C.; GODKE, R. A. Comparing follicle stimulating hormone from two commercial sources for oocyte production from out-of-season dairy goats. *Journal of Dairy Science*, v. 83, p. 484-487, 2000.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Produção da pecuária municipal 2007*. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 05 de setembro 2009.

INFORME EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia. *Informativo Nacional sobre a situação dos Recursos Genéticos Animais do Brasil*. MARIANTE, S. S.; MCMANUS, C.; MENDONÇA, J. F. 1ed., Brasília-DF, 92p., 2003.

KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L.; OPIELA, J.; RYNSKA, B. Effects of oocyte quality, semen donor and embryo co-culture system on the efficiency of blastocyst production in goats. *Theriogenology*, v. 68, p. 736-744, 2007.

KEEFER, C. L.; BALDASSARRE, H.; KEYSTON, R.; WANG, B.; BHATIA, B.; BILODEAU, A. S.; ZHOU, J. F.; LEDUC, M.; DOWNEY, B. R.; LAZARIS, A.; KARATZAS, C. N. Generation of dwarf goat (*Capra hircus*) clones following nuclear transfer with transfected and nontransfected fetal fibroblasts and vitro-matured oocytes. *Biology of Reproduction*, v. 64, p. 849-856, 2001.

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.

KNIGHTS, M.; BAPTISTE, Q. S.; DIXON, A. B.; PATE, J. L.; MARSH, D. J.; INSKEEP, E. K.; L'EWIS, P. E. Effects of dosage of FSH, vehicle and time of treatment on ovulation rate and prolificacy in ewes during the anestrous season. *Small Ruminant Research*, v. 50, p. 1-9, 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.; TEIXEIRA, D. I. A.; PAULA, N. R. O.; MEDEIROS, A. A.; RONDINA, D.; FREITAS, V. J. F. Transcervical embryo recovery in Saanen goats. *South African Society for Animal Science*, v. 33, p. 127-131, 2003.

LOCATELLI, Y.; VALLET, J. C.; HUYGHE, F. P.; COGNIÉ, Y.; LEGENDRE, X.; MERMILLOD, P. Laparoscopic ovum pick-up and in vitro production of sika deer

embryos: Effect of season and culture conditions. *Theriogenology*, v. 66, p. 1334-1342, 2006.

LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOS, D.; BOLAND, M. P.; GORDON, I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization and culture in vitro. *Molecular Reproduction and Development*, v. 37, p. 48-53, 1994.

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

LONG, J. A. Reproductive biotechnology and gene mapping: tools for conserving rare breeds of livestock. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 43, p. 83-88, 2008.

LOPES JÚNIOR, E. S.; MAIA, E. L. M. M.; PAULA, N. R. O.; TEIXEIRA, D. I. A.; VILLARROEL, A. B. S.; RONDINA, D.; FREITAS, V. J. F. Effect of age of donor on embryo production in Morada Nova (white variety) ewes participating in a conservation programme in Brazil. *Tropical Animal Health Production*, v. 38, p. 555-561, 2006.

MARIANTE, A. S.; EGITO, A. A.; ALBUQUERQUE, M. S. M. Conservação dos recursos Genéticos Animais Brasileiros. In: *III Simpósio de Recursos Genéticos para a América Latina e Caribe – SIRGEALC*, Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná, p. 127-131, 2001.

MARIANTE, A. S.; EGITO, A. A. Animal genetic resources in Brazil: result of five centuries of natural selection. *Theriogenology*, v. 57, p. 223-235, 2002.

MENEZES, M. P. C.; MARTINEZ, A. M. M.; RIBEIRO, M. N.; PIMENTA FILHO, E. C.; BERMEJO, J. V. D. Caracterização genética de raças caprinas nativas brasileiras utilizando-se 27 marcadores microssatélites. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 35, n. 4, p. 1336-1341, 2006.

MONNIAUX, D.; CHUPIN, D.; SAUMANDE, J. Superovulatory response of cattle. *Theriogenology*, v. 19, p. 55-81, 1983.

MOOR, R. M.; OSBORN, J. C.; CROSBY, I. M. Gonadotrophin-induced abnormalities in sheep oocytes after superovulation. *Journal Reproduction and Fertility*, v. 74, p. 167-172, 1985.

MOTLOMELO, K. C.; GREYLING, J. P. C.; SCHWALBACH, L. M. J. Synchronisation of oestrous in goats: the use of different progestagen treatments. *Small Ruminant Research*, v. 45, p. 45-49, 2002.

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.

MOURA, R. R.; LOPES-JUNIOR, E. S.; TEIXEIRA, D. I. A.; SEROVA, I. A.; ANDREEVA, L. E.; MELO, L. M.; FREITAS, V. J. F. Pronuclear embryo yield in Canindé and Saanen goats for DNA microinjection. *Reproduction in Domestic Animals*, DOI: 10.1111/j.1439-0531.2009.01530.x, 2009.

PEREIRA, A. B.; ALMEIDA, N. F. *Genética, Biotecnologia e Agricultura*. 1ed., Porto, Portugal, 96p., 2005.

PIERSON, J.; WANG, B.; NEVEU, N.; SNEEK, L.; CÔTÉ, F.; KARATZAS, C. N., 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, 2004.

PUKAZHENTHI, B.; COMIZZOLI, P.; TRAVIS, A. J.; WILDT, D. E. Applications of emerging technologies to the study of conservation of threatened and endangered species. *Reproduction Fertility and Development*, v. 18, p. 77-90, 2006.

PUKAZHENTHI, B.; WILDT, D. E. Which reproductive technologies are most relevant to studying, managing and conserving wildlife? *Reproduction Fertility and Development*, v. 16, p. 33-46, 2004.

POPE, C. E. Embryo technology in conservation efforts for endangered felids, *Theriogenology*, v. 53, p. 163-174, 2000.

PTAK, G.; CLINTON, M.; BARBONI, B.; MUZZEDDU, M.; CAPPAL, P.; TISCHNER, M.; LOI, P. Preservation of the wild European mouflon: the first example of genetic management using a complete program of reproductive biotechnologies. *Biology Reproduction*, v. 66, p. 796-801, 2002.

RIBEIRO, M. N. Estado de conservação de caprinos naturalizados no Brasil. 1999. Disponível em: < <http://www.capritec.com.br/art07.htm> > Acesso em 18 de setembro de 2009.

RODRÍGUEZ, C.; ANEL, L.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; BOIXO, J. C.; CHAMORRO, C. A.; Paz, P. Ovum pick-up in sheep: a comparison between different aspiration devices for optimal oocyte retrieval. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 41, p. 106-113, 2006.

RODRÍGUEZ-DORTA, N.; COGNIE, Y.; GONZÁLEZ, F.; POULIN, N.; GUIGNOT, F.; TOUZÉ, J. L.; BARIL, G.; CABRERA, F.; ÁLAMO, D.; BATISTA, M.; GRACIA, A.; MERMILLOD, P. Effect of co-culture with oviduct epithelial cells on viability after transfer of vitrified in vitro produced goat embryos. *Theriogenology*, v. 68, p. 908-913, 2007.

ROLDAN, E. R. S.; GOMENDIO, M.; GARDE, J. J.; ESPESO, G.; LEDDA, S.; BERLINGUER, F.; OLMO, A.; SOLER, A. J.; RREGUI, L. A.; CRESPO, C.; GONZALEZ, R. Inbreeding and reproduction in endangered ungulates: preservation of genetic variation through the organization of Genetic Resource Banks. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 41, p. 82-92, 2006.

RUMPF, R.; BEM, A. R.; PEIXER, M. A. S.; DODE, M. A. N.; SOUSA, R. V.; SILVA A. E. D. F.; ZANENGA, C.; PEREIRA, D. C.; PIVATO, I.; MELO, L. F.; SILVEIRA, L. L.; SARTORI, R. *Manual de Transferência e Micromanipulação de Embriões nas Espécies Bovina e Equina*: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, p. 256, 2006.

SANTANA, C. J.; QUERINO, E. C. S.; COSTA, F. J. T.; MELO JÚNIOR, U. C. *Manual de Caprinocultura*. Agronegócios SEBRAE/PE 43p., 2000.

SHIRAZI, A.; SADEGHI, N. The effect of ovine oocyte diameter on nuclear maturation. *Small Ruminant Research*, v. 69, p. 103-107, 2007.

SOUZA, A. L.; GALEATI, G.; ALMEIDA, A. P.; ARRUDA, I. J.; GOVONI, N.; FREITAS, V. J.; RONDINA, D. Embryo production in superovulated goats treated with insulin before or after mating or by continuous propylene glycol supplementation. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 43, p. 218-221, 2008.

TERVIT, H. R. Laparoscopy/laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding. *Animal Reproduction Science*, v. 42, p. 227-238, 1996.

TIBARY, A.; ANOUASSI, A.; KHATIR, H. Update on reproductive biotechnologies in small ruminants and camelids. *Theriogenology*, v. 64, p. 618-638, 2005.

VAN ZUTPHEN, L. F. M.; BALLS, M. *Animal Alternatives, Welfare, and Ethics*, Elsevier, Amsterdam, 1260 pp., 1997.

VELILLA, E.; RODRIGUEZ-GONZALEZ, E.; VIDAL, F.; PARAMIO, M.T. Microtubule and microfilament organization in immature, in vitro matured and in vitro fertilized prepubertal goat oocytes. *Zygote*, v. 13, p. 155-65, 2005.

ZHOU, P.; WU, Y.G.; LI, Q.; LAN, G. C.; WANG, G.; GAO, D.; TAN, J.H. The interactions between cysteamine, cystine and cumulus cells increase the intracellular glutathione level and developmental capacity of goat cumulus-denuded oocytes. *Reproduction*, v. 135, p. 605-611, 2008.

APÊNDICE

APÊNDICE A

RESUMO PUBLICADO: Colheita oocitária por laparoscopia (COL) em cabras não estimuladas hormonalmente.

XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal
Centro de Convenções Expominas, Belo Horizonte, MG.
3 a 5 de junho de 2009.

Colheita oocitária por laparoscopia (COL) em cabras não estimuladas hormonalmente

Laparoscopic oocyte recovery (LOR) in hormonally non-stimulated goats

S.R.G. Avelar, K.C. Almeida, A.F. Pereira, F.C. Sousa, R.R. Moura, A.S. Alcântara Neto, A.C.A. Teles Filho, L. M. Melo, D.I.A. Teixeira, V.J.F. Freitas

Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução - Universidade Estadual do Ceará
Av. Dedé Brasil, 1700, 60740-903. Fortaleza-Ceará. E-mail: suelyavelar@gmail.com

Introdução

A produção *in vitro* de embriões em caprinos pode ser uma valiosa ferramenta para o rápido melhoramento genético do rebanho. A colheita oocitária por laparoscopia (COL) apresenta-se como uma fonte de oócitos em quantidade e qualidade; no entanto, este processo é normalmente realizado após estimulação hormonal nas fêmeas doadoras (Gibbons *et al.* 2007). O objetivo deste trabalho foi avaliar parâmetros quanti-qualitativos de oócitos recuperados por COL, em fêmeas caprinas não estimuladas hormonalmente, e submetidos à maturação *in vitro* (MIV).

Material e Métodos

Foram utilizadas oito cabras adultas cíclicas as quais foram submetidas a jejum hídrico-alimentar e anestesia. O sistema de colheita consistiu de uma agulha 22G e uma bomba de vácuo a 30 mmHg. Os folículos (≥ 2 mm) foram contados e aspirados. Os complexos *cumulus*-oócito (CCOs) foram recuperados em TCM199 acrescido de HEPES, heparina e gentamicina. Os CCOs foram classificados em graus (I a IV) quanto à presença de células do *cumulus* e homogeneidade do citoplasma. Para a MIV, CCOs de grau I e II foram incubados em TCM199 suplementado com cisteamina, EGF e gentamicina a 5% de CO₂, 38,5 °C por 24 h. A verificação da maturação foi realizada pela marcação dos oócitos com Hoechst 33342 em microscópio de epifluorescência. Os dados foram expressos como média $\pm$ e.p.m.

Resultados e Discussão

Foram verificados $4,7 \pm 2,6$ e $1,9 \pm 0,4$ folículos visualizados e oócitos recuperados por cabra, respectivamente, resultando numa taxa de recuperação de 39,5%. Dos oócitos colhidos, 6,6, 53,3 e 40,1% foram classificados como grau I, II e III, respectivamente. Estes resultados mostram-se similares aos citados na literatura (Aguillar *et al.*, 2002). Após MIV, observou-se 77,7% de taxa de maturação. Assim, a COL a partir de cabras não estimuladas pode se apresentar como uma opção para a obtenção de oócitos competentes à MIV.

Referências bibliográficas

AGUILLAR, B.; ROCHE, A.; OLIVERA, J.; FOLCH, J.; ALABART, J. L. Oocyte retrieval after repeated *ovum pick-up* in unstimulated sheep and goat. In: **Proceedings of the 18th Meeting Association Européenne de Transfert Embryonnaire (AETE)**, 2002.
GIBBONS, A.; PEREYRA-BONNET, F.; CUETO, M.I.; CATALA, M.; SALAMONE, D.F.; GONZALEZ-BULNES, A. Procedure for maximizing oocyte harvest for in vitro embryo production in small ruminants. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 59, p.423-426, 2007.

Palavras-chave: oócito; laparoscopia; caprino.

Keywords: oocyte; laparoscopy; goat.

APÊNDICE B

RESUMO PUBLICADO: Efeito de diferentes protocolos de estimulação ovariana sobre a colheita de oócitos por laparoscopia (COL) em cabras Canindé

Universidade Estadual do Ceará – UECE
XIV Semana Universitária / Encontro de Iniciação Científica e
Encontro de Pesquisadores
9 a 13 de novembro de 2009, Fortaleza, CE.

Efeito de diferentes protocolos de estimulação ovariana sobre a colheita de oócitos por laparoscopia (COL) em cabras Canindé

Avelar SRG, Moura RR, Telles-Filho ACA, Sousa FC, Melo LM, Teixeira DIA, Freitas VJF

A colheita oocitária por laparoscopia (COL) é uma importante ferramenta na obtenção de oócitos para produção *in vitro* (PIV) de embriões. Para aumentar o número de oócitos, a COL é realizada após tratamento de estimulação ovariana. Deste modo, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes tratamentos hormonais sobre a resposta ovariana, taxa de colheita e qualidade oocitária. Para tanto, 18 cabras Canindé adultas e cíclicas foram submetidas a tratamento com esponja vaginal contendo 60 mg de acetato de medroxiprogesterona (Progespon, Syntex, Argentina) por 11 dias e aplicação intra-muscular (i.m.) de 50 µg de cloprostenol (Ciosin, Coopers, Brasil) no oitavo dia do tratamento. Para a estimulação ovariana, as cabras foram distribuídas em três grupos, sendo que cada grupo foi submetido a três tratamentos alternadamente, de acordo com um dos seguintes protocolos: a) múltiplas-doses (MD, n=18) com 120 mg de pFSH (Folltropin, Vetrepfarm, Canadá) em cinco injeções i.m. (30/30, 20/20 e 20 mg) a intervalos de 12 h, b) três doses (TD, n=17) com 120 mg de pFSH (60, 40, 20 mg) em três injeções i.m. a intervalos de 24 h e c) dose única (DU, n=17) em injeção i.m. de 70 mg pFSH e 200 UI de eCG (Novormom, Syntex, Argentina) às 36 h antes da retirada da esponja. Nos grupos MD e TD as injeções de pFSH começaram no oitavo dia do tratamento progestágeno. A COL foi realizada no momento da retirada das esponjas e 24 h antes da mesma, as fêmeas passaram por um jejum hídrico-alimentar. Os oócitos foram recuperados utilizando um sistema de punção constituído de uma agulha 22G (Watanabe, São Paulo, Brasil) acoplada a um tubo de colheita e uma bomba de vácuo (Biovacuum, Biocom, Brasil), regulada para promover uma pressão de 30 mmHg. Os folículos maiores que 2 mm foram aspirados em meio TCM199 acrescido de HEPES, heparina e gentamicina. As estruturas colhidas foram observadas sob estereomicroscópio (SMZ800, Nikon, Japão) e classificadas quanto à qualidade, de acordo com número de camadas de células do *cumulus* e uniformidade do citoplasma em grau I, II, III ou IV, sendo os de grau I e II considerados viáveis. O número de folículos visualizados e aspirados foi expresso como média $\pm$ desvio padrão. As taxas de colheita e de qualidade oocitária foram analisadas pelo teste qui-quadrado. Não houve diferença estatística ($p > 0,05$) entre os grupos para média de folículos visualizados e aspirados por cabra. A taxa de colheita foi inferior ($p < 0,05$) no grupo TD (67,9%) em comparação aos grupos MD (84,1%) e DU (72,4%). A qualidade oocitária não sofreu influência do tratamento, sendo observada uma taxa de oócitos viáveis de 73,9%, 66,5% e 70,1% para MD, TD e DU, respectivamente. Em conclusão, os três tratamentos hormonais foram eficientes na produção de folículos ovarianos puncionáveis e de oócitos viáveis para PIV. No entanto, devido à menor taxa de colheita obtida, o grupo TD é desaconselhado para uso na estimulação ovariana de caprinos da raça Canindé.

APÊNDICE C

RESUMO ACEITO: EFFECT OF SUCESSIVE LAPAROSCOPIC OOCYTE RECOVERY AFTER HORMONAL TREATMENT IN CROSSBRED GOATS

36TH Annual Conference of the IETS / 23rd Annual Meeting SBTE
Sheraton Córdoba Hotel.
January 9-12, 2010, Córdoba, Argentina.

EFFECT OF SUCESSIVE LAPAROSCOPIC OOCYTE RECOVERY AFTER HORMONAL TREATMENT IN CROSSBRED GOATS

S. R. G. Avelar, K. C. Almeida, A. F. Pereira, F. C. Sousa, R. R. Moura, A. C. A. Teles Filho, C. H. S. Melo, E. S. Albuquerque, F. B. Pereira, L. M. Melo, D. I. A. Teixeira, V. J. F. Freitas*

State University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil

Laparoscopic oocyte recovery (LOR) is a valuable tool for obtaining oocytes for in vitro embryo production. When preceded by treatment of ovarian stimulation, this technique produces an increase in the amount of oocytes recovered. However, a little information has been found to respect the effect of successive hormonal treatments on both oocyte quantity and quality. Therefore, the objectives of this study were to evaluate the ovarian response and quantitative and qualitative cumulus-oocyte complexes (COCs) production. Five adult crossbred goats were hormonally treated with intravaginal sponges containing 60 mg of medroxyprogesterone acetate (MAP, Progespon, Syntex, Argentina) for 11 days. In the 8th day of progestagen treatment, was administered 50 µg of prostaglandin F2α analogue (Ciosin, Coopers, Brazil), by i.m. injection. At this time, ovarian stimulation was initiated by the administration of 120 mg pFSH (Folltropin-V, Vetrepsharm, Canada) distributed in five decreasing doses (30/30, 20/20, 20 mg), at 12 hours intervals. The animals were fasted for 24 h before laparoscopic procedure, which was performed just after the sponge removal. A laparoscopic system connected to a 22 gauge needle (WTA, Watanabe, Brazil) and a vacuum pump (Biovacuum, Biocom, Brazil) providing 30 mmHg was used. All follicles with a size larger than 2 mm present in both ovaries were counted and aspirated. The collection medium was TCM199 supplemented with HEPES (10 mM), heparin (20 IU/mL) and gentamicin (40 µg/mL). The COCs were graded based on presence of cumulus cells and cytoplasm homogeneity (I to IV). The hormonal treatment and LOR procedures were repeated three times at 14 days intervals. Data were expressed in percentage or mean ± SEM. The differences were analyzed using ANOVA and Tukey's or Fischer's exact test when appropriate, with $p < 0.05$. No statistical differences were found ($p > 0.05$) for the follicle number obtained in each LOR session: 17.0 ± 3.91 , 18.75 ± 2.59 and 18.0 ± 4.73 , respectively. Repeated LOR procedures also did not affected ($p > 0.05$) the aspirated follicle number (15.0 ± 3.92 , 15.5 ± 2.33 and 16.0 ± 4.36), resulting of the three sessions, respectively. Average recovery rate were not statistically different ($p > 0.05$), resulting in 74.7%, 62.9% and 64.6% between sessions. With respect to the percentage of viable COCs (GI and GII) were not observed statistical differences ($p > 0.05$), as verified the follow values at 1st to 3rd sessions: 76.79%, 84.62% and 74.19%. In conclusion, three successive hormonal stimulation LOR procedures no cause detrimental effects on the quantitative and qualitative oocyte production, suggesting that this protocol can be used for programs of in vitro goat embryos production.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported the following Brazilian agencies: FINEP, CNPq, FUNCAP and CAPES.