

ANTONIO CARLOS DUENHAS MONREAL

**INFLUÊNCIA DO FOTOPERÍODO ARTIFICIAL NA PRODUÇÃO
DE OÓCITOS E COMPETÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO
EMBRIONÁRIO EM CABRAS (*Capra hircus*-Linnaeus-1758)
ESTIMULADAS COM FSH-ov NO ANESTRO ESTACIONAL**

**DOUTORADO
2003**

ANTONIO CARLOS DUENHAS MONREAL

**INFLUÊNCIA DO FOTOPERÍODO ARTIFICIAL NA PRODUÇÃO
DE OÓCITOS E COMPETÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO
EMBRIONÁRIO EM CABRAS (*Capra hircus*-Linnaeus-1758)
ESTIMULADAS COM FSH- α v NO ANESTRO ESTACIONAL**

Tese apresentada ao Departamento de
Reprodução Animal da Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia-
Universidade Estadual Paulista “Julio de
Mesquita Filho” Campus de Botucatu, como
pré-requisito para a obtenção do título de
Doutor em Medicina Veterinária (Área de
concentração: Reprodução Animal)

Orientador: Prof. Dr. Gilson Hélio Toniollo

**Botucatu-SP
2003**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Elza Numata

Monreal, Antonio Carlos Duenhas.

Influência do fotoperíodo artificial na produção de oócitos e competência no desenvolvimento embrionário em cabras (*Capra hircus*-Linnaeus-1758) estimuladas com FSH-ov no anestro estacional / Antonio Carlos Duenhas Monreal. – 2003.

Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2003.

Orientador: Gilson Hélio Toniollo

Assunto CAPES: 50504003

1. Cabra - Reprodução 2. Fertilização *in vitro*

CDD 636.3908926

Palavras-chave: Cabras; Fertilização *in vitro*; Superovulação; Oócitos; Fotoperíodo artificial

ANTONIO CARLOS DUENHAS MONREAL

**INFLUÊNCIA DO FOTOPERÍODO ARTIFICIAL NA PRODUÇÃO
DE OÓCITOS E COMPETÊNCIA NO DESENVOLVIMENTO
EMBRIONÁRIO EM CABRAS (*Capra hircus*-Linnaeus-1758)
ESTIMULADAS COM FSH- α v NO ANESTRO ESTACIONAL**

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

- 1° Examinador.....Prof. Dr. Gilson Hélio Toniollo-Unesp-Jaboticabal
2° Examinador.....Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia-Unesp Jaboticabal
3° Examinador.....Prof. Dr^a. Eunice Oba –Unesp-Botucatu
4° Examinador.....Prof. Dr. Benedito Dias de Oliveira Filho UFG
5° Examinador.....Prof. Dr. Marcos Chalhoub Coelho Lima UFBA

Botucatu (SP), Brasil, 12 de dezembro de 2003.

DADOS CURRICULARES

ANTONIO CARLOS DUENHAS MONREAL

Dados Profissionais

Nascimento: 08.09.1959- Mirandópolis/SP

Filiação: Antonio Duenhas Monreal e Terezinha P. Bissoli D. Monreal

1981/1985: Curso de Graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual de Londrina-PR

1986: Estágio nos Estados Unidos da América na Clínica Veterinária de Monon-Indiana

1987/1992: Médico Veterinário Autônomo

1993: Ingresso no Magistério Superior através de concurso público no Departamento de Morfofisiologia pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

1994: Curso de Especialização em Morfofisiologia básica pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

1997: Ingresso no Curso de Pós-Graduação (Mestrado) em Medicina Veterinária: Área de concentração-Reprodução Animal-FMVZ-Unesp-Botucatu.

1999: Conclusão de Mestrado- Unesp-Botucatu

2000: Ingresso no Curso de Pós-Graduação (Doutorado) em Medicina Veterinária: Área de concentração-Reprodução Animal-FMVZ-Unesp-Botucatu.

2003: Conclusão de Doutorado- Unesp-Botucatu

Ao meu orientador,
Prof. Dr. Gilson Hélio Toniollo,
Pela orientação deste trabalho, na
vida pessoal e profissional, sempre
ponderado e com bom senso, **dedico**

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível graças à colaboração direta ou indireta de muitas pessoas e animais. Manifestamos nossa gratidão a todas elas e de forma particular:

À minha família, que amo tanto e que a espiritualidade me encaminhou: Maria Tereza, minha esposa; Marília e Vitória, minhas filhas surpreendentes;

Ao meu orientador Prof. Dr. Gilson Hélio Toniollo, Professor da FCAV-Unesp-Jaboticabal, por aceitar esta orientação, pelo estímulo constante, principalmente pelo apoio incondicional e imparcial em todos os momentos, sendo amigo e pai, acreditando sempre em meu trabalho, meu profundo agradecimento pelos ensinamentos recebidos, consideração, respeito e amizade sempre;

À Profa. Dra. Eunice Oba, por ter sempre acreditado em minha pessoa e propiciado condições de realização de vários trabalhos durante a pós-graduação;

Ao Prof. Dr. Heraldo César Gonçalves e ao Técnico Agrícola José Antonio Franco, do setor da Caprinocultura da Unesp de Botucatu por terem emprestado parte dos animais; além da amizade, respeito e consideração;

Ao Prof. Dr. Kleber Tomás de Resende, da Caprinocultura de Jaboticabal, funcionários Carlos e Júnior, por cederem o espaço para a pesquisa e terem cuidado dos animais durante a experimentação, respectivamente;

Ao Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia, por ter me ajudado muito em todos os momentos fáceis e principalmente nos difíceis, despojando-se de seu tempo para me atender, sempre com disposição, entusiasmo e paciência;

À técnica do laboratório de FIV, Roberta Vantini, incluindo alguns pós-graduandos aos quais sem esta ajuda, este trabalho não seria possível;

À Profa. Dra Keico O. Nonaka e o pós graduando Charles Chenwei Wang pela dosagem de melatonina deste trabalho;

Ao Senhor Hélio Duarte, pela doação dos dispositivos intravaginais CIDR-G;

Ao Paulo Sérgio da Silva, funcionário da Unesp-Jaboticabal, pela ajuda nas colheitas de sangue noturnas, diurnas e nas cirurgias; além da amizade e comprometimento com a pesquisa;

Ao pós graduando Mestre, Joandes H. Fontequê, da FMVZ- Unesp-Botucatu, pela ajuda nas confecções das figuras deste trabalho;

Aos Professores Doutores Ciro Moraes Barros, Homero Barros, Stélio P. L. Luna, Wilter R. R. Vicente, pelos ensinamentos recebidos para a minha vida;

Aos amigos Doutores Luciana Toscano e Wilson Maruyama pela apoio durante minha permanência em Jaboticabal e auxílio na primeira colheita de sangue noturna para dosagem de melatonina, sem a qual não teria prosseguido;

Às famílias de Botucatu: Santa Rosa (Dona Lola e o Sr. Bôrtolo), Rosa e Márcio Godoy, Cristina e Ronaldo, Sr. e Sra. Benedito e Belmira, Sra. Adélia e Adriana Goya por terem me acolhido tão bem;

Aos amigos Clísia Mara Carreira, Rodrigo J. Oliveira, José Gaspar Moreno, ao Hebert Almeida Menezes (mestrando em Química pela UFMS) e ao Prof. Adj. Dr. Henrique Mongelli (UFMS/Depto de Computação) e Prof. Adj. MSc. Daniel D. Santee (UFMS/Depto de Letras); pelos momentos de amizade, confecção das figuras de melatonina e revisão do abstract, respectivamente;

Aos órgãos financiadores: Capes, UFMS, Fapesp, Fundunesp e Bibliotecas da Unesp de Botucatu e Jaboticabal pelo suporte para a realização deste trabalho;

Ao Conselho Departamental de Morfofisiologia pelo apoio e liberação para a realização deste trabalho;

À funcionária Damares Perecim Roviero da fisiologia da Unesp de Jaboticabal, pós-graduandos Janessa Sampaio de Abreu e Richard Philip Brinn e à Prof^a.Dr^a. Elizabeth C. Urbinati pela ajuda na dosagem de progesterona plasmática e Cortisol , além da bibliotecária Ana Silvia Pamplona Mariano, pela gentileza na correção das referências bibliográficas e aos residentes Renata L. Linardi e José Henrique S. Borges, todos da FCAV-Unesp Jaboticabal;

À Profa. Maria Garcia, pela revisão gramatical deste trabalho;

Às cabras, pois sem elas este trabalho não seria possível;

**“A ciência é a investigação metódica,
imparcial e reveladora da presença de Deus,
no genoma embrionário da vida”**

“André Luiz”

Mensagem recebida na manhã do dia 16/11/2002 pelo
médium Luis Fernando Grijó, Campo Grande-MS, inédita
para este trabalho

SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	xi
Lista de Figuras.....	xii
Introdução.....	1
Revisão da Literatura.....	4
1. Hormônios.....	4
2. Fertilização “ <i>in vitro</i> ”.....	11
3. Fotoperíodo.....	24
Material e Métodos.....	28
1. Animais Experimentais e instalações.....	28
2. Período de Adaptação.....	28
3. Alimentação.....	29
4. Delineamento experimental.....	29
5. Estimulação Ovariana.....	30
6. Colheita de Sangue.....	30
7. Fotoperíodo artificial.....	32
8. Colheita de Oócitos.....	33
9. Maturação “ <i>in vitro</i> ”.....	34
10. Capacitação Espermática.....	35
11. Fertilização “ <i>in vitro</i> ”.....	36
12. Cultivo embrionário.....	36
13. Análise Estatística.....	37
Resultados.....	38
Discussão.....	66
1. Hormônios.....	66
2. Fertilização “ <i>in vitro</i> ”.....	74
3. Fotoperíodo.....	87
Conclusões.....	93
Resumo.....	94
Abstract.....	96
Referências.....	98
Anexos.....	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Número total de oócitos, oócitos maturados, oócitos fertilizados, oócitos clivados e blastocistos em cabras submetidas ou não ao fotoperíodo artificial, durante a estação e anestro estacional. Jaboticabal, 2002.....	39
Tabela 2	Número total de oócitos, oócitos maturados, oócitos clivados e blastocistos. Média, desvio padrão ($X \pm s$) e mediana (Md) em cada grupo. Estatística para a comparação entre grupos e comentários, Jaboticabal, 2002.....	40
Tabela 3	Concentrações plasmáticas médias de progesterona (ng/mL) de cabras submetidas ou não ao fotoperíodo artificial na estação reprodutiva. Médias e desvios padrão ($X \pm s$) e medianas (valores entre parêntesis) dos grupos em cada momento. Estatísticas (p-value) para comparação entre grupos em cada momento e entre momentos em cada grupo. Comentários, Jaboticabal, 2002.....	47
Tabela 4	Concentrações plasmáticas médias de progesterona (ng/mL) em cabras submetidas ou não ao fotoperíodo artificial no anestro estacional. Médias e desvios padrão ($X \pm s$) e medianas (valores entre parêntesis) dos grupos em cada momento. Estatísticas (p-value) para comparação entre grupos em cada momento e entre momentos em cada grupo. Comentários. Jaboticabal, 2002.....	49
Tabela 5	Concentrações plasmáticas médias de cortisol (nmol/mL) em cabras submetidas ou não ao fotoperíodo artificial na estação reprodutiva. Média, desvio padrão ($X \pm s$) e mediana (Md) em cada grupo. Estatística para a comparação entre grupos e comentários. Jaboticabal, 2002.....	52
Tabela 6	Concentrações plasmáticas médias de cortisol (nmol/mL) em cabras submetidas ou não ao fotoperíodo artificial no anestro estacional. Média, desvio padrão ($X \pm s$) e mediana (Md) em cada grupo. Estatística para a comparação entre grupos e comentários. Jaboticabal, 2002.....	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ovário exposto para o procedimento de aspiração folicular.....	34
Figura 2	Figura demonstrativa dos complexos <i>cumulus</i> oócitos (COCS) obtidos por aspiração dos folículos de cabras submetidas à laparotomia, tratamento com foto período artificial e estimulação com FSH.....	42
Figura 3	Figuras demonstrativas dos oócitos de cabras depois de cultivados para maturação durante 27 horas.....	43
Figura 4	Figura demonstrativa dos oócitos e zigotos de cabras depois de serem submetidos à fecundação <i>in vitro</i> por 12 horas.....	44
Figura 5	Figura demonstrativa dos embriões de cabras produzidos <i>in vitro</i> durante o cultivo nos diferentes estádios do desenvolvimento.....	45
Figura 6	Concentrações plasmáticas médias de progesterona (ng/mL) em cabras submetidas ou não ao fotoperíodo artificial durante a superestimulação ovariana do G1, na estação reprodutiva. Jaboticabal, 2002.....	48
Figura 7	Concentrações plasmáticas médias de progesterona (ng/mL) em cabras submetidas ou não ao fotoperíodo artificial durante a superestimulação ovariana do G2 e G3, no anestro estacional. Jaboticabal, 2002.....	50
Figura 8	Concentrações plasmáticas médias de cortisol (nmol/L) em cabras submetidas ou não ao fotoperíodo artificial, durante a superestimulação ovariana do G1, na estação reprodutiva, Jaboticabal, 2002.....	53
Figura 9	Concentrações plasmáticas médias de cortisol (nmol/mL) em cabras submetidas ou não ao fotoperíodo artificial, durante a superestimulação ovariana do G1, na estação reprodutiva. Jaboticabal, 2002.....	53
Figura 10	Concentrações plasmáticas médias de cortisol (nmol/L) em cabras submetidas ou não ao fotoperíodo artificial, durante a superestimulação ovariana do G2 e G3, no período do anestro estacional. Jaboticabal, 2002.....	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 11	Concentrações plasmáticas médias de cortisol (nmol/mL) em cabras submetidas ou não ao fotoeríodo artificial, durante a superestimulação ovariana do G2 e G3, no anestro estacional. Jaboticabal, 2002.....	56
Figura 12	Concentrações plasmáticas médias de melatonina (pg/mL) em cabras submetidas ou não ao fotoperíodo artificial, anterior ao fotoperíodo artificial, no anestro estacional. Jaboticabal, 2002.....	57
Figura 13	Concentrações plasmáticas médias de melatonina (pg/mL) em cabras submetidas ou não ao fotoperíodo artificial durante a suplementação luminosa, no anestro estacional. Jaboticabal, 2002.....	58
Figura 14	Concentrações plasmáticas médias de melatonina (pg/mL) em cabras submetidas ou não ao fotoperíodo artificial após a suplementação luminosa, no anestro estacional. Jaboticabal, 2002.....	59
Figura 15	Concentrações plasmáticas médias de melatonina (pg/mL) em cabras submetidas ou não ao fotoperíodo artificial durante o período CIDR-G da superestimulação ovariana dos grupos G2 e G3, no anestro estacional. Jaboticabal, 2002.....	60
Figura 16	Concentrações plasmáticas médias de melatonina (pg/mL) em cabras submetidas ou não ao fotoperíodo artificial durante o período CIDR-G+ FSH-ov da superestimulação ovariana dos grupos G2 e G3, no anestro estacional. Jaboticabal, 2002.....	61
Figura 17	Concentrações plasmáticas médias de melatonina (pg/mL) em cabras submetidas ou não ao fotoperíodo artificial, na transição anestro/estação. Jaboticabal, 2002.....	62
Figura 18	Concentrações plasmáticas médias de melatonina (pg/mL) em cabras submetidas ou não ao fotoperíodo artificial, no período CIDR-G da superestimulação ovariana do G1, na estação reprodutiva. Jaboticabal, 2002...	63
Figura 19	Concentrações plasmáticas médias de melatonina (pg/mL) em cabras submetidas ou não ao fotoperíodo artificial, no período CIDR-G+ FSH-ov da superestimulação ovariana do G1, na estação reprodutiva. Jaboticabal, 2002..	65

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA = Albumina bovina sérica

CIDR[®] -G = Liberação de Droga Interna Controlada (marca registrada)

COCS= complexo cumulus oocítico

D₀-D₁₆= Dia zero a dia dezesseis

eCG = Gonadotrofina Coriônica Equina

EDTA(K₃) = etileno diamino tetra acético-potássico

FGA = Acetato de fluorogestona

FCAV = Faculdade Ciências Agrárias Veterinárias de Jaboticabal

FSH = Hormônio Folículo Estimulante

FSH-p = Hormônio Folículo Estimulante de suínos

FSH-ov = Hormônio Folículo Estimulante de ovinos

FIV = Fertilização in vitro

g= força gravitacional

G1, 2, 3, 4 e 5= Grupos experimentais de 1 a 5

GnRH = Hormônio liberador de Gonadotrofina

h = horas

hCG = Gonadotrofina Coriônica Humana

LH = Hormônio Luteinizante

LH-p= Hormônio Luteinizante de origem suína

LHRH = Hormônio Liberador do hormônio Luteinizante

L= Litros

MAP = medroxiprogesterona

M1, 2 , 3 = Momentos

Md = Mediana

MGA = Acetato de melengestrol

min= minutos

mL= mililitros

mM= milimolar

ng/mL = nanogramas por mililitros

pg/mL = picogramas por mililitros

nmol/mL= nanomol por mililitros

nmol/L= nanomol por litro

PB = Proteína Bruta

PBS = Soro fetal bovino

PGF2 α = Prostaglandina

PMSG = Gonadotrofina sérica de égua gestante

RIE = radioimunoensaio

SRD = sem raça definida

SOF= fluido sintético de oviduto

TE = Transferência de embrião

TSH= Hormônio Tiroxina

UFSCar = Universidade de Federal de São Carlos

? w/cm²= micro watts por centímetros ao quadrado

UI = unidade internacional

INTRODUÇÃO

Os caprinos foram os primeiros animais a serem domesticados pelo homem e durante esta domesticação e convivência, o homem foi aprendendo a extrair os produtos provenientes da espécie. Essa extração, inicialmente de subsistência, presente até hoje em muitos locais, foi intensificando-se e melhorando sua qualidade durante essa longa convivência. Hoje, a extração dos produtos dessa espécie, além de carne, leite e seus derivados, pele e pêlos, ganhou importância mundial a produção de animais transgênicos.

O Brasil ocupa a nona posição mundial em população caprina, sendo o nordeste a região que agrega 95% desse contingente e a Bahia apresenta o maior número populacional da espécie (Ribeiro, 1997). Mesmo assim, a produção brasileira dos produtos comercializados dessa espécie é baixa, merecendo uma política de atenção.

Essencialmente, a reprodução bem assistida e com qualidade, favorece a expansão do setor e a biotecnologia representa uma ferramenta de auxílio a essa atividade. Os animais transgênicos, produzidos pela FIV, propiciam um avanço na área, pois os caprinos são muito utilizados em pesquisas, satisfazendo as premissas em vários aspectos desses estudos, como: produtos farmacêuticos e animais clonados, produzidos pela transferência de embriões (Baldassare et al., 2002).

A obtenção do primeiro produto caprino pela fertilização *in vitro* foi conquistada por Hanada (1985), utilizando oócitos ovulados. Já Crozet et al. (1993), com a presença da maturação “*in vitro*”, obtiveram o primeiro produto caprino totalmente produzido em laboratório.

Os hormônios têm sido estudados nessa espécie, porém ainda não se avaliou o perfil de cortisol e progesterona durante a estimulação ovariana concomitante ao ato cirúrgico para colheita de oócitos por laparotomia. A melatonina tem sido avaliada associada ao fotoperíodo natural e suas relações com o período claro e escuro (Alila-Johansson et al., 2001), entretanto não se sabe ainda o perfil da mesma em relação ao fotoperíodo artificial e suas associações com outros hormônios. Sabe-se que o cortisol eleva-se com o estresse cirúrgico em ovinos (Chapman et al. 1994) e no momento do parto em cabras (Fonteque, 2001).

Os objetivos do presente experimento foram:

- 1- investigar se o fotoperíodo artificial promove melhora na produção de oócitos e competência do desenvolvimento embrionário em cabras (*Capra hircus*-Linnaeus-1758) estimuladas com FSH-ov no anestro estacional sob latitude 21°15' 22'' S,
- 2- verificar as concentrações plasmáticas de progesterona (ng/mL) durante a superestimulação ovariana, aspiração folicular e quatro dias após ao processo cirúrgico, na estação reprodutiva e anestro estacional,

- 3- verificar as concentrações plasmáticas de cortisol (nmol/mL) durante a superestimulação ovariana, aspiração folicular e quatro dias após ao processo cirúrgico, na estação reprodutiva e anestro estacional,
- 4- verificar as concentrações plasmáticas de melatonina (pg/mL) durante a superestimulação ovariana do período CIDR-G e CIDR-G + FSH-ov, na estação reprodutiva e anestro estacional.

REVISÃO DA LITERATURA

1. HORMÔNIOS

O trabalho de transferência de embriões em caprinos pelo método não-cirúrgico foi empregado por Agrawal & Bhattacharyya (1982) em cinco cabras doadoras e 12 receptoras com a utilização de MGA (acetato de melengestrol) (0,15 mg/animal) durante 16 dias e aplicação de eCG no último dia do tratamento para as doadoras. A lavagem uterina para a colheita de embriões ocorreu 120 h após o início do estro. Foram transferidos 17 embriões em 7 receptoras obtendo-se 40% de prenhez em três receptoras, resultando dois filhotes em período de gestação normal para a espécie.

Armstrong et al. (1983) relataram o fato de vários trabalhos serem realizados fora da estação reprodutiva, bem como a utilização de progestágenos sintéticos por 3 semanas como fator reprodutivo limitante na indução do estro em cabras. Devido aos constantes achados de folículos não ovulados em cabras superestimuladas, os autores propuseram um estudo comparativo entre FSH-p (15 mg) e eCG (1000UI), bem como o efeito do progestágeno na resposta ao eCG. Os melhores resultados foram ao FSH-p, com número de aplicações em intervalos de 12 h por quatro dias. Os progestágenos auxiliaram na supressão do pico de LH promovendo baixas taxas de estradiol e redução de folículos grandes.

A maturação oocítica em oviduto de coelha foi empregada por Rao et al. (1984) para se obter melhores resultados em embriões caprinos. Uma dosagem de progestágeno (15g/animal/16 dias) e eCG (500 UI) foi aplicado para promover a superovulação em 12 doadoras e nove receptoras. Além disso, uma dose de hCG (750UI) foi utilizado em cada doadora ao ser detectado o estro para auxiliar na maturação dos folículos de Graaf. A lavagem uterina foi realizada após 120 h do estro. Foi administrado nas coelhas hCG (100 UI) e estas foram inseminadas com sêmen fresco de bode. Após a xenofertilização, os embriões foram transferidos às cabras. Apenas uma cabra completou o período gestacional e produziu três filhotes machos.

Battye et al. (1988) investigaram a participação das prostaglandinas como causa da regressão prematura de corpos lúteos em cabras anãs. As observações foram efetuadas por laparoscopia após a superovulação com eCG (1200UI) e MAP (60 mg) e um grupo utilizando flunixin meglumine. De acordo com esses autores, as prostaglandinas podem participar da regressão prematura dos corpos lúteos.

Cameron et al. (1988) observaram o tempo de ovulação em 47 cabras tratadas com eCG (1200UI) com e sem GnRH (50 µg), na laparoscopia. O tempo de ovulação ($41,6 \pm 38h$) auxilia a inseminação artificial e colheita de embriões para a posterior transferência. As ovulações foram melhores no tratamento de eCG com GnRH, porém a concentração média de progesterona foi significativamente maior entre as cabras que ovularam, sendo maiores em cabras que possuíam corpos lúteos presentes durante todo tempo.

O estudo realizado por Kumar et al. (1990), testou a possibilidade do eCG ser a provável causa da condensação de cromatina em cabras superovuladas. Compararam o FSH-ov com eCG, constatando a inadequação da utilização de eCG para superovular cabras e observaram a ausência da condensação de cromatina no grupo do FSH-ov, com maior produção de oócitos viáveis ($p < 0,05$).

Baril & Vallet (1990) estudaram o tempo de ovulação em cabras no intuito de descobrirem o melhor horário para a realização da inseminação artificial e posterior colheita de embriões. Além disso, os autores avaliaram a pesquisa em duas épocas distintas: na estação reprodutiva e anestro estacional. As 10 cabras Alpinas por grupo, foram submetidas a superovulação com FSH-p (16 mg) em doses decrescentes, perfazendo três dias de aplicação. Poucas variações foram observadas nos resultados, mesmo assim houve maior variabilidade na época de anestro estacional (contra-estação), bem como maior intervalo de ovulação após a retirada do dispositivo intravaginal (esponja).

Taneja et al. (1991) avaliaram a utilização de FSH-p em cabras Barbari, em diferentes doses (12, 14 e 16 mg) e concluíram que 14 mg parece estar próxima da dose ideal, uma vez que o grupo de 16 mg apresentou número menor de ovulações e embriões transferíveis. O uso de progestágeno chronogest por 12 dias e 125 µg de cloprostenol completaram a mimetização da sincronização para a promoção da superovulação. Não houve diferença significativa entre os grupos para as dosagens de 12 e 16 mg, apenas para a de 14 mg.

A temperatura ambiente média monitorada mensalmente entre 6-18h do dia, durante a sincronização e superovulação de 63 cabras na Malásia, em período de estação reprodutiva, foi relacionada a ovulação e fertilidade. O FSH-p utilizado em três doses diferentes (10, 15 e 20 mg) foi comparado com eCG (500, 1000 e 1500 UI). Uma boa condição corpórea é ressaltada como importante na resposta à superovulação e em meses chuvosos a resposta se intensifica. A melhor resposta para o FSH-p foi de 15 mg ($p > 0,005$) em relação aos de 10 e 20 mg e houve regressão prematura com a utilização de eCG (Rosnina et al., 1992). Para os meses secos do ano, as respostas observadas por Bondurant (1981) em relação às superovulações são menores e em zonas temperadas são restritas aos meses com luz decrescente.

O dispositivo intravaginal CIDR-G utilizado para sincronizar cabras e ovelhas foi avaliado por Wheaton et al., (1993). Esse não interferiu na produção leiteira e promoveu 100% do estro sincronizados. Além disso, as concentrações plasmáticas de progesterona exógenas estiveram presentes em quantidades elevadas até o D₂ (dia dois) do tratamento, fato confirmado por Monreal (1999), baixando seus níveis até o dia de sua retirada (1-2 ng/mL).

O FSH utilizado para induzir múltiplas ovulações foi administrado duas vezes ao dia (Armstrong et al. 1983), porém a facilidade de uma única aplicação de eCG promove anormalidades na maturação oocítica devido ao LH (Kumar et al., 1990). Uma proposta de trabalho para minimizar esses efeitos anteriormente citados, foi efetuada por Batt et al. (1993), utilizando FSH-p e FSH-ov em dose única ou em múltiplas doses, combinadas com GnRH e/ou eCG (200 e 400UI).

Pelos resultados obtidos, os grupos controle de FSH-p e FSH-ov se equipararam em taxa de ovulação, porém para o número de embriões colhidos o resultado foi maior para FSH-p ($p < 0,05$) em relação aos outros grupos FSH-ov e suas associações com eCG.

Oito cabras, usadas como doadoras foram superovuladas com FSH (16mg) + LH (40%), produzido na Universidade de Liege - Bélgica, no intuito de obter embriões. O perfil hormonal de progesterona sérica dessas 8 doadoras apresentou um significativo aumento entre o último dia do estro ($0,4 \pm 0,1 \text{ ng/mL}$) e dois dias após essa colheita ($11,1 \pm 1,8 \text{ ng/mL}$). Nas nove receptoras, o intervalo de progesterona sérica esteve entre 0,6 e 8,4 ng/mL, um dia antes da TE, sendo que as cabras que não conceberam, apresentaram 2,3; 0,6; 2,6 e 3,0 ng/mL e as gestantes apresentaram 1,1; 1,4; 8,4; 0,9 e 1 ng/mL (Besenfelder et al., 1994).

Mogas et al. (1997b) concluíram que o FSH-p não promoveu diferença estatística entre as duas categorias animais (cabras pré-púberes e adultas) no desenvolvimento embrionário. A maturação oocítica das cabras não tratadas (65,8%) e tratadas com FSH-p (64,7%) e os blastocistos obtidos ao final de dez dias pós-inseminação das não tratadas (3,6%) e tratadas (6,9%) não diferiram. O efeito hormonal de FSH-p melhora a qualidade dos oócitos por ovário, provenientes de folículos entre 3-6 mm ou maiores que isso.

Baseando-se nos resultados obtidos por Flores-Foxworth et al. (1992), 78,7% de embriões colhidos por laparoscopia ($p < 0,001$) em relação a via não-cirúrgica (36,9%), Kühholzer et al. (1998) empregaram a técnica de laparoscopia para a lavagem de embriões no oviduto com o objetivo de investigar o melhor tempo de colheita de embriões com pró-núcleos. Para a superovulação foi utilizado FSH-p em doses decrescentes e as cabras foram cobertas por monta natural. Os melhores resultados confirmam as colheitas efetuadas entre 75-78 h após a aplicação de prostaglandina+FSH-p (15 mg) em cabras no período de estação reprodutiva, além das lavagens unilaterais do oviduto.

Utilizando 250 UI de FSH-p em dose única, 24 h antes da retirada de esponja, pela via subcutânea, comparado com FSH-p (250 UI), divididos em 4 dias, em doses decrescentes (65, 65, 30, 30, 20, 20, 10, 10 UI), pela via intramuscular, Terzano et al. (2000) não conseguiram diferença estatística entre os dois grupos, acreditando que o protocolo mais fácil em dose única pode ser empregado.

Pesquisas médicas na área da cronobiologia, desde 1950 reconhecem a glândula pineal como o relógio biológico, além da já conhecida ação sobre o processo de maturação sexual no homem, sendo fortemente influenciada pelos ciclos da luz. Já se admite outros fatores externos, além da luz, na influência dos ciclos biológicos (temperatura ambiente, disponibilidade de alimentos, fatores sociais, pressão atmosférica, campos eletrostáticos e eletromagnéticos, umidade relativa do ar).

A glândula pineal não produz os ritmos, mas os organiza, pois faz a integração com os hormônios, relacionada ao hipotálamo e sistema límbico no diencéfalo do homem, sabidamente área do cérebro relacionada com o comportamento humano. A melatonina tem sido descrita ainda como inibidora de metástases de certos tipos de neoplasias em animais de experimentação, principalmente o câncer de mama, que pode ser induzido em ratas com a ablação cirúrgica da pineal. Mulheres cegas têm níveis de melatonina maiores que a população em geral e também uma incidência diminuída de câncer de mama. Ela é considerada a “glândula das glândulas”, a “reguladora das reguladoras”, responsável por coordenar todos os hormônios do corpo, minimizando o estresse e mantendo a homeostase. A melatonina foi descoberta e isolada em bovinos e testada em sapos, observando-se que nos melanócitos dos anfíbios a melatonina aglutina os grânulos de melanina em redor do núcleo, de tal forma que os animais ficam mais claros, o que originou o nome melatonina (Iandoli Jr., 2001).

A melatonina em cabras, produzida pela glândula pineal, atua na adenohipófise, onde se encontram os receptores da pars-tuberalis preferencialmente, hipotálamo basal (núcleo arqueado e hipotálamo ventro medial). Os mediadores desse sistema indireto da melatonina sobre o LHRH são a dopamina, serotonina e aminoácidos excitatórios, porém seu mecanismo de ação ainda é desconhecido em ovinos e caprinos (Malpaux et al., 1996).

Para se conhecer mais sobre os eventos biológicos em caprinos, Fonteque (2001) avaliou, pelo nível sérico de cortisol, o estresse em cabras nos períodos de gestação, parto e lactação, evidenciando que são períodos críticos e merecem uma visualização e conhecimento melhor sobre o fato. O estresse pode ser mensurado pelo nível sérico do cortisol, secretado pela adrenal, porém sua interpretação pode ser dificultada pela resposta ao estresse agudo ou crônico. Amostras colhidas antes, durante e após um período de estresse em grandes animais podem determinar importantes informações sobre a magnitude dessa condição. As amostras colhidas, diariamente, pela manhã, uma vez ao dia, mostraram elevação próximo ao parto (113,11nmol/mL), sendo que 24-48 h após, já se encontravam em parâmetros variando de 7,03-44,97 nmol/L. Em ovinos, após cirurgia, também eleva-se o nível de cortisol (85 ± 10 para 192 ± 14 nmol/L) nos primeiros 15 minutos e após 24h ($P < 0,05$) (Chapman et al., 1994).

2. FERTILIZAÇÃO “*IN VITRO*”

Song & Iritani (1985) observaram a fertilização “*in vitro*” com espermatozóides provenientes do epidídimo e capacitados em solução de bicarbonato Ringer-Krebs (m-KRB) obtendo 57% de fertilização “*in vitro*”. Os oócitos com apresentaram “*cumulus oophorus*” compacto e foram maturados por 25 h, os espermatozóides foram pré-incubados por 6h em meio m-KRB.

Kumar et al. (1991) avaliaram a possibilidade de LH e FSH serem a causa da indução da condensação de cromatina. Utilizaram FSH-ov (3,95 e 7,90 mL), divididas em 4 dias com intervalo de 12 h para cada aplicação. Em outro grupo, avaliados com LH, usaram doses de 0,25, 100 e 200 UI de hCG. Se aumentar a bioatividade de LH durante a superovulação, conseqüentemente ativa-se a maturação nuclear nos oócitos. Em altas doses de FSH purificado observaram o mesmo efeito do LH.

Com o objetivo de desenvolver a técnica de FIV e produzir zigotos caprinos e viabilizar a possibilidade de animais transgênicos, Younis et al. (1991), durante a época do outono, utilizaram 23 cabras das raças Angorá, Alpina, Anglo-nubiana e Toggenbourg como doadoras e nove receptoras. Aplicaram FSH-p (20 mg) em três dias consecutivos, doses decrescentes e com intervalo de 12 h entre elas. Todos os animais foram ovariectomizados após 24 h da última injeção de FSH-p e 48 h depois da aplicação de PGF2a. Folículos superiores a sete mm foram aspirados e lavados quatro vezes com TCM-199 (Sigma) sem BSA. Sêmen fresco foi utilizado para a capacitação espermática e os melhores resultados, “*in vitro*”, foram obtidos com o meio que não continha penicilina, apenas BSA e glutamina 17% de fertilizados e 10% clivados.

Flores & Foxworth et al. (1992) compararam a técnica de laparoscopia com a transvaginal. Obtiveram taxas de embriões colhidos por laparoscopia de 78,7% ($p < 0,001$) com as doadoras em relação ao grupo não-cirúrgico-transvaginal (36,9%). Na transferência porém, por laparoscopia conseguiram 35,7% e a técnica transvaginal 38,9%, os métodos não diferiram ($p > 0,05$).

De Smedt et al. (1992) superovularam cabras para obtenção de oócitos ovulados, com 16 mg de FSH-p em três dias e doses decrescentes entre intervalos de 12 h entre as aplicações. Lavaram os oócitos em meio hepes, TCM-199 (Sigma). Na capacitação espermática utilizaram sêmen fresco, meio modificado de Brackett + 10 mM hepes. Os folículos entre 2-6 mm (43%) atingiram a metáfase II, 85% fertilizaram após 17h pós-inseminação com oócitos maduros. Dos oócitos maturados “*in vitro*” (35), 29 (83%) foram fertilizados. Oócitos oriundos de ovários provenientes de matadouros ou ovariectomizados, podem atingir a maturação (90%) e normalmente serem fertilizados (60%) “*in vitro*”.

Elaborando um protocolo para promover a maturação e fertilização “*in vitro*” com oócitos de cabras, Younis et al. (1992), pela via cirúrgica, aspiraram oócitos entre 2-5 mm e maturou-os com TCM-199, suplementado com 20% de soro de cabra em estro e adicionado aos meios: a) 5µg FSH, b) 100 µgLH, c) 0,5 µg TSH e d) meio controle (s/ hormônio). Heparina (10 µg/mL) e cafeína (2mM) foi utilizada em sêmen fresco para inseminar os oócitos. Todos os oócitos atingiram 100% de maturação em todos os meios, excetuando o de TSH (42%). No desenvolvimento, foi utilizado TCM-199 + 10% de soro de cabra em estro e sem BSA. A clivagem foi maior no meio de LH (50%) em relação aos demais: FSH (46%), TSH (28%) e 24% para o controle. A transferência dos embriões produzidos “*in vitro*” foi efetuada via não-cirúrgica.

A dinâmica folicular estudada por Ginther & Kot (1994) apontam a existência de quatro ondas foliculares durante 17 dias do ciclo estral em cabras. O folículo dominante esteve expresso durante a maioria das ondas foliculares, especialmente nas ondas um e quatro (onda ovulatória). A média de folículos foi de 6,4 com 4 mm de diâmetro e de 2,9 com 6mm de diâmetro, e o diâmetro médio dos folículos grandes, na onda um foi de 8,7 mm e na onda quatro foi de 9,7 mm, essas ondas são importantes no ciclo estral em cabras.

Questionando a provável qualidade dos oócitos provenientes de cabras pré-púberes em comparação com as adultas, sem tempo de maturação adequada (24 ou 27 h) ou a melhor fonte de obtenção de ovários para se trabalhar com FIV, Martino et al. (1994a) utilizaram seis cabras multíparas Murcianas com superovulação promovida com FSH-p (7 mg). Os oócitos oriundos de ovários de cabritas com dois meses de idade, provenientes de matadouros, foram comparados com os oócitos oriundos de cabras adultas para maturação e fertilização. Não houve diferença significativa entre ambos.

A dificuldade em se obter ovários de cabras tem prejudicado o avanço na área de biotecnologia. Além disso, geralmente a maior concentração do rebanho caprino está distante das áreas desenvolvidas para FIV (Martino et al., 1994b). Com esse pensamento, para maximizar a obtenção do número de oócitos, Martino et al. (1994b) compararam a obtenção dos oócitos pelas técnicas de dissecação, aspiração e cortes e sua capacidade para maturação “*in vitro*”.

Verificaram que a melhor técnica para obtenção de oócitos é a dissecação, pela presença de “cumulus oophorus”, porém é muito demorada, comprometendo a maturação futura dos oócitos. Pela técnica de aspiração, a colheita é mais rápida e o tempo de maturação foi definido em 27 h.

Keskintepe et al. (1994) avaliaram os hormônios LH, FSH, hCG e TSH, durante a maturação “*in vitro*” de oócitos caprinos. Durante a estação reprodutiva, 68 cabras foram submetidas à ovariectomia para fornecer os oócitos. Os folículos foram dissecados em meio mHM-199. Os oócitos foram lavados quatro vezes em TCM-199, sem BSA. Foi utilizado sêmen fresco para a fertilização com BSA, gentamicina (50µg/mL) e penicilina (mDM), além de heparina (10µg) e cafeína (2mmol/mL). Os resultados apontam a necessidade da presença de hormônios na maturação “*in vitro*”, especificamente para hCG + FSH, significativo entre eles, já na clivagem a importância foi do meio LH/FSH ($p<0,05$) em relação ao controle e os demais grupos (FSH, LH, hCG, FSH, TSH).

Holtz & Nowshari (1995) submeteram embriões caprinos em cultivo “*in vitro*” da fase entre mórula e blastocisto para a congelação. Superovularam 66 cabras Boer com eCG e FSH-p. No cultivo “*in vitro*” foi adicionado PBS + 20% de soro inativado de cabra por 10 minutos. Pelos resultados obtidos, a transferência a fresco é a melhor alternativa para os embriões caprinos, caso haja necessidade de congelação, a fase de blastocisto é a mais indicada, se houver embriões em fase de mórula, melhor cultivar “*in vitro*” até blastocisto e congelar posteriormente.

Oócitos oriundos de ovários de cabras Alpinas e Saanen estimuladas conforme a metodologia empregada por De Smedt et al. (1992) foram submetidas a observações morfológicas e funcionais até a completa competência meiótica (metáfase II). Os folículos, dissecados, foram classificados por tamanho, a saber: 0,5-0,8 mm, 1-1,8 mm, 2-3mm e 3-6mm. Os resultados apresentados por De Smedt et al. (1994) para os folículos inferiores a 0,5 mm de tamanho foram considerados inaptos à meiose. Entretanto, os folículos superiores a três mm apresentaram competência para completar a metáfase II da meiose (96%), podendo seguir para a maturação e fertilização “*in vitro*”.

Mogas et al. (1995) expuseram oócitos a vários tipos de meios: 50µL TCM-199 + 20% de soro fetal bovino, 10µg/mLFSH + 10 µg/mL/LH+ 1µg/mL estradiol-17β, 50µLTCM-199 + 20% soro de cabra em estro, 50UI TCM-199 + 20% soro de cabra em estro + 10µg/mL FSH + 10 µg/mL LH+ 1 µg/mL estradiol 17 β, 2 mL de TCM-199 + 20% soro de cabra em estro + 10 µg/mL FSH + 10 µg/mL LH + 1µg/mL estradiol 17β + células da granulosa 1-1,5x10⁶/mL. Após a maturação por 27 h foram fertilizados com sêmen fresco. A melhor taxa de clivagem foi o grupo com 50 µL + hormônios + soro de cabra em estro (2,96%), com 64% de fertilizados.

Palomo et al. (1995a) tentando verificar se há efeito do tempo para pré-incubação com a heparina no resultado para fertilização, com oócitos de cabras pré-púberes, concluem que 30 minutos são suficientes para incubação, em meio TALP, com 100µg/L de heparina, para capacitação espermática.

Palomo et al. (1995b) investigando o efeito da dose de heparina na capacitação espermática e concentração final de espermatozóides para utilização em FIV de caprinos, concluíram que a taxa de clivagem esteve entre 45,29% com 200µg/mL e 55,47% com 100 µg/mL com sêmen fresco.

Crozet et al. (1995) compararam a maturação, fertilização e cultura “*in vitro*” entre oócitos ovulados e dissecados. Para a maturação oocítica, capacitação espermática e fertilização foi usada a mesma metodologia empregada por De Smedt et al. (1992). Obtiveram na maturação “*in vitro*” 84% para folículos entre 3,1-5mm e 87% para folículos grandes, maiores que cinco mm ($p>0,05$) e 62% para folículos entre dois-três mm ($p<0,001$) em relação aos anteriores pela colheita de dissecção. Já para os oócitos ovulados não houve diferença significativa na clivagem entre os de folículos grandes superiores a cinco mm (69%) e os ovulados (75%).

Sidhu & Cheena (1995) verificaram a importância em se colocar LH-p na maturação “*in vitro*”. Para isso, utilizaram ovários provenientes de abatedouros e por aspiração folicular colheram os oócitos. Nesse procedimento, aspiraram folículos de 1-2 mm e obtiveram entre 4-6 oócitos por ovário. Com 1µg/mL de estradiol e três diferentes meios com LH-p (5, 10 e 20µg/mL) efetuaram a experimentação, com resultados mais satisfatórios para LH (10µg/mL) + estradiol (13%) e LH (20µg/mL) + estradiol (45%) e zero para o meio LH (5µg/mL) + estradiol (1µg/mL), sendo todos oócitos observados até a metáfase II.

Keskintepe et al. (1996) reportaram sobre a possibilidade de produção de embriões caprinos a partir de ovários provenientes de abatedouros até atingir o estágio de mórula e blastocisto. Keskintepe et al.(1994) utilizaram folículos entre 2-6 mm, aspirados com agulhas 20G. Os oócitos maturados após 27 h em TCM-199, preparados com soro fetal bovino + 100µgLH, 0,5µg FSH, 1µg estradiol-17β, 5,5 mg de glicose, 3,6 mg NaHCO₃, 112 µg de piruvato e 50 µg de gentamicina. Na capacitação espermática, sêmen fresco foi utilizado com meio definido (mDM), preparado com BSA, 20% de soro fetal bovino e 25mM hepes, pH 7,3. Centrifugado a 320 G por 10 minutos. Heparina (100µg) foi adicionado ao meio final + 2mM de cafeína por 15 minutos. Não foi utilizado, em nenhum momento, soro de cabra em estro para a maturação, bem como soro de ovelha em estro na capacitação espermática. Os oócitos intactos em mDM apresentaram melhores resultados no desenvolvimento com presença de “cumulus” do que os desnudos. O uso de cálcio lactato na capacitação melhorou os resultados (31,8%) no desenvolvimento com 14 h de inseminação “*in vitro*”.

Simplicio et al. (1997) utilizaram sêmen de bodes Anglo-Nubianos congelado para fertilizar oócitos caprinos obtidos durante o anestro estacional. Esse sêmen foi congelado com leite desnatado e gema de ovo, com prévia lavagem (duas vezes). Concluíram que o sêmen congelado em leite desnatado, com heparina e soro de ovelha em estro na capacitação, foi melhor ($p<0,05$) que para o grupo do sêmen congelado com gema de ovo, tanto aquele proveniente do laboratório quanto aquele sêmen processado com gema de ovo e adquirido no comércio.

Amoah & Gelaye (1997) relataram as dificuldades em se produzir embriões caprinos “*in vitro*”, principalmente no processo de maturação oocítica, capacitação espermática e fertilização. Enfatizam que da clivagem até o desenvolvimento a blastocisto são necessárias mais investigações sobre todos os fatores envolvidos.

Mogas et al. (1997a) avaliaram o tempo de fertilização “*in vitro*” de oócitos de ovários caprinos pré-púberes (dois meses de idade) provenientes de abatedouros. Na maturação, TCM-199 + 20% de soro de cabra em estro inativado, 10 µg/mL FSH-ov, 10µg/mL LH, 1µg/mL estradiol 17β e 50 µg/mL de gentamicina foram utilizados para a incubação durante 27 h. Com sêmen fresco apresentando 60% de motilidade, provenientes de três bodes da raça Murciana-Granadina, foi processada a capacitação espermática. Depois de 200 G por 10 minutos de centrifugação, o sobrenadante foi descartado e re-suspenso com 100µg/mL de heparina e TALP, incubado por 45 minutos. Pelos resultados mostrados no trabalho, concluiu-se que após quatro h da inseminação ocorre a maior penetração espermática, a condensação da cromatina acontece entre 6-8 h no macho e 10-16 h na fêmea, obtendo 45,5% de clivagem após 48h.

Na tentativa de reduzir os custos da fertilização “*in vitro*” em caprinos, com a substituição de TCM-199, Malik et al. (1999) empregaram o fluido peritoneal de coelhos e caprinos, comparando-os, para avaliar o comportamento da maturação “*in vitro*” dos oócitos caprinos. Os resultados para maturação “*in vitro*” de fluido peritoneal de coelhos foi menor ($p<0,05$) em relação aos outros grupos (controle e fluido peritoneal).

Palomo et al. (1999) compararam o efeito seletivo e não seletivo de diferentes meios e metodologias diferentes para ejaculados na clivagem e maturação “*in vitro*” com oócitos de cabras pré-púberes. O processo de preparação dos oócitos foi efetuado segundo Mogas et al. (1997a). Pelos resultados, houve superioridade ao Swim-up ($p < 0,05$) em todos os intervalos estudados quando comparado ao grupo controle (Ficoll). Apesar disso, os resultados não foram significativos para clivagem e fertilização no gradiente de Percoll.

Um método de colheita de oócitos em caprinos, guiado por ultra-som, foi estudado por Graff et al., (1999). Nos resultados apresentados para a época de estação reprodutiva, na laparoscopia aspirativa obtiveram 71,5% e na aspiração transvaginal 61%. Na porcentagem de oócito/fêmea foram significativos, 14,4 oócitos/cabra pela aspiração contra 4,3 oócitos/cabra pelo método transvaginal. No anestro estacional, a porcentagem de oócitos colhidos por animal na laparoscopia foi de 68,3% e na transvaginal 68,2%, não foi significativo.

Izquierdo et al. (1999) tentaram melhorar a clivagem e o desenvolvimento embrionário “*in vitro*” em oócitos caprinos pré-púberes, acrescentando células epiteliais de oviduto e de “cumulus”, de caprinos e bovinos, com e sem a presença de soro dos respectivos animais ou células epiteliais de oviduto. Na maturação e fertilização “*in vitro*”, com 10% de TCM-199 sem soro e células epiteliais de oviduto, obtiveram 57,6% de clivagem 48h pós-inseminação e 21,3% de desenvolvimento embrionário no oitavo dia após a inseminação.

Quando se estudou o efeito provável da maturação, fertilização e cultura “*in vitro*” de oócitos, provenientes de cabras pré-púberes e adultas, Izquierdo et al. (1997) não observaram diferença significativa entre os grupos, para maturação oocítica das adultas (71,4%), bem como nas pré-púberes (81,4%). A quantidade de blastocistos provenientes das cabras adultas e pré-púberes (dois meses de idade) foi semelhante, o mesmo observado por Koeman et al. (2000).

Samaké et al. (2000), preocupados com a reprodução interrompida dos caprinos, trabalharam com a fertilização “*in vitro*” no período de anestro estacional. Na superestimulação ovariana, FSH-p (22 mg) foi utilizado. A maturação dos oócitos provenientes de folículos entre 2-6 mm, foi efetuada com TCM-199, 10% de soro fetal bovino, 100 µg/LH/mL, 0,5µgFSH/mL, 1µg estradiol-17β, com 38,5°C, 5% de umidade e CO₂. Sêmen congelado, capacitado com hepes-talp, foi empregado na capacitação espermática para a fertilização “*in vitro*”. Na re-suspensão foi utilizado 200 µL/mL de heparina e a maturação durou 24h. Para as duas técnicas utilizadas (ovariectomia e laparotomia), 100% dos oócitos estavam maturados e fertilizados. Na clivagem foi conseguido 78% (p<0,05) pela laparotomia, com obtenção de 90% de blastocistos por ovariectomia e 65% pela laparotomia aspirativa.

Graff et al. (2000) avaliaram, no período de anestro estacional, a superestimulação ovariana em cabras com duas fontes de FSH (suína-p e ovina-ov).

As dosagens de FSH-p (40mg) e de FSH-ov (37,5 mg) foram empregadas e efetuadas as aspirações foliculares. Não houve diferença estatística para o tipo de FSH utilizado, apresentando para o FSH-p, de 44,2 oócitos/cabra e para o FSH-ov 37,2 oócitos/cabra.

O tempo requerido para maturação “*in vitro*” de oócitos caprinos é de 27h (Martino et al., 1994a, Rho et al., 2001). Para melhorar a produção de embriões produzidos “*in vitro*”, três meios foram testados (Percoll, Swin-up e filtração Glass-Wool). Rho et al. (2001) apresentaram resultados favoráveis ao gradiente de Percoll ($p < 0,001$) em relação aos demais, porém não são desprezíveis os demais, podendo também ser utilizados. A taxa de clivagem com Percoll (62,4%) ($p < 0,05$), foi superior ao do Swin-up (49,6%) e Glass-Wool (44,5%). Os ovários foram obtidos de abatedouros e os oócitos foram retirados por corte, mais demorado, porém eficiente conforme Martino et al. (1994b).

A ionomicina (100nM) melhorou a qualidade na capacitação espermática de sêmen fresco e congelado com gema de ovo ($p < 0,01$) usado na fertilização “*in vitro*”, quando comparado ao grupo de sêmen congelado e capacitado com heparina e cafeína. Em gradiente de Percoll, também foi comparado o soro de cordeiro e cabra, ovelha e cabra no estro, além do soro fetal bovino. Na clivagem não houve diferença significativa para os diferentes soros animais (Bathia et al., 2002).

A ativação oocítica promovida pelo etanol e ionomicina tem sido utilizada para melhorar a fertilização “*in vitro*”. Os resultados obtidos, mostraram melhora ($p < 0,05$) em relação à fertilização “*in vitro*” normal para clivagem e também porcentagem de blastocistos, em praticamente o dobro no grupo de ionomicina e etanol (Ongeri et al. 2001).

Com a mesma técnica para maturação “*in vitro*” e capacitação espermática utilizada por Izquierdo et al. (1999), Palomo et al. (1999), e Mogas et al. (1997b), Izquierdo et al. (2002) investigaram o efeito da maturação “*in vitro*”, fertilização e subsequente desenvolvimento embrionário de oócitos provenientes de cabras doadoras (adultas e pré-púberes) e co-cultura de embriões em células de ovidutos. Além disso, submeteram embriões com 1, 2 e 3 dias após o desenvolvimento e avaliaram o efeito “*in vivo*” desses embriões em cultura de oviduto de coelhas. Não obtiveram resultados satisfatórios ($p > 0,05$) entre os grupos pesquisados, bem como na cultura de oviduto de coelhas.

A comparação da colheita de oócitos não foi significativa entre cabras adultas e pré-púberes (Izquierdo et al., 1997, Koeman et al 2000 e Baldassarre et al., 2002). Baldassarre et al. (2002) utilizaram a laparoscopia para obtenção de animais transgênicos. Dos 242 oócitos obtidos (35%), 129 fertilizaram e 17 filhotes nasceram. Uma única injeção de FSH-p (133 mg) e em doses múltiplas foram comparadas com eCG, aplicadas 36-48h antes da retirada do dispositivo, no dia da aspiração e não significativo ($p > 0,05$) entre os grupos, o mesmo encontrado por Terzano et al. (2000).

Uma enzima sintetizada nos oócitos em desenvolvimento, quando está em atividade reduzida, define o término do crescimento oocítico. Essa enzima, denominada glicose-6-fosfato dehidrogenase (G6PD) pode ser medida, de maneira indireta, na tentativa de se avaliar a qualidade dos oócitos provenientes de cabras pré-púberes. Oócitos com baixa produção de G6PD, detectado pelo azul-cresyl brilhante podem ser descartados, favorecendo os oócitos melhores para a produção de embriões, provavelmente minimizando o custo da FIV (Rodríguez-Gonzalez et al., 2002).

3. FOTOPERÍODO

De acordo com Haibel (1990), os caprinos, após 1 ou 2 meses do término do período do solstício de verão, manifestam os estros pela ação da melatonina endógena produzida pela pineal, ao qual controla o sistema bioquímico hormonal da espécie. Além disso, os animais, próximos a linha do Equador, se diferenciam dos que vivem distantes dessa linha, apresentando um período reprodutivo contínuo e outro de anestro. Não há padronização na quantidade de luz para o tratamento luminoso, sendo que duas lâmpadas fluorescentes (40W) para cada 37 m², distanciadas aproximadamente 12 metros e altura do piso de 8,9 metros foram suficientes para promover o tratamento luminoso.

Em cabras, como em outras espécies, os sinais de melatonina carregam seguramente as alterações do fotoperíodo. Essas alterações são conservadas até uma hora após o período escuro. Os sinais deaios longos foram melhores armazenados durante o final da primavera do que início do outono, sugerindo que a secreção endógena de melatonina pode estar modulada pelo mecanismo circanual e/ou pela história prévia do fotoperíodo longo anterior (Alila-Johansson et al., 2001).

Conforme Devenson et al (1990), para se inibir 80% da melatonina endógena em cabras, são necessários entre 100-200 luxes ou 30-40 μ W/cm². por outro lado, Brackel-Bodenhausen et al. (1994) sugerem o emprego de 300 luxes durante 90-100 dias para o tratamento luminoso, enquanto Monreal et al.(1996) e Monreal (1999) recomendaram média de 98 luxes por 60 dias, podendo ser reduzido.

O sêmen caprino apresenta baixa qualidade no período de anestro estacional (Delgadillo et al., 1995). Em contrapartida, para melhorar a reprodução nesse período, para ambos, macho e fêmea é necessário a sincronização e quebra da estacionalidade. No anestro estacional, o sêmen caprino, congelado em época de estação reprodutiva, pode ser utilizado no anestro, para cabras sincronizadas nesse período, favorecendo a demanda de aumento de produção de leite, carne e derivados nos criatórios. Nesse raciocínio, Keskinetepe et al. (1998) aplicaram a técnica de sêmen congelado na época do anestro estacional para a fertilização caprina “*in vitro*”.

Bodes submetidos ao fotoperíodo artificial e trabalhados em colheita de sêmen duas vezes por semana, aumentam em 61% a produção espermática (Delgadillo et al., 1991). Quando foram submetidos por três anos consecutivos aumentaram os parâmetros de produção espermática em relação ao controle (Delgadillo et al., 1993). Além desses parâmetros, o tamanho testicular se manteve constante enquanto os do controle variaram durante a estação (Chemineau et al., 1999). O tratamento luminoso, em machos, promoveu aumento significativo no número de espermatogônias com alta taxa de divisão espermática, durante a estação reprodutiva (Delgadillo et al., 1995).

Em fêmeas, o fotoperíodo artificial tem sido empregado para melhorar a atividade ovariana no período de anestro estacional. No período da estação reprodutiva, o método promoveu o estro e diminuiu a produção de leite, que se interrompe em um período do ano (Chemineau et al., 1999). Além disso, o tratamento luminoso muda a velocidade de crescimento dos folículos pilosos em cabras (Gebbie et al., 1999), por mecanismos não ligados a melatonina e em cabras gestantes não causou aborto (Monreal, 1999). As (fêmeas), oriundas desse tratamento luminoso iniciam a puberdade quatro semanas antes do tempo previsto (Devenson et al., 1990).

O fotoperíodo artificial (sozinho) foi empregado por Chi & Rong (1999) e Monreal (1999) apresentando resultados semelhantes para fertilidade de 60,7% e 69,2% respectivamente, com sincronização de todas as cabras e mesma metodologia (20h de luz/dia natural + artificial durante 60 dias).

O investimento compensa o retorno da produção, pelo baixo custo, porém não houve resultados semelhantes entre propriedades ($p < 0,05$) com o mesmo protocolo e época (Chi & Rong, 1999).

Chemineau et al. (1999) avaliaram o fotoperíodo artificial em cabras, com e sem melatonina, utilizando 126 e 115 animais respectivamente, obtendo fertilidade respectiva de 75,3% e 73%. Para o tratamento luminoso sozinho, em 3236 cabras, a fertilidade obtida foi de 76,8% com 1,83 de prolificidade, já nos anos anteriores, em 1996 e 1997, obtiveram prolificidade de 2,07 e 2,0 com e sem melatonina respectivamente.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais experimentais e instalações

O trabalho foi desenvolvido no Setor de Caprinocultura e no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias Veterinária/Unesp-Jaboticabal (latitude 21°15'22''S e longitude 48°18'58'' e altitude de 595m). Utilizou-se 31 cabras da raça Alpina, nulíparas e multíparas, durante o estro e anestro estacional (fevereiro-outubro/2002). As fêmeas foram previamente examinadas quanto ao estado clínico geral, e consideradas aptas quanto aos estados sanitário e reprodutivo. Os animais foram mantidos em boxes de 3 m², sob luminosidade natural até o início do fotoperíodo artificial para o G2.

O manejo sanitário quanto a ecto e endoparasitas e a condição clínica dos animais foram semanalmente avaliados.

2. Período de adaptação

Os animais utilizados foram submetidos a um período pré-experimental de um mês, para adaptação à alimentação e à estabulação, sendo pesados e distribuídos nos grupos experimentais por sorteio.

3. Alimentação

A alimentação consistiu de ração (14% de proteína bruta e 5,05% de fibra bruta) e feno de *Cynodon dactylon* (“Coast Cross”) (4,98% de proteína bruta e 35,88% de fibra bruta, na matéria seca). Os animais receberam 0,5 kg/cabeça/dia de ração concentrada e 2 kg/cabeça/dia de feno, com disponibilidade *ad libitum* de mistura mineral e água.

4. Delineamento experimental

Foram constituídos cinco grupos experimentais e estudados durante os seguintes períodos:

Período de Anestro Estacional

(G2) Grupo com emprego do **fotoperíodo artificial**, n=5

(G3) Grupo com fotoperíodo natural, n=5

Período da Estação Reprodutiva

(G1) Grupo Controle com fotoperíodo natural, n=7.

(G4) Grupo com fotoperíodo natural, n=7. **Heparina** (200µg/mL) na capacitação espermática.

(G5) Grupo com fotoperíodo natural, n=7 **Sêmen fresco** na fertilização.

5. Estimulação Ovariana - FSH-ov (G1, G2, G3, G4, G5)

Para aumentar a disponibilidade de folículos na aspiração (= a 3 mm) os 05 grupos experimentais foram submetidos a impregnação prévia de progesterona exógena (CIDR-G-0,3g)¹ por 12 dias (retirados previamente à cirurgia), superestimulação ovariana com FSH-ov² (10mg), em doses decrescentes nos dias D₉, 10 e 11, divididos em intervalos de 12 h em volumes de (3, 2; 2, 1; 1; 1mL), respectivamente. No D10 foi aplicado 125 µg de cloprostenol³.

6. Colheita de sangue para análise de melatonina, cortisol e progesterona (G1-estação reprodutiva e G3-fotoperíodo natural e G2-fotoperíodo artificial durante o anestro estacional)

As colheitas, para dosificação de melatonina, foram efetuadas em todos os animais, antes do início do fotoperíodo artificial (08/06/2002), durante o fotoperíodo artificial (13/07/2002), após o emprego do mesmo (17/08/2002), durante a estimulação hormonal do anestro, no período CIDR-G (28/08/2002) e CIDR-G + FSH-ov (31/08/2002) e na estação reprodutiva do período CIDR-G (25/02/2002) e CID-G + FSH-ov (03/03/2002), ao final do ano, na transição do anestro e estação reprodutiva (18/12/2002).

¹Intervet- Nova Zelândia

²Ovagen-ICP-Bio immuno-chemical Products Ltd-Nova Zelândia- partida 2182

³(Cooper do Brasil-partida 005/00)

Os horários das colheitas para melatonina foram de duas em duas horas, iniciando às 17h, e terminando às 09h do dia seguinte.

Para iluminar o local durante a escuridão, foi utilizada luz vermelha (<0,2 lux)-filtro 25 A⁴, 58M, acoplado a uma lanterna comum, no período escuro para não alterar a concentração do hormônio, 8 colheitas, com 117 amostras cada em 9 horários, totalizando 936 amostras.

As amostras de sangue para dosar melatonina, foram centrifugadas para obtenção do plasma, com 1500 G por dez minutos. As alíquotas foram identificadas, armazenadas e estocadas em ependorf, ato contínuo foram congelados a -18°C até o momento em que se efetuaram as análises em São Carlos, no laboratório de Fisiologia. O anticorpo ovino⁵ (G/S704-6483 ou G/S/704-8483) foi utilizado para a dosagem de melatonina, sendo 100% de especificidade para caprinos, já diluído (dois mL) e fracionado em ependorf de 500µL, o método de dosificação foi o de Frazer et al., (1983).

Para a dosagem de cortisol (endógeno) e progesterona (endógena e exógena) foram colhidas amostras de sangue diárias, pela manhã, durante 16 dias (12 dias da superestimulação ovariana e quatro dias posteriores a retirada do CIDR-G) (D₀-D₁₆).

⁴Tokina Co. Ltd-Japão

⁵Stockgrand Ltda, Inglaterra

Foram efetuadas as médias de cada 3 e 4 dias, respectivamente no intuito de minimizar a variação do valor absoluto hormonal e foram denominados momentos (M), para progesterona M₁, 2 e 3 e Cortisol M₁, 2, 3, 4 e 5. Foram dosados pela técnica de radioimunoensaio, no Laboratório de Fisiologia da FCAV-Unesp-Jaboticabal, com Kits comerciais⁶.

7. Fotoperíodo artificial (G2)

O tratamento luminoso foi empregado apenas no G2, durante 45 dias, no período de anestro estacional, entre 15 de junho/2002 até 30 de julho/2002. Os animais ficaram em galpão apropriado no setor de caprinocultura da FCAV-Unesp- Jaboticabal, em baias conjuntas com 3 m²/animal. No galpão, as cinco cabras Alpinas receberam suplementação luminosa média de 120 luxes composta de quatro lâmpadas fluorescentes de 40W, dispostas entre elas de um metro e meio com dois metros de altura. O grupo G2 (fotoperíodo artificial) recebeu o tratamento luminoso distante 600 metros dos outro grupos (G1, G3, G4 e G5).

O período luminoso (claro) foi de 20 h diárias (natural-11,26 h + artificial - 8,74 h), perfazendo as 20 h, de acordo com a técnica de Wilkinson & Stark (1987).

⁶Coat-A-Count, Total Progesterone e Cortisol, DPC®

8. Colheita dos oócitos

Os oócitos foram colhidos em duas épocas do ano. Em fevereiro/2002, as cabras do grupo G1, G4 e G5, em estro estacional, foram superovuladas e foram colhidos os oócitos. Em setembro/2002 foram colhidos os oócitos provenientes do grupo G2 (fotoperíodo artificial, realizado anteriormente entre junho e julho/2002) e G3, cabras em anestro com fotoperíodo natural. Os oócitos das cabras foram colhidos no Hospital Veterinário da FCAV. Para isso, os animais foram submetidos ao jejum sólido e hídrico de 24 h e 12 h respectivamente. Após este jejum, foram pré-anestesiadas com sulfato de atropina⁷ (0,02mg/Kg/peso corporal IM) e anestesiadas 15 minutos após por punção da veia jugular com Cloridrato de Xilazina⁸(0,2mg/Kg/peso corporal) e Cloridrato de Quetamina⁹ (2-3mg/Kg peso corporal) na mesma seringa.

Após tricotomia na região abdominal foi efetuada, anti-sepsia com iodo e abertura do abdômen, cinco cm cranial à glândula mamária. Os ovários, após exposição, iniciou-se a aspiração folicular com scalp 19 G (Figura 1), acoplados a seringa de 20 mL contendo cinco mL de PBS suplementado com 10 unidades de heparina/mL. A incisão cirúrgica foi suturada com fio catagute nº 2 (peritoneo e musculatura) e na pele sutura simples com nylon e fez-se antibioticoterapia (Oxitetraciclina¹⁰ -1mL/Kg peso corporal/três dias alternados).

⁷Ariston Ind. Química e Farmacêutica Ltda-Brasil Lote 5693-partida 03/02

⁸Bayer do Brasil-partida 004/01

⁹Holliday-Ind. Argentina, Scott S/A, Argentina

¹⁰Pfizer do Brasil Ltda, partida 009/01

O monitoramento para a recuperação dos animais foi efetuado durante todo o processo cirúrgico e após, até o restabelecimento dos mesmos. Logo após, os oócitos foram transferidos ao Laboratório de FIV para o processo de avaliação e seleção, maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário.

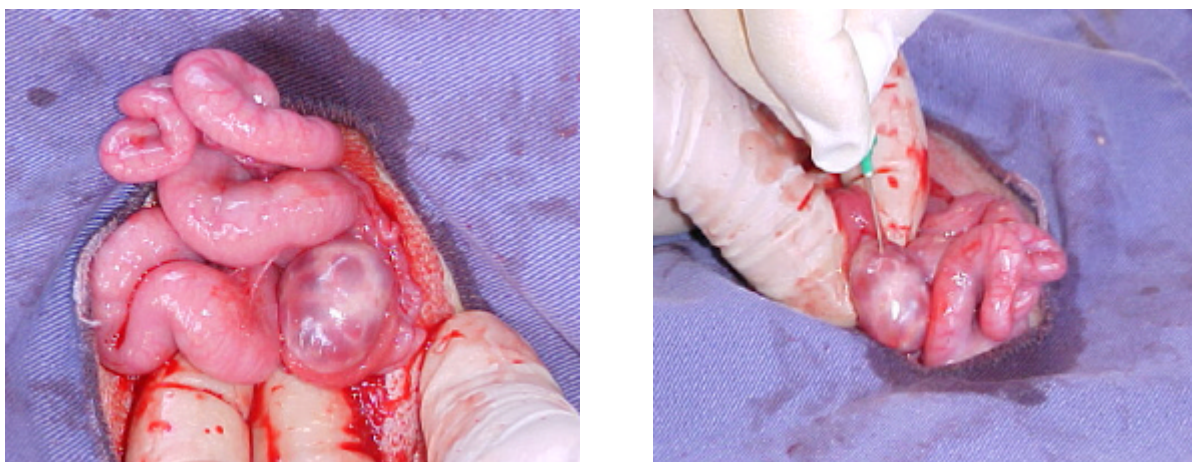


Figura 1- Ovário exposto para o procedimento de aspiração folicular.

9. Maturação “*in vitro*”

Os oócitos foram lavados por três vezes em TCM-199, suplementado com 20 mM de hepes, 5 mM de NaHCO_3 e 10% de soro de cabra no estro. O cultivo para maturação foi realizado por 27 horas a $38,5^\circ\text{C}$ em atmosfera de 5% de CO_2 em ar no TCM-199 (Sigma), suplementado com 10% de soro de cabra em estro, $1\mu\text{g/mL}$ de estradiol, $10\mu\text{g/mL}$ de FSH e $10\mu\text{g/mL}$ de LH.

A extrusão do primeiro corpúsculo polar foi examinada por microscopia de contraste de fase em microscópio invertido para avaliação da taxa da maturação.

10. Capacitação espermática

O conteúdo de uma palheta média de sêmen congelado foi submetido a um gradiente de percoll (90/45) a uma força de 700 g durante 30 minutos, para separação dos espermatozoides viáveis.

O sedimento espermático foi ressuspenso em meio de fecundação suplementado com 20% de soro de ovelha no estro e PHE (Anexos) segundo Bavister (1989). A capacitação espermática foi de 1×10^6 espermatozoides/mL em microgotas de 100 μ L, sob óleo mineral durante 90 a 120 minutos à temperatura de 38,5°C e atmosfera de 5% de CO₂ em ar. Para o sêmen fresco foi utilizado a mesma metodologia, excetuando uma primeira lavagem por 10 minutos com TL-sêmen (Anexos) após a colheita e deste retirado 0,5 mL referente ao volume da palheta de sêmen congelado. Para o G4, 200 μ g/mL de heparina na capacitação espermática foi adicionado no lugar de 20% de soro de ovelha em estro.

11. Fertilização “*in vitro*”

Os oócitos maturados “*in vitro*” foram adicionados aos espermatozóides capacitados nas gotas de meio imersos em óleo mineral. Incubou-se os oócitos em 100mL de meio de fecundação contendo 100×10^3 de espermatozóides, por 17 h a 38,5 °C, em estufa com 5% CO₂ em ar.

12. Cultivo embrionário

Após fecundação os prováveis zigotos foram transferidos para microgotas de 100 µl de meio SOF modificado (Anexos), suplementado com 5 µg de BSA, 2,5% de soro fetal bovino e cultivados por sete dias à temperatura de 38,5°C, na atmosfera de 5% de CO₂ em ar.

O meio foi parcialmente (50% a 70%) renovado a cada 48h. Os embriões foram avaliados com 30 e 144h para avaliação da clivagem e desenvolvimento embrionário. Após esse prazo, as células foram submetidas ao cultivo e coloração por 10 minutos com 10 µg/mL de Hoeschst 33342 em meio de lavagem (TCM-199-Sigma). Observou-se os oócitos corados em microscópio de epifluorescência para avaliação da dinâmica nuclear. Os fecundados apresentaram dois pró-núcleos e os não fecundados permaneceram em metáfase II.

13. Análise Estatística

Para caracterizar os dados dos grupos em cada momento foram utilizados médias e desvios padrão ($X \pm s$) e mediana (Md).

Para as comparações entre grupos em cada momento, dependendo do tipo da variável, foi utilizada ou a prova não-paramétrica de Kruskal-Wallis ou Análise de variância. Em ambas as situações foram explicitados os níveis de significância (p-value).

Para as comparações entre momentos dentro de cada grupo foi utilizada a prova não-paramétrica de Friedman.

Em todas as análises efetuadas foram consideradas diferenças significativas quando $p < 0,05$. Nos casos em que $0,05 < p < 0,10$ foi referida tendência à significância (p é a probabilidade de erroneamente concluir pela significância) e para a melatonina foi efetuada somente análise descritiva (Curi, 1997).

RESULTADOS

Foram puncionados todos os folículos superiores a 3 mm, o que possibilitou a obtenção de 720 oócitos, em cinco grupos, 31 animais. O número de oócitos conseguidos separadamente por grupos foi 175; 139; 156; 126 e 124 para o G1; G2; G3; G4 e G5, respectivamente (Tabela 1). Todos os oócitos colhidos foram submetidos ao processo de maturação, encontrando-se seis; nove; 18; zero e oito estruturas fertilizadas para o G1; G2; G3; G4 e G5, respectivamente, sendo que todas estas apresentaram clivagem celular. O número de blastocistos produzidos foi zero; dois; cinco; zero e zero, respectivamente para G1; G2; G3; G4 e G5, ($p>0,05$).

Todos os oócitos obtidos foram provenientes da aspiração por laparotomia, conseguindo estruturas com e sem *cumulus oophorus* (Figura 2).

Quanto à clivagem, a maior porcentagem foi verificada no G3, cujos animais encontravam-se em anestro estacional (Tabela 1).

A produção média de oócitos por animal, em ordem crescente, foi 17,7; 18,0; 25,0; 27,8 e 31,2, para o G5; G4; G1; G2 e G3, respectivamente, enquanto a porcentagem de clivagem foi zero; 3,42; 6,45; 6,47 e 11,5%, respectivamente para G4; G1; G5; G2 e G3. A produção de blastocisto foi zero para G1; G4 e G5, dois (1,4%) no G2 e cinco (3,2%) no G3.

Foram encontrados oito corpos lúteos no G1, dois no G4 e G5, durante a estação reprodutiva, no período de anestro estacional, no G2 e G3 não foi observado nenhum corpo lúteo.

Tabela 1 – Número total de oócitos, oócitos maturados, oócitos fertilizados, oócitos clivados e blastocistos em cabras submetidas ou não ao fotoperíodo artificial, durante a estação e anestro estacional. Jaboticabal, 2002.

Grupos	Animais	Oócitos	Maturados	Fertilizados	Clivados	Blastocistos	Observações
G1	7	175	175	6	6	0	8 corpos lúteos
G2	5	139	139	9	9	2	Sem corpos lúteos
G3	5	156	156	18	18	5	Sem corpos lúteos
G4	7	126	126	0	0	0	2 corpos lúteos
G5	7	124	124	8	8	0	2 corpos lúteos
Total	31	720	720	41	41	7	12 corpos lúteos

Houve diferença estatística ($p < 0,05$) para a variável clivados (Tabela 2), sendo ($G1=G4=G5$) $<G3$ com G2 intermediário. Nas outras variáveis, não houve diferença estatística ($p > 0,10$). Os blastocistos foram conseguidos no G3 (5) e G2 (2) e foram congelados nessa fase (Figura 4 C).

Tabela 2 – Número total de oócitos, oócitos maturados, oócitos clivados e blastocistos. Média, desvio padrão ($X \pm s$) e mediana (Md) em cada grupo. Estatística para a comparação entre grupos e comentários, Jaboticabal, 2002.

Grupos Variável	G1	G2	G3	G4	G5	Estatística
Oócitos	18 $\pm$ 10,64	27,8 $\pm$ 10,38	31,2 $\pm$ 5,64	25 $\pm$ 9,18	20,7 $\pm$ 6,45	$p > 0,10$ grupos não diferem
Maturados	18 $\pm$ 10,64	27,8 $\pm$ 10,38	31,2 $\pm$ 5,64	25 $\pm$ 9,18	20,7 $\pm$ 6,45	$p > 0,10$ grupos não diferem
Clivados	0,86 $\pm$ 0,83	1,8 $\pm$ 0,75	3,6 $\pm$ 1,02	0 $\pm$ 0	1,3 $\pm$ 0,94	$P < 0,05$ ($G1=G4=G5$) $< G3$ G2 intermediário
Blastocistos	0 $\pm$ 0	0,4 $\pm$ 0,49	1 $\pm$ 1,26	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	$p > 0,05$ grupos não diferem

Iniciou-se o processo de maturação para todos os oócitos e após a maturação, todos apresentaram uma expansão celular e extrusão do corpúsculo polar após completar o processo (27h) (Figura 3 C) e assim foram colocados para fertilização.

Alguns oócitos aspirados apresentaram-se desnudos (Figura 2), porém a maioria apresentou “*cumulus oophorus*”. A clivagem aconteceu após 27 h de maturação, 17 h de fertilização e 48 h de desenvolvimento (Figura 4 A e B), chegando a mórula e blastocistos do G2 e G3 (Figura 4 C), foram visualizados 7 dias após a fertilização. Além disso, considerou-se os fertilizados apenas os clivados, pois todos foram corados e não apresentaram penetração do espermatozóide. O G4 (heparina 200µg/mL) (Tabela 1) e G5 (sêmen fresco) não atingiram blastocistos, porém o G5 apresentou 8 células clivadas em até 4 divisões.

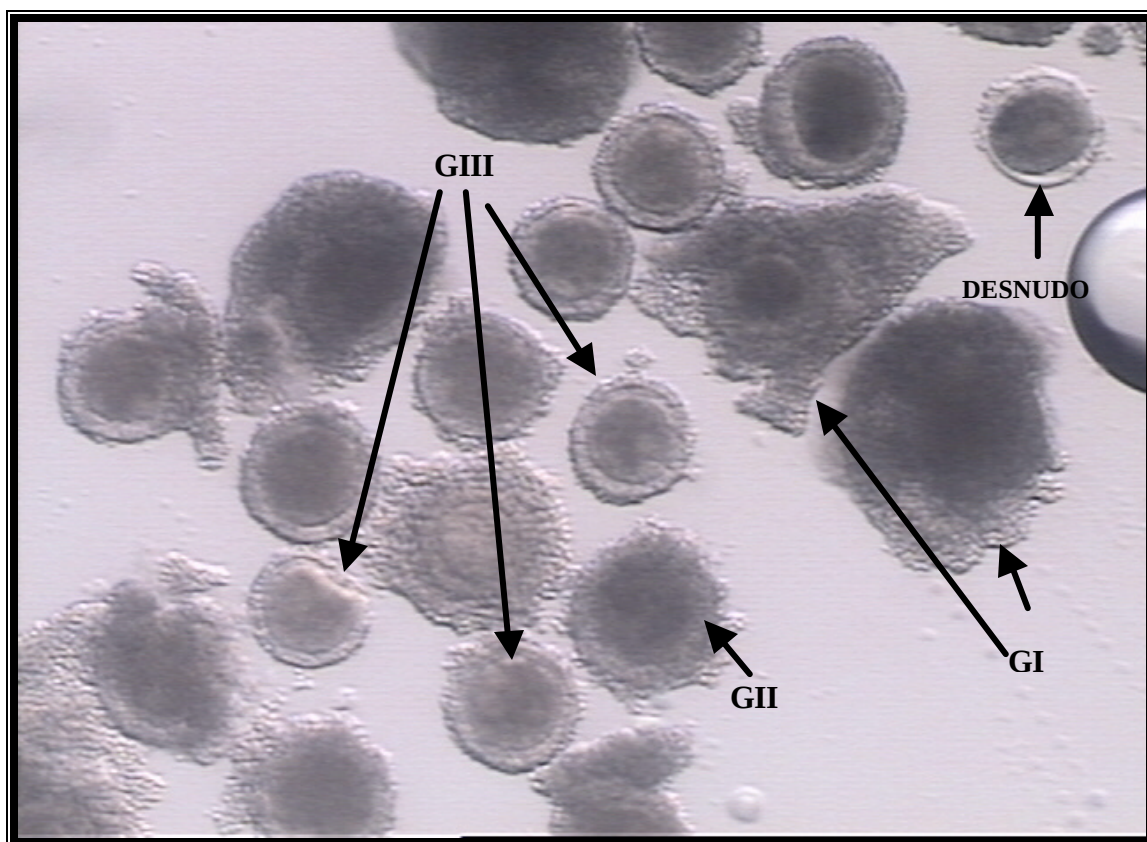


Figura 2- Figura demonstrativa dos complexos *cumulus* oócitos (COCS) obtidos por aspiração dos folículos de cabras submetidas à laparotomia, tratamento com foto período artificial e estimulação com FSH.

GI: cocs de melhor qualidade

GII: cocs de qualidade média

GIII: cocs de qualidade baixa

DESNUDO: sem revestimento de células do *cumulus*.

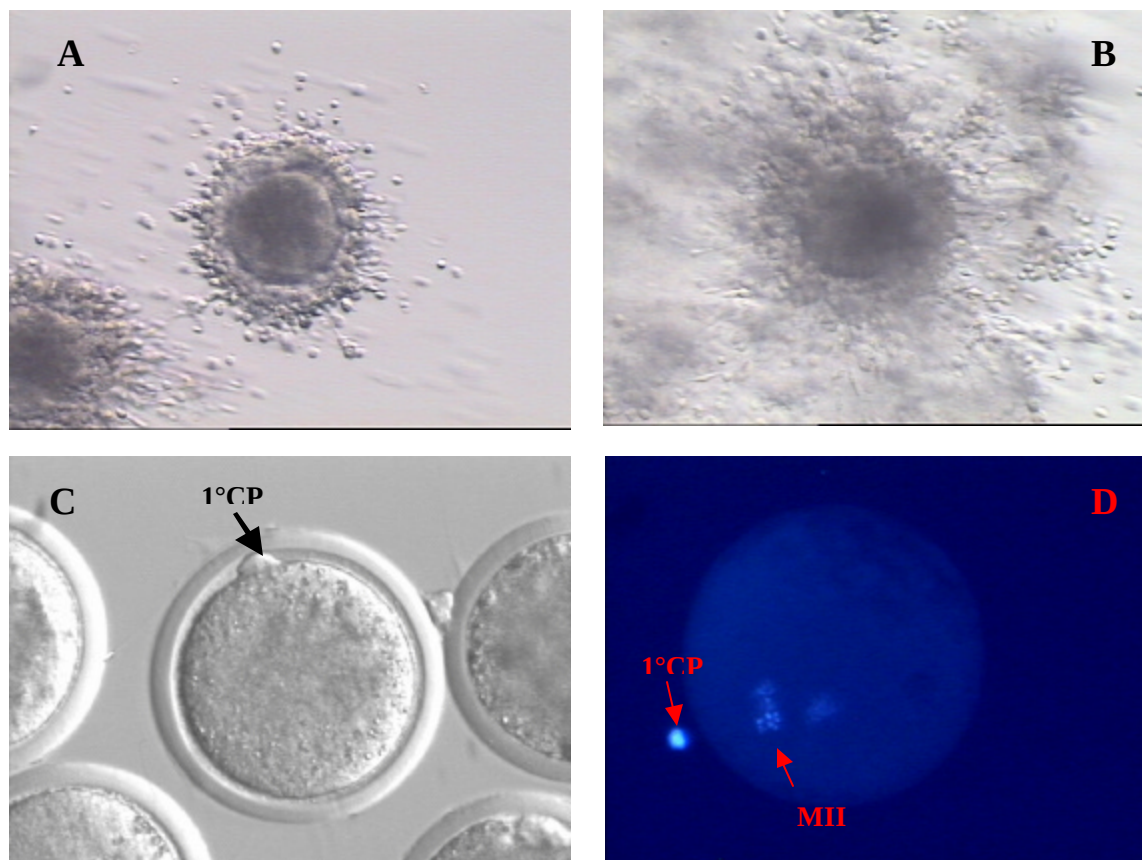


Figura 3- Figuras demonstrativas dos oócitos de cabras depois de cultivados para maturação durante 27 horas.

A: oócito GII apresentando expansão do *cumulus*

B: oócito GI apresentando expansão do *cumulus*

C: oócito maturado apresentando o primeiro corpúsculo polar (1°CP)

D: oócito maturado e corado com Hoechst 33342, apresentando o primeiro corpúsculo polar (1°CP) e metáfase II (MII).

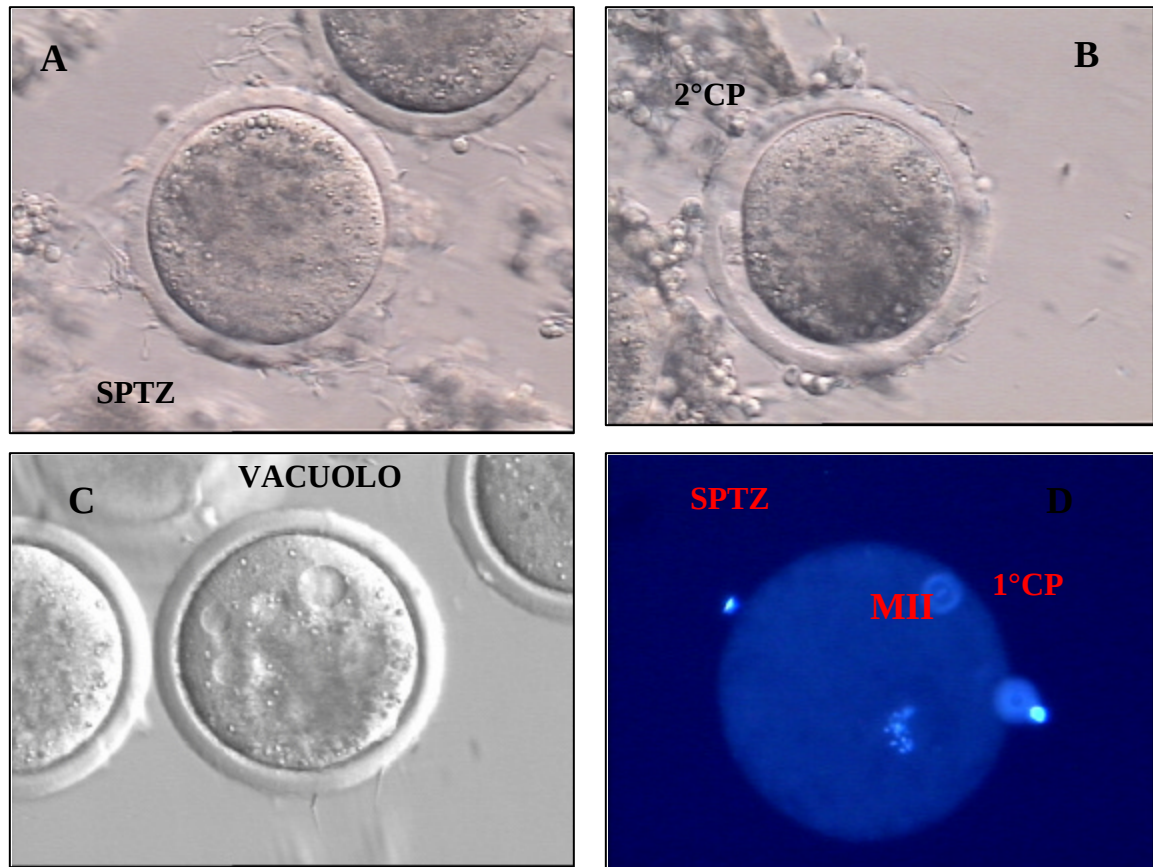


Figura 4 Figura demonstrativa dos oócitos e zigotos de cabras depois de serem submetidos à fecundação “*in vitro*” por 12 horas.

- A: oócito apresentando espermatozóides (SPTZ) aderidos à zona pelúcida
B: Zigoto apresentando o segundo corpúsculo polar (2°CP)
C: oócito ou zigoto apresentando vacuolização (VACUOLO)
D: oócito apresentando metáfase II (MII), primeiro corpúsculo polar (1°CP) e espermatozóide (SPTZ) aderido à Zona Pelúcida.

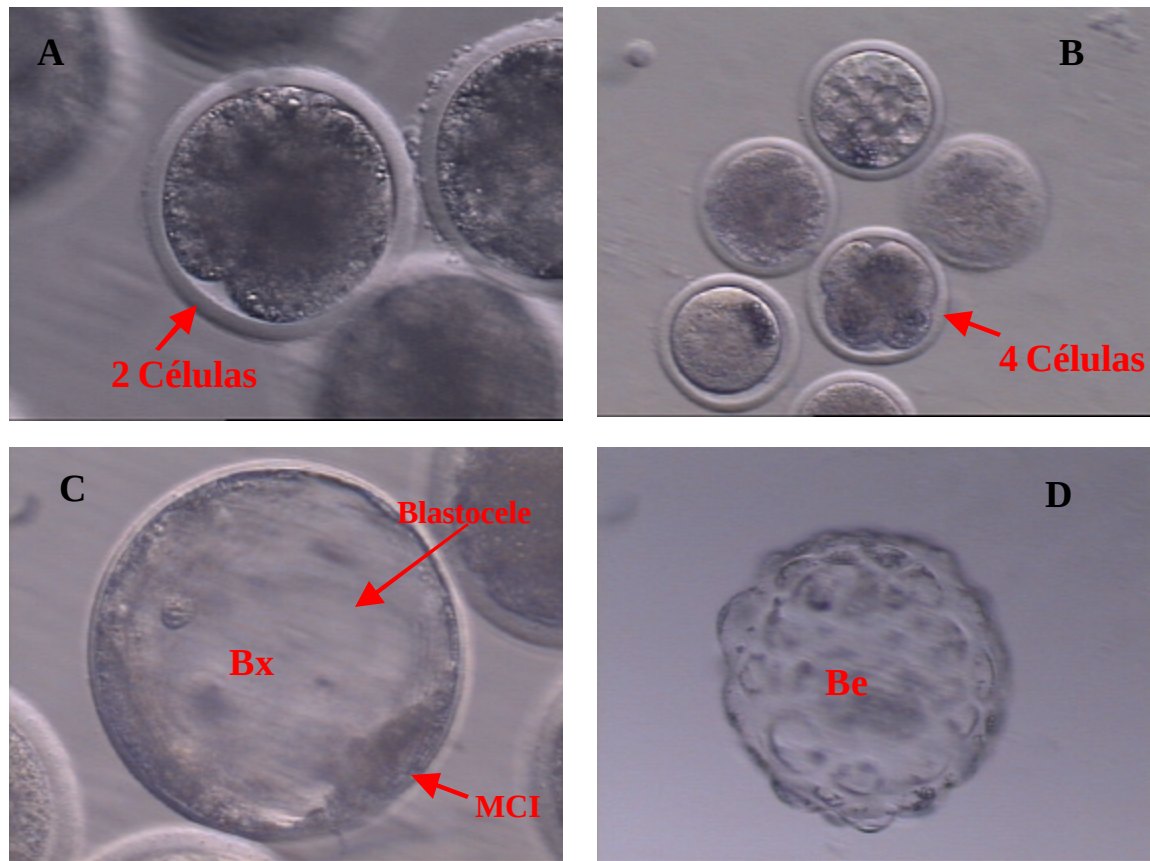


Figura 5- Figura demonstrativa dos embriões de cabras produzidos “*in vitro*” durante o cultivo nos diferentes estádios do desenvolvimento.

A: embrião de cabra apresentando duas células

B: embrião de cabra apresentando 4 células

C: embrião de cabra no estágio de Blastocisto expandido (Bx) apresentando a Blastocele e Massa celular interna (MCI)

D: embrião de cabra no estágio de Blastocisto eclodido (Be).

As concentrações plasmáticas médias de progesterona (ng/mL) encontravam-se elevadas em valores absolutos no período da estação reprodutiva no mesmo dia em todos os grupos. O grupo superestimulado (G1) apresentou níveis médios elevados no D₀ de progesterona endógena, G1 (53,0 ng/mL), G2 (33,0 ng/mL) e G3 (27,2 ng/mL) e houve redução após esse período, porém os demais grupos G2 e G3 também apresentaram redução no nível de progesterona plasmática, mesmo sem o CIDR-G. No entanto, para melhor visualização e trabalho estatístico, condensamos pelas médias em momentos (M₁, M₂ e M₃), os 16 dias de colheitas sempre somando três dias consecutivos e obtendo sua respectiva média para minimizar o efeito variável dos valores de progesterona em cada dia, nos dias de colheita. Os resultados da análise estatística estão expostos na Tabela 3 e Figura 6 (médias e medianas). No período da estação houve redução no nível de progesterona plasmática do M₁ para o M₃ e todos foram diferentes ($p < 0,05$) para todos os grupos (Tabela 3). No momento M₁ não houve diferença estatística e os grupos estavam iguais em valores, como em M₃. Porém, no M₂ houve tendência de $G1 = (G2 = G3)$ (Tabela 3). Visualiza-se na Figura 6 os resultados apresentados na Tabela 3. Quando se comparam momentos em cada grupo, observa-se que no G1, os momentos $M_1 > M_2 > M_3$, foram idênticos ao G2, porém no G3 apresentou $M_1 > (M_2 = M_3)$, todos $p < 0,05$.

Tabela 3 – Concentrações plasmáticas médias de progesterona (ng/mL) de cabras submetidas ou não ao fotoperíodo artificial na estação reprodutiva. Médias e desvios padrão ($X \pm s$) e medianas (valores entre parêntesis) dos grupos em cada momento. Estatísticas (p-value) para comparação entre grupos em cada momento e entre momentos em cada grupo. Comentários, Jaboticabal, 2002.

Momentos		Comparação entre momentos			
Grupos		M ₁	M ₂	M ₃	em cada grupo
G1	Média	14,72±9,25	2,83±0,24	0,40±0,25	P<0,05; M ₁ >M ₂ >M ₃
	Mediana	(12,78)	(2,82)	(0,42)	
G2	Média	18,83±18,24	1,27±1,14	0,34±0,48	p<0,05; M ₁ >M ₂ >M ₃
	Mediana	(7,52)	(2,91)	(0,11)	
G3	Média	8,13±9,25	1,01±1,53	0,47±0,53	p<0,05; M ₁ >(M ₂ =M ₃)
	Mediana	(2,30)	(0,14)	(0,14)	
Comparação entre grupos em cada momento		p>0,10 G1=G2=G3	0,05<p<0,10 tendência G1=(G2=G3)	p>0,10 G1=G2=G3	

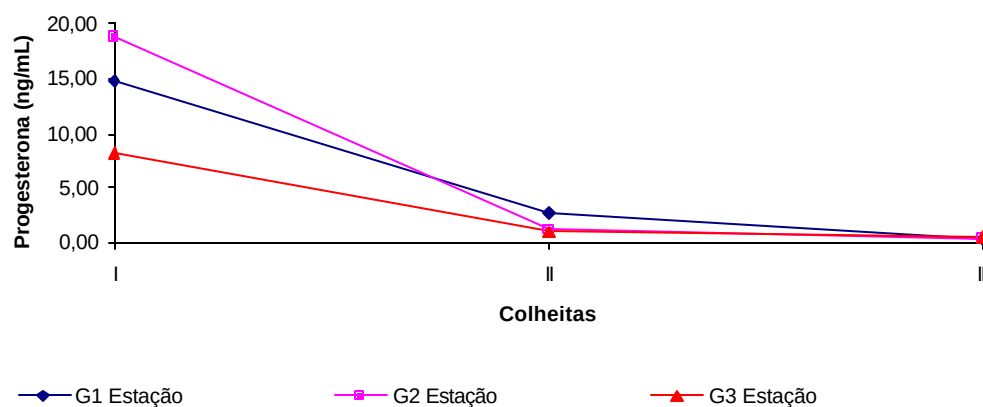


Figura 6 – Concentrações plasmáticas médias de progesterona (ng/mL) em cabras submetidas ou não ao fotoperíodo artificial durante a superestimulação ovariana do G1, na estação reprodutiva. Jaboticabal, 2002.

No período do anestro estacional, o valor médio absoluto de progesterona plasmática estava baixo (D_0) em todos os grupos. O G1 apresentou valor de progesterona endógena de 0,05 ng/mL, G2 0,09 ng/mL e G3 0,06 ng/mL. A sincronização e superestimulação ovariana nesse período apresentaram aumento devido ao dispositivo CIDR-G nos grupos G2 e G3, porém o G1 também mostrou elevada sua concentração de progesterona plasmática endógena. Os momentos nesse período foram diferentes ($p < 0,05$) para os grupos, sendo que G1 apresentou ($M_1 = M_2$) $> M_3$, em G2 e G3 $M_1 > M_3$ e M_2 intermediário, coincidindo com o mesmo tratamento hormonal.

Em relação aos grupos em cada momento (Tabela 4), também foram diferentes ($p<0,05$), sendo diferentes no M_3 em que $G1<G3<G2$ e para os momentos M_1 e M_2 , $G1<(G2=G3)$. Na Figura 7 visualiza-se graficamente os valores contidos na Tabela 4, sendo baixos para o G1 ao iniciar o experimento, reduzindo-se no M_2 e M_3 .

Tabela 4 – Concentrações plasmáticas médias de progesterona (ng/mL) em cabras submetidas ou não ao fotoperíodo artificial no anestro estacional. Médias e desvios padrão ($X \pm s$) e medianas (valores entre parêntesis) dos grupos em cada momento. Estatísticas (p-value) para comparação entre grupos em cada momento e entre momentos em cada grupo. Comentários. Jaboticabal, 2002.

Momentos Grupos	Comparação entre momentos em cada grupo		
	M_1	M_2	M_3
G1			
Média	0,85±0,52	0,70±0,31	0,09±0,05
Mediana	(0,54)	(0,80)	(0,09)
	p<0,05; ($M_1=M_2$)> M_3		
G2			
Média	2,34±0,53	1,87±0,52	0,94±0,31
Mediana	(2,42)	(2,22)	(1,04)
	p<0,05; $M_1>M_3$; M_2 intermediário		
G3			
Média	2,99±0,79	2,61±1,07	0,47±0,53
Mediana	(2,75)	(2,58)	(0,22)
	p<0,05; $M_1>M_3$; M_2 intermediário		
Comparação entre grupos em cada momento	p<0,05 $G1<(G2=G3)$	p<0,05 $G1<(G2=G3)$	p<0,05 $G1<G3<G2$

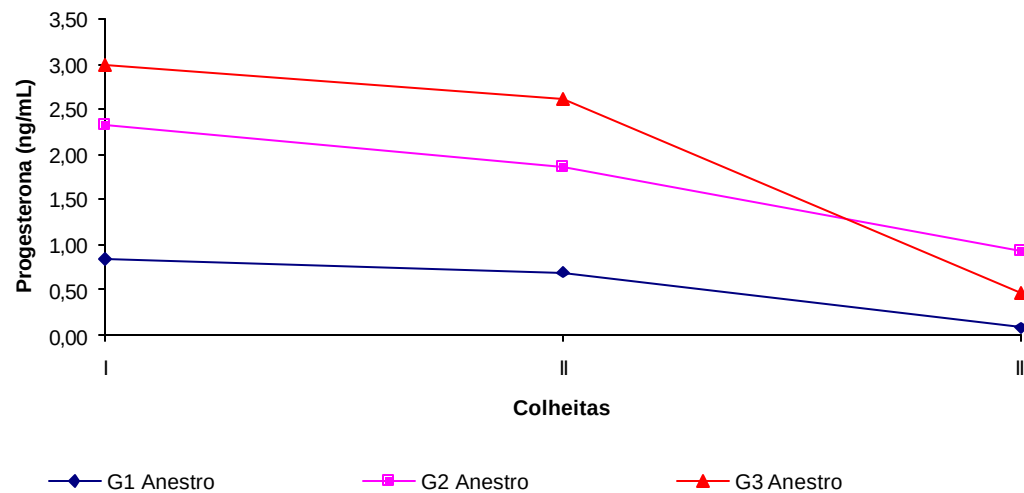


Figura 7 – Concentrações plasmáticas médias de progesterona (ng/mL) em cabras submetidas ou não ao fotoperíodo artificial durante a superestimulação ovariana do G2 e G3, no anestro estacional. Jaboticabal, 2002.

As concentrações médias de cortisol (nmol/L) das cabras do G1, no D₁₂, foram 48 nmol/L, do G2 30,70 nmol/L e do G3 37,20 nmol/L, para o período da estação reprodutiva. No D₁₃, alteraram seus valores para o G1 em 70,60 nmol/L, G2 25,80nmol/L e G3 10,20nmol/L, exatamente 24 h após a realização do ato cirúrgico. O G1 (70,60 nmol/L), grupo que foi submetido à intervenção cirúrgica, apresentou valores maiores que os do G2 (25,80nmol/L) e G3 (10,20 nmol/L). O G1 apresentou ainda aumento no D₁₅ (72h) após o ato cirúrgico (45,50 nmol/L), mas não em quantidades superiores ao D₁₃.

Ao início das colheitas (D_0), os animais não apresentaram níveis altos de cortisol na estação reprodutiva, variando ao longo do tempo, porém não superando valores superiores a 30 nmol/L. Após o D_{12} (*ato cirúrgico), constatou-se aumento nos níveis de cortisol (Figura 8). Nos momentos estudados, houve diferença ($p < 0,05$) para o G1, sendo $M_1 < (M_4 = M_5)$ e $M_2 = M_3$ intermediários (tabela 5). Já para o G2 ($p > 0,10$) $M_1 = M_2 = M_3 = M_4 = M_5$ e G3 $0,05 < p < 0,10$, com tendência $M_2 = (M_3 = M_5)$.

A comparação entre grupos em cada momento, variou a partir do momento M_2 , sendo em M_4 e M_5 ($p < 0,05$), tendenciando a $G1 = G2$ e G3 intermediário e M_5 $G1 > (G2 = G3)$ (Tabela 5). Observa-se na Figura 9, os dados estatísticos da Tabela 5, em que apenas o G1, com intervenção cirúrgica, alterou o valor do cortisol em nmol/mL.

Tabela 5 – Concentrações plasmáticas médias de cortisol (nmol/mL) em cabras submetidas ou não ao fotoperíodo artificial na estação reprodutiva. Média, desvio padrão ($X \pm s$) e mediana (Md) em cada grupo. Estatística para a comparação entre grupos e comentários. Jaboticabal, 2002.

Momentos Grupos	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅	Comparação entre momentos em cada grupo
G1	Média	17,67±12,47	18,19±3,25	18,49±1,51	26,54±10,21	40,94±18,53
	Mediana	(11,41)	(17,91)	(17,59)	(21,92)	(35,67)
G2	Média	11,63±4,31	13,47±4,10	11,03±3,87	14,11±2,57	17,86±14,90
	Mediana	(12,58)	(15,87)	(10,43)	(14,10)	(11,61)
G3	Média	16,44±7,15	19,85±4,48	11,77±5,23	18,88±8,20	16,00±16,51
	Mediana	(17,44)	(20,17)	(10,71)	(19,48)	(7,23)
Comparação entre grupos em cada momento		p>0,10	0,05<p<0,10	p<0,05	0,05<p<0,10	p<0,05
		G1=G2=G3	tendência	G1>(G2=G3)	tendência	G1>(G2=G3)
			(G1=G3)=G2		G1=G2	
					G3	
					intermediário	

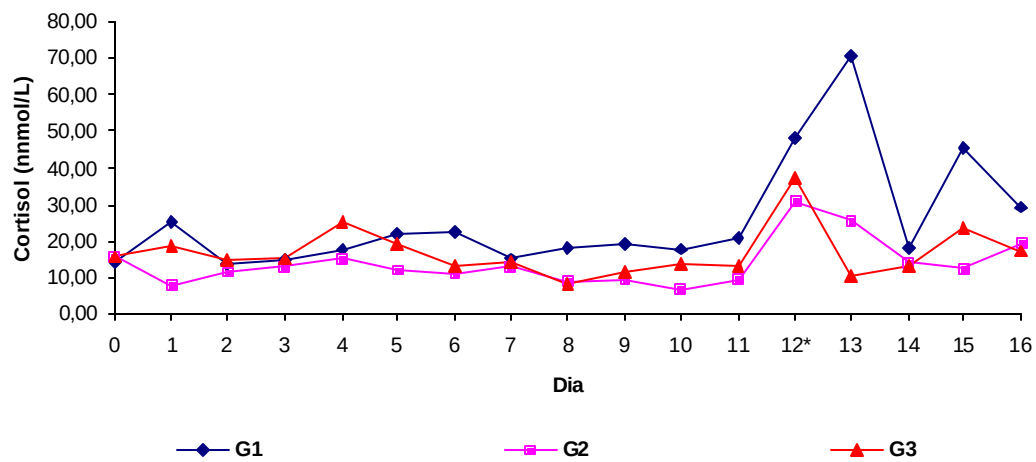


Figura 8 – Concentrações plasmáticas médias de cortisol (nmol/L) em cabras submetidas ou não ao fotoperíodo artificial, durante a superestimulação ovariana do G1, na estação reprodutiva, Jaboticabal, 2002.

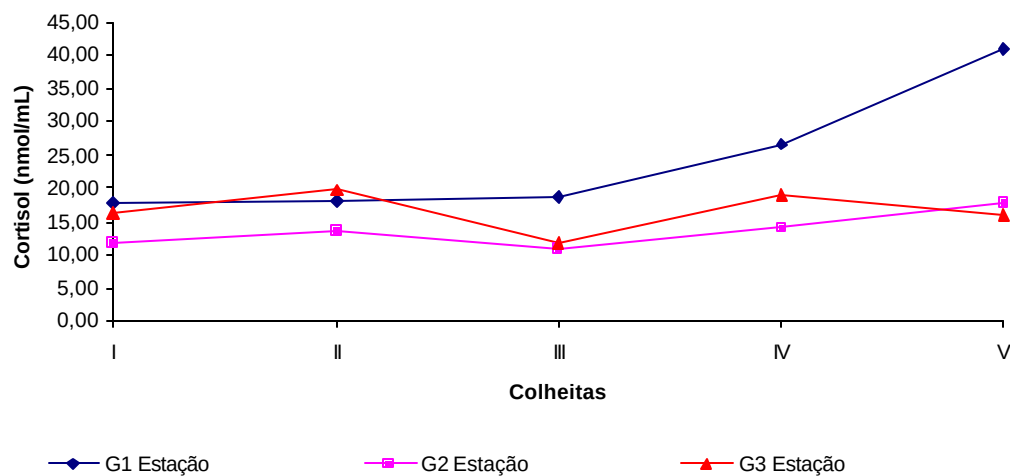


Figura 9 – Concentrações plasmáticas médias de cortisol (nmol/mL) em cabras submetidas ou não ao fotoperíodo artificial, durante a superestimulação ovariana do G1, na estação reprodutiva, Jaboticabal, 2002.

Para o período de anestro estacional, ao iniciar as colheitas (D_0), os valores de cortisol (nmol/L) apresentaram-se elevados (superiores a 20nmol/L) enquanto que no período da estação reprodutiva estavam entre 10 e 20 nmol/L, principalmente no G1 (45,24nmol/L), em relação aos demais: G2 (25,21nmol/L) e G3 (31,78 nmol/L). Após esse período do D_0 , os valores continuaram a oscilar, porém ficaram entre 45 e 9 nmol/L até o D_{12} (*ato cirúrgico para o G2 e G3). No D_{13} , os valores anteriores (D_{12}) de G1 (11,79nmol/L), G2 (13,56 nmol/L) e G3 (25,84nmol/L) passaram a G1 (22,54nmol/L), G2 (49,85nmol/L) e G3 (70,19nmol/L). Após esse período os valores permaneceram entre 9 e 30nmol/L (Figura 10).

Em todos os momentos estudados para o G1, foram iguais e não houve diferença estatística ($p > 0,10$) $M_1 = M_2 = M_3 = M_4 = M_5$, já no G2 houve tendência ($0,05 < p < 0,10$) e $(M_1 = M_5) = M_2$. Em M_5 , $G1 = G3$, com G2 intermediário (tabela 6).

Elucidando melhor, a Figura 11 pode colaborar no entendimento estatístico dos momentos ou complementar os comentários da tabela 7. Notou-se no G2, no M_5 , após a intervenção cirúrgica, não acompanhou os valores do G3 em que sofreu a mesma intervenção, ficando intermediário e ($0,05 < p < 0,10$).

Tabela 6 - Concentrações plasmáticas médias de cortisol (nmol/mL) em cabras submetidas ou não ao fotoperíodo artificial no anestro estacional. Média, desvio padrão ($X \pm s$) e mediana (Md) em cada grupo. Estatística para a comparação entre grupos e comentários. Jaboticabal, 2002.

Momentos		M ₁	M ₂	M ₃	M ₄	M ₅	Comparação entre momentos em cada grupo
Grupos	Média	42,53±27,39	21,93±16,36	14,54±7,40	16,57±8,00	13,18±9,43	
	Mediana	(48,36)	(14,25)	(11,23)	(16,28)	(8,59)	p>0,10; M ₁ =M ₂ =M ₃ =M ₄ =M ₅
G1							
G2	Média	19,50±8,24	9,47±4,78	13,14±9,70	10,82±3,31	26,70±15,39	0,05<p<0,10
	Mediana	(18,12)	(9,33)	(9,25)	(11,36)	(22,67)	tendência (M ₁ =M ₅)=M ₂
G3	Média	22,96±13,84	12,61±9,76	23,57±27,20	20,72±14,79	35,35±17,10	
	Mediana	(18,09)	(6,49)	(11,62)	(17,80)	(30,90)	0,05<p<0,10; tendência M ₅ =M ₂
Comparação entre grupos em cada momento		p>0,10 G1=G2=G3	p>0,10 G1=G2=G3	p>0,10 G1=G2=G3	p>0,10 G1=G2=G3	0,05<p<0,10 tendência G1=G3 G2 intermediário	

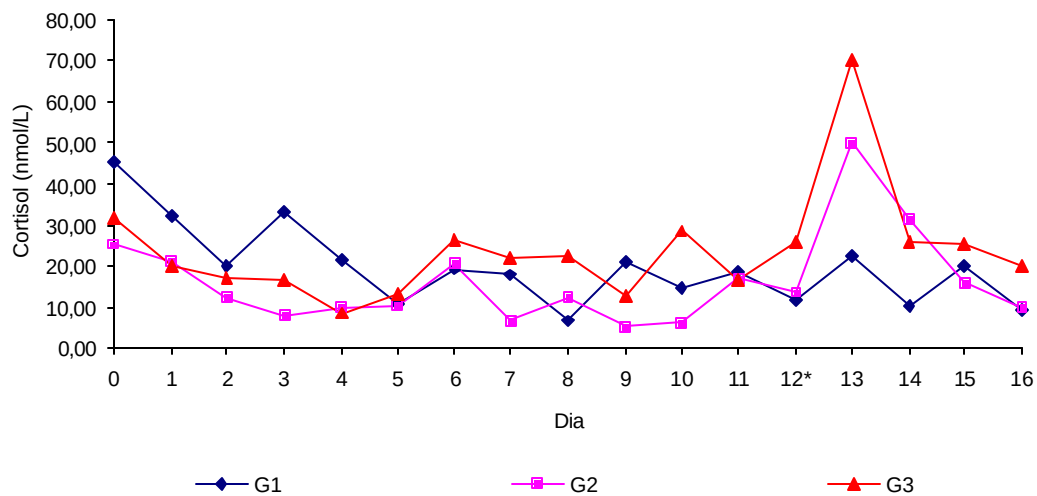


Figura 10 – Concentrações plasmáticas médias de cortisol (nmol/L) em cabras submetidas ou não ao fotoperíodo artificial, durante a superestimulação ovariana do G2 e G3, no período do anestro estacional. Jaboticabal, 2002.

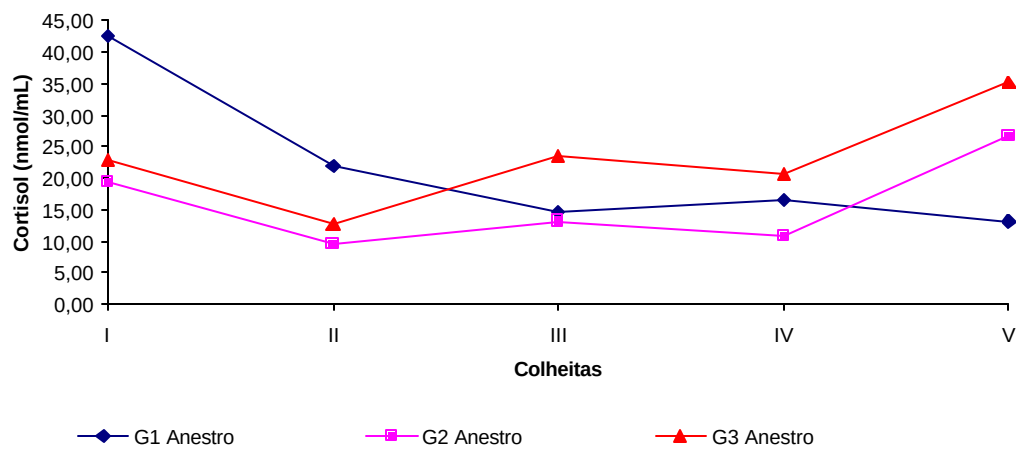


Figura 11- Concentrações plasmáticas médias de cortisol (nmol/mL) em cabras submetidas ou não ao fotoeríodo artificial, durante a superestimulação ovariana do G2 e G3, no anestro estacional. Jaboticabal, 2002.

A dosagem de melatonina do dia 08/06/2002 (Figura 12), anterior a suplementação luminosa, apresentou-se crescente a partir das 17 h (primeira colheita da série). O período escuro para a data está entre as 17 h 35 min até às 06 h 47 min do dia seguinte e especificado em todas as figuras com tracejado escuro contínuo, calculado para todas as datas. Para os grupos G1 e G2, a dosagem média foi crescente até às 21 h e para G3 às 19 h. Decresceu para os três grupos à 1h, elevando-se até às 3h, porém mais para o G3 que G1 e G2. Às 09 h, no dia 09/06/2002, as dosagens médias dos três grupos estavam baixas.

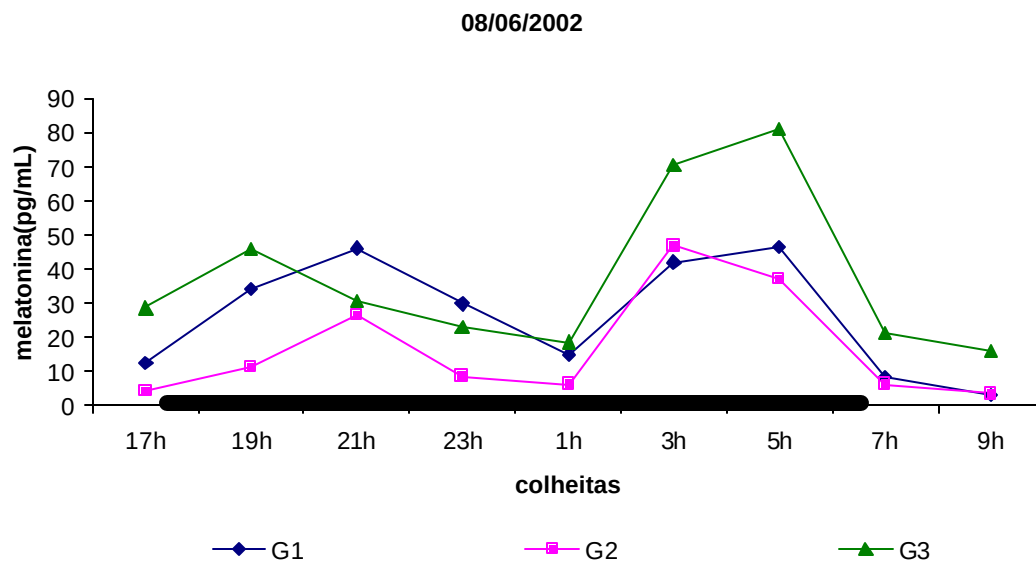
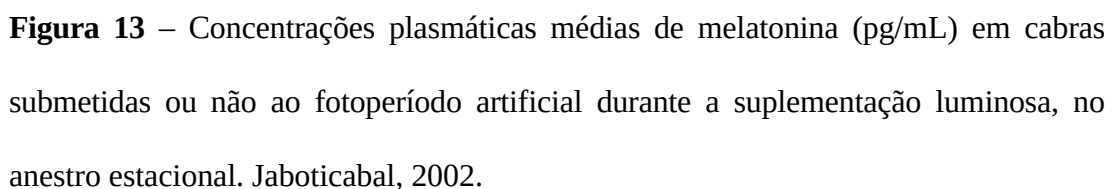


Figura 12 – Concentrações plasmáticas médias de melatonina (pg/mL) em cabras submetidas ou não ao fotoperíodo artificial, anterior ao fotoperíodo artificial, no anestro estacional. Jaboticabal, 2002.

O grupo G1 apresentou dosagem média para melatonina maior às 23 h intermediário para o grupo G3 e mais baixa no grupo G2. Às 09 h os três grupos apresentaram quantidades de melatonina média ainda elevadas para o horário.



Após 45 dias da suplementação luminosa, em 17/08/2002, já em fotoperíodo natural, os grupos G1, G2 e G3 apresentaram dosagens médias de melatonina mais próximas entre si. O pico maior ocorreu às 19 h para o G3, enquanto que para o G1 às 05 h. Às 09 h os grupos ainda tinham quantidades crescentes de melatonina (Figura 14). O período escuro está compreendido entre 17 h 54 min até às 06 h 43 min.

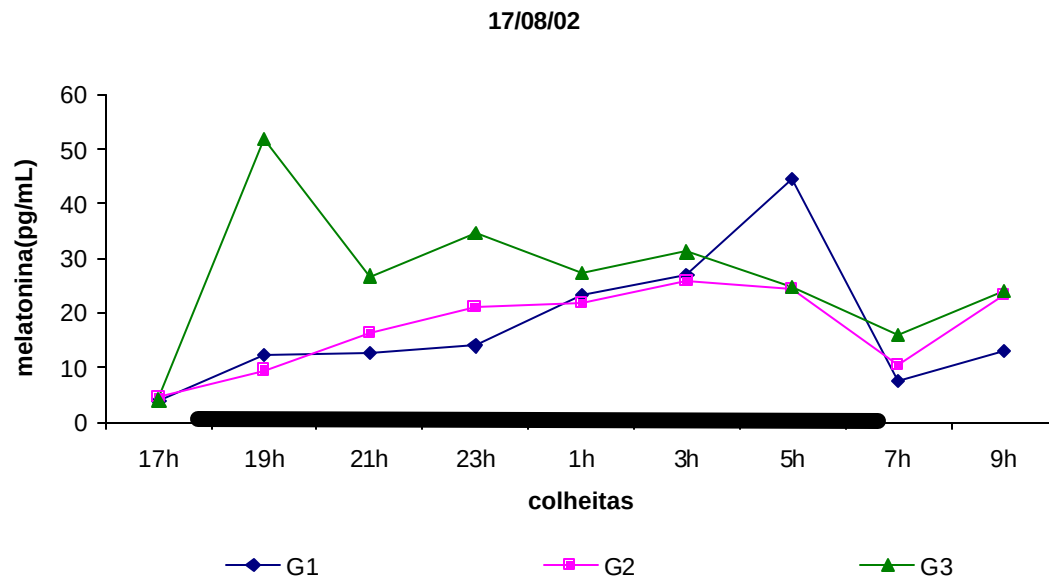


Figura 14 – Concentrações plasmáticas médias de melatonina (pg/mL) em cabras submetidas ou não ao fotoperíodo artificial após a suplementação luminosa, no anestro estacional. Jaboticabal, 2002.

No período CIDR-G, em época de anestro estacional, durante a superestimulação ovariana, a dosagem média para a melatonina, nos três grupos, apresentou-se irregular durante toda colheita (Figura 15). Picos crescentes e decrescentes durante todos os horários foram observados, sendo que às 09 h, a dosagem média estava mais baixa durante todo o período de análise. O período escuro da época está entre 17 h 57 min e 06 h 36 min.

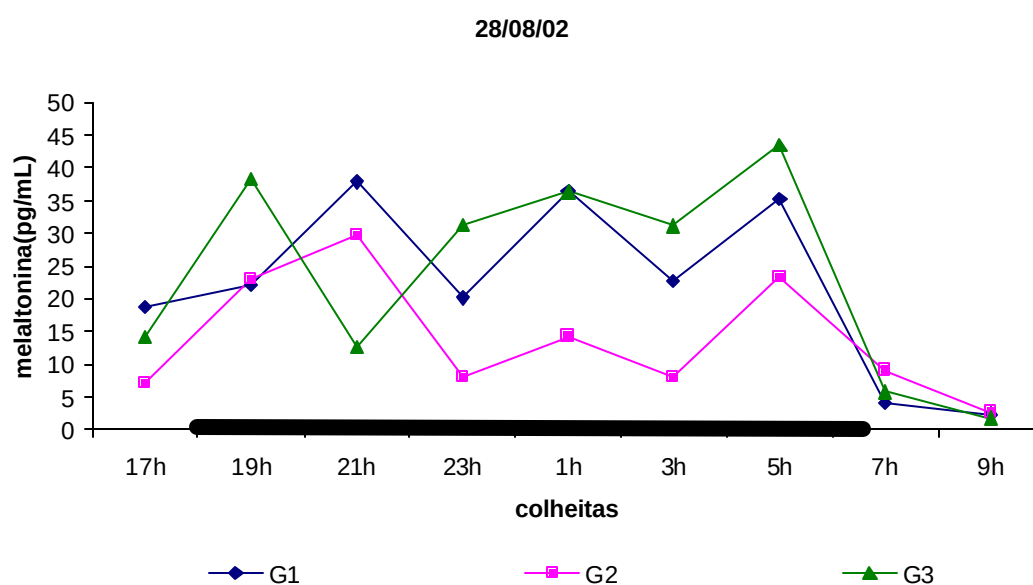


Figura 15 – Concentrações plasmáticas médias de melatonina (pg/mL) em cabras submetidas ou não ao fotoperíodo artificial durante o período CIDR-G da superestimulação ovariana dos grupos G2 e G3, no anestro estacional. Jaboticabal, 2002.

Em 31/08/2002, no período CIDR-G + FSH-ov, durante a superestimulação ovariana do G2 e G3, a melatonina estava mais uniforme entre os grupos estudados G1, G2 e G3 (Figura 16). Foi crescente a partir das 17 h, reduzindo-se no horário de 23 h, voltando a elevar-se à 01 h. Observa-se ainda que no G1, às 09 h, estava baixo, intermediário para G3 e alta para o G2. O período escuro está compreendido entre 18 h até 06 h 27 min. Esta colheita ocorreu três dias após a anterior, reduzindo o período escuro em praticamente 1 h.

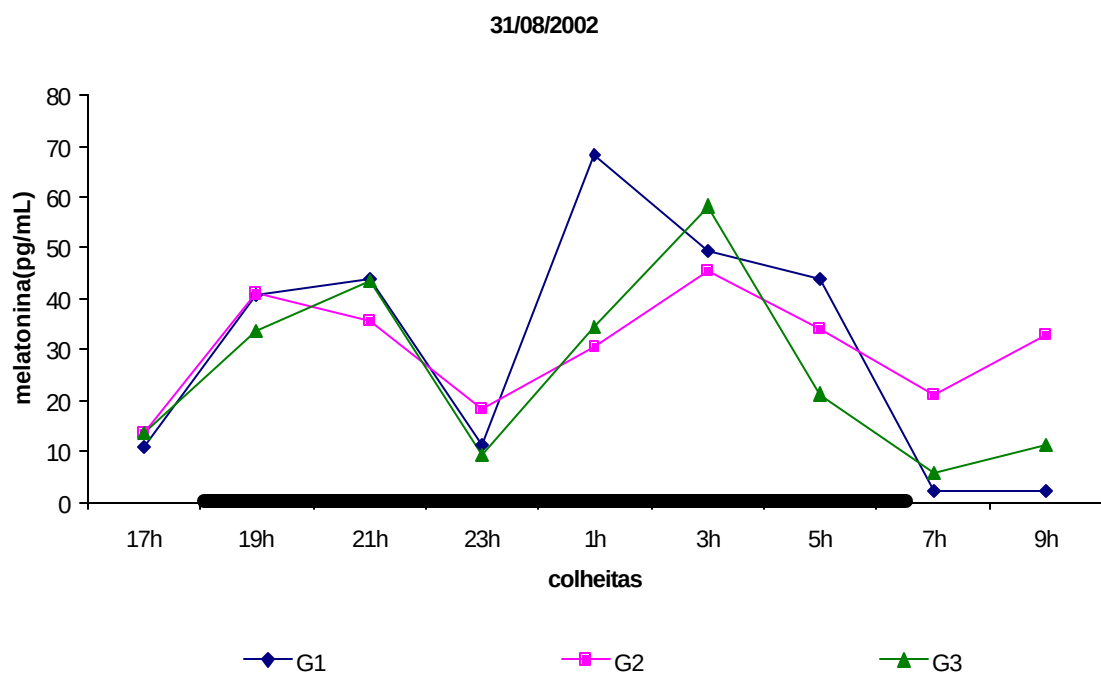


Figura 16 – Concentrações plasmáticas médias de melatonina (pg/mL) em cabras submetidas ou não ao fotoperíodo artificial durante o período CIDR-G+ FSH-ov da superestimulação ovariana dos grupos G2 e G3, no anestro estacional. Jaboticabal, 2002.

Ao final do ano, três dias antes do início da entrada oficial do verão, em 18/12/2002, as dosagens médias para a melatonina, nos três grupos G1, G2 e G3 estavam baixas às 17 h. Após esse horário, elevaram-se, chegando em valores médios máximos às 23 h e reduzindo-se às 09 h para os três grupos. Nessa época, o período escuro está compreendido entre a aurora boreal e austral das 18 h 44 min até às 05 h 28 min (Figura 17).

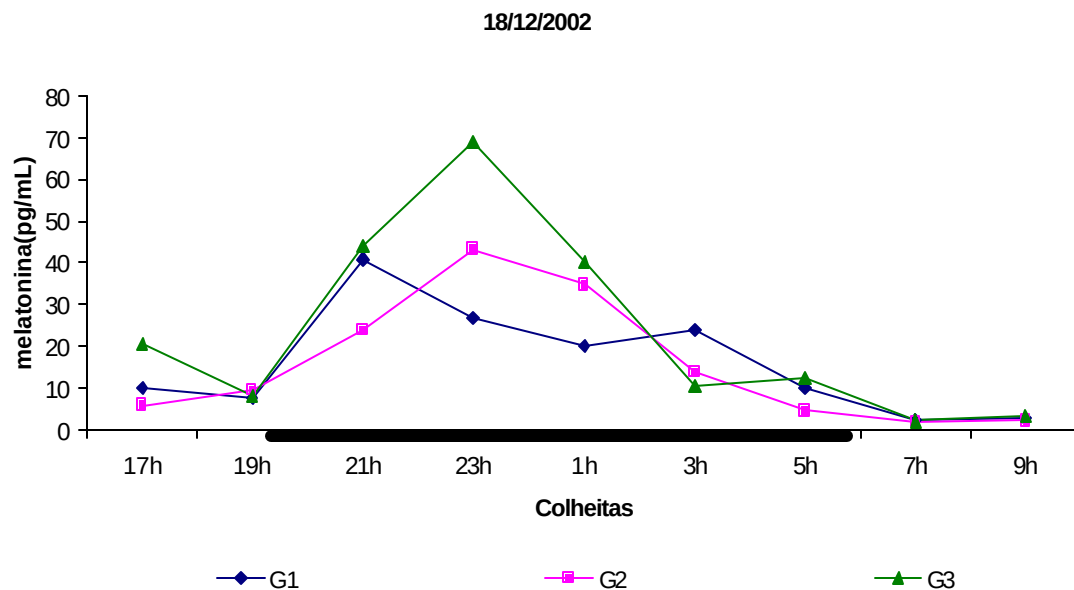


Figura 17 – Concentrações plasmáticas médias de melatonina (pg/mL) em cabras submetidas ou não ao fotoperíodo artificial, na transição anestro/estação. Jaboticabal, 2002.

Para o período CIDR-G, na superestimulação ovariana do G1, durante a estação reprodutiva, em 25/02/2002, as dosagens médias de melatonina das cabras foram crescentes nos três grupos até às 23 h, excetuando o G2, que se apresentou baixo. Já a 01 h, o G1 estava mais baixo, G2 intermediário e G3 pouco superior a esse (Figura 18). Às 09 h, os três grupos equipararam seus valores, sendo baixos, como constatado no dia anterior, às 17 h. O período escuro local está entre 18 h 44 min e 06 h 10 min.

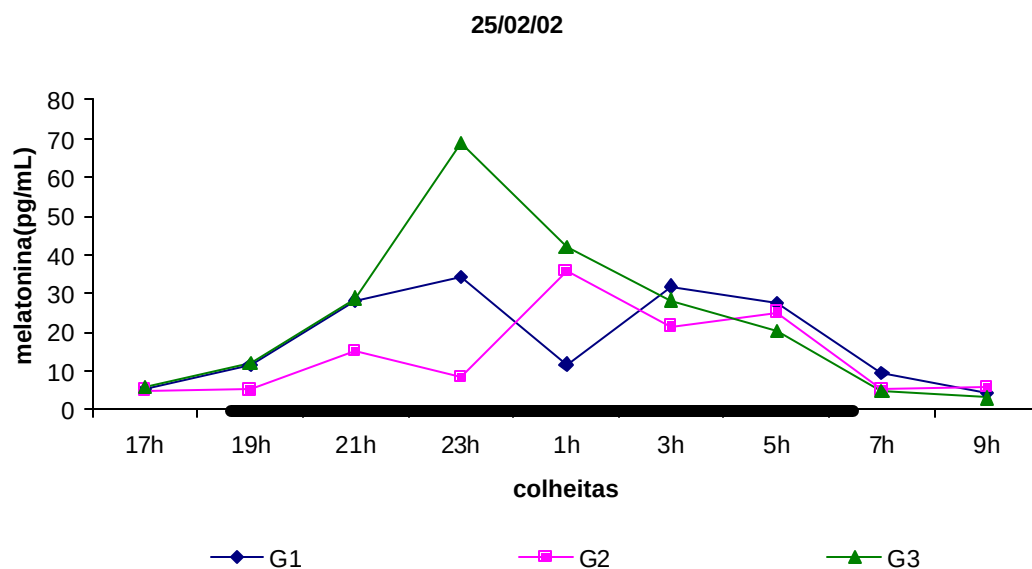


Figura 18 - Concentrações plasmáticas médias de melatonina (pg/mL) em cabras submetidas ou não ao fotoperíodo artificial, no período CIDR-G da superestimulação ovariana do G1, na estação reprodutiva. Jaboticabal, 2002.

Os níveis plasmáticos de melatonina do dia 03/03/2002 (Figura 19), cuja colheita foi realizada seis dias após a anterior, durante a superestimulação ovariana, no período da estação reprodutiva, com aplicação de FSH-ov, apresentou-se crescente após às 17 h. Esteve reduzida às 23 h para os grupos G1 e G2 e elevada para o grupo G3, este crescente até às 05:00 h, equiparando-se ao grupo G2. As dosagens médias de melatonina para o grupo G1 não se elevaram durante todo o processo até às 09 h. Nesse horário, os grupos G1, G2 e G3 apresentaram dosagens médias de melatonina altas no período claro.

O período escuro local está compreendido entre 18 h 38 min e 06 h 13 min (04/03/02), perfazendo 12 h 25 min de escuridão. A variação escura de todo o período anual local é pequena (02 h 28 min) quando comparada às outras regiões do Brasil.

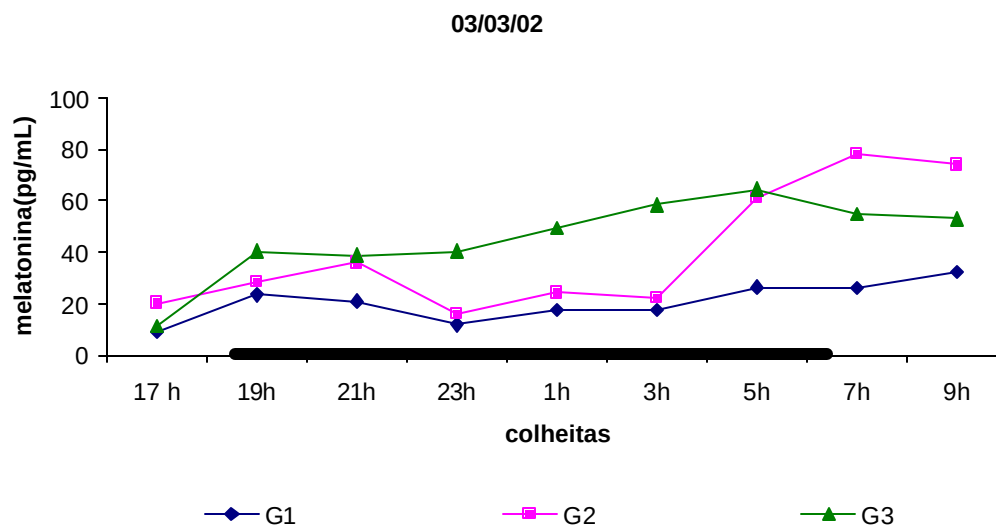


Figura 19 - Concentrações plasmáticas médias de melatonina (pg/mL) em cabras submetidas ou não ao fotoperíodo artificial, no período CIDR-G+ FSH-ov da superestimulação ovariana do G1, na estação reprodutiva. Jaboticabal, 2002.

DISCUSSÃO

1. HORMÔNIOS

Agrawal & Bahttacharyya (1982) obtiveram 40% de prenhez com TE caprinos, utilizando eCG na superovulação, por via não-cirúrgica (desde a colheita até a transferência dos embriões). A superovulação foi realizada com eCG, mais empregado na época, porém, conforme relatado na literatura, induz a formação de anticorpos nos animais. O emprego de FSH-ov provavelmente não promove a produção de anticorpos, facilitando a reutilização dos animais.

Os efeitos colaterais pela utilização do FSH-p em cabras, ao longo do tempo, limitam o seu emprego, apesar de amplamente utilizado. A utilização do FSH-ov não propicia esse problema. Neste trabalho, empregou-se o FSH-ov e obteve-se no G1 18 oócitos/animal, no G2 27,8/animal, para o G3 31,2/animal, no G4 25/animal e no G5 20,7/animal, todos provenientes de folículos superiores a três mm (Tabela 1). Os resultados obtidos por Armstrong et al. (1983) foram superiores para o eCG (14,5 folículos grandes/animal) em relação ao FSH-p (4,4 folículos/animal), além da presença de corpos lúteos na proporção 7:1 respectivamente, nos dois períodos da estação. Observou-se o mesmo comportamento ovariano, porém os corpos lúteos apareceram apenas durante a estação reprodutiva.

Portanto a resposta efetiva do tratamento hormonal de superovulação e ou superestimulação, parece estar no período de anestro onde o domínio hormonal exógeno imprime maior efeito, provavelmente pela ausência do ciclo estral, ou seja, reduzida função hormonal endógena.

A laparoscopia foi utilizada por Battye et al. (1988) para avaliar a regressão luteal prematura em pequenos ruminantes. Era ocasionada pela liberação de prostaglandinas. Para observação apenas de órgãos, como ovários, é bem empregada, o que dificulta é o sangramento ovariano instalado nas visualizações das aspirações posteriores à primeira, dificultando ainda mais a colheita, fato observado nesta experimentação, visto que não conseguiu-se obter nenhum oócito por esse método, optando então pela aspiração dos ovários após laparotomia. Entretanto, a laparotomia é eficaz e prática para aspiração folicular, com desvantagem em provocar aderência de órgãos, o que na laparoscopia pode ocorrer em menor intensidade. Neste experimento, das 31 cabras utilizadas pela laparotomia, 15 retornaram a reprodução por monta e estro natural, apresentando índice de 78% de fertilidade e 1,6 de prolificidade*.

*Dados fornecidos pelo setor de Caprinocultura da Fazenda Lageado-Unesp-Botucatu.

Cameron et al. (1988) utilizaram a laparoscopia, promovendo melhora, em vários aspectos: tanto para os animais quanto para a equipe de trabalho que realiza a aspiração folicular. Porém necessita de aparelho específico e domínio da técnica para execução do procedimento com sucesso. Observaram, no mesmo trabalho, que a progesterona plasmática, nas 27 h de observação, após a retirada do progestágeno, foi constatado uma quantidade maior e significativa desse hormônio nas cabras do referido experimento. No entanto, pela média de progesterona plasmática nos grupos estudados neste trabalho, no período de anestro estacional, houve comportamento hormonal esperado, ou seja, quantidades praticamente nulas de progesterona plasmática ao iniciar a superestimulação ovariana e nos dias D₁₄ e D₁₆ do pós-tratamento. Já no período da estação reprodutiva, não houve o mesmo perfil para os animais dos mesmos grupos. Ao início, todas apresentaram atividade ovariana, porém o grupo do fotoperíodo artificial (G2), apresentou quantidades baixas de progesterona plasmática (não detectável) desde o D₁₂ do tratamento, o mesmo para o G1 (superestimulado), muito provavelmente influenciado pelo tratamento artificial luminoso empregado anteriormente (Figuras 11 e 12).

A utilização de FSH-ov (14mg) promoveu boa quantidade de oócitos ovulados (média de 10,8/animal) no trabalho realizado por Kumar et al. (1990), porém com 10 mg do mesmo princípio ativo (FSH-ov), obteve-se média de 18 oócitos por animal (G1) no período da estação reprodutiva e 31,2 oócitos no anestro (G3). Média superior com dosagem hormonal inferior, diferenciando apenas pela aplicação da técnica de aspiração por laparotomia e não oócitos ovulados do referido trabalho, portanto justificado sua quantidade inferior. Entretanto, nesta experimentação, após a maturação por 27h, a maioria apresentou metáfase II e supostamente estavam habilitados para a etapa de fertilização “*in vitro*”, conforme visualização da extrusão do corpúsculo polar (Figura 3 C).

O intervalo de ovulações após a retirada do dispositivo intravaginal foi maior no período de anestro estacional (Baril & Vallet, 1990) durante os trabalhos de superovulação, apesar de ter utilizado praticamente o mesmo número de dias do dispositivo intravaginal (11 dias) nas superovulações; acredita-se que o CIDR-G possa imprimir uma resposta mais regular e natural de progesterona exógena. Observou-se que os animais submetidos à laparotomia nos dois períodos (estação e anestro), apresentaram corpos lúteos na estação (12), sendo provavelmente explicado pelo fato do CIDR-G não ser suficientemente capaz de suprimir o efeito hormonal endógeno ou se reduzir os dias do emprego do CIDR-G (de 11 para 9) para realização da laparotomia.

Os resultados satisfatórios e significativos para 14 mg de FSH-p recomendados por Taneja et al. (1991), podem ser considerados adequados, porém neste experimento empregando somente 10 mg de FSH-ov obteve-se melhores resultados em número total de oócitos (720) (Tabela 1), com a vantagem de não promover a produção de anticorpos, própria de produtos heterólogos e respectivo custo. No que se refere à utilização do progestágeno-Chronogest empregada pelos mesmos autores citados acima, acredita-se que seja maior a dificuldade da aplicação, bem como provável agente de transmissão de doenças infectocontagiosas.

Empregando FSH-ov (6,91mg em volume de 7,9 mL) e 100 UI de hCG referente ao LH, Kumar et al. (1991) obtiveram 21% de células em metáfase II, podendo ter aumentado esses valores com doses superiores de FSH-ov e sem hCG. Provavelmente o aumento de LH leva a condensação de cromatina. A aspiração folicular é um método que reduz a colheita no número de oócitos, porém é um método fácil, mas a dissecação propicia melhor qualidade oocítica, porém esta é demorada e trabalhosa, podendo comprometer a maturação dos mesmos possivelmente. Se aqueles autores tivessem usado a aspiração e não a dissecação, poderiam ter melhorado seus resultados.

Considerando que as dosagens empregadas por Younis et al. (1991) para FSH-p (20mg) poderiam estar reduzidas com o mesmo resultado, mas ainda assim os resultados satisfatórios foram alcançados. Os oócitos provenientes de folículos superiores a 3 mm poderiam ser perfeitamente aproveitados pelo trabalho de Younis et al. (1991).

A clivagem (10%) e fertilização (17%) ainda foram semelhantes ao deste experimento, valor superior (11,5%) aqui encontrado para o grupo G3, provavelmente pelo emprego de sêmen fresco e ausência de penicilina, o que promoveu a obtenção deste resultado.

Apesar das respostas encontradas por Rosnina et al. (1992) para o FSH-p (15mg) ($p < 0,05$) terem sido melhores que as doses de 10 e 20 mg, acredita-se que a utilização de FSH-ov na dosagem de 10mg, sejam suficientes para promover a superovulação com boa produção de oócitos e provavelmente de embriões, quando for o objetivo e interesse, havendo pouca limitação no seu emprego. Temperaturas altas e clima seco podem interferir nas respostas às superovulações, como observaram Rosnina et al. (1992) e Bondurant (1981), os quais consideraram ainda, baixa resposta à superovulação em zonas temperadas e luz decrescente em meses secos.

Os resultados do presente experimento, baixos em relação a clivagem (Tabela 1), fertilização e produção de blastocistos, podem ser justificados, provavelmente devido à alta temperatura local para a época de realização na estação reprodutiva, bem como o período seco de inverno.

No intuito de avaliar o dispositivo intravaginal CIDR-G nos animais superestimulados, dosou-se a progesterona plasmática por RIE no período de superestimulação ovariana e 4 dias após a retirada do CIDR-G, condensando em três momentos para facilitar a visualização de seu efeito (Figuras 6 e 7) (Tabelas 3 e 4).

A mesma concentração plasmática de progesterona endógena e exógena, foi também relatado por Wheaton et al. (1993), com uma pequena diferença já esperada, entretanto significativo ($p < 0,05$) para todos os momentos da estação (Tabela 3) e anestro (Tabela 4). Essa observação justifica-se em que, no D₀ na estação reprodutiva, os animais de todos os grupos apresentaram atividade ovariana, salientando que o grupo G2, a partir do D₁₁ apresentou níveis médios não detectáveis de progesterona plasmática, provavelmente influenciado pelo tratamento luminoso do ano anterior.

Apesar dos resultados apresentados por Batt et al. (1993), em relação aos tratamentos empregados com FSH-ov e FSH-p e suas associações com eCG (200 e 400UI) e 2,5 e 7,5 mL de FSH-ov e 4 mL e 12mL de FSH-p, acredita-se que o FSH-ov apresente melhor resposta, apesar de seus resultados favorecerem o FSH-p ($p < 0,05$) em relação aos outros tratamentos. A fonte de FSH-p é uma alternativa, porém se puder optar sempre para o FSH-ov, acredita-se obter melhores resultados.

Após aplicações de 10 mg de FSH-ov em doses decrescentes, durante três dias consecutivos, obteve-se as seguintes quantidades de oócitos para G1 (175), G2 (139), G3 (156), G4 (125) e G5 (124) (Tabela 1). A dosagem empregada por Batt et al. (1993), 2,5 mL = 2,1875 mg e 7,7 mL = 6,5625 mg, cujas doses foram inferiores às que se utilizaram para o mesmo produto neste experimento, talvez isso justifique a média de três embriões normais para o grupo do FSH-ov em relação ao FSH-p - 8,6 ($p < 0,05$).

A concentração plasmática de progesterona, durante o processo de superestimulação ovariana e até quatro dias após a cirurgia para aspiração folicular, foram diferentes entre os dois períodos (estação reprodutiva e anestro estacional). Pode-se observar que, ao iniciar o período de CIDR-G (D_0), os valores de progesterona plasmática estavam elevados no período de estação reprodutiva e quase zero no anestro, o que é perfeitamente aceitável e compreensível. O nível de progesterona plasmática exógena durante o período CIDR-G, nas duas estações, variou entre 1,15 - 6,09 ng/mL, resultados semelhantes aos observados por Monreal (1999). Besenfelder et al. (1994), no entanto, pela mesma técnica de laparotomia, relataram valores de ($11,1 \pm 1,8$ ng/mL) para progesterona sérica em doadoras, dois dias após o estro, porém apenas no período da estação reprodutiva as cabras deste experimento atingiram valores altos: G1 53,00ng/mL, G2 33,03ng/mL e G3 27,17ng/mL.

A utilização de FSH-p (40 mg) e FSH-ov (37,5mg) utilizados em cabras durante a estação reprodutiva e período de anestro não exibiu diferença estatística, bem como a quantidade de LH (Graff et al. 2000). Obteve-se resultados semelhantes para essa afirmação, porém com quantidades inferiores de FSH-ov (10mg).

A técnica de aplicação de FSH-p pela via sub-cutânea, em dose única, utilizada por Terzano et al. (2000), para promover a superestimulação ovariana e colheita de oócitos pela via laparoscópica ($42,8 \pm 8,2$), apresentando resultados satisfatórios e superiores aos deste trabalho em número de oócitos (G3), porém acredita-se que se utilizassem FSH-ov, poderiam melhorar ainda seus resultados.

Mesmo assim a tese hipotética de uma única dose de FSH (qualquer origem), poderia ser revisada e testada sob estas condições para se avaliar os resultados, minimizando as aplicações seriadas em três dias.

2. FERTILIZAÇÃO “*IN VITRO*”

A dificuldade em trabalhar-se com FIV em caprinos na região sudeste, onde se concentra o maior número de laboratórios do Brasil nessa área, é justamente a obtenção de ovários de matadouros de pequenos ruminantes. Já para a região nordeste, apesar de possuir o maior rebanho caprino nacional (Ribeiro, 1997), opõe-se pelo restrito número de laboratórios. Frente a essas dificuldades e limitações e estando na região sudeste a experimentação científica ora exposta, optou-se pela aspiração folicular por laparotomia, mantendo os animais vivos e aptos à reprodução posterior, pensando em produção animal viável e realizável. O custo da manutenção dos animais, provavelmente ainda supere o custo do sacrifício para obtenção dos ovários, sendo que se reutilizou alguns animais que em sua maioria já retornaram ao criatório tendo apresentado reprodução normal. Isso pode ser um dado positivo, pois se puder reutilizar os animais submetidos a laparotomia, estes poderão ser usados novamente na reprodução. Apesar de Martino et al. (1994b) reconhecerem que a dissecação é mais vantajosa, acredita-se que a aspiração não apresente qualquer problema. Para as condições brasileiras, a FIV pode, sem dúvida, ser empregada pela técnica de laparotomia e com FSH-ov, permitindo duas colheitas por animal em intervalo de seis meses.

O laparoscópio poderia auxiliar muito nesse procedimento, evitando o estresse cirúrgico, o que foi citado por Baldassarre et al. (2002), porém o domínio da técnica é crucial na resposta efetiva.

Younis et al. (1992) não obtiveram sucesso com a obtenção de filhotes vivos pelo método FIV, pois estes não chegaram a termo. Já os resultados para maturação e fertilização após emprego de heparina, foram satisfatórios. Concluíram que pode-se chegar a 50% de oócitos inseminados e 56% de clivados, o que não se conseguiu no presente experimento, mesmo tendo utilizado heparina (200µg/mL) no G4, não foi possível obter bons resultados (Tabela 1). Outro ponto importante é a quantidade de soro de cabra em estro (20%) utilizada por Younis et al. (1992), enquanto neste experimento atingiu-se valores próximos a 100% na maturação dos oócitos, com apenas 10% de soro de cabra em estro.

Os resultados obtidos por De Smedt et al. (1992) para oócitos provenientes de dissecação, portanto imaturos, atingiram 85% de maturação e 60% de fertilização. Já neste experimento, usando sêmen congelado, não foi possível obter os mesmos resultados com a mesma técnica. Para a maturação atingiu-se resultados semelhantes (100%) (Figura 3), todavia, na fertilização “*in vitro*” não se logrou o mesmo êxito. O processo de capacitação espermática necessita mais investigações sob as mesmas condições, bem como os meios de fertilização para viabilizar a melhoria nas respostas.

Influenciado por Ginther & Kot (1994), que trabalharam com dinâmica folicular em cabras, no período da estação reprodutiva, levou-se a pensar em uma hipótese: se existiria melhor época para sincronizar e/ou superovular cabras.

Além da época, se o período do ciclo estral influencia sua resposta na produção de folículos, oócitos e conseqüentemente sua qualidade. Neste experimento, os resultados dos grupos G1- estação reprodutiva (18 oócitos/animal); G2- fotoperíodo artificial (27,8/animal); G3-anestro estacional (31,2/animal); G4 (17,7/animal) e G5 (20,7/animal) (Tabela 2), não confirmaram a indagação. Apesar dos dados não serem significativos entre os grupos, pode-se acreditar numa tendência em imaginar que o melhor período para proporcionar sincronização/superoovulação seria durante a estação reprodutiva, porém isso não parece acontecer. Conseguiu-se produzir, cinco embriões no período de anestro (Tabela 1).

As observações feitas por Martino et al. (1994b), em relação aos oócitos dissecados, com alta qualidade, porém baixo número de folículos adequados e longa duração na colheita do processo limita sua utilização. Seria melhor aproveitado se houvesse condições de aspirar os folículos inferiores a três mm. No processo aspirativo realizado, apesar da maior quantidade de oócitos e alteração de “*cumulus*” (células desnudas) (Figura 2), as células sofreram menor índice de autólise provavelmente pelo rápido tempo entre colheita e transporte ao laboratório para maturação.

A maioria dos oócitos colhidos de cabras pré-púberes, provenientes de folículos superiores a três mm atingem a competência meiótica como o das cabras adultas. Porém, os ovários provenientes de matadouros, possuem uma quantidade menor de folículos superiores a três mm, necessitando uma oferta maior daqueles órgãos (ovários).

Além disso, a melhora na maturação oocítica depende do tempo, sendo 27h o que melhor apresentou melhores resultados nos testes efetuados, concordados com Martino et al. (1994a). A maturação empregada nesta experimentação, idêntica ao do autor citado anteriormente, com 27h e os oócitos provenientes de ovários de cabras Alpinas jovens (nulíparas) e adultas, sugerem que a semelhança na quantidade e qualidade dos oócitos provenientes das duas categorias animais, que atingiram a metáfase II, podem ser desafiados à fertilização, clivagem e desenvolvimento.

A coincidência do emprego da técnica na maturação e clivagem deste trabalho com o de Keskinetepe et al. (1994) para TCM-199, 27 h, LH e FSH, não favoreceram os mesmos resultados para o meio LH + FSH (52%) de clivagem que os pesquisadores atingiram. Foi adicionado a esse meio soro de cabra em estro, 1µg/mL de estradiol, o mesmo utilizado por Crozet et al. (1995), porém com sêmen fresco e neste experimento empregou-se sêmen congelado e fresco. Entretanto não se obteve respostas semelhantes às técnicas citadas, acreditando-se, mais uma vez, que o meio para desenvolvimento ou fertilização necessite de mais investigações.

O congelamento dos embriões obtidos por fertilização “*in vitro*” foi efetuado em fase de blastocisto com PBS + 20% de soro de cabra em estro, como descreveram Holtz & Nowshari (1995), apesar de que os embriões, após a fase de mórula, cresceram bem em meio de desenvolvimento com BSA, SOF modificado, 2,5% de soro fetal bovino. Congelou-se os embriões (sete) em fase de blastocisto com o meio BSA, SOF e soro fetal bovino.

Assim como observado por De Smedt et al. (1994), folículos superiores a três mm estão aptos a atingir a competência meiótica. Dessa maneira, praticou-se a aspiração folicular, ao invés da dissecação, atingindo valores aceitáveis de maturação (praticamente 100%), superior aos 96% encontrado por De Smedt et al. (1994). Portanto, acredita-se que realmente os melhores folículos são aqueles acima de três mm de diâmetro para participarem do processo de FIV e a maturação oocítica evoluiu bem, no meio proposto.

Mogas et al. (1995) conseguiram resultados superiores para oócitos clivados (46,48%) com o mesmo meio praticado nestas condições experimentais (TCM-199 + hormônios + soro de cabra em estro). Neste trabalho os valores atingidos para o G1 (3,42%), G2 (6,47%) e G3 (11,5%) de clivagem nesta experimentação, estão abaixo da expectativa esperada, porém provavelmente o meio para a fertilização e desenvolvimento pode ser melhorado, o que merece reavaliação. Mogas et al. (1995) obtiveram blastocistos (2,96%), cujos resultados foram semelhantes aos valores observados nos grupos G2 (1,43%) e G3 (3,2%), mas não para o G1 (0%), G4 (0%) e G5 (0%) do presente experimento.

Na tentativa de melhorar a fertilização neste experimento, 126 oócitos foram desafiados (G4) (Tabela 1) em mesmo meio da metodologia de fertilização proposto por Palomo et al. (1995a), porém aumentando-se de 100 para 200µg/mL de heparina segundo (Palomo et al., 1995b), visto que com 100µg/mL os resultados não foram significativos na referência citada primeiramente, encontrando 55,47% e 200µg/mL 45,29%.

Mesmo assim não se conseguiu melhorar a fertilização ainda com sêmen congelado. Tudo leva a acreditar que, provavelmente a heparina na dosagem de 200µg/mL, não melhora a fertilização, nem o sêmen fresco foi capaz de incrementar a taxa de clivagem no G5 (0%) e seu respectivo desenvolvimento, restando então outros tipos de meios para serem avaliados.

Comparando os resultados encontrados por Crozet et al. (1995) com os do presente experimento, pode-se observar que, a quantidade de folículos imaturos, superiores a três mm obtidos por aspiração, foi maior neste estudo, utilizando metodologias semelhantes para maturação, fertilização e desenvolvimento de oócitos. Crozet et al. (1995) e Palomo et al. (1995b) empregaram a técnica de dissecação, porém com bons resultados na fertilização com sêmen fresco, o que não foi possível no presente experimento promovido pela aspiração e utilização de sêmen congelado.

De acordo com Sidhu & Cheema (1995), o emprego de LH e estradiol no meio de maturação “*in vitro*” para caprinos é fundamental. Também empregaram 10µg/mL de LH + 1µg/mL de estradiol e a maioria dos oócitos maturaram. Esses autores empregaram também 20 µg/mL de LH + 1µg/mL de estradiol e obtiveram resultados inferiores aos resultados deste trabalho, em termos de maturação (45%). Provavelmente o soro de cabra em estro tenha melhorado os resultados na maturação (100 %) deste trabalho, mas mesmo assim, podemos acreditar que os resultados em FIV são muito diversos nessa espécie.

Os resultados apresentados por Keskinetepe et al. (1996), relacionados ao desenvolvimento “*in vitro*” dos oócitos maturados (41,6%), foram inferiores aos obtidos nesta experimentação (praticamente 100%), mesmo para os oócitos desnudos. A dosagem de heparina (100µg/mL) e ausência de soro animal não melhorou a fertilização e maturação oocítica segundo os autores, todavia pensa-se ser de real valia a utilização de soro animal na técnica de maturação, fertilização e clivagem para melhorar a resposta desses fatores .

Izquierdo et al. (1997) trabalharam com sêmen fresco (mistura do ejaculado de três bodes murcianos) para a fertilização “*in vitro*” e obtiveram resultados semelhantes, entre grupos de cabras adultas e pré-púberes, em quantidade de blastocistos (14,1%). Neste trabalho, tentou-se comparar os resultados entre cabras adultas (multíparas e nulíparas de um ano de idade) (G4 e G5), percebeu-se que não houve diferença significativa para o número de folículos, oócitos e maturação, levando-se a pensar que essas idades provavelmente não interferiram na resposta desses fatores mencionados, o que também foi citado por Koeman et al. (2000).

Simplício et al. (1997) usaram sêmen lavado e congelado em leite desnatado e gema de ovo (com duas fontes diferentes) e capacitado com soro de cordeiro e swim-up, para a produção de blastocisto “*in vitro*”. Os resultados foram superiores ($p < 0,05$) para o sêmen congelado com gema de ovo.

Comparando os resultados finais em blastocistos em relação aos desta experimentação, G1 (0%), G2 (1,4%) e G3 (3,2%), indiscutivelmente pode-se questionar a utilização do sêmen congelado (com leite desnatado ou gema de ovo sem lavagem prévia) ou fresco como fator melhorador na resposta de fertilização em FIV. O sêmen utilizado neste experimento com motilidade de 40% após descongelação, pode ter influenciado os resultados, pois foi congelado com gema de ovo sem lavagem prévia. Simplício et al. (1997) mencionaram ainda que os períodos de anestro podem melhorar as respostas para FIV, afirmação com a qual se pode concordar já que o G2 do fotoperíodo artificial não superou o G3 do anestro. Suspeita-se assim, que a origem do sêmen pode influenciar os resultados de FIV.

Neste experimento foram encontradas várias dificuldades que também foram constatadas por Amoah & Gelaye (1997) relacionadas à fertilização “*in vitro*”, capacitação e desenvolvimento embrionário para o tipo de sêmen empregado em FIV de caprinos. Acredita-se ainda que são necessárias várias investigações para os tipos de meios e também sêmen ideal que seria para estas condições. Keskinetepe et al. (1998) atingiram valores de 20% de blastocistos com sêmen congelado em leite desnatado, 11,3% congelado com gema de ovo (comercial) e 3,8% congelado com gema de ovo no próprio laboratório, fatores que mostram provável interferência do sêmen na resposta de produção de embriões caprinos obtidos por FIV.

Infelizmente não se possui oferta de ovários como Mogas et al. (1997b) apontam, porém o efeito, apesar de semelhante, de FSH-p para superestimulação ovariana entre cabras pré-púberes tratadas e não tratadas, promoveu uma quantidade e qualidade de oócitos favorável ao grupo tratado ($p<0,05$). A superestimulação hormonal é necessária, principalmente para FIV, minimizando o custo operacional da pesquisa na obtenção de maior número de oócitos, acima de três mm. Concorde-se com os autores na categoria animal, mas ainda insistindo na utilização de FSH-ov e laparoscopia após o domínio da técnica.

Kühholzer et al. (1998) lavaram o útero de cabras entre 75-78 h após a aplicação do agente luteolítico. Quando se compara o horário de aplicação para prostaglandinas (36h) antes da aspiração folicular por laparotomia, nota-se a presença de corpos lúteos jovens (12), provavelmente em consequência de ovulações recentes, podendo assim, reduzir o período do progestágeno.

Malik et al. (1999) compararam outros meios em substituição ao TCM-199, para maturação “*in vitro*” de oócitos caprinos com o objetivo de minimizar o custo laboratorial. Utilizaram fluido peritoneal de cabra e coelha, os quais foram significativamente superiores ($p<0,05$) em relação ao controle (TCM-199 + 20% de soro de cabra em estro). Infelizmente os autores não forneceram análise detalhada do custo e benefício dos produtos em relação ao TCM-199, bem como não avaliaram o final do processo (fertilização, clivagem e desenvolvimento). Portanto, esses dados induzem a pensar que o fluido peritoneal de coelhas não auxilia no processo de maturação “*in vitro*” de oócitos caprinos.

Palomo et al. (1999) compararam os meios de Swin-up, Ficoll e Percoll na capacitação espermática, observando que estes não foram diferentes estatisticamente ($p>0,05$). Porém, o Ficoll (controle) não foi superior para a fertilização e clivagem ($p<0,0005$). O Percoll se mostrou semelhante ao Swin-up ($p>0,005$). Apesar de utilizar o Percoll por se mostrar eficaz, testou-se também o Swin-up que não apresentou diferença com o Percoll em relação à fertilidade. Concluiu-se que para a capacitação espermática, tanto o Percoll, como o Swin-up podem ser utilizados sem prejuízo para o processo de capacitação espermática.

A colheita de oócitos pela técnica transvaginal, guiada por ultra-som, utilizada por Graff et al. (1999), embora valiosa, necessita conhecimento necessário da metodologia. Os resultados obtidos para o número de oócitos/fêmea, quando compararam entre laparoscopia (14,4) e transvaginal (4,3), ainda não superaram os obtidos neste estudo, pela técnica de laparotomia/aspiração/superestimulação: G1 (18), G2 (27,8), G3 (31,2), G4 (25) e G5 (20,7) (Tabela 2). Por essa técnica (aspiração ovariana), obteve-se uma quantidade maior de oócitos/animal. Estes dados em número de oócitos não diferiram ($p>0,05$) entre grupos e períodos (estação reprodutiva e anestro estacional).

Izquierdo et al. (1999) utilizaram células epiteliais de oviduto de caprinos e bovinos em cultivo de oócitos desnudos para produção de blastocistos caprinos e obtiveram 15,1% e 14,8% respectivamente, técnica não empregada nesta experimentação.

Notou-se que alguns oócitos apresentaram-se desnudos, o que também foi relatado por Martino et al. (1994a), Mogas et al. (1997b) e Keskinetepe et al. (1998). A presença de “*culmulus oophorus*” é importante na maturação e FIV.

Oócitos provenientes de ovários obtidos por ovariectomia e aspirados por laparotomia, no período de anestro estacional, foram comparados por diferentes metodologias Samaké et al. (2000). Porém os autores não avaliaram durante a estação reprodutiva. A dosagem de FSH-p (22mg) propiciou os resultados para ovariectomia 18/animal e 8,25/animal na laparotomia ($p < 0,05$), inferiores ao que se obteve por laparotomia aspirativa para o grupo G3 (31,2/animal). Apesar do emprego de sêmen congelado, os resultados foram superiores para clivagem (78%) em relação aos deste experimento do G3 (11,5%) no anestro. Talvez a quantidade de LH (100µg/mL) associada a 24h de maturação possa ter melhorado a resposta quando comparados ao deste experimento (10µg/mL e 27 h de maturação). No mesmo estudo de Samaké et al. (2000), usando 200µg/mL de heparina, na capacitação espermática, obteve-se mais sucesso na fertilização “*in vitro*” (clivagem), tanto na ovariectomia (90%) como na aspiração por laparotomia (65%) quando comparados ao deste experimento no G3 (11,5%). O soro de cabra em estro para maturação e de ovelha em estro na fertilização “*in vitro*” oferecem bons resultados, segundo De Smedt et al., (1994), Izquierdo et al., (1999) e Palomo et al., (1999), entretanto, Samaké et al. (2000) conseguiram sucesso efetivo apesar de não os adotarem, acredita-se que os soros citados auxiliem a FIV em caprinos.

Bathia et al. (2002) ressaltaram a utilização de ionomicina na capacitação espermática ($p < 0,01$), porém os resultados não foram significativos ($p > 0,01$) para clivagem com Percoll. Apesar de terem testado vários tipos de soros animais ($p > 0,05$) para melhorar a clivagem (cabra e ovelha em estro ou não, cordeiro e soro fetal bovino), leva-se a pensar que provavelmente estes resultados não foram comprometidos por esses soros e sim pela quantidade do mesmo.

De acordo com Onger et al. (2001), a ionomicina e o etanol podem melhorar a clivagem e produção de blastocistos através da ativação oocítica. Assim, utilizaram sêmen congelado, o que se pensa ser um dos causadores dos baixos resultados de clivagem e fertilização “*in vitro*”. Os grupos estudados com ionomicina e etanol ($p > 0,05$) apresentaram superioridade em relação ao controle ($p < 0,05$), que não foram ativados, sendo que os trabalhos foram realizados em dois laboratórios com a mesma amostra, mostrando resultados diferentes. No laboratório detentor da experimentação (Onger et al. 2001), o grupo de oócitos sem ativação foi superior ao outro laboratório ($p < 0,05$), confirmando que para as mesmas amostras os resultados foram diferentes.

O cultivo de células em oviduto de coelhas foi empregado no desenvolvimento embrionário para oócitos de caprinos (Rao et al., 1984 e Izquierdo et al., 2002). Os resultados ($p > 0,05$) foram semelhantes para cabras adultas e pré-púberes. Acredita-se realmente que essa alternativa pouco ajudaria a técnica, mesmo com sêmen fresco ou alterando o meio.

Os resultados obtidos por Izquierdo et al. (2002) para clivagem de oócitos provenientes de cabras adultas 42,8% e pré-púberes 66,3%, bem como embriões, respectivamente 31% e 25%, são superiores aos encontrados neste trabalho, porém utilizaram um pool de sêmen fresco, proveniente de três bodes, sendo mais seguro.

Pela observação efetuada em número de oócitos por cabra (nulíparas e múltíparas) deste experimento, leva-se a acreditar que há pouca variação, concordando com Izquierdo et al. (1997), Koeman et al. (2000) e Baldassarre et al. (2002). Porém a utilização de laparoscopia para a colheita de oócitos evita futuras aderências, bem como a possibilidade de se reutilizar fêmeas, principalmente em locais distantes de abatedouros que seriam fontes de ovários.

Conforme Rodríguez-González et al. (2002), o emprego do azul brilhante de cresyl, evidencia os melhores oócitos caprinos (81,4%) para a utilização em FIV. O corante atua de maneira indireta marcando a baixa produção de glicose fosfato dehidrogenase (G6PD), em oócitos que já estabilizaram o crescimento. Dessa forma, esses oócitos poderão ser melhor utilizados para produção de embriões caprinos e proporcionando menor custo na FIV.

Sêmen congelado (Gencor-Guelph-ON-Canadá) foi utilizado por Rho et al. (2001) para fertilização “*in vitro*” em caprinos. Esse sêmen, na proporção de 2×10^6 spz/mL foi capacitado nos meios de gradiente Percoll, Swin-up e Glass-wool, avaliando suas respostas.

Foram superiores para o gradiente de Percoll ($p < 0,0001$) em relação aos demais. No início deste estudo, o Percoll e Swin-up também foram comparados e confirmou-se os mesmos achados de Rho et al. (2001). Entretanto, para a fertilização “*in vitro*” não se obteve as mesmas respostas. Provavelmente, se fosse utilizado na fertilização “*in vitro*”, uma centrifugação igual ao de Rho et al. (2001), que utilizou 300g por 10 minutos, diferente da que foi empregada (700g por 30 minutos), utilizada também por Martino et al. (1994a e b), poderia ter alterado os resultados de FIV. A centrifugação paralela do sêmen (300g por 10 minutos) foi realizada e não se percebeu prejuízo na sua fertilidade, em função da motilidade do sêmen, restando a dúvida se poderia ou não ser empregada para a FIV visando melhores resultados.

2. FOTOPERÍODO

De acordo com Monreal (1999), a duração, em dias, para o fotoperíodo artificial (tratamento luminoso) com o intuito de sincronização do estro em cabras está compreendido entre 30-60 dias, com média de 98 luxes, tendo promovido a sincronização em cabras mestiças. Devenson et al. (1990) relataram que entre 100-200 luxes ou 30-60 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ inibe-se em 80% o efeito da atividade da melatonina, entretanto Brackel-Bodenhausen et al. (1994) utilizaram 300 luxes e obtiveram resultados semelhantes. Diante disso, neste estudo, foi aplicado quantidade em luxes que pudesse aproximar de uma inibição próxima a 80%, com duração de 45 dias.

Assim propôs-se então 45 dias como duração adequada para promover a sincronização do estro em cabras que necessitam de indução da atividade ovariana em período de anestro. Em 30 m², dois metros de altura de pé direito, média de 120 luxes, com quatro lâmpadas de 40W distanciadas de quatro metros, foram suficientes para promover a atividade ovariana do G2, pois o pêlo dos animais desse grupo apresentaram severa alopecia 30 dias após o tratamento luminoso empregado, as demais cabras não apresentaram esse efeito. Essa observação foi relatada por Gebbie et al. (1999), como efeito do tratamento luminoso mas não estando relacionado à melatonina e Monreal (1999) relacionou como estresse.

A superestimulação ovariana foi praticada após 30 dias do término do fotoperíodo artificial durante o anestro e 30 dias do término do fotoperíodo natural no período da estação reprodutiva para obter melhores resultados.

Apesar de Monreal (1999) ter utilizado média de 98 luxes e 60 dias de duração, acredita-se na proposta de 45 dias. A duração do tratamento luminoso (entre 30-45 dias) é mais importante que a intensidade em luxes, porém nunca inferior a média de 98 luxes. Ainda não existe uma padronização na intensidade luminosa para sincronizar cabras (Haibel, 1990). A luz vermelha, utilizada para as colheitas noturnas, quando medida pelo luxímetro em linha reta com cinco cm de distância do mesmo, gerava entre 8-9 luxes e a 12 cm zero luxes, medido sob uma folha de papel sulfite branca plana. Essa intensidade luminosa foi suficiente para realizar as colheitas e não interferir na concentração de melatonina endógena.

O tratamento luminoso melhora o desempenho reprodutivo em machos (Delgadillo et al. 1991, 1993, 1995), bem como em fêmeas (Devenson et al., 1990; Monreal et al., 1996; Monreal, 1999, Chemineau et al., 1999), principalmente no período de anestro estacional. Tendo isso como parâmetro, o emprego do tratamento luminoso efetuado em cabras alpinas, durante o anestro estacional, provavelmente modificou a atividade ovariana desses animais.

Quando se compara ao tratamento luminoso, empregado por Chemineau et al. (1999), os achados de fertilidade 75,3% e 73% em cabras com e sem emprego da melatonina respectivamente, leva-se a pensar que o emprego de melatonina exógena possa funcionar como tratamento luminoso, principalmente quando se observou os resultados de prolificidade, 2,07 e 2,0, respectivamente, para o emprego ou não de melatonina. Entretanto, para a latitude em que se inseriu o trabalho (46°N), pode ser significativa, porém funciona adequadamente. Na latitude de 20°28'S, por 60 dias, com média de 98 luxes, Monreal (1999) conseguiu 69,2% de fertilidade e 1,6 de prolificidade, cujos resultados foram inferiores ao de Chemineau et al. (1999). Esses autores, trabalhando com 3226 cabras (dados não publicados) conseguiram 1,83 de prolificidade, valores superiores aos 1,6 obtidos por Monreal (1999), outros fatores podem modificar os resultados como umidade e temperatura.

Pela presente experimentação, julga-se suficiente 45 dias, com média de 120 luxes, podendo ser reduzida para 30 dias, sempre mantendo a proporção de 20 h claro e 4h escuro (alterando como um solstício e não equinócio), sendo um bom promotor de sincronização de estro e atividade ovariana em cabras.

Os valores para as concentrações plasmáticas de melatonina das cabras deste experimento, oscilaram muito entre os animais do mesmo grupo e em seus períodos de colheita e estiveram próximas aos valores obtidos por Alila-Johansson et al. (2001), porém vários estiveram fora da curva padrão, possibilitando uma análise descritiva. As observações importantes e procedentes das dosagens de melatonina para este trabalho são exatamente a aplicação da suplementação luminosa, em que durante seu emprego foi constatado valores menores para o grupo G2, mesmo assim, valores ainda altos para o emprego de luz quando comparada aos outros grupos estudados. O período escuro (escotoperíodo) variou ao longo do ano, sendo maior durante o inverno e menor no verão. No início do experimento, as quantidades de melatonina estiveram baixas antes das 17h, subindo logo após e mostraram-se elevadas às 5h do dia seguinte. Essa concentração plasmática foi semelhante durante todo ano, porém com relativa variação entre os grupos. Vale ressaltar que as concentrações plasmáticas de melatonina no período CIDR-G no anestro, variaram sensivelmente e aproximaram a sincronização com a aplicação de FSH-ov, mais no anestro do que quando comparado ao período da estação reprodutiva. Análise futura investigando a possibilidade ou não da interferência hormonal exógena efetuada por outros hormônios sobre a melatonina endógena de cabras merece atenção.

Elevadas concentrações de melatonina às 09 h na última colheita, opondo-se ao encontrado por Alila-Johansson et al. (2001), merecendo portanto mais investigações, pois nesta experimentação devido a época do ano (início da transição estro/anestro) possivelmente alteraram esses efeitos.

O cortisol variou nos oito dias antes do parto e no dia do parto de 27,03 nmol/mL para 113,11nmol/mL ($p<0,05$) em cabras, indicando estresse (Fonteque, 2001) e em ovinos cirurgiados (85 ± 10 nmol/L para 192 ± 14 nmol/L após 24 h) (Chapman et al., 1994). Quando se mensurou o cortisol, por radioimunoensaio, para os grupos G1, G2 e G3, foi observado que, no período de anestro estacional, os valores de cortisol, 24 h após o procedimento cirúrgico para colheita de oócitos, esteve aumentado para os grupos cirurgiados G2 (49,85 nmol/L) e G3 (70,19 nmol/L) e pouco aumentado para o G1 (22,54nmol/L) sem cirurgia. O grupo G2 (cirurgiado), com suplementação luminosa prévia, no período de anestro estacional (Figuras 13 e 14) apresentou níveis intermediários de cortisol em relação ao G1 e G3. Já no período de estação reprodutiva os grupos apresentaram G1- (cirurgiado) 70,07 nmol/L, G2-25,80 nmol/L e G3-10,20 nmol/L(ambos sem cirurgia) para o mesmo período.

Por estes resultados, acredita-se que a melatonina é um hormônio responsável pelo equilíbrio regulatório geral do corpo, incluindo o estresse, confirmado por Iandoli Jr. (2001).

Importante relatar e discutir que o G1, sem cirurgia, no anestro estacional elevou o seu nível de cortisol basal para o mesmo período, provavelmente interagindo socialmente com os demais animais cirurgiados.

Resumindo, acredita-se que exista relação benéfica do cortisol com a melatonina, esta por sua vez minimizando os efeitos do cortisol e estresse em caprinos, podendo até influenciar outros hormônios sexuais. Além disso, julga-se que a melatonina endógena sofra efeitos quantitativos quando da aplicação de hormônios exógenos como progesterona e FSH-ov, podendo, muito provavelmente, alterar o equilíbrio durante o processo de aplicação hormonal exógena e restabelecendo em seguida sua quantidade e seus efeitos secundários, mais no período de anestro que na estação reprodutiva.

CONCLUSÕES

Analisando os resultados obtidos no presente experimento, é possível **concluir**, de acordo com os objetivos propostos que:

1. O fotoperíodo artificial não promoveu melhora na produção de oócitos caprinos, bem como na competência e desenvolvimento embrionário sob a latitude de 21°15'22''S,
2. As concentrações plasmáticas de progesterona durante a estação e anestro estacional variaram na superestimulação ovariana ($p < 0,05$), aspiração folicular e quatro dias após o processo cirúrgico nos grupos estudados,
3. As concentrações plasmáticas de cortisol durante a estação reprodutiva e anestro estacional variaram na superestimulação ovariana, aspiração folicular e quatro dias após o processo cirúrgico, sendo que o G2 (fotoperíodo artificial) apresentou concentrações plasmáticas de cortisol intermediárias entre o G1 (controle) e o G3 (fotoperíodo natural),
4. As concentrações plasmáticas de melatonina sofreram alteração durante a superestimulação ovariana (período CIDR-G e CIDR-G + FSH-ov), sendo mais visível no anestro estacional que no período da estação reprodutiva.

REFERÊNCIAS

AGRAWAL, K.P.; BHATTACHARYYA, N.K. Non surgical transplantation of embryos in goats. In: **INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOAT PRODUCTION AND DISEASE**, 3., 1982, Proceedings, Tuckson, Arizona, USA, 1982, p.340.

ALILA-JOHANSSON, A.; ERIKSSON, L.; SOVERI, T.; LAAKSO, M-L. Seasonal variation in endogenous serum melatonin profiles in goats: a difference between spring and fall. **Journal of Biological Rhythms**, New York, v.16, n.3, p.254-63, 2001.

AMOAHA, E.A.; GELAYE, S. Biotechnological advances in goat reproduction. **Journal Animal Science**, Savoy, v.75, p.578-85, 1997.

ARMSTRONG, D. T.; PFITZNER, A. P.; WARNES, G. M.; RALPH, M. M.; SEAMARK, R. T. Endocrine responses of goats after induction of superovulation with PMSG and FSH. **Journal Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.67, p.395-401, 1983.

BALDASSARRE, H.; WANG, B.; KAFIDI, N.; KEEFER, C.; LAZARIS, A.; KARATZAS, C.N. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up “in vitro” embryo production technologies. **Theriogenology**, London, v.57, p.275-84, 2002.

BARIL, G.; VALLET, J.C. Time of ovulations in dairy goats induced to superovulated with porcine follicle stimulating hormone during and out of the breeding season. **Theriogenology**, London, v.34, n.2, p.303-11, 1990.

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

BATTYE, K.M.; FAIRCLOUGH, R.J.; CAMERON, A.W.N.; TROUNSON, A.O. Evidence for prostaglandin involvement in early luteal regression of the superovulated nanny goat (*Capra hircus*). **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.84, n.2, p.425-30, 1988.

BAVISTER, B.D. A consistently successful procedure for “in vitro” fertilization of golden hamster eggs. **Gamete Research**, New York, v. 23, p. 139-58, 1989.

BESSENFELDER, U.; ZINOVIEVA, N.; DIETRICH, E.; SOHNREY, B.; HOLTZ, W.; BREM, G. Tubal transfer of goat embryos using endoscopy. **Veterinary Record**, London, v.135, p.480-81, 1994.

BHATIA, B.; WANG, B.; BALDASSARRE, H.; KEEFER, C. “in vitro” fertilization of goat oocytes using fresh and frozen-thawed spermatozoa. **Theriogenology**, London, v.57, n.1, p.658, 2002.

BONDURANT, R. H. Reproductive physiology in the goat. **Modern Veterinary Practice**, Santa Barbara, p.526-29, 1981.

BRACKELL-BODENHAUSEN, V.A.; WUTTKE, W.; HOLTZ, W. Effects of photoperiod and slow-release preparations of Bromocryptine and melatonin on Reproductive activity and Prolactin secretion in female goats. **Journal of Animal Science**, Savoy, v.72, p.955-62, 1994.

CAMERON, A.W.N.; BATTYE, K.M.; TROUNSON, A.O. Time of ovulation in goats (*Capra hircus*) induced to superovulated with PMSG. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.83, n.2, p.747-52, 1988.

CHAPMAN, R.E.; FELL, L.R.; SHUTT, D.A.; A comparison of stress in surgically and non-surgically mulesed sheep. **Australian Veterinary Journal**, Brunswok, v.71, n.8, p.2443-47, 1994.

CHEMINEAU, P.; BARIL, G.; LEBOEUF, B.; MAUREL, M.C.; ROY, F.; PELLICER-RUBIO, M.; MALPAUX, B.; COGNIÈ, Y. Implications of recent advances in reproductive physiology for reproductive management of goats. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.54, p.129-42, 1999.

CHI, H. J.; RONG, Y.J. Effects of photoperiod and melatonin on conception rate of dairy goats in the non-breeding season. **Journal of Taiwan Livestock Research**, Taiwan, v.32, n.4, p.383-92, 1999.

CROZET, N.; DE SMEDT, N.; AHMED-ALI, M.; SÉVELLEC, C. Normal development following “in vitro” oocyte maturation and fertilizaation in the goats. **Theriogenology**, London, Abstract, v.39, p.206, 1993.

CROZET, N.; AHMED-ALI, M.; DUBOS, M.P. Developmental competence of goat oocytes from follicles of diferent size categories following maturation, fertilization and culture “in vitro”. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.103, p.293-98, 1995.

CURI, P.R. **Metodologia e análise da pesquisa em ciências biológicas**. Botucatu: Tipomic, 1997. 263p.

DELGADILLO, J.A.; LEBOEUF, B.; CHEMINEAU, P. Decrease of seasonality of sexual behaviour and sperm production in bucks by short photoperiodic cycles. **Theriogenology**, London, v.36, p.755-70, 1991.

DELGADILLO, J.A.; LEBOEUF, B.; CHEMINEAU, P. maintenance of sperm production in bucks using a third year of short photoperiodic cycles. **Reproduction Nutrition Development**, Paris, v.33, p.609-17, 1993.

DELAGADILLO, J. A; HOCHEREAU-De REVIERS., M. T.; DAVEAU, A.; CHEMINEAU, P. Effect of short photoperiodic cycles on male genital tract and testicular parameters in male goats (*Capra hircus*). **Reproduction Nutrition Development**, Paris, v.35, p.549-58, 1995.

De SMEDT, V.; CROZET, N.; AHMED-ALI, M.; MARTINO, A.; COGNIÉ, Y. “*in vitro*” maturation and fertilization of goat oocytes. **Theriogenology**, London, v.37, p.1049-60, 1992.

De SMEDT, V.; CROZET, N.; GALL, L. Morphological and function changes accompanying the acquisition of meiotic competence in ovarian goat oocyte. **The Journal of Experimental Zoology**, New York, v. 269, p. 128-39, 1994.

DEVENSON, S.; ARENDT, J.; FORSYTH, I. A. Effects of melatonin on seasonal breeding in goats. **Goat Veterinary Society Journal**, London, v.11, n.2, p.45-51, 1990.

FONTEQUE, J.H. **Avaliação dos níveis séricos de cortisol, estradiol, progesterona, do hemograma e do metabolismo oxidativo de neutrófilos em cabras (Capra hircus) saanen nos períodos de gestação, parto e pós-parto.** 2001. f.145. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 2001.

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

FRAZER, S.; COWEN, P.; FRANKLIN, M.; FRANEY, C.; ARENDT, J. Direct radioimmunoassay for melatonin in plasma. **Clinical Chemistry**, Washington, v.29, p.396-7, 1983.

GEBBIE, F. E, FORSYTH, I. A.; ARENDT, J. Effects of maintaining solstice light and temperature on reproductive activity, coat growth, plasma prolactin and melatonin in goats. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.116, p.25-33, 1999.

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

GRAFF, K.J.; MEINTJES, M.; DYER, V.W.; PAUL, J.B.; DENNISTON, R.S.; ZIOMEK, C.; GODKE, R.A. Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval following FSH stimulation of domestic goats. **Theriogenology**, London, v.51, p.1099-119, 1999.

GRAFF, K.; MEINTJES, Y., H.; REGGIO, B. C.; DENNISTON, R. S.; GAVIN, W. G.; ZIOMEK, C.; GODKE, R. A. Comparing follicle stimulating hormone from two commercial sources for oocytes production from out-of-season dairy goats. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.83, p.484-87, 2000.

HAIBEL, G. K. Out- of- Season breeding in goats. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Philadelphia, v.6, n.3, p.577-83, 1990.

HANADA, A. "*in vitro*" fertilization in goats. **Japan Journal Animal Reproduction**, Tokyo, v.31, p.21-6, 1985.

HOLTZ, W.; NOWSHARI, M.A. "*in vitro*" culture of goat morulae to blastocysts before freezing. **Theriogenology**, London, v.44, p.983-88, 1995.

LANDOLI JR., D. **Fisiologia transdimensional**. São Paulo: FE. Editora Jornalística, 2001, 249 p.

IZQUIERDO, D.; VILLAMEDIANA, P.; PARAMIO, M.T. IVM, IVF and IVC of oocytes from prepubertal and adult goats. Effect of ovidut ephitelial cells origin on prepubertal embryo development. **Theriogenology**, London, v.47, n.1, p.290, 1997.

IZQUIERDO, D.; VILLAMEDIANA, P.; PARAMIO, M.T. Effect of culture media on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. **Theriogenology**, London, v.52, p.847-61, n.5, 1999.

IZQUIERDO, D.; VILLAMEDIANA, P.; LÓPEZ-BEJAR, M.; PARAMIO, M.T. Effect of "*in vitro*" and in vivo culture on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. **Theriogenology**, London, v.57, p.1431-41, 2002.

KESKINTEPE, L.; DARWISH, M.G.; YOUNIS, I.A.; BRACKETT B.G. “*in vitro*” development of morulae from immature caprine oocytes. **Zygote**, Cambridge, v.2, p.97-102, 1994.

KESKINTEPE, L.; LUVONI, G.C.; RZUCIDLO, S.J.; BRACKETT, B.G. procedural improvements for “*in vitro*” production of viable uterine stage caprine embryos. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.20, p.247-54, 1996.

KESKINTEPE, L.; SIMPLICIO, A.A.; BRACKETT, B.G. Caprine blastocyst developmental after “*in vitro*” fertilization with spermatozoa frozen in different extenders. **Theriogenology**, London, v.49, p.1265-74, 1998.

KOEMAN, J.K.; KEEFER, C.L.; BALDASSARRE, H.; LANE, M.; GARDNERS, D.K.; DOWNEY, B.R. Developmental competence of prepubertal and adult goat oocytes cultured in semi-defined media. **Theriogenology**, London, v.53, p.297, 2000.

KÜHHOLZER, B.; MÜLLER, S.; BESENFELDER, U.; PROKOFIEV, M.I.; ERNST, L.K.; BREM, G. Laparoscopic recovery of pronuclear-stage goat embryos. **Veterinary Record**, London, v.42, p.40-2, 1998.

KUMAR, J.; OSBORN, J.C.; CAMERON, A.W.N.; BATT, P.A.; TROUNSON, A. O. Premature condensation of chromatin induced in goat (*Capra hircus*) oocytes after gonadotrophin treatment. **Reproduction Fertility and Development**, Collingwood, v.2, p.661-70, 1990.

KUMAR, J.; OSBORN, J. C.; CAMERON, A. W.N. Luteinizing hormone and follicle stimulating hormone induce premature condensation of chromatin in goat (*Capra hircus*) oocytes. **Reproduction Fertility and Development**, Collingwood, v.3, p.585-91, 1991.

MALIK, R.K.; LOHAN, I.S.; DHANDA, O.P.; HOODA, O.K.; SINGH, S. Peritoneal fluid from rabbits on goats as media for “*in vitro*” maturation, fertilization and initial culture of caprine oocytes. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.54, p.195-201, 1999.

MALPAUX, B.; VIGNIÉ, C.; SKINDER, D.C.; THIÈRY, J.C.; PELLETIER, J.; CHEMINEAU, P. Seasonal breeding in sheep: Mechanism of action of melatonin **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.42, p.109-17, 1996.

MARTINO, A.; MOGAS, T.; PALOMO, M. J.; PARAMIO, M. T. Meiotic competence of prepubertal goat oocytes. **Theriogenology**, London, v.41, p.969-80, 1994a.

MARTINO, A.; PALOMO, M. J.; MOGAS, T.; PARAMIO, M. T. Influence of the collection technique of prepubertal goat oocytes on “*in vitro*” maturation and fertilization. **Theriogenology**, London, v.42, p.859-73, 1994b.

MOGAS, T.; PALOMO, M. J.; IZQUIERDO, M.D.; PALOMO, M.J.; PARAMIO, M. T. Effect of hormones, serum source and culture system on the IVM and IVF of prepubertal goat oocytes and subsequent embryo development. **Theriogenology**, London, v.43, p.284, 1995.

MOGAS, T.; PALOMO, M. J.; IZQUIERDO, M.D.; PARAMIO, M. T. Morphological events during “*in vitro*” fertilization of prepubertal goat oocytes matured “*in vitro*”. **Theriogenology**, London, v.48, p.815-29, 1997a.

MOGAS, T.; PALOMO, M.J.; IZQUIERDO, M.D.; PARAMIO, M.T. Developmental capacity of “*in vitro*” matured and fertilized oocytes from prepubertal and adult goats. **Theriogenology**, London, v.47, p.1189-203, 1997b.

MONREAL, A.C.D., GATASS, C.B.A., BONILLA, R., BICUDO, S.D. Eficiência reprodutiva de cabras com cio induzido por fotoperíodo artificial. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 12., 1996, Caxambu. **Anais...**Caxambu: 1996, p.141.

MONREAL, A. C. D. **Comparação do estro induzido pelo CIDR e fotoperíodo artificial em cabras (*Capra hircus*-Linnaeus-1758) sob latitude 20°28'S.** 1999. 68f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária- Reprodução Animal), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1999.

ONGERI, E.M.; BORMANN, C.L.; BUTLER, R.E.; MELICAN, D.; GAVIN, W.G.; ECHELARD, Y.; KRISHER, R.L.; BEHBOODI, E. Development of goat embryos after “*in vitro*” fertilization and parthenogenetic activation by different methods. **Theriogenology**, London, v.55, p.1933-45, 2001.

PALOMO, M.J.; IZQUIERDO, D.; MOGAS, T.; PARAMIO, M.T. Effect o sperm pré-incubation time with heparin on IVF of prepubertal goat oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, n.15, p.68, 1995a.

PALOMO, M.J.; MOGAS, T.; IZQUIERDO, D.; PARAMIO, M.T. Effect of heparin and sperm concentration on IVF of prepubertal goat oocytes. **Theriogenology**, London, v.43, p.292, 1995b.

PALOMO, M.J.; IZQUIERDO, D.; MOGAS, T.; PARAMIO, M.T. Effect of semen preparation on IVF of prepubertal goat oocytes. **Theriogenology**, London, v.51, p.927-40, 1999.

RAO, V.H.; SARMAH, B. C.; BHATTACHARYYA, N. K. Xenogenous fertilization of goat ova in the rabbit oviduct. **Journal Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.71, p.377-79, 1984.

RHO, G.J.; HAHNEL, A.C.; BETTERIDGE, K. J. Comparisons of oocyte maturation times and of three methods of sperm preparation for their effects on the production of goat embryos “*in vitro*”. **Theriogenology**, London, v.56, p.503-16, 2001.

RIBEIRO, S.de A. **Criação racional de Caprinos**. São Paulo: Editora Nobel, 1997, 317p.

RODRIGUÉZ-GONZÁLEZ, E.; LÓPEZ-BÉJAR, M.; VELILLA, E.; PARAMIO, M.T. Selection of prepubertal goat oocytes using the brilliant cresyl blue test. **Theriogenology**, London, v.57, p.1397-409, 2002.

ROSNINA, Y.; JAINUDEEN, M. R.; NIHAYAL, M. Superovulation and egg recovery in goats in the tropics. **Veterinary Record**., London, v.130, n.5, p.97-9, 1992.

SAMAKÉ, S.; AMOAH, E. A.; MOBINI, S.; GAZAL, O.; GELAYE, S. “*in vitro*” fertilization of goat oocytes during the non-breeding season. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.35, p.49-54, 2000.

SIDHU, K.S.; CHEEMA, S. Effect of luteinizing hormone and estradiol on “*in vitro*” maturation of follicular oocytes in goat (*Capra hircus*). **Acta Veterinaria Hungarica**, Budapest, v.43, n.1, p.89-93, 1995.

SIMPLÍCIO, A.A.; BRACKETT, B.G.; KESKINTEPE, L. Use of cryopreserved spermatozoa for caprine “*in vitro*” fertilization (IVF). **Theriogenology**, London, v.47, n.1, p.299, 1997.

SONG, H.B.; IRITANI, A. “*in vitro*” fertilization of goat follicular oocytes with epididymal spermatozoa capacitated in a chemically defined medium. In: **AAAP.ANIMAL SCIENCE CONGRESS**, 3., 1985, London. Proceedings, London, 1985. p.463.

TANEJA, M.; PAWSHE, C. H.; GURON, C. S.; TOTEY, S. M.; SINGH., G. Use of chronogest implants and folltropin for estrus synchronization and superovulation in goats. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Dehli, v.29, p.1079-80, nov., 1991.

TERZANO, G.M.; ROMANO, D.; SENATORE, E.M.; MAURO, G.de; SCATÁ, M. C.; BORGHESE, A. Recovery of oocytes by laparoscopic follicle aspiration in FSH-treated gots. **Theriogenology**, London, v.53, n.1, p.509, 2000.

TMA63-1. **horas do nascer e pôr do Sol**- Proteção ao Vôo. Ministério da Aeronáutica, 1981., 150 p.

WHEATON, J.E.; CARLSON, K.M.; WINDLES, H.F.; JOHNSTON, L.J. CIDR: A new progesterone-releasing intravaginal device for induction of estrus and cycle control in sheep and goats. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.33, p.127-41, 1993.

WILKINSON, J. M.; STARK, B. A. **Producción comercial de cabras**. 19ed. Madrid: Acribia, 1987. 163p.

YOUNIS, A.I.; ZUELKE, K. A.; HARPER, K. M.; OLIVEIRA, M.A.L.; BRACKETT, B.G. “*In vitro*” fertilization of goat oocytes. **Biology of Reproduction**, Madison, v.44, p.1177-82, 1991.

YOUNIS, A. I ; KESKINTEPE, L.; MACKIE, K.; BRACKETT, B.G.; “*in vitro*” maturation and fertilization of Toggenburg goat oocytes. **Theriogenology**, London, v.37, n.1, p.330, 1992.

MONREAL, A. C. D. Influência do fotoperíodo artificial na produção de oócitos e competência no desenvolvimento embrionário em cabras (*Capra hircus* - Linnaeus-1758) estimuladas com FSH-ov no anestro estacional, 2003. 113 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária-Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

Os caprinos foram os primeiros animais a serem domesticados pelo homem. Desses animais produz-se carne, leite, seus derivados, pele e pêlos. O fotoperíodo artificial tem sido utilizado apenas na sincronização de estros em caprinos. Atualmente, os caprinos ganharam importância mundial pela produção de animais transgênicos produzidos por FIV (fertilização “*in vitro*”). As concentrações plasmáticas de progesterona, cortisol e melatonina, durante a superestimulação ovariana na estação reprodutiva e anestro estacional ainda não foram avaliadas, bem como a influência do fotoperíodo artificial na melhora da produção de oócitos. Sendo assim, os objetivos deste estudo foram avaliar se o fotoperíodo artificial empregado em cabras (120 luxes/45 dias/20 h), melhora a produção e desenvolvimento dos oócitos caprinos no período de estação reprodutiva e anestro estacional, verificar as concentrações plasmáticas de progesterona, cortisol e melatonina durante a superestimulação ovariana e quatro dias após o processo cirúrgico para colheita dos oócitos por laparotomia. Foram utilizadas 31 cabras Alpinas, distribuídas em cinco grupos, avaliando o fotoperíodo natural e artificial, sêmen fresco e congelado e heparina (200µg/mL) na capacitação espermática. Foram obtidos 720 oócitos e sete blastocistos (cinco do G3- fotoperíodo natural e dois no G2 –fotoperíodo artificial, ambos durante o anestro estacional). Não houve diferença estatística entre os grupos. As concentrações plasmáticas de progesterona variaram durante a superestimulação ovariana ($p<0,05$) em todos os momentos estudados, na estação e anestro estacional. Houve diferença estatística para as concentrações plasmáticas de cortisol ($p<0,05$), na estação reprodutiva e anestro estacional, porém o G2 (fotoperíodo artificial) apresentou concentrações hormonais de cortisol intermediárias entre o grupo controle e o G3 (fotoperíodo natural + cirurgia).

Na melatonina endógena variou durante a superestimulação ovariana mais no período CIDR-G que no CIDR-G + FSH-ov do anestro estacional. O fotoperíodo artificial não promoveu melhora na produção de oócitos caprinos e seu respectivo desenvolvimento embrionário. As concentrações plasmáticas endógenas de progesterona, cortisol e melatonina alteraram durante a superestimulação ovariana. Mais investigações são necessárias para melhorar a fertilização “*in vitro*”. Os estudos indicam que a superestimulação ovariana é mais importante no período do anestro estacional.

Palavras-chave: Cabras; Fertilização “*in vitro*”, Superovulação; Oócitos; Fotoperíodo artificial

MONREAL, A. C. D. Influence of artificial photoperiod in oocytes production and embryonic competence development in goats (*Capra hircus* -Linnaeus-1758) stimulated by FSH-ov during anestrus period, 2003. 113 p. Thesis (Doctorate in Veterinary Medicine - Animal Reproduction) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

ABSTRACT

Goats were the first animals to be domesticated by man. From these animals meat, milk, its byproducts, skin and fur are obtained. Artificial photoperiod has been used only in the synchronization of estrus in goats. Currently, goats have gained world-wide importance for the production of transgenic animals obtained by IVF ("in-vitro" fertilization). Plasmatic concentrations of progesterone, cortisol and melatonin, during ovarian superstimulation in the reproductive season and seasonal anestrus, or the influence of artificial photoperiod in the improvement of the production of oocytes have not yet been evaluated. Thus, the objectives of this study were to evaluate if the artificial photoperiod used in goats (120 lux/45 days/20 h), improves the production and development of goat oocytes in the reproductive seasonal period and anestrus, to verify the plasmatic concentrations of progesterone, cortisol and melatonin during ovarian superstimulation and four days after the surgical process for removal of oocytes for laparotomy. 31 Alpine goats were used, distributed into five groups, evaluating natural photoperiod and artificial, fresh and frozen semen and heparin (200µg/mL) in sperm qualification. 720 oocytes and seven blastocysts were obtained (five from the natural G3-photoperiod and two in the G2 artificial photoperiod, both during seasonal anestrus). There was no statistical difference among the groups. The plasmatic concentrations of progesterone varied during ovarian superstimulation ($p<0,05$) during the whole period studied, in the season and in the anestrus season. There were statistical differences in the plasmatic concentrations of cortisol ($p<0,05$), in the reproductive season and in the anestrus season, however the G2 (artificial photoperiod) presented intermediate hormone concentrations of cortisol between the control group and the G3 (natural photoperiod + surgery).

In the endogenous melatonin it varied during the ovarian superstimulation in the CIDR-G period more than in the CIDR-G + FSH-ov of the seasonal anestrus. The artificial photoperiod did not promote improvement in the production of goat oocytes nor in their respective embryonic development. The endogenous plasmatic concentrations of progesterone, cortisol and melatonin changed during ovarian superstimulation. More research is necessary in order to improve "*in vitro*" fertilization. Studies indicate that ovarian superstimulation is more important in the period of seasonal anestrus.

Keywords : Goats; in-vitro Fertilization; Superovulation; Oocytes; artificial Photoperiod

ANEXOS

SOLUÇÃO TALP-STOCK

Composição	Concentração
NaCl	666 mg
KCl	24 mg
MgCl ₆ H ₂ O	10 mg
NaH ₂ PO ₄	4,1 mg
NaHCO ₃	210 mg
CaCl ₂ .H ₂ O	30 mg
Lactato de Na (60%)	143 µL
Vermelho Fenol	1 mg
PH	7,4
Volume	100 mL

MEIO PRÉ-FIV

Composição	Concentração
TL-STOCK (4.1.1)	10 mL
BSA (Sigma Fração V A-8806)	6 mg/mL
Piruvato (Sigma P-4562)	22 µg/mL
Penicilina (Sigma P-3032)	70 µg/mL
Estreptomicina (Sigma S-6501)	50 µg/mL

MEIO FIV-GOTAS

Composição	Concentração
Meio Pré FIV	3.840 µL
<i>PHE</i>	160 µL
Soro de Ovelha no Estro	1,0 ml

SOLUÇÃO DE PHE (Penicilina, Hipotaurina e Epinefrina)

Composição	Concentração
Penicilamida (Sigma P-4875)	125 µL (23%)
Hipotaurina (Sigma H-1384)	125 µL (23%)
Epinefrina (Sigma E-4250)	100 µL (18%)
Solução Salina 0,9%	200 µL (36%)

SOF-MODIFICADO

Composição	Concentração
H ₂ O	7,8 mL
Estoque A	1,0 mL
Estoque B	1.0 mL
Estoque C	100 µL
Estoque D	100 µL
MEM essenciais (aminoácidos 100X)	300 µL
MEM não essenciais (aminoácidos 100X)	100 µL
L-Glutamina	10 µL
Antibiótico	50 µL
Myo-inositol	0,05 g
Citrato tri-sódio	0,001 g
Volume	10 mL

ESTOQUE A (Solução de Sódio 10X)

Composição	Concentração
NaCl	0,629 g
KCl	0,0534 g
KH ₂ PO ₄	0,0162 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,0182 g
H ₂ O	9,84 mL
Ácido láctico	0,060 mL
Volume	10 mL

Filtrar em 0,22 µm, pode ser estocado em geladeira durante 1 mês

ESTOQUE B (Solução de Bicarbonato)

Composição	Concentração
NaHCO ₃	0,210 g
Phenol Red	0,001 g
H ₂ O	10 mL

Filtrar em 0,22 µm, pode ser estocado em geladeira durante 1 mês

ESTOQUE C (Solução de Piruvato)

Composição	Concentração
Ácido pirúvico	0,008 ^o g
H ₂ O	1,0 mL

Filtrar em 0,22 µm, pode ser estocado em geladeira durante 1 mês

ESTOQUE D (Solução de Cloreto de Cálcio)

Composição	Concentração
CaCl ₂ H ₂ O	0,0262 g
H ₂ O	1,0 mL

Filtrar em 0,22 µm, pode ser estocado em geladeira durante 1 mês

L-GLUTAMINA

Dissolver 0,2923 g em 10 mL de H₂O