



Biotécnicas da reprodução como técnicas de manejo reprodutivo em ovinos¹

Biotechniques of reproduction as techniques of reproductive management in sheep

Aurino Alves Simplício^{2,5}, Vicente José de Figueirêdo Freitas³, Jeferson Ferreira da Fonseca⁴.

²Embrapa Caprinos; Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró, RN, Brasil;

³Universidade Estadual do Ceará (UECE)-Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução (LFCCR), Fortaleza, CE, Brasil

⁴Núcleo Sudeste de Caprino-Ovinocultura, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil

⁵Correspondência: aa.simplicio@uol.com.br

Resumo

O objetivo deste trabalho é apresentar e discutir biotécnicas da reprodução e o uso delas como práticas de manejo reprodutivo na exploração racional de ovinos de corte. Ressalta-se a importância do manejo da alimentação-nutrição e sanitário, do ambiente e da programação, organização e gestão da unidade produtiva. Ainda, da sobrevivência e desenvolvimento ponderal das crias e do intervalo entre partos. Estes são aspectos importantes para a produtividade dos ovinos de corte e a rentabilidade da exploração.

Palavras-chave: ovino, reprodução, biotécnicas da reprodução, manejo reprodutivo.

Abstract

The aim of this work is to present and discuss biotechniques of reproduction as reproductive management practices to explore sheep to meat production.

Keywords: sheep, reproduction, reproductive biotechniques, reproductive management.

Introdução

A exploração racional dos ovinos de corte exige programação, infra-estrutura, mão-de-obra qualificada e foco no mercado. É imperioso compreender o papel e a importância que a alimentação-nutrição, a saúde e o ambiente exercem sobre os animais e em consequência no desempenho produtivo deles, independente de idade; de sexo; da condição reprodutiva; do regime de manejo e da fase da exploração. Por outro lado, as biotécnicas da reprodução, quando devidamente usadas, são fortes aliadas e respondem por significativas melhorias na produtividade e rentabilidade dos rebanhos. Ressalte-se que os custos de produção e a qualidade dos produtos e de seus derivados são responsáveis por significativa parcela da maior ou menor competitividade da atividade. Ainda, ao se programar a implementação de biotécnicas da reprodução como práticas de manejo reprodutivo (MR) surgem à necessidade de se investir na organização e gestão da unidade produtiva; na qualificação de mão-de-obra e na maximização da eficiência reprodutiva da fêmea e do macho visando-se o incremento do retorno econômico do empreendimento. Toda técnica de MR deve ser posta em prática com base em critérios técnicos, praticidade de uso e visão empresarial. Dentre as práticas de MR, destacam-se a estação de monta, a inseminação artificial, a sincronização/ indução do estro, a superovulação, a produção *in vivo* e *in vitro* e a transferência de embriões, o diagnóstico precoce de prenhez e a indução do parto. Não se pode negligenciar a importância e o papel que biotécnicas como: a criopreservação de sêmen, de embriões e de oócitos; a sexagem de sêmen e de embriões; a transgênese e a clonagem têm como ferramentas de produção animal, de alimentos funcionais e de fármacos e para a preservação de espécies em via de extinção com foco no bem-estar animal, na longevidade dos indivíduos e garantia de sobrevivência das espécies, animal e humana (Simplício e Santos, 2005a, b; Kruij e van Reenen, 2000).

Eficiência reprodutiva

Independente de sexo, o uso racional de biotécnicas da reprodução (BR) pode repercutir direta e significativamente, sobre a eficiência reprodutiva (ER) dos ovinos. Ao usá-las como práticas de MR com foco na produção, existe a necessidade de se garantir a sobrevivência e o desenvolvimento corporal das crias, dessa forma, contribuindo positivamente para o desempenho produtivo e o aumento do desfrute dos rebanhos. A implementação de BR deve ser precedida da implantação das escriturações, zootécnica e contábil e do descarte dos animais improdutivos e/ ou menos produtivos. Ainda, não se pode deixar de fazer a análise prévia da relação custo-benefício de toda prática de MR quando cogitada sua implementação em nível de rebanho. O desempenho produtivo dos indivíduos ou rebanhos é fortemente influenciado, dentre outros fatores, pelo ambiente, pela

¹Palestra apresentada no XVII Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 31 de maio a 02 de junho de 2007, Curitiba, PR.

nutrição e a conseqüente condição corporal (CC), pelo estado de saúde, pelo manejo reprodutivo, pela genética e pelo regime de manejo. Para se maximizar a ER com rentabilidade econômico-financeira deve-se colocar ênfase empresarial na exploração. A fase de produção que compreende da cobertura ou inseminação artificial das matrizes até o desmame das crias, é o período em que o uso racional das BR mais pode contribuir para o desempenho reprodutivo e produtivo dos indivíduos e, conseqüentemente para o sucesso da exploração. Jeffeires (1961), avaliando a distribuição de tecido adiposo ao longo da região lombar, enfatizou a importância da CC das ovelhas para o desempenho reprodutivo. Gonzalez-Stagnaro (1991), descreveu o efeito da CC ao parto sobre o período de serviço e a mortalidade de crias. A avaliação da CC é de fácil execução e deve ser feita antes de se implementar quaisquer práticas de MR, mas, o sucesso da avaliação depende muito do conhecimento e da experiência do técnico e/ou do produtor. Cezar e Sousa (2006), descrevem que a mensuração da CC em fêmeas de raças deslanadas e seus mestiços deve ser feita, preferencialmente, nas regiões do esterno e da escápula. Entende-se, que a região da inserção da cauda a garupa presta-se, também, para se fazer à avaliação. Neste caso, cuidado deve ser tomado com as raças pertencentes aos grupamentos garupa gorda e rabo largo e seus descendentes. A importância do ambiente e, por conseqüência da ambiência, esta vista como o bem-estar dos indivíduos frente as possíveis interações passíveis de acontecer entre os animais e o ambiente que os rodeia, não deve ser negligenciada. No ambiente considerem-se os aspectos biológicos, climáticos, físicos, químicos e sociais e as possíveis interações entre si e com os animais, pois eles servirão de suporte para que os indivíduos expressem suas potencialidades reprodutiva e produtiva. Dentre esses aspectos, ressaltam-se: a disponibilidade e qualidade da água; a quantidade e distribuição de chuvas; o hábito de pastejo dos animais; a qualidade e disponibilidade das forragens; a capacidade de suporte; a taxa de lotação; a possibilidade de dominância entre os indivíduos; a maior ou menor intensidade do fotoperíodo; o calor; a radiação solar; a umidade do ar e do solo e o movimento e poluição do ar. Esses elementos podem interferir direta ou indiretamente, no consumo de alimentos e na saúde dos animais o que repercute na resposta dos indivíduos ao serem submetidos aos desafios das BR afetando os desempenhos reprodutivo e produtivo. Uma vez as condições de ambiente, a capacidade biológica dos indivíduos, os custos de produção e os mercados sejam favoráveis deve-se buscar a maximização da ER. Neste contexto, as BR usadas como práticas de MR podem contribuir economicamente, para o aumento da produção e da produtividade dos ovinos (Simplício e Santos, 2005a, b).

Estação de monta e inseminação artificial

A estação de monta (EM), em particular quando implantada conjuntamente com a inseminação artificial (IA), leva a programação de atividades e contribui fortemente para a organização e gestão da unidade produtiva. Para se estabelecer a EM com objetividade é importante definir a função explorada, isto é, carne ou leite e o intervalo entre partos a ser alcançado, bem como, conhecer as necessidades do mercado. A EM para a fêmea ovina pode ter uma duração de 35 dias a 49 dias. A suplementação nutricional dos reprodutores deve começar oito a 10 semanas antes da data prevista para o início da EM (Braden *et al.*, 1974). Também, é possível usar o efeito macho para sincronização /indução de estros férteis, em associação ou não a progestágeno e ao uso racional da monta natural ou da IA (Azevedo *et al.*, 1999; Ungerfeld e Rubianes, 1999). A fertilidade ao parto e o desempenho produtivo dos animais podem ser afetados, negativamente pela época em que a EM é feita e a raça do reprodutor, particularmente quando se trata de animais de raças exóticas (Machado e Simplício, 1998). Enquanto, o regime de amamentação controlada, apenas duas vezes ao dia, favorece a ovelha reassumir a função dos ovários mais cedo, apresentar estro clínico e ovular, o que propicia o encurtamento do intervalo entre partos e não interfere na sobrevivência e no desenvolvimento ponderal das crias (Souza e Simplício, 1999a, b). A EM com fêmeas nulíparas, quando conduzida a campo, deve ser feita numa unidade de manejo independente daquela usada para as pluríparas, visando-se evitar a dominância destas sobre aquelas na competição pelo macho e, a conseqüente redução da fertilidade ao parto. A EM ao concentrar os nascimentos favorece a programação de práticas de manejo como as inerentes à nutrição e a saúde das fêmeas, em diferentes estádios fisiológicos e os cuidados com as matrizes e as crias no transcorrer do período peri-parto. Também, disponibilizar ao mercado animais uniformes quanto à idade, ao peso e a condição de acabamento dos indivíduos. Estas situações favorecem, positivamente a comercialização. Acredita-se que a única limitação em se fazer a EM e em decorrência concentrar os nascimentos é a necessidade do uso intensivo de mão-de-obra, particularmente, durante a estação de partos (Simplício e Santos, 2005a, b).

Entende-se que a IA é uma técnica que apresenta grande impacto em um programa de melhoramento genético, desde que bem conduzida. No entanto, no Brasil e no Mundo, a IA ainda não é usada na ovelha no nível em que é na vaca. Alguns fatores têm contribuído para isto, destacando-se a anatomia da cérvix uterina; a ausência de uma técnica de inseminação eficaz, simples e de baixo custo e a inexistência de técnicas eficazes e seguras para se avaliar a capacidade fecundante da célula espermática, antes e após a congelação (Bunch e Ellsworth, 1981; Halbert *et al.*, 1990b; Naqvi *et al.*, 1998; Luz *et al.*, 2000). Killen e Caffery (1982), ao usarem a laparoscopia para fazer a IA na fêmea ovina deram uma grande contribuição para se expandir o uso desta técnica em nível de unidade produtiva. A técnica, afora permitir a suplantação da barreira física imposta pela condição anatômica da cérvix favorece a redução da dose inseminante, mesmo quando se usa espermatozóide sexado e,

pode ser usada independente da época do ano; do regime de manejo; do tipo de estro: natural, sincronizado ou induzido; da forma de apresentação e de preparação do sêmen etc. (Maxwell, 1986b; Findlater *et al.*, 1991; Ghalsasi e Nimbkar, 1996; Luz *et al.*, 2000; Hollinshead *et al.*, 2002). Luz *et al.* (2000), concluem que através da avaliação conjunta da motilidade individual progressiva (MIP) após a descongelação, do teste de termorresistência e do porcentual de células espermáticas íntegras é possível estimar-se a capacidade fecundante do sêmen congelado. Apesar dos avanços feitos no tocante a criopreservação do sêmen ovino alguns aspectos inerentes a modificações que ocorrem, particularmente nas membranas da célula espermática após a criopreservação e suas conseqüências na fertilidade ao parto não estão devidamente esclarecidos (Maxwell e Watson, 1996; Brisola *et al.*, 1999). Ressalte-se que a fertilidade ao parto varia fortemente com o doador do sêmen criopreservado (Perkins *et al.*, 1996). Maxwell (1986a), citam que a fertilidade ao parto e a prolificidade foram crescentes quando as inseminações intra-uterinas, por laparoscopia, foram feitas no intervalo entre 48 horas e 72 horas após a remoção das esponjas e a aplicação da eCG. Enquanto, Findlater *et al.*, (1991), descrevem que resultados satisfatórios de fertilidade ao parto são obtidos quando as inseminações intra-uterinas são feitas entre 54 horas e 60 horas e que a prolificidade é, positivamente correlacionada com a condição corporal das fêmeas no momento da aplicação das esponjas. Apesar dos inúmeros avanços quanto ao desenvolvimento das BR ainda persistem, por exemplos, o uso da técnica de congelamento do sêmen na forma de pellets e a predominância do uso do sêmen resfriado (Morais *et al.*, 1998; Brisola *et al.*, 1999; Luz *et al.*, 2000; Bicudo *et al.*, 2003). Aquela dificulta a identificação da dose inseminante e, ambas, limitam a comercialização de sêmen, dentro e entre estado, região e país. Ressalte-se que a ovinocultura de corte tem crescido e desenvolvido muito, no Brasil e n'outros países. Neste contexto, a avaliação genética de machos jovens e a identificação daqueles superiores ganham importância, bem como, a necessidade de intercâmbio de sêmen congelado oriundo desses animais, entre os estados, as regiões e os países. Apesar dos resultados animadores descritos na literatura, ainda existe o desafio da praticidade e da eficácia da IA pela via trans-cervical (Halbert *et al.*, 1990a, b; Windsor *et al.*, 1994; Buckrell *et al.*, 1994; Campbell *et al.*, 1996; Sayre e Lewis, 1997; Naqvi, *et al.*, 2001). Esta técnica, afóra contribuir para a redução dos custos operacionais, propiciaria a massificação do uso do sêmen criopreservado. Independente da técnica, a experiência do inseminador influencia fortemente nos resultados alcançados. A massificação da IA como prática de MR está na dependência do uso de uma única inseminação artificial em tempo fixo (IATF), dispensando a observação das fêmeas para ocorrência de estro clínico e resultado de fertilidade ao parto, mínima, de 60,0%. Diante do avanço do conhecimento quanto as BR e das tecnologias ora disponíveis, acredita-se que no futuro próximo a IA, na fêmea ovina de corte, conquistará espaço no Brasil.

Sincronização e indução do estro e da ovulação

A ovelha pode apresentar-se como poliéstrica estacional ou contínua, dependendo do fotoperíodo da região. A duração da estação reprodutiva é definida, primariamente pela latitude e secundariamente pela raça. As principais vantagens da sincronização/ indução dos estros são: o uso maximizado de reprodutores, a concentração dos nascimentos, melhor manejo nutricional e sanitário das matrizes; obtenção de lotes homogêneos de crias, entre outras. Entre as desvantagens podemos citar: a exigência de pessoal qualificado, a necessidade de manipulação e administração de drogas, entre outras. Para se compreender a aplicabilidade da sincronização/ indução de estros, deve-se considerar o objetivo do sistema de exploração em uso e o custo dos dias em que as ovelhas permanecem não prenhes. A sincronização refere-se à concentração de animais em estro num intervalo de 24 horas a 72 horas, durante a estação natural de acasalamento. Durante as estações de anestro e de transição o estro pode ser induzido por meio de técnicas que utilizam manipulações hormonais e de luz artificial e o efeito macho, Fig. 1. A seguir serão apresentados, sucintamente, os principais protocolos utilizados para sincronização do estro e da ovulação em ovelhas.

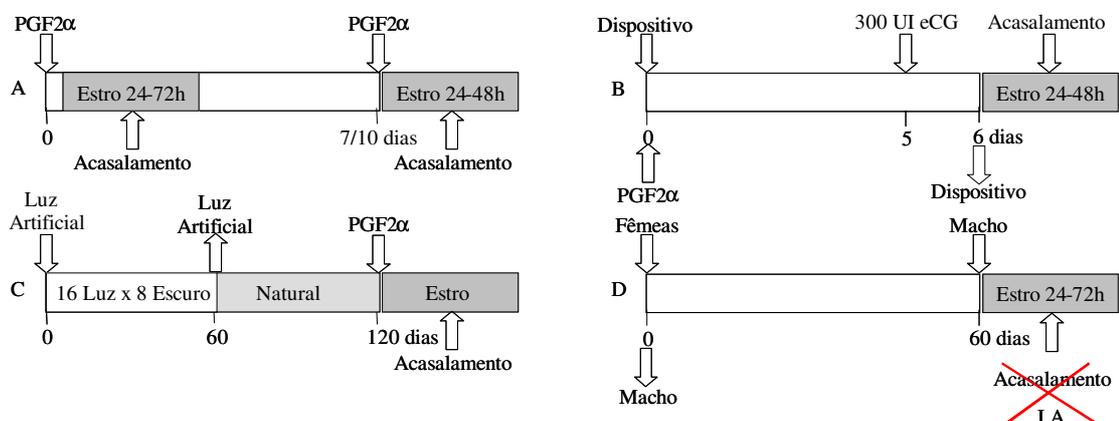


Figura 1. A. Sincronização de estros com $PGF_{2\alpha}$; B. Indução de estros com hormônios; C. Uso de luz artificial e, D. Uso do efeito macho (Fonseca, 2005).

Prostaglandina

Durante a estação de acasalamento, a sincronização de estro pode ser eficientemente alcançada com o uso de PGF_{2α}, em dose única ou duas doses intervaladas de sete dias (Fig. 1 A). O encurtamento deste intervalo de 10 para sete dias tem apresentado melhores resultados, sobretudo por permitir maior sincronia das ovulações, favorecendo a IA em tempo fixo (IATF). No uso de duas aplicações, o aproveitamento ou não do estro após a primeira é facultativa, mas os estros após a segunda aplicação ocorrem em maior porcentual de animais, de forma mais sincrônica e com sincronia das ovulações (Menchaca e Rubianes, 2004). A associação de PGF_{2α} e dispositivo intravaginal contendo progestágeno ou progesterona é outra possibilidade (Fonseca *et al.*, 2004). Em ambos os casos, a aplicação de eCG ou de hCG pode ser dispensada sem afetar a fertilidade.

Coquetéis hormonais

A indução de estro pode ser alcançada usando-se progestágeno em associação com gonadotrofina e PGF_{2α}. A eCG é mais utilizada mas, a hCG pode ser usada com sucesso (Fonseca *et al.*, 2004). O uso de progestágeno, por seis dias, têm apresentado elevada eficiência, tanto com relação ao porcentual de animais em estro, quanto com a sincronia e a fertilidade (Souza *et al.*, 2007). A dose, a duração do período de exposição, o tipo e a via de administração do progestágeno, bem como, o uso ou não de PGF_{2α} e o momento de sua aplicação variam com o protocolo. Gonadotrofina e PGF_{2α} são administradas 24 horas a 48 horas antes ou no momento da retirada do progestágeno.

Luz artificial

O estro pode ser induzido pelo uso de luz artificial. As fêmeas são submetidas a 16 horas de luz e oito horas de escuro por um período de 60 dias e os animais manifestam estro cerca de 60 dias após o final do tratamento, Fig. 1 C. Os machos também devem ser submetidos ao mesmo tratamento e não há sincronia entre fêmeas em estro. A IA no primeiro estro não é recomendada (Fonseca *et al.*, 2007).

Efeito macho

O efeito macho se faz presente após o afastamento completo do macho das fêmeas por um período não inferior a três-quatro semanas. Ao ser re-introduzido no rebanho, um significativo número de fêmeas ovula em 72 horas (Fig 1 D). Sua aplicação é mais eficiente na estação de transição e pode ser associada com o uso de luz artificial (Sasa *et al.*, 2004) e indução hormonal de estro (Rajamahendran *et al.*, 1993). A grande desvantagem da técnica é o baixo grau de sincronia no aparecimento dos estros.

Melatonina

Implante de melatonina é usado para a indução de estro em ovinos (Züñica *et al.*, 2002; Gómez *et al.*, 2006). Normalmente, a técnica é usada próxima à estação de monta natural, antecipando-a. Todavia, pode ser usada no final da estação de acasalamento ou início da estação de anestro. Nestas últimas condições, ovelhas submetidas a implantes de melatonina por 40 dias associado à introdução do macho no rebanho a partir da retirada dos implantes, apresentaram concepção de 78,0%. Resposta idêntica foi obtida em ovelhas que receberam esponja com 30 mg de fluorogestona, por 12 dias e 450 UI de eCG no momento da retirada.

A sincronia da ovulação é desejável, particularmente quando do uso da IATF (Vinoles *et al.*, 2001; Fonseca *et al.*, 2007). Em geral, ao promover a sincronização dos estros, tem-se uma boa sincronia das ovulações. Em ovelhas Merino, a administração de GnRH 36 horas após a retirada das esponjas antecipou a ovulação (48,0±2,8 vs 52,8±3,8 h) quando comparado às ovelhas controle (52,2±5,7 vs 57,0±4,2 h) durante as estações de anestro e de acasalamento, respectivamente (Reyna *et al.*, 2005). Cavalvanti *et al.* (2006a, b) submeteram ovelhas Santa Inês e mestiças Santa Inês /Dorper à indução de estro com seis dias de progestágeno (60mg MAP) e administração de PGF_{2α} e eCG 24 horas antes da retirada das esponjas. A sincronia das ovulações (50,1±5,6 vs 48,3±6,2 h) e a porcentagem de gestação foram idênticas (50,0 vs 44,0) para animais que receberam solução salina e GnRH 24 horas após a retirada das esponjas, respectivamente. As taxas de gestação foram 52,0 e 38,0 para a monta natural e IATF, por laparoscopia, às 55 horas, respectivamente. A associação de GnRH no momento da IATF, às 42 horas após a segunda dose de PGF_{2α}, Fig. 1A, afetou, negativamente a taxa de gestação em ovelhas Corriedale tratadas (37,0) em comparação as controle (49,0) (Gil *et al.*, 2004).

Transferência de embriões

A TE em ovelhas no Brasil tornou-se uma realidade, fato atribuído à contribuição significativa feita na simplificação das técnicas envolvidas no processo e ao aumento no número de técnicos qualificados. Todavia, dados oficiais mostram um declínio no número de embriões colhidos da ordem de - 47,0% no biênio 2004/2005, apesar de registrar o aumento no número de embriões criopreservados.

Doadora

Esta deve ser criteriosamente avaliada e selecionada. Em geral, o técnico responsável pela TE não detém o poder de decisão sobre que fêmeas devem ou não servir como doadoras em função das características genéticas e produtivas. Alguns critérios devem ser considerados (Fonseca, 2007). Avaliação do histórico de fertilidade; estágio fisiológico, com, no mínimo, 60 dias pós-parto e em ganho de peso positivo; vermifugação e vacina devem ser feitas, pelo menos, com 15 dias de antecedência em relação ao início da sincronização; quando do exame ginecológico, sempre que possível, associar a vaginoscopia e a ultra-sonografia; o manejo alimentar e da nutrição não deve ser modificado no transcorrer do processo, caso ocorra alguma mudança, esta deve ser implementada com, não menos do que, duas semanas do início da sincronização e o escore da condição corporal (ECC) superior a 2,5, porém, não superior a 4, numa escala de 1 a 5.

Superovulação

Durante o ciclo estral, um a quatro folículos podem alcançar diâmetro ovulatório (Evans, 2003). O princípio básico da superovulação é o fornecimento de quantidade elevada de FSH, levando a ovulações múltiplas. Os hormônios utilizados são FSH, eCG e hMG. A administração de seis a oito aplicações de FSH é a mais comum. A dose total de FSH usada é relativamente elevada. A ampla variabilidade nas respostas frente ao desafio gonadotrófico é, sem dúvida, o principal fator limitante da transferência de embriões em ovinos (Cognié, 1999; Driancourt, 2001). Fatores como perfil folicular ovariano no início das aplicações de FSH e o grau de pureza das preparações hormonais, têm sido associados a esta elevada variabilidade. Isto evidencia a necessidade de desenvolvimento de protocolos mais simples, eficientes, menos estressantes, menos onerosos e que garantam taxas de recuperação elevadas e constantes (Fonseca *et al.*, 2007). Durante a estação reprodutiva o desafio gonadotrófico pode ser feito com base na observação de estro e sem uso de progestágenos. Todavia, a sincronização de estro facilita e otimiza os eventos envolvidos na superovulação e colheita de embriões. Normalmente, utilizam-se progesterona ou progestágeno impregnado em dispositivo vaginal ou auricular com um período de exposição igual ou superior a 12 dias. A redução deste período pode encurtar a duração do processo com sucesso (Fonseca *et al.*, 2007). A administração de PGF_{2α} também é necessária e variações no momento da aplicação relativo ao momento da inserção do dispositivo devem ser consideradas. A regressão lútea precoce, também ocorre na ovelha. O fenômeno parece estar associado a elevadas concentrações plasmáticas de estrógenos durante a fase lútea inicial e, em consequência, nota-se um decréscimo na resposta superovulatória. Em ovelhas superovuladas, a regressão lútea precoce pode variar de 6,0% a 75,0% (Fukui *et al.*, 1998; Lopes Jr *et al.*, 2006). Dentre os fatores que podem afetar a resposta ao desafio gonadotrófico citam-se a estação do ano, raça, idade, saúde, nutrição, condição corporal e protocolos utilizados. Todavia, um dos principais fatores é a presença de folículos maiores que cinco a seis mm de diâmetro no início do desafio gonadotrófico. A presença destes folículos tem sido associada a respostas inferiores (Rubianes *et al.*, 1995; Gonzáles-Bulnes *et al.*, 2002, 2003). O racional seria iniciar as aplicações de FSH paralelamente a emergência folicular. Como durante um ciclo estral podem ocorrer várias ondas e a (s) onda (s) intermediária (s) entre a primeira e a última aparece a intervalos irregulares, apenas a primeira onda poderia ser aproveitada para este propósito. Neste sentido, com o auxílio de acompanhamento por ultra-sonografia têm sido testados os protocolos do “dia 0”. Assim, a primeira aplicação de FSH é feita paralelamente à ovulação e emergência da primeira onda folicular (Rubianes e Menchaca, 2006; Fonseca *et al.*, 2007). Nos pequenos ruminantes os protocolos tradicionais têm por base a duração do ciclo estral, enquanto os protocolos do “Dia 0” pautam-se no conhecimento de dinâmica folicular associada à manipulação do ciclo estral. Nos protocolos do “dia 0”, a diminuição do período de permanência dos dispositivos minimiza os riscos de perda, além de reduzir vaginites decorrentes do uso de dispositivos intravaginais. Outra forma de se simplificar a superovulação é reduzir o número de aplicações de FSH. A associação de FSH com polivinilpirrolidina (PVP) apresentou taxa de recuperação de embriões idêntica ao protocolo de múltiplas administrações (D’Alessandro *et al.*, 2001).

Acasalamento

Preferencialmente, deve-se fazer a IA, por laparoscopia, sendo o número variável entre uma e duas. Neste caso, com intervalo de 12 horas. A primeira ou única inseminação, com sêmen fresco, deve ser feita 36

horas após a retirada do progestágeno (Gusmão, 2006). Quando do uso da monta natural, o reprodutor deve ser sexualmente maduro, estar em bom estado de higiene e sendo nutricionalmente suplementado há, aproximadamente, 60 dias e aprovado em exame clínico-andrológico previamente por técnico qualificado.

Colheita e avaliação de embriões

A colheita de embriões em ovelhas tem sido predominantemente executada por laparotomia ou por laparoscopia e sob anestesia geral. Ovelhas superovuladas e submetidas a colheitas repetidas não apresentam redução significativa na resposta. Todavia, o procedimento cirúrgico não é rotineiramente repetido mais de três vezes (Bari *et al.*, 2001; Cordeiro *et al.*, 2003). Este parece ser o limite das colheitas cirúrgicas, quando as seqüelas inviabilizam novas colheitas (Fonseca, 2007). No entanto, a colheita pela via transcervical em ovelhas foi reportada com sucesso (Barry *et al.*, 1990; Almeida *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2005). A técnica pode ser executada com o animal em estação, sob anestesia epidural, local (cérvice), bem como leve sedação. A colheita é feita seis a sete dias após o início do estro e em média, cinco embriões viáveis são recuperados por doadora. É recomendável jejum hídrico/ alimentar mínimo de 24 horas antes da colheita.

Criopreservação de embriões

Sua aplicabilidade é ressaltada pelo número grande de TE anualmente. Associada a TE contribuem para o controle da transmissão e propagação de doenças, redução de custos do transporte e perdas genéticas em comparação a manutenção de animais vivos. A congelação é classificada em lenta e rápida, de acordo com a taxa de resfriamento e o tipo e concentração do crioprotetor (Shaw *et al.*, 2000). A porcentagem de gestação de ovelhas inovuladas varia de 30,0 a 70,0 em função da qualidade dos embriões. A técnica mais usada para ovinos é a congelação em glicerol com desidratação (pré-congelação) e re-hidratação (pós-descongelação) em várias fases. Os embriões, após desidratação e envase são colocados em máquinas programáveis e submetidos a uma curva de resfriamento rápida (3°C/min), a indução de cristalização (seeding) e uma segunda curva de resfriamento lenta (0,3-0,6 °C/min) até alcançar -30 a -32 °C, quando as palhetas contendo os embriões são imersas em nitrogênio líquido. A vitrificação é um processo onde se obtém solidificação sem formação ou separação de cristais de gelo nem concentração de solutos, minimizando o choque osmótico. Fatos que podem ocorrer em maior ou menor proporção nas técnicas tradicionais de congelação. Em ovinos, Bari *et al.* (2001), obtiveram 53,0% de crias viáveis oriundas de transferência direta de embriões vitrificados.

Receptora

Esta responde por 50,0% dos resultados alcançados em um programa de transferência de embriões. Daí, a sua escolha merece a mesma atenção dedicada à das doadoras, exceto no tocante às características genéticas. Atenção especial deve ser dada à ordem de parto, ao desenvolvimento corporal e a habilidade materna. O protocolo de sincronização de estro deve embasar-se no tempo de permanência do dispositivo contendo progestágeno ou progesterona, nas doadoras. Também, pode basear-se no dia esperado para ocorrência do estro da doadora. Sugere-se que a inserção e remoção do dispositivo sejam efetuadas entre 10:00 horas e 12:00 horas. Fêmeas em estros naturais também podem ser usadas, desde que atendam à sincronia com a doadora. Em geral, para cada doadora são sincronizadas cinco a 10 receptoras.

Inovulação

A inovulação dos embriões pode ser feita pelas técnicas cirúrgica, laparoscopia, semi-laparoscopia e transcervical, sendo a última pouco relatada. Normalmente, registram-se taxas de gestação que variam de 40,0% a 80,0%. As técnicas que possibilitam a avaliação morfo-funcional do corpo lúteo favorecem a identificação de problemas, a exemplo a regressão lútea precoce e, dessa forma, contribuem para a obtenção de melhores taxas de concepção e fertilidade ao parto. A transferência pode ser de um ou dois embriões para o corno uterino ipsilateral ao ovário contendo corpo (s) lúteo (s) funcional (is). A assincronia entre doadora e receptoras não deve ser superior a um dia, dando-se preferência àquelas que apresentaram estro no mesmo dia da doadora. A inovulação transcervical pode ser uma tendência futura. Neste caso, o corpo lúteo deve ser localizado por ultra-sonografia para identificação de qual corno receberá o embrião. O uso de drogas dilatadoras da cérvice, como oxicina e estrógeno, favorece a inovulação transcervical (Khalifa *et al.*, 1992; Wulster-Radcliffe *et al.*, 1999). Evidencia-se que o diâmetro do inovulador, o desenvolvimento corporal e a ordem de parto da receptora poderão auferir maior ou menor facilidade a passagem da cérvice.

Produção *in vitro* (PIV) de embriões

O interesse crescente pelo sistema PIV de embriões pode ser explicado pela existência de uma fonte barata de obtenção de oócitos, ou seja, ovários oriundos de abatedouro. No entanto, esses oócitos não podem ser usados em programas de melhoramento genético, pois, em geral, os ovários são oriundos de animais de descarte. Por consequência, a colheita de oócitos em animais vivos, de genética e condição de higiene conhecidas, passou a ser a técnica preferida para uso em sistemas de PIV de embriões. A colheita de oócitos ou *ovum pick-up* guiada por laparoscopia (LOPU) tem sido usada com sucesso na espécie ovina (Baldassarre *et al.*, 1996; Tervit, 1996). A LOPU em ovelhas não tratadas com hormônios propicia a recuperação de, aproximadamente cinco oócitos por fêmea. Mas, a recuperação pode ser incrementada pelo uso de múltiplas injeções de FSH ou uma única de FSH-eCG (Baril, 2006). Após a obtenção dos oócitos imaturos, o protocolo de PIV de embriões envolve três etapas: a maturação dos oócitos recém-colhidos – primários; a fecundação dos oócitos maturados - secundários e o cultivo dos presumíveis zigotos por, cerca de uma semana até a formação de blastocistos que podem ser transferidos a fresco ou criopreservados (Lima Verde *et al.*, 2003).

Maturação in vitro (MIV)

A aquisição da competência dos oócitos para o desenvolvimento ocorre durante a foliculogênese e é influenciada pela idade da doadora, o tamanho e a atresia dos folículos (Mermillod *et al.*, 1999). Contudo, independente da natureza heterogênea dos oócitos imaturos usados para a PIV, a maturação deles pode ser influenciada pelos componentes do meio e as condições de cultivo. Para a MIV de oócitos ovinos, o TCM 199 pode ser suplementado com fluido folicular (FF) colhido de folículos maiores do que quatro (4) mm e com 100 ng/mL de oFSH. O efeito positivo do FF sobre a maturação citoplasmática dos oócitos é maior quando estes são oriundos de folículos não atresícos ou de folículos estimulados com gonadotrofinas (Cognié *et al.*, 1995). Nessas condições, a extrusão do primeiro corpúsculo polar (metáfase II) ocorre entre 16 horas e 24 horas após o início da maturação (Cognié *et al.*, 2003). Melhorias no meio de maturação levaram a resultados que se aproximaram dos 70,0% de blastocistos alcançados com oócitos ovulados (Cognié e Poulin, 2006).

Fecundação in vitro (FIV)

Após um período de maturação de 24 horas, o *cumulus oophorus* é removido por pipetagem e os oócitos são lavados em meio de fecundação. Quarenta a 50 oócitos são colocados em placas de quatro poços com meio SOF sob óleo mineral. Espermatozoides móveis são obtidos pelo uso da técnica do gradiente de Percoll (45,0%/90,0%), quando os mesmo são centrifugados por 10 minutos a 500 g. Os espermatozoides viáveis, colhidos do fundo da fração de 90,0% são diluídos para uma concentração de 1×10^7 espermatozoides/mL e incubados por uma hora em meio suplementado com soro sanguíneo de ovelha em estro, inativado, para a capacitação (Cognié *et al.*, 2003). Os espermatozoides capacitados são adicionados à gota de fecundação e as placas são incubadas por 17 horas a 39 °C sob uma atmosfera de 5,0 % de CO₂. Após quatro horas de incubação dos oócitos com os espermatozoides, as taxas de clivagem e de blastocistos são similares às de 17 horas de incubação (Cognié *et al.*, 2003).

Cultivo in vitro (CIV)

Três sistemas de cultivo são rotineiramente usados: (a) co-cultivo com suporte de células somáticas, (b) condições semi-definidas em meio adequado para as exigências do embrião e (c) desenvolvimento *in vivo* no oviduto (VIVO). O co-cultivo de embriões ovinos é geralmente realizado em TCM 199 ou meio B2, normalmente suplementado com soro fetal bovino. As células de escolha são as epiteliais do oviduto ou as células Vero que produzem fatores promotores de crescimento e/ ou que removem componentes inibitórios provenientes do meio. O sistema semi-definido, mais comumente usado para o cultivo de embriões ovinos, é o fluido sintético do oviduto (SOF) enriquecido com aminoácidos e albumina sérica bovina (SOF-BSA) a 38,5 °C em 5,0% O₂, 5,0% CO₂ e 90,0% N₂ em atmosfera umidificada (Cognié *et al.*, 2003). Independente do sistema de cultivo, as taxas de desenvolvimento de oócitos são similares (Holm *et al.*, 1994). Contudo, após transferência para receptoras sincronizadas, o CIV de zigotos em SOF, reduziu a viabilidade do embrião para 15,0% a 25,0% em comparação ao co-cultivo (Ranilla *et al.*, 1998) e ao desenvolvimento no oviduto (Holm *et al.*, 1996). Adicionalmente, a sobrevivência de embriões oriundos da PIV em ovinos (Ptak *et al.*, 1999) é significativamente mais baixa (-25,0%), quando comparada com embriões colhidos de fêmeas superovuladas, principalmente devido ao aumento da perda embrionária entre os primeiros 30 a 40 dias de gestação.

Diagnóstico precoce de prenhez

Em nível de rebanho, particularmente em regime de manejo semi-intensivo ou intensivo, o diagnóstico precoce de gestação é uma BR muito importante. Ao identificar às fêmeas prenhes, serve de suporte ao manejo da nutrição e sanitário destas e a tomada de decisão quanto ao descarte das não gestantes ou a condução de outra EM. Favorece a identificação de fêmeas portadoras de problemas reprodutivos e contribui para minimizar as perdas, principalmente de ordem econômica. Algumas técnicas de diagnóstico de gestação são imprecisas; de difícil operacionalização; requerem equipamentos caros; exigem metodologia sofisticada; necessitam de mão-de-obra qualificada; apresentam riscos para as matrizes e os embriões ou fetos. Com o advento da ultra-sonografia em tempo real a maior parte desses entraves deixou de existir (Buckrell, 1988) e tornou-se a técnica de preferência para se fazer diagnóstico de prenhez pela a maioria dos profissionais que se dedica à reprodução ovina (Chalhoub e Ribeiro Filho, 2002; Chalhoub *et al.*, 2005a). A melhor eficácia com a ultra-sonografia trans-abdominal é obtida entre o 40^o dia e o 75^o dia após a cobertura ou IA enquanto, a trans-retal já é eficaz entre o 25^o dia e o 30^o dia (Haibel, 1990; Ishwar, 1995). Calamari *et al.* (2003), concluem que através da ultra-sonografia trans-retal é possível auscultar os batimentos cardíacos do embrião ao 21^o dia da prenhez, visualizar placentomas ao 25^o dia e fazer o diagnóstico de prenhez ao 31^o após a cobertura ou IA com uma acurácia de 82,4%. Na raça Ideal a mensuração do embrião foi possível a partir do 21^o dia de prenhez (Chalhoub *et al.*, 2001). Peixoto *et al.* (2005), evidenciam que na raça Santa Inês é possível fazer-se a quantificação do número de fetos após o 60^o dia de gestação. Enquanto, na mesma raça, Santos *et al.* (2006), descrevem que a sexagem fetal é possível a partir do 50^o dia de prenhez. Dentre as vantagens da ultra-sonografia em tempo real, ressaltam-se a eficácia; a precocidade em que o diagnóstico pode ser feito em relação à data da cobertura, da IA ou da transferência de embrião e a segurança para o operador, a matriz e o conceito (Haibel, 1990; Ishwar, 1995). O conhecimento da idade fetal e do número de fetos favorece a implementação de práticas de manejo sanitário e alimentar-nutricional, uma vez que as exigências nutricionais variam em função da idade e do número de fetos (Greenwood *et al.*, 2002; Chalhoub *et al.*, 2005a). O manejo alimentar e da nutrição no transcórre do terço final da prenhez contribui, positivamente para preparar as matrizes quanto à condição corporal ao parto e para o ganho de peso dos fetos o que repercute diretamente no peso das crias ao nascerem. Esses dois aspectos são muito importantes para que o sistema reprodutor das matrizes reassuma sua função plena, o mais cedo possível, durante o período pós-parto e para a sobrevivência das crias no transcórre do período de amamentação (Simplício e Santos, 2005a, b).

Indução do parto

Esta é justificada quando se está diante de uma prenhez prolongada e esta, na maioria das vezes, é acompanhada de transtornos patológicos, como hidropsia das membranas fetais, paraplegia pré-parto etc. Também, quando se pretende implementar um programa de controle de doenças; se desejar agrupar os partos; se programa prestar assistência mais efetiva as fêmeas em trabalho de parto ou quando se pretende abreviar a duração do período de prenhez. Ressalte-se que a indução do parto (IP) antes do 144^o dia de prenhez pode favorecer a morte das crias, pois estas ainda podem apresentar imaturidade para sobreviverem no meio externo devido, principalmente à sua incompleta capacidade respiratória. A ovelha é corpo lúteo dependente para manutenção da prenhez, apenas durante o primeiro terço da gestação passando a placenta a ser a principal fonte de progesterona, o que torna o CL dispensável para sua manutenção. Em consequência a PGF_{2-alfa} e seu análogo sintético, cloprostenol não são substâncias eletivas para indução do parto (Harman e Slyter, 1980). Em geral, para se induzir o parto na ovelha usa-se corticosteróides, pela via intramuscular (Chalhoub *et al.*, 2005b, particularmente a dexametazona e a betametazona, sendo esta mais efetiva do que aquela. A associação da betametazona com o estradiol além de garantir a ocorrência e a concentração dos partos no intervalo de 36 horas a 56 horas após as aplicações, favorece a sobrevivência das crias (Ptak *et al.*, 2002). A betametazona tem sido usada na dose de 15 mg enquanto, dose de 10 mg a 20 mg de dexametazona é usual. A expulsão da placenta deve ocorrer no período de oito horas após o nascimento da última cria. A tração dos envoltórios fetais não é aconselhável, pois, pode levar a morte da matriz em decorrência de hemorragia e, também favorece o surgimento de infecção uterina o que interfere na duração do período de serviço e em consequência afeta, negativamente a duração do intervalo entre partos (Grunert e Birgel, 1984).

Sexagem de embriões

Existem diversas técnicas para sexagem de embriões. Dentre elas: a análise citogenética; a detecção do antígeno H-Y e o uso de sondas específicas para o cromossomo Y. Através de técnicas de PCR que amplificam as seqüências de DNA sexo-específicas, o sexo do embrião pode ser determinado em bovinos, suínos, humanos e camundongos (Bondioli *et al.*, 1992). A sexagem embrionária com testes a base de PCR apresenta as vantagens de ser simples, rápida, de baixo custo e acurácia elevada. Em ovinos a técnica tem sido pouco usada. Independente de espécie, a sexagem de embriões deverá crescer em importância como uma técnica de manejo reprodutivo e para elucidar aspectos inerentes a efeitos ligados ao sexo sobre o desenvolvimento e diferenciação dos embriões.

Bisseção e clonagem de embriões

A bissecção de embriões necessita de mão-de-obra técnica e qualificada. Embriões em estágio de mórula ou blastocisto são divididos em dois hemi-embriões. Cada par de hemi-embriões é transferido para uma receptora, com resultados de prenhez e parto gemelar satisfatórios (Chesné, 2006). Em animais de produção, a clonagem foi feita pela primeira vez em ovinos usando-se a técnica de transferência de núcleos embrionários para oócitos enucleados (Willadsen, 1986). No entanto, as possibilidades de obtenção de clones a partir desta técnica são limitadas devido, particularmente ao pequeno número de núcleos disponíveis. Um grande passo foi dado com a possibilidade de obter crias viáveis a partir de células somáticas (Wilmot *et al.*, 1997). A clonagem somática consiste em usar células diferenciadas colhidas de um animal adulto como fonte de núcleos diplóides e transferi-los para oócitos receptores previamente enucleados. Evidenciou-se que os embriões reconstituídos por micromanipulação são cultivados *in vitro* antes de serem transferidos para receptoras. Desde o nascimento de “Dolly”, a transferência nuclear tem sido aplicada com sucesso em uma variedade de espécies animais. Estudos em embriões e fetos permitiram aprofundar o conhecimento sobre os mecanismos epigenéticos envolvidos na reprogramação nuclear. Todavia, a frequência de nascimentos de crias viáveis continua baixa. Do ponto de vista prático, a transferência nuclear atualmente pode ser aplicada na multiplicação de espécies ameaçadas de extinção e na produção de animais transgênicos para pesquisa, exploração pecuária e produção de fármacos (Campbell *et al.*, 2005).

Transgênese

Esta pode ser definida como uma modificação da informação genética de um organismo através de técnicas de DNA recombinante. Ovinos transgênicos são produzidos há mais de 20 anos através de microinjeção de uma construção de DNA no pró-núcleo de zigotos (Hammer *et al.*, 1985). Os ovinos apresentam características favoráveis que os qualificam como um excelente modelo para a transgênese, destacando-se um intervalo entre gerações curto, prolificidade elevada e um baixo custo para manutenção. Uma grande quantidade de recursos financeiros, equipamentos sofisticados e mão-de-obra qualificada são necessários para produção de animais transgênicos; sendo o custo de produção de um bovino transgênico da ordem de US\$ 546.000 e a de um ovino de US\$ 60.000 (Wall *et al.*, 1992). Em geral, animais transgênicos são usados para aumento de características de produção e em biomedicina, isto é, síntese de biofármaco e para xenotransplante. Ovinos transgênicos portadores de uma construção queratina/ IGF-I apresentam expressão cerca de 6,0% maior na pele do que aqueles não transgênicos (Damak *et al.*, 1996a, b). Em ambos os casos nenhum efeito adverso do transgene foi observado sobre a sanidade e a reprodução dos animais. Está prevista para este ano, a produção de medicamentos para o tratamento da fibrose cística e da deficiência em α -anti-tripsina. Os medicamentos serão produzidos a partir de proteínas sintetizadas pela glândula mamária de ovelhas transgênicas (Niemann e Kues, 2003).

Referências

- Almeida VM, Câmara DR, Salles HO, Oliveira DPF, Medeiros JN, Alves OMM. Colheita de embriões via transcervical em ovinos. *Rev Bras Reprod Anim*, v.5, p.82-84, 2002.
- Azevedo HC, Oliveira AA, Simplício AA, Santos DO. Efeito macho sobre a distribuição do primeiro estro em ovelhas Santa Inês submetidas à estação de monta. *Rev Bras Reprod Anim*, v.23, n.3, p.232-234, 1999.
- Baldassarre H, Furnus CC, Matos DG, Pessi H. In vitro production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis: alternative gonadotrophin treatments for stimulation of oocyte donors. *Theriogenology*, v. 45, p. 707-717, 1996.
- Bari F, Khalid M, Wolf B, Haresign W, Murray TMA, Merrell B. The repeatability of superovulatory response and embryo recovery in sheep. *Theriogenology*, v.56, p.147-155, 2001.
- Baril G. Ovum pick-up em caprinos e ovinos. In: Freitas VJF. *Biotecnologia da reprodução em pequenos ruminantes: produção de embriões por transferência nuclear (clonagem)*. Fortaleza: Multicor, 2006. p.30-45.
- Baril G, Traldi AL, Cognie Y, Leboeuf B, Beckers JF, Mermillod P. Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. *Theriogenology*, v. 56, p.299-305, 2001.
- Barry DM, Van Niekerk CH, Rust J, Van Der Walt T. Cervical embryo collection in sheep after ripening of the cervix with prostaglandin E₂ and estradiol. *Theriogenology*, v.33, p.190, 1990.
- Bicudo SD, Sousa DB, Takada L. Possibilidades e limitações da inseminação artificial com sêmen ovino refrigerado e biotécnicas associadas como estratégias de intensificação do manejo reprodutivo. *Rev Bras Reprod Anim*, v. 27, p.120-127, 2003.
- Bondioli KR. Embryo sexing: A review of current techniques and their potential for commercial application in livestock production. *J Anim Sci*, v.70, p.19-25, 1992.



- Braden AWH, Turnbull KE, Mattner PE, Moule GR.** Effect of protein and energy content of the diet on the rate of sperm production in rams. *Aust J Biol Sci*, v.27, p.67-73, 1974.
- Brisola LBS, Neves JP, Gonçalves PBD, Oliveira JFC, Montagner MM.** Integridade das membranas plasmática, nuclear e mitocondrial de espermatozoides ovinos criopreservados com etileno glicol. *Ci Rur*, v.29, p.527-531, 1999.
- Buckrell BC.** Applications of ultrasonography in reproduction in sheep and goats. *Theriogenology*, v.29, p.71-84, 1988.
- Buckrell BC, Buschbeck C, Gartley, CJ, Kroetsch T, McCutcheon W, Martin J, Penner WK, Walton JS.** Further development of a transcervical technique for artificial insemination in sheep using previously frozen semen. *Theriogenology*, v.42, p.601-611, 1994.
- Bunch TD, Ellsworth HS.** Gross anatomy of the ovine cervix. *Int Goat Sheep Res*, v.4, p.282-285, 1981.
- Calamari CV, Ferrari S, Leinz FF, Rodrigues CFC, Bianchini D, Ferreira F, Dias RA.** Avaliação de dois métodos de diagnóstico precoce de gestação em ovelhas: ultra-sonografia transretal e detector de prenhez para pequenos ruminantes (DPPR – 80). *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.40, p.261-266, 2003.
- Campbell JW, Harvey TG, McDonald MF, Sparksman RI.** Transcervical insemination in sheep: an anatomical and histological evaluation. *Theriogenology*, v.45, p.1535-1544, 1996.
- Campbell KHS, Alberio R, Choi I, Fisher P, Kelly RDW, Lee JH, Maalouf W.** Cloning: eight years after Dolly. *Reprod Dom Anim*, v.40, p.256-268, 2005.
- Cavalcanti AS, Fonseca JF, Nogueira LAG, Brandão FZ, Silva ALS, Pinho TG, Bioté MC, Carvalho BC.** Taxa de ovulação em protocolos de sincronização com progestágenos associados ao GnRH em ovelhas. *Acta Vet Sci*, v.34, p.385, 2006a. Resumo.
- Cavalcanti AS, Fonseca JF, Nogueira LAG, Brandão FZ, Silva ALS, Pinho TG, Pinna AE, Carvalho BC.** Efeito do GnRH na taxa de gestação em protocolos de sincronização de estro em ovelhas. *Acta Vet Sci*, v.34, p.384, 2006b. Resumo
- Chalhoub M, Almeida AK, Ribeiro Filho AL.** Emprego da ultra-sonografia como estratégia do manejo reprodutivo em ovinos e caprinos. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2005, Goiânia, GO. *Anais ...* Belo Horizonte: CBRA, 2005a. 3p. CD-ROM.
- Chalhoub M, Lopes MD, Prestes NC, Ribeiro Filho AL.** Perfil ultra-sonográfico do crescimento embrionário/fetal ovino do 21^o ao 41^o dia de gestação. *Rev Bras Saúde Prod Anim.*, v.2, p.65-68, 2001.
- Chalhoub M, Ribeiro Filho AL** Diagnóstico de gestação em pequenos ruminantes por ultra-sonografia de tempo real. *Rev Bras Reprod Anim Supl*, n.5, p.27-30, 2002.
- Chalhoub M, Ribeiro Filho AL, Bittencourt RF.** Eficiência reprodutiva: indução do parto em pequenos ruminantes. In: Congresso Norte/Nordeste de Reprodução Animal, 2, 2005, Teresina PI. *Anais ...* TeresinaPI: CONERA, 2005b. 12p. CD-ROM.
- Chesné P.** Métodos de clonagem em caprinos e ovinos. In: Freitas VJF. *Biotecnologia da reprodução em pequenos ruminantes: produção de embriões por transferência nuclear (clonagem)*. Fortaleza: Multicor, 2006. p.71-84.
- Cezar MF, Sousa WH.** Avaliação e utilização da condição corporal como ferramenta de melhoria da reprodução e produção de ovinos e caprinos de corte. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 43, 2006, João Pessoa, PB. *Anais ...* João Pessoa: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2006. p.649-678.
- Cognie Y.** State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*, v.51, p.105-116, 1999.
- Cognié Y, Baril G, Poulin N, Mermillod P.** Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*, v.59, p.171-188, 2003.
- Cognié Y, Poulin N.** Produção *in vitro* de óocitos maduros e embriões em caprinos e ovinos. In: Freitas, VJF. *Biotecnologia da reprodução em pequenos ruminantes: produção de embriões por transferência nuclear (clonagem)*. Fortaleza: Multicor, 2006. p.46-60.
- Cognié Y, Poulin N, Pisselet C, Monniaux D.** Effect of atresia on the ability of follicular fluid to support cytoplasmic maturation of sheep oocytes *in vitro*. *Theriogenology*, v.43 p.188, 1995. Resumo.
- Cordeiro MF, Lima-Verde JB, Lopes-Júnior ES, Teixeira DIA, Farias LN, Sales HO, Simplício AA, Rondina D, Freitas VJF.** Embryo recovery rate in Santa Inês ewes subjected to successive superovulatory treatments with pFSH. *Small Rumin Res*, v.49, p.19-23, 2003.
- D'Alessandro AG, Martemucci G, Colonna MA, Borghese A, Terzano MG, Bellitti A.** Superovulation in ewes by a single injection of pFSH dissolved in polyvinylpyrrolidone (PVP): effects of PVP molecular weight, concentration and schedule of treatment. *Anim Reprod Sci*, v.65, p.255-264, 2001.
- Damak S, Jay NP, Barrell GK, Bullock DW.** Targeting gene expression to the wool follicle in transgenic sheep. *Biotechnology*, v.14, p.181-184, 1996a.
- Damak S, Su H, Jay NP, Bullock DW.** Improved wool production in transgenic sheep expressing insulin-like growth factor 1. *Biotechnology*, v.14, p.185-188, 1996b.
- Driancourt DA.** Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*, v.55, p.1211-1239, 2001.



- Evans ACO.** Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.289-306, 2003.
- Findlater, RCF, Haresign W, Curnock RM, Beck NFG.** Evaluation of intrauterine insemination of sheep with frozen semen: effects of time of insemination and semen dose on conception rates. *AnimProd*, v.53, p.89-96, 1991.
- Fonseca JF.** Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em caprinos e ovinos. *In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*, 16, 2005, Goiânia. *Anais ...* Belo Horizonte: CBRA, 2005. CD-ROM;
- Fonseca JF, Bruschi JH, Viana JHM, Zambrini FN, Palhão MP; Magalhães ACM.** Induction of synchronized estrus in Santa Inês sheep. *In: Jornada de Medicina Veterinária da UNIPAR*, 9, 2004, Umuarama, PR. *Anais ...* Umuarama, PR:UNIPAR, 2004. CD-ROM.
- Fonseca JF, Souza JMG, Bruschi JH.** Sincronização de estro e superovulação em ovinos e caprinos. *In: Simpósio Mineiro de Caprinos e Ovinos*, 2, 2007, Belo Horizonte. *Anais ...* Belo Horizonte, 2007. CD-ROM.
- Fukui Y, Okada M, Ishida M.** Incidence of premature luteal regression in ewes superovulated with a single injection of follicle-stimulating hormone combined with equine chorionic gonadotropin. *J Reprod Dev*, v.44, p.407-412, 1998.
- Ghalsasi PM, Nimbkar C.** Evaluation of laparoscopic intrauterine insemination in ewes. *Small Rumin Res*, v.23, p.69-73, 1996.
- Gil J, Oliveira J, Menchaca A, Rubianes R.** Effect of GnRH associated with the application of timed artificial insemination in ewes. *Reprod Fertil Dev*, v.16, p.507, 2004.
- Gómez JD, Balasch S, Gómez LD, Martino A, Fernández N.** A comparison between intravaginal progestagen and melatonina implant treatments on the reproductive efficiency of ewes. *Small Rumin Res*, v.66, p.156-163, 2006.
- Gonzalez-Bulnes A, Garcia-Garcia RM, Santiago-Moreno J, Dominguez V, Lopez-Sebastian A, Cocero MJ.** Reproductive season affects inhibitory effects from large follicles on the response to superovulatory FSH treatments in ewes. *Theriogenology*, v.60, p.281-288, 2003.
- Gonzalez-Bulnes A, Garcia-Garcia RM, Santiago-Moreno J, Lopez-Sebastian A, Cocero MJ.** Effect of follicular status on superovulatory response in ewes is influenced by presence of corpus luteum at first FSH dose. *Theriogenology*, v.58, p.1607-1614, 2002.
- Gonzalez-Stagnaro C.** Control y manejo de los factores que afectan al comportamiento reproductivo de los pequeños ruminantes en el medio tropical. *In: International Symposium on Nuclear and Related Techniques in Animal Production and Health*, 1991, Viena. *Proceedings ...* Viena: International Atomic Energy Agency, 1991. p.405-421.
- Greenwood PL, Slepetic RM, McPhee MJ, Bell AW.** Prediction of stage of pregnancy in prolific sheep using ultrasound measurement of fetal bones. *Reprod Fertil Dev*, v.14, p.7-13, 2002.
- Gusmão AL.** Transferência de embriões em pequenos ruminantes. *O Embrião*, n.25, p.6-9, 2006.
- Grunert, E, Birgel EH.** *Obstetrícia veterinária*. 2.ed. Porto Alegre, RS, Sulina, 1984. p.106-138.
- Haibel GK.** Use of ultrasonography in the productive management of sheep and goats. *Vet Clin North Am Food and Anim Pract*, v.6, p.597-613, 1990a.
- Halbert GW, Dobson H, Walton JS, Buckrell BC.** A technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. *Theriogenology*, v.33, p.993-1010, 1990a.
- Halbert GW, Dobson H, Walton JS.** The structure of the cervical canal of ewes. *Theriogenology*, v.33, p.977-992, 1990b.
- Halbert GW, Dobson H, Walton JS, Sharpe P, Buckrell BC.** Field evaluation of a technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. *Theriogenology*, v.33, p.1231-1243, 1990b.
- Harman EL, Slyter AL.** Induction of parturition in the ewes. *J. Anim. Sci.*, v.50, p.391-393, 1980.
- Hammer RE, Pursel VG, Rexroad CE, Wall RJ, Bolt DJ, Ebert KM, Palminter RD, Brinster RL.** Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*, v.315, p.680-683, 1985.
- Hollinshead FK, O'Brien JK, Maxwell WMC, Evans G.** Production of lambs of predetermined sex after the insemination of ewes with low numbers of frozen-thawed sorted X- or Y-chromosome-bearing spermatozoa. *Reprod Fertil Dev*, v.14, p.503-508, 2002.
- Holm P, Walker SK, Petersen BA, Ashman RJ, Seamark RF.** In vitro vs in vivo culture of ovine IVM/IVF ova: effect on lambing. *Theriogenology*, v. 41, p.217, 1994.
- Holm P, Walker WH, Seamark RF.** Embryo viability, duration of gestation and birth weight in sheep after transfer of in vitro matured and in vitro fertilized zygotes cultured in vitro or in vivo. *J Reprod Fertil*, v.107, p.175-181, 1996.
- Ishwar AK.** Pregnancy diagnosis in sheep and goats: a review. *Small Rumin Res*, v.17, p.37-44, 1995.
- Jefferies BC.** Body conditions scoring and its use in management. *Tasm J Agric*, v.2, p.19-21, 1961.
- Khalifa RME, Sayre BL, Lewis GS.** Exogenous oxytocin dilates the cervix in ewes. *J Anim Sci*, v.70, p.38-42, 1992.
- Killen ID, Caffery GJ.** Uterine insemination of ewes with the aid of a laparoscope. *Aust Vet J*, v.59, p.95, 1982.



- Kruij ThAM, van Reenen CG.** New biotechniques and their consequences for farm animal welfare. *Reprod Dom Anim*, v.35, p.247-252, 2000.
- Lima Verde JB, Rondina D, Freitas VJF.** Produção *in vitro* de embriões ovinos. *Ci Anim*, v.13, p.79-87, 2003.
- Lopes Jr ES, Maia ELMM, Almeida KC, Paula NRO, Teixeira DIA, Rondina D, Selaive-Villaroel AB, Freitas VJF.** Influência dos níveis plasmáticos de progesterona sobre a resposta ovariana e produção embrionária de ovelhas Morada Nova (variedade branca). *Acta Vet Sci*, v.34, p.510, 2006. Resumo.
- Luz SLN, Neves JP, Gonçalves PBD.** Parâmetros utilizados na avaliação do sêmen congelado ovino para inseminação laparoscópica. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.37, p.10-18, 2000.
- Machado R, Simplício AA.** Efeito da raça do padreador e da época de monta sobre a eficiência reprodutiva de ovelhas deslançadas acasaladas com reprodutores de raças especializadas para corte. *R Bras Zootec*, v.27, p.54-59, 1998.
- Maxwell WMC.** Artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen at a synchronized oestrus. 1. Effect of time of onset of oestrus, ovulation and insemination on fertility. *Anim Reprod Sci*, v.10, p.301-308, 1986a.
- Maxwell WMC.** Artificial insemination of ewes with frozen-thawed semen at a synchronized oestrus. 2. Effect of dose of spermatozoa and site of insemination on fertility. *Anim Reprod Sci*, v.10, p.309-316, 1986b.
- Maxwell WMC, Watson PF.** Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim Reprod Sci*, v.42, p.55-65, 1996.
- Menchaca A, Rubianes E.** New treatments associated with timed artificial insemination in small ruminants. *Reprod Fertil Dev*, v.16, p.403-413, 2004.
- Mermillod P, Oussaid B, Cognié Y.** Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *J Reprod Fertil*, v.54, p.449-460, 1999.
- Morais JCF, Souza CJH, Collares RS.** Situação atual e perspectiva da inseminação artificial em ovino. *Rev Bras Reprod Anim*, v.22, p.87-91, 1998.
- Naqvi SMK, Joshi A, Bag S, Pareek SR, Mittal JP.** Cervical penetration and transcervical AI of tropical sheep (Malapura) at natural oestrus using frozen-thawed semen. *Small Rumin Res*, v.29, p.329-333, 1998.
- Naqvi SMK, Joshi A, Das GK, Mittal JP.** Development and application of ovine reproductive technologies: an Indian experience. *Small Rumin Res*, v.39, p.199-208, 2001.
- Niemann H, Kues WA.** Application of transgenesis in livestock for agriculture and biomedicine. *Anim Reprod Sci*, v.79, p.291-317, 2003.
- Peixoto ALVA, Câmara DR, Leite SVF, Pimenta Filho E, Wischral A, Guerra MMP.** Avaliação ultrasonográfica do desenvolvimento fetal em ovelhas da raça Santa Inês. In: Congresso Norte/Nordeste de Reprodução Animal, 2, 2005, Teresina, PI. *Anais ... Teresina: CONERA, 2005.* 2p. CD-ROM.
- Perkins NR, Hill JR, Pedrana RG.** Laparoscopic insemination of frozen-thawed semen into one or both uterine horns without regard to ovulation site in synchronized Merino ewes. *Theriogenology*, v.46, p.541-545, 1996.
- Ptak G, Clinton M, Tischner M, Barboni B, Mattiolo M.** Improving delivery and offspring viability of *in vitro*-produced and cloned sheep embryos. *Biol Reprod*, v.67, p.1719-1725, 2002.
- Ptak G, Dattena M, Loi P, Tischner M, Cappai P.** Ovum pick-up in sheep: efficiency of *in vitro* embryo production, vitrification and birth of offspring. *Theriogenology*, v.52, p.1105-1114, 1999.
- Rajamahendran R, Raniowski J, Ravindran V.** Effects of PMMSG and ram contact on the reproductive performance of progestagen-treated ewes during breeding and anestrus season. *Small Rumin Res*, v.10, p.341-347, 1993.
- Ranilla MJ, Gebbie FE, King ME, Carolan C, Sinclair KD, Watt RG, Dolman DF.** The incidence of embryo and fetal loss following the transfer of *in vitro*-cultured sheep embryos. *Theriogenology*, v.49, p.248, 1998. Resumo.
- Reyna J, Thompson P, Evans G, Maxwell C.** Synchronization of ovulation in Merino ewes with GnRH in the breeding and non-breeding season. *Reprod Fertil Dev*, v.17, p.320, 2005.
- Rubianes E, Ibarra D, Ungerfeld R, Carbajal B, De Castro T.** Superovulatory response in anestrus ewes is affected by the presence of a large follicle. *Theriogenology*, v.43, p.465-472, 1995.
- Rubianes E, Menchaca A.** Dinâmica folicular, sincronização de estro e superovulação em ovinos. *Acta Vet Sci*, v.34, p.251-261, 2006.
- Santos MHB dos, Moraes EPBX de, Guido SI, Bezerra FQG, Melo NA, Lima PF de, Oliveira MAL de.** Sexagem fetal em ovelhas Santa Inês por ultra-sonografia. *Ci Rur*, v.36, p.573-578, 2006.
- Sasa A, Torreão JNC, Coelho LA, Ivanoff, Silva CCM, Nunes BCP.** The use of artificial photoperiod associated to male effect and male effect alone on reproductive activity in Saanen goats under subtropical conditions in Brazil. In: International Congress on Animal Reproduction, 15, 2004, Porto Seguro, BA. *Abstracts ... Belo Horizonte: CBRA, 2004.* v.2, p.294. (resumo).
- Sayre BL, Lewis GS.** Fertility and ovum fertilization rate after laparoscopic or transcervical intrauterine artificial insemination of oxytocin-treated ewes. *Theriogenology*, v.48, p.267-275, 1997.
- Shaw JM, Oranratnachay A, Trouson AO.** Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissues. *Theriogenology*, v.53, p.59-72, 2000.



- Silva JC, Quintela A, Andrade Moura JC Resende J, Martins L, Chalhoub M, Ribeiro Filho AL, Bittencourt T, Gusmão AL.** Colheita transcervical de embriões ovinos da raça Dorper no semi-árido nordestino. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2005, Goiânia. *Anais ...* Belo Horizonte: CBRA, 2005. CD-ROM.
- Simplício AA, Santos DO.** Estação de monta vs mercado de cordeiro e leite. In: Simpósio de Caprinos e Ovinos da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, 1, 2005. *Anais ...* Belo Horizonte: Escola de Veterinária da UFMG, 2005a. CD-ROM.
- Simplício AA, Santos DO.** Manejo reprodutivo de caprinos e ovinos em regiões tropicais. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 42, 2005, Goiânia. *Anais ...* Goiânia: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2005b. p.136-148.
- Souza JMG, Gomes LM, Couto JF, Bruschi JH, Viana JHM, Camargo LSA, Fonseca JF.** Uso de protocolos curtos para indução de estro em ovelhas Santa Inês. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 17, 2007, Curitiba. *Anais...* Belo Horizonte: CBRA, 2007. Disponível em www.cbra.org.br/publicacoes/.
- Souza PHF, Simplício AA.** Efeito da amamentação controlada ou contínua, sobre o desempenho produtivo de crias da raça Santa Inês. *Ciênc. Ci Vet Tróp*, v.2, p.175-179, 1909a.
- Souza PHF, Simplício AA.** Efeito da amamentação sobre o desempenho reprodutivo pós-parto em ovelhas da raça Santa Inês. *Ci Vet Tróp*, v.2, p.115-124, 1999b.
- Tervit HR.** Laparoscopy/laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding. *Anim Reprod Sci*, v.42, p.227-238, 1996.
- Ungerfeld R, Rubianes E.** Estrus response to the ram effect in Corriedale ewes primed with medroxyprogesterone during the breeding season. *Small Rumin Res*, v.32, p.89-91, 1999.
- Viñoles C, Forsberg M, Bancho G, Rubianes E.** Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology*, v.55, p.993-1004, 2001.
- Wall RJ, Hawk HW, Nel N.** Making transgenic livestock: genetic engineering on a large scale. *J Cell Biochem*, v.49, p.113-120, 1992.
- Willadsen SM.** Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*, v.320, p.63-65, 1986.
- Wilmot I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS.** Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, v.385, p.810-813, 1997.
- Windsor DP, Széll AZ, Buschbeck C, Edward AY, Milton JTB, Buckrell BC.** Transcervical artificial insemination of Australian Merino ewes with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, v.42, p.147-157, 1994.
- Wulster-Radcliffe MC, Costine BA, Lewis GS.** Estradiol-17-Oxytocin-induced cervical dilatation in sheep: application to transcervical embryo transfer. *J Anim Sci*, v.77, p.2587-2593, 1999.
- Zúñiga O, Forcada F, Abecie JA.** Effect of melatonin implants on the response to the male effect and on subsequent cyclicity of Rasa Aragonesa ewes implanted in April. *Anim Reprod Sci*, v.72, p.165-174, 2002.
-