



Gargalos tecnológicos na reprodução assistida em ovinos: o estado da arte

Technological bottlenecks in sheep assisted reproduction: the state of the art

Sony Dimas Bicudo, L. Rodello, R.F. Bittencourt, C.D. Monteiro, L.F. Crocomo, M.B. Falleiros, C.E.A. Biscarde, T.M. Oliveira

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, FMVZ, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

E-mail: sony@fmvz.unesp.br

Resumo

A expansão da criação de ovinos tem representado uma oportunidade no avanço dos estudos referentes às Biotécnicas de Reprodução Assistidas em ovinos. Como principal objetivo deste trabalho está uma análise dos principais gargalos tecnológicos à aplicação da Reprodução Assistida na espécie ovina. Serão ainda abordados princípios básicos que podem ser úteis à adoção de estratégias visando à superação desses entraves.

Palavras chaves: biotécnicas da reprodução, ovinos, reprodução assistida, manejo reprodutivo.

Abstract

The expansion of the creation of sheep has represented an opportunity in the advancement of studies related to Biotechnology of Assisted Reproduction in sheep. The main objective of this study is an analysis of the major technological bottlenecks to the implementation of Assisted Reproduction in sheep. Basic principles that may be useful to adopt strategies aimed at overcoming these barriers will be approached.

Keywords: biotechnology of reproduction, sheep, assisted reproduction, reproductive management.

Incorporação de animais jovens ao rebanho de matrizes e reprodutores

A incorporação de animais jovens ao rebanho das matrizes e reprodutores persiste como um desafio na aplicação das técnicas de manejo. O melhoramento genético é sem dúvida o caminho a ser seguido, mas a ampliação dos conhecimentos sobre a reprodução em animais jovens continua a merecer atenção.

Há várias definições quanto ao início da puberdade, entre elas: primeiro estro, primeira ovulação, idade na qual a fêmea suporta a prenhez sem efeitos deletérios futuros, este último principalmente relacionado ao peso corporal. A idade à puberdade em borregas situa-se entre 4 e 14 meses, e é influenciada pela genética, nutrição, época de nascimento, relações sociais, peso corporal, depósito de gordura corporal, concentração de glicose sanguínea e taxas plasmáticas de leptina (Senger, 2003).

As principais hipóteses para o entendimento do bloqueio da atividade gonadal, nos animais pré-púberes são a “teoria gonadostática”, que enfatiza o exacerbado controle retrógrado negativo que o estradiol provoca no hipotálamo; e a “teoria neural” em que a inibição provocada pelos opióides endógenos suprime o sistema neural dopaminérgico. O sistema neural adrenérgico também possui papel estimulatório na secreção de gonadotrofinas (Cardoso e Nogueira, 2007).

Durante o período de transição na pré-puberdade há diminuição na concentração de receptores ao estradiol no hipotálamo e hipófise, o que permite aumento da frequência dos pulsos de LH e aumento na produção de estradiol pelos folículos ovarianos com conseqüente desenvolvimento da genitália (Schillo *et al.*, 1992).

Alterações na bioatividade do FSH (alterações no peso molecular e afinidade de receptor), associadas com mudanças no padrão de distribuição de isoformas de FSH, no período de desencadeamento da puberdade em ovelhas, coincidentes com alta frequência de liberação de GnRH e crescentes concentrações de estradiol influenciam o aumento do número e diâmetro dos folículos (Rawlings *et al.*, 2003).

Para a expressão do comportamento estral, se faz necessário que a fêmea seja exposta previamente às determinadas concentrações plasmáticas de progesterona que no período de puberdade são decorrentes dos corpos lúteos formados após as primeiras ovulações (Lamming e Mann, 1995).

Tratamentos de longa duração utilizando progesterona por 12 a 14 dias são amplamente e eficazmente utilizados em pequenos ruminantes na indução e sincronização de estro (Scaramuzzi *et al.*, 2006).

O efeito macho associado ao pré-tratamento com progestágenos possibilita a obtenção de melhores resultados de sincronização de cio para utilização em inseminação artificial, sem os inconvenientes da utilização de hormônios protéicos proveniente de outras espécies, suscetíveis a formação de anticorpos e capazes de diminuir a fertilidade. A utilização prévia de progestágenos permite que um número significativo de ovelhas demonstre estro poucos dias após a introdução dos machos e previne a formação de CL de curta duração

(Ungerfeld *et al.*, 2003).

Estudos com ovelha mostram que o efeito macho durante ou depois do tratamento com progestágeno aumenta o número de fêmeas ovinas que exibem estro aumentando a taxa de concepção, reduzindo intervalo entre partos e início da puberdade (Mellado *et al.*, 2000).

Na sincronização de estro em ovelhas e cabras durante o anestro ou período pré-púbere, a administração de PMSG, hCG, hMG, FSH ou GnRH aumenta a resposta ovulatória de animais tratados com progestágenos (Mellado *et al.*, 2000). Como alternativa barata para induzir ovulação durante o anestro em cabras e ovelhas pode-se utilizar o efeito-macho em associação ao progestágeno. Este estímulo externo provoca aumentos na concentração de LH dentro de poucos minutos e a onda pré-ovulatória de LH surge 1 a 3 dias após início do efeito macho.

A Inseminação artificial: uma biotécnica a ser incrementada

Com a expansão numérica dos rebanhos e valor crescente dos reprodutores geneticamente superiores, vem se consolidando um ambiente propício à adoção de um maior rigor na aplicação das técnicas de manejo principalmente visando à melhoria da eficiência reprodutiva.

As diversas modalidades de inseminação artificial são ferramentas úteis à intensificação do manejo reprodutivo. Na atualidade existem técnicas disponíveis à aplicação do sêmen congelado de ovino que envolve laparoscopia ou mesmo transposição cervical sem, contudo, a maior ou menor sofisticação do método de deposição do sêmen no genital da fêmea representar um fator impeditivo ao crescimento do uso ou popularização da técnica.

A criopreservação do sêmen ovino como gargalo tecnológico

A congelamento do sêmen envolve aspectos físicos e bioquímicos em que as modificações impostas pelo abaixamento da temperatura resultam em maior rigidez das membranas espermáticas, mudanças nas estruturas e posição dos lipídeos das membranas, grande movimentação de água do compartimento intra para o extracelular bem como diminuição do metabolismo (Bicudo *et al.*, 2007).

A relação entre o colesterol e os fosfolipídeos que compõem a membrana plasmática dos espermatozoides é mais baixa nos ovinos que nas espécies suína, bovina, murina, leporina e humana (Brian, 1981). Com isto, há uma predisposição ao choque térmico e devido à grande quantidade de ácidos graxos polinsaturados, uma maior possibilidade da ação de radicais livres sobre os espermatozoides ovinos congelados e descongelados (Maxwell e Watson, 1996).

As alterações que ocorrem na criopreservação podem conferir aos espermatozoides a capacidade de fertilização tanto *in vitro* como *in vivo* após sua deposição, próximo ao local de fertilização. Contudo, há uma redução de sua viabilidade, possivelmente devido à morte prematura. O processo de criopreservação é conhecido por causar danos às organelas espermáticas, em particular nas membranas e induzir mudanças semelhantes à capacitação espermática e reação acrossomal na população sobrevivente (Bailey *et al.*, 2000). Conseqüentemente, o primeiro objetivo, dos protocolos de congelamento é o uso de diluidores que previnam a formação de cristais de gelo intracelulares, que são letais, bem como reduzam os danos na membrana durante o processo de criopreservação.

A associação destas peculiaridades constitui-se em um importante entrave a ser superado e para isto têm sido empregadas diversas estratégias no incremento da congelabilidade do sêmen ovino.

Aditivos utilizados no meio de congelamento

Apesar do efeito positivo da utilização do leite e da gema de ovo nos diluidores para a manutenção da viabilidade espermática pós-descongelamento, esse componente tem o inconveniente de apresentar uma falta de controle da qualidade, devido a grande variação em sua composição (Gil *et al.*, 2003), bem como os riscos de contaminação bacteriana (Bousseau *et al.* 1998). Esses fatos vêm estimulando o desenvolvimento de diluidores quimicamente definidos, ou semi-definidos, formulados a base de lecitina de soja ou albumina sérica bovina (BSA), para a substituição da gema de ovo nos meios de congelamento do sêmen ovino (Fukuy *et al.*, 2007, 2008; Gil *et al.*, 2000, 2003; Matsuoka *et al.* 2006) e manutenção dos índices de fertilidade semelhantes àqueles do sêmen de ovinos criopreservados com os meios convencionais. Estes autores ressaltam que o diluidor a base de lecitina de soja, sem aditivos de origem animal, pode ser uma alternativa segura para a introdução de um material genético em um rebanho e, principalmente, em outro país.

A gema de ovo, que é normalmente utilizada na concentração de 20%, em associação com outros componentes, ajuda as células espermáticas a resistirem ao processo de criopreservação (Bogart e Mayer, 1950). Existem também substâncias na gema que inibem a respiração do espermatozóide ou reduzem a sua motilidade (Pace e Graham, 1974; Watson e Martin, 1975).

As atenções têm se voltado para definir quais componentes, presentes na gema de ovo, promovem a

proteção da célula espermática, a fim de preparar diluidores quimicamente conhecidos. Pace e Graham (1974) purificaram a gema de ovo usando ultracentrifugação e concluíram que o extrato lipídico de baixa densidade tem uma ação crioprotetora. As lipoproteínas de baixa densidade representam 2/3 dos sólidos totais presentes na fração solúvel da gema de ovo. Essas lipoproteínas apresentam uma densidade de 0,982 g/mL e contém 83 a 89% de lipídeos e 11 a 17% de proteínas. Desses lipídeos, aproximadamente 69% são triglicerídeos, 26 % de fosfolipídeos e 5% de colesterol (Moussa *et al.*, 2002). Esses autores obtiveram melhores resultados de motilidade e características de movimentos, quando substituíram a gema de ovo por extrato lipídico de baixa densidade na concentração de 8%.

Corcine *et al.* (2004) demonstraram em sêmen refrigerado de cães, ser possível a substituição da gema de ovo em meio a base de tris-glicose com manutenção da motilidade ou integridade de membrana semelhante ao controle com meio contendo gema de ovo.

Moustacas (2009) observou em sêmen ovino que as lipoproteínas de baixa densidade são capazes de manter a viabilidade das células espermáticas após a criopreservação, da mesma forma que a gema total, utilizando como base o tri-glicose-gema.

Fukui *et al.*, (2007, 2008) relatam que o sêmen de carneiros, congelado com os meios tris-gema de ovo (15%) ou BSA (10%) sem gema de ovo, obtiveram taxas de fertilidade semelhantes em fêmeas inseminadas em tempo fixo. Estes achados indicam que o meio com BSA pode substituir integralmente a gema de ovo nos meios de congelamento do sêmen ovino, sem comprometer os índices de fertilidade.

O dissacarídeo trealose exerce ação crioprotetora sobre o espermatozóide pela sua atividade desidratante, interação com as membranas celulares, prevenção da desnaturação protéica e efeito antioxidante. Dessa forma, a utilização da trealose tem promovido melhorias nas taxas de motilidade e preservação da morfologia espermática ovina pós-descongelamento (Aisen *et al.*, 2000). O sêmen dos carneiros diluídos e criopreservados em meio contendo a trealose possibilitou índices de fertilidade duas vezes e meia superiores à obtida pelo grupo sem trealose (Aisen *et al.*, 2005). Entretanto, existem relatos de insucesso com a utilização da trealose para a congelamento do sêmen ovino, com observação do efeito deletério da adição desse dissacarídeo sobre os parâmetros espermáticos pós-descongelamento (Bittencourt *et al.*, 2008a; Valleriote *et al.*, 2005).

Devido à ocorrência de lesões estruturais e morte celular promovidas pelo aumento do influxo de cálcio intracelular, durante o resfriamento do sêmen, têm-se empregado o EDTA com o objetivo de quelar o cálcio no meio extracelular, minimizando a ocorrência de alterações espermáticas (Aisen *et al.*, 2000, 2005; Bittencourt *et al.*, 2008b). Tem se demonstrado que a atividade de crioproteção da trealose pode ser potencializada com o uso conjunto com o EDTA, pela existência de uma atividade sinérgica importante entre essas substâncias (Aisen *et al.*, 2000; Bakás e Disalvo, 1991).

Os ácidos graxos polinsaturados presentes nas membranas dos espermatozoides são susceptíveis a peroxidação na presença de espécies oxigênio reativas- ROS (ex. Radical superóxido $-O_2^-$, Peróxido de hidrogênio $-H_2O_2$ e radical hidroxil $-OH$), principalmente durante a criopreservação, com conseqüências que incluem danos às membranas, diminuição da motilidade, inibição da respiração e extravasamento de enzimas intracelulares (Maxwell e Watson, 1996).

Numerosos estudos têm mostrado que as ROS têm um importante papel na taxa de fertilidade. As ROS estão envolvidas fundamentalmente na função fisiológica do espermatozóide. Em baixas concentrações as ROS produzida pelos espermatozoides são utilizadas para iniciar a função de capacitação espermática (Rivlin *et al.*, 2004), na hiperativação da motilidade (De Lamirande *et al.*, 1993), reação acrossomal (De Lamirande *et al.*, 1998) e na fusão espermatozóide-oócito; Kodama *et al.*, 1996). Para os espermatozoides é essencial o equilíbrio entre agentes óxidos-redutores, como as ROS e a detoxificação pelo sistema de defesa antioxidante. Uma vez ocorrido um desequilíbrio na produção de ROS e/ou nas defesas antioxidantes e o bloqueio do metabolismo oxidativo no espermatozóide, gera o estresse oxidativo aumentando a peroxidação de lipídios causando danos ao DNA, alterações no citoesqueleto, efeitos no axonema espermático, diminuindo a motilidade, inibição da fusão espermatozóide-oócito, resultando em um impacto negativo na fertilidade (Chatterjee e Gagnon, 2001; Peris *et al.*, 2007).

Os sistemas antioxidante utilizados consiste em Glutathione reduzida (GSH), Glutathione peroxidase (GSH-PX), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) bem descritos no mecanismo de defesa contra a peroxidação de lipídios no sêmen e importantes na manutenção da motilidade e viabilidade espermática (Aitken e Baker, 2004; Gadea *et al.*, 2004; Maia, 2006; Bucak *et al.*, 2008). Estudos recentes têm mostrado também que a inclusão de antioxidantes como a cisteamina, taurina, trealose, selênio, cisteína, glutamina e trolox[®] (análogo da vitamina E) têm melhorado a motilidade, viabilidade e a integridade das membranas espermáticas pós-descongelamento (Aisen *et al.*, 2002; Aitken e Baker, 2004; Gadea *et al.*, 2004; Maia, 2006; Bucak *et al.*, 2007, 2008, 2009).

Curva de congelamento do sêmen ovino

À temperatura ambiente, os lipídeos e as proteínas de membrana permanecem em estado de fluidez, no entanto, a contínua queda de temperatura promove alterações físicas da membrana, que passa do seu estado

líquido ao de gel; as cadeias de ácidos graxos que estavam aleatoriamente distribuídas ordenam-se paralelamente, produzindo uma estrutura rígida e tornando essas áreas fracas e suscetíveis a rupturas e a fusões, como também permeáveis a íons (Hammerstedt *et al.*, 1992).

Os principais danos sofridos pelas células no processo de criopreservação ocorrem durante os processos de resfriamento e descongelamento. Assim, uma taxa de resfriamento e aquecimento adequada e a adição de diluentes são necessárias para prevenir danos causados à membrana, pelo choque térmico (Maxwell e Watson, 1996).

Quando o sêmen é resfriado sob temperaturas abaixo de 0°C, ocorre a formação de gelo no meio extracelular, com aumento na concentração de sais, o que provoca a saída da água do meio intracelular para o extracelular, a favor do gradiente osmótico, levando o espermatozóide a uma desidratação progressiva e lesão celular (Amann e Pickett, 1987). Esta é considerada a fase crítica da criopreservação espermática e encontra-se na faixa de temperatura compreendida entre -15 e -25°C, na qual ocorrem a maioria lesões espermáticas (Salamon e Maxwell *et al.*, 1995).

É importante salientar que a curva de congelação ideal deve ser suficientemente lenta, para permitir que os espermatozoides se desidratem e rápida o bastante para evitar que os espermatozoides fiquem expostos, por muito tempo, as altas concentrações de soluto (Snoeck, 2003).

Assim, as curvas de congelação utilizadas para o sêmen ovino com resultados satisfatórios têm variado de -5°C/min (Byrne *et al.*, 2000), -20°C/min (Anel *et al.*, 2003; Azevedo *et al.*, 2005) até -60°C/min (Nordstoga *et al.*, 2009). Apesar de Fiser e Fairfull (1984) afirmarem que a taxa de congelação do sêmen ovino deve variar de -10 a -100°C/min, Byrne *et al.* (2000) ao submeterem o sêmen ovino às curvas de congelação inferiores a -10°C/min (-0,5 e 5°C/min) verificaram índices satisfatórios de fertilidade com a taxa mais rápida de congelação (5°C/min), e quando comparado com a curva lenta resultou em maiores índices de concepção das fêmeas inseminadas pela via intra-uterina (60 versus 40%). Kumar *et al.* (2003) ao testarem três curvas de congelação (-1, -30 ou -50°C/min) observaram que a taxa de congelação de -1°C/min proporcionou os piores (P<0,05) índices de viabilidade espermática pós-descongelação, havendo uma discreta superioridade para o sêmen congelado à taxa intermediária de -30°C/min, em relação à mais rápida de -50°C/min.

A congelação do sêmen ovino em palhetas, usualmente é realizada através da manutenção dessas amostras no vapor de nitrogênio líquido, e a velocidade de congelação é controlada pela distância a que são mantidas as palhetas do nível do nitrogênio líquido. O espermatozóide ovino tolera uma grande variação de velocidades de congelação nas palhetas (Salamon e Maxwell, 2000). No entanto, os melhores resultados para a preservação do sêmen ovino em palhetas devem respeitar uma curva de congelação que lembra o formato de uma parábola, e isto é conseguido quando o sêmen é mantido a uma altura que varia de quatro a seis centímetros da superfície do nitrogênio líquido (Maxwell *et al.*, 1995).

Avaliação do sêmen pós-descongelação

O processo de congelação de sêmen causa danos ultra-estruturais, bioquímicos e funcionais aos espermatozoides, resultando na redução da motilidade, viabilidade, dificultando o transporte no trato reprodutivo feminino e, conseqüentemente, prejudicando a fertilidade (Leboeuf *et al.*, 2000). Algumas dessas alterações, como as lesões acrossomais, embora causem infertilidade, não interferem na motilidade, e são distribuídos igualmente entre a população de espermatozoides móveis e imóveis. Portanto, torna-se necessária a utilização de outros testes além da motilidade e vigor, para verificar a viabilidade espermática, já que pesquisas vêm demonstrando que o emprego de um teste isoladamente, na maioria das vezes, é ineficaz para detectar as lesões que estão atingindo a célula.

O teste de termoresistência (TTR) foi proposto por Dimitropoulos (1967), para a avaliação do potencial de fertilidade das partidas de sêmen congelado de bovinos, sendo adaptado posteriormente para outras espécies. O TTR obteve grande aceitação, pois submete o sêmen à condições de temperatura semelhantes ao trato genital de fêmeas em estro, demonstrando e testando a capacidade de resistência do sêmen pós-inseminação, além de possuir correlação positiva e altamente significativa com a fertilidade a campo (Kozumplík e Sosnová, 1985).

O teste hiposmótico (TH) foi originalmente elaborado para uso com espermatozoides humanos, com a função de avaliar a atividade bioquímica da membrana espermática intacta (Jeyendran *et al.*, 1984). O TH tem sido rotineiramente utilizado como protocolo de avaliação da viabilidade funcional da membrana espermática de ovinos (Oberst *et al.*, 2003; Aisen *et al.*, 2005), com as osmolaridades utilizadas variando de 30 mOsmol/L (Nagy *et al.*, 1999) a 100 mOsmol/L (Aisen *et al.*, 2005) sendo essa última a mais comum.

Para a avaliação da integridade estrutural dos espermatozoides pode ser empregada a técnica com associação de sondas fluorescentes que permitem indicar ao mesmo tempo lesões nos diferentes compartimentos (Silva e Gadella, 2006). Nagy *et al.* (2003) descreveram em seu estudo a utilização da coloração espermática multi-paramétrica, na qual quatro fluorocromos foram utilizados pra identificar lesões nas diferentes estruturas dos espermatozoides: SYBR-14 e iodeto de propídio (IP) para avaliação da integridade da membrana plasmática; a PNA-PE (*Arachis hypogaea*) para estudo da integridade acrossomal e a Mitotracker vermelha TM para avaliação do status funcional das mitocôndrias.

Sousa *et al.* (2007) propuseram a avaliação das sub-populações espermáticas pela análise individual da cinética de cada célula no sistema CASA integrada à sondas fluorescentes combinadas (SFC - iodeto de propídeo; FITC-PSA; Mitotracker Green FM) considerando os fatores: F1, relacionado à progressividade do movimento; F2, representando o deslocamento espermático sem considerar a direção do movimento; F3, relacionado à energia disponível/disponibilizada para a movimentação espermática. Com o uso da análise estatística multivariada do sêmen ovino congelado/descongelado foi possível determinar no sistema CASA e teste SFC diferenças fisiológicas e na cinética das sub-populações bem como estabelecer a analogia entre parâmetros do sistema CASA e teste SFC.

Espermatozoides com lesão de DNA podem apresentar integridade estrutural e funcional das membranas e das organelas como também, padrão normal de motilidade. E apesar das lesões ocorridas no DNA espermático não interferirem no processo de fertilização ovocitária e clivagem, as alterações na estrutura do DNA são responsáveis por falhas no desenvolvimento e ocorrência da morte embrionária em estágios posteriores (Fatehi *et al.*, 2006; Neild *et al.*, 2005) o que as tornam extremamente importantes. As lesões de DNA podem ser avaliadas em três níveis diferentes (condensação, quebras ou fraturas e fragmentação nuclear), empregando-se para cada tipo de lesão diferentes testes. Por exemplo, o DNA espermático é submetido à extrema condensação durante o desenvolvimento da espermátide, como um mecanismo de defesa para evitar a ocorrência futura de lesões oxidativas. Esse nível de condensação pode ser avaliado pelo teste do “Cometa”, ao submeter o DNA espermático a uma força eletroforética em gel de agarose (MORRIS *et al.*, 2002). A interpretação é feita de acordo com o padrão de fluorescência apresentado e da migração deste DNA após a eletroforese (migração mínima para células com condensação normal e formação de uma “cauda” de DNA para núcleos com problemas de condensação; Silva e Gadella, 2006).

Dessa forma pode-se afirmar que não existe um teste perfeito que possa prever com segurança a capacidade fertilizante dos espermatozoides. Os testes e parâmetros utilizados devem ser empregados em conjunto, cujos resultados compilados podem contribuir para uma conclusão mais próxima possível das condições em que se encontra a célula espermática, seu “status” funcional e sua capacidade de fertilizar um óvulo e levar à termo o embrião produzido.

Considerações sobre a fisiologia da reprodução em ovelhas: controle do crescimento folicular e momento da ovulação

A reprodução na espécie ovina apresenta diversas particularidades entre elas o fato da ovelha apresentar gestação de cinco meses, sendo possível o acasalamento de animais entre o primeiro e segundo ano de vida. Além disso, a maioria das raças ovinas apresenta estacionalidade reprodutiva com a concentração das ocorrências deaios no final de verão e durante o outono. A temporada de nascimento usualmente ocorre nos meses de inverno ou início da primavera. Os ovinos apresentam um ciclo curto de produção, com a possibilidade de cordeiros serem abatidos em seu primeiro ano de vida. (Bicudo *et al.*, 2002).

O ovino tem sua reprodução favorecida no final do verão e início do outono, quando da diminuição estacional do fotoperíodo (Setchell, 1992). Somando-se o período de gestação ao da época de acasalamento, há ocorrência dos partos coincidentemente com a primavera. Entretanto, a domesticação, a pressão adaptativa e a distribuição cosmopolita das raças fizeram com que muitos grupos raciais ampliassem o período de atividade reprodutiva, havendo casos em que a estacionalidade praticamente inexistente.

Existe sólido conhecimento sobre a quebra da estacionalidade reprodutiva em ovelhas, que inclui a literatura nacional. Há despeito disto o principal entrave ao avanço no controle do ciclo estral e momento ovulatório e a falta do preciso entendimento do pleno controle do crescimento folicular e momento ovulatório na ovelha. O conhecimento das oscilações no desenvolvimento dos folículos na ovelha é imprescindível quando são levadas em consideração as utilizações das biotecnias de superovulação, sincronização e indução de estro. Nos primórdios, os estudos e a avaliação da oscilação deste crescimento era realizada através da histologia com ovários de animais abatidos em diferentes estágios do ciclo estral (Cahill *et al.*, 1979) ou observação dos através de laparotomia ou laparoscopia (Oldham *et al.*, 1976), por fim, o minimamente invasivo advento da ultrassonografia (Schrick *et al.*, 1993).

Os ovários têm sido examinados por ultrassonografia (US) com sucesso usando transdutor linear rígido 7,5 MHz transretal desenvolvido para exames de próstata em humanos, permitindo o estudo de estruturas ovarianas, dinâmica folicular e a formação do CL (Ravindra e Rawlings, 1997).

O uso de US em ovelhas com ovários cirurgicamente transplantados (Souza *et al.*, 1996) e em ovários intactos (Ginther *et al.*, 1995; Ravindra e Rawlings, 1997; Rubianes, 2000) permitiu monitoramento do desenvolvimento do folículo ovariano antral e a função do corpo lúteo sem estressar o animal.

Em pequenos ruminantes o desenvolvimento folicular ocorre em ondas tanto na estação reprodutiva (Ginther *et al.*, 1995) como durante o anestro estacional (Souza *et al.*, 1996; Batlewski *et al.*, 1998), emergindo com intervalos de 4-6 dias. Os esteróides ovarianos interagem com as gonadotrofinas para regular a dinâmica folicular. A emergência da onda é determinada pelo aumento de FSH observando-se 1 a 2 dias antes de cada onda.

A utilização diária da endoscopia (Noel *et al.*, 1993) ou da ultra-sonografia transretal de ovários (Ginther *et al.*, 1995; Bartlewski *et al.*, 1998), durante o ciclo estral de ovelhas, proporcionou o estudo do crescimento do folículo antral ovariano, diâmetro do folículo ovulatório, e o padrão de ondas foliculares. Algumas ovelhas apresentam três ou quatro ondas foliculares definido pelo crescimento do folículo excedendo 5 mm de diâmetro por intervalo interovulatório.

Eventos foliculares como recrutamento, seleção e dominância foram descritas em vacas (Adams *et al.*, 1993), mas em ovelhas existem poucos relatos devido as dificuldades de acesso anatômicas e a pequena diferença de tamanho entre o folículo dominante e o subordinado (Rubianes, 2000).

Existem fortes evidências experimentais que indicam que durante a primeira e a última (ovulatória) onda folicular ocorre um mecanismo denominado dominância. Um folículo de um pool de recrutados é selecionado, ele continua crescendo enquanto os outros entram em atresia. O folículo dominante na sua fase final de crescimento dependente da pulsabilidade de LH (Baird e Mcneilly, 1981). O folículo maior de uma onda será o folículo ovulatório se conseguir estabelecer uma cascata endócrina com o LH que resulte em um pico pré-ovulatório de LH. Há opiniões divergentes entre os autores, sobre a existência da dominância nas ondas intermediárias do ciclo estral das ovelhas (Rubianes, 2000).

Estudos da ultra-sonografia em ovelhas durante o anestro (Souza *et al.*, 1996; Ravindra e Rawlings, 1997; Bartlewski *et al.*, 1998) demonstraram um padrão cíclico de crescimento folicular e atresia similar ao que ocorre durante a estação reprodutiva com emergência da onda folicular associada à ocorrência de flutuações de concentrações plasmáticas de FSH. Os folículos durante o anestro podem atingir tamanho pré-ovulatório, mas entram em atresia (Bartlewski *et al.*, 1998).

Dinâmica folicular: embasamento para a sincronização e indução de estro nas ovelhas

A ultrassonografia proporcionou avanço muito grande no estudo da função ovariana, seja pela observação do crescimento folicular, seja por conta das diferentes ecotexturas que o mesmo vai formando à medida que os protocolos são desenvolvidos (Liu *et al.* 2007). No entanto, pelo fato desta espécie ter o problema anatômico de um acesso dificultado, ocorre um aumento no tempo de exame, devido à dificuldade em colocar a superfície ovariana diretamente em contato com a probe, dificultando o mapeamento desta gônada.

Com o objetivo de auxiliar neste estudo, Bicudo *et al.* (2009) desenvolveram dois tipos de implantes metálicos colocados no ligamento próprio do ovário para que houvesse uma facilitação no encontro destas estruturas, embora não fosse encontrada diferença significativa no tempo de exames nos grupos com e sem o implante, este advento foi de muita valia para treinamento da equipe para avaliações posteriores sem os determinados implantes.

Com relação aos hormônios controladores da dinâmica folicular, há evidências que progesterona tem uma ação intra-ovariana muito importante, onde os folículos possuem uma menor taxa de crescimento e menor número de folículos pré-ovulatórios em ovários que apresentam corpo lúteo (Contreras-Solis *et al.* 2008), restando a necessidade da confirmação se este fator local é a inibina, já comprovada em cabras e vacas (Sangha *et al.*, 2002). Por outro lado quando a progesterona é exógena em protocolo de curta duração, não há observação deste efeito no desenvolvimento folicular (Letelier *et al.*, 2009), mas sim um aumento do volume folicular pré-ovulatório (Noel *et al.*, 1994; Leyva *et al.*, 1998). Desta forma o protocolo de curta duração surge como uma alternativa de elevado valor, proporcionando a ovulação de folículos jovens (Ali, 2007; Karaca *et al.*, 2009).

Outro importante hormônio esteróide importante na atividade ovariana da ovelha é o estradiol, porém sua atividade é controversa, diferentemente do que ocorre com a égua e vaca, esta espécie tem uma possível proteção à atividade inibitória nos folículos subordinados, ocorrendo uma variação entre raças que possuem expressão de genes diretamente ligados a prolificidade (Evans *et al.*, 2003). Quando utilizado estrógeno exógeno para indução de ovulação, as raças mais prolíficas precisam de uma maior dose agindo por um tempo também maior (Ben Saïd *et al.*, 2007). As ovelhas, assim como as cabras, apresentam uma independência tão grande desta condição inibitória, que em alguns casos ocorre à ovulação de folículos provenientes de diferentes ondas (Gibbons *et al.*, 1999). A cessação da oscilação na mobilização em *pool* dos folículos foi observada com a utilização de implantes com elevadas concentrações de 17 β -estradiol (Barret *et al.*, 2007), este mesmo análogo do estrógeno, na concentração de 350 mg, foi utilizado 6 dias antes da retirada do implante com medroxiprogesterona (MAP), promovendo atraso na emergência da onda folicular, proporcionando uma maior sincronia, de 4 a 7 dias, quando comparadas ao grupo estradiol sem MAP (Barret *et al.* 2008).

Os hormônios esteróides são mais baratos para manipulação do ciclo estral, sendo necessárias várias linhas de pesquisa que proporcionem o estudo do maior controle no ciclo estral, com um menor valor por programa de sincronização do estro.

Biotécnicas envolvendo oócitos e embriões

A busca de maior eficiência no processo de se obter múltiplas ovulações e sistemas de obtenção de embriões do ambiente uterino com técnicas minimamente evasivas têm se constituído no real entrave à evolução

da transferência de embriões em ovinos. As técnicas atualmente disponíveis, embora eficientes, apresentam grande diversidade de resultados e por vezes provocado alterações irreversíveis na capacidade reprodutiva de doadoras.

A colheita não cirúrgica por via transcervical tem sido utilizada com sucesso no Brasil (Gusmão *et al.*, 2007) e pode vir a se tornar amplamente empregada dada as vantagens que apresenta na minimização de riscos ao comprometimento da saúde reprodutiva da doadora.

Nos últimos anos, diferentes protocolos de superovulação, criopreservação de embriões, métodos de colheita e transferência de embriões de pequenos ruminantes foram propostos (Dattena *et al.*, 2004; Traldi, 2008; Green *et al.*, 2009), chegando às técnicas mais avançadas como a produção *in vitro* de embriões, a qual serve de base para clonagem e transgenia (Baldassare, 2007).

Estas biotécnicas, além de consistirem em uma ferramenta de pesquisa (Gonçalves *et al.*, 2008), possibilitam um avanço considerável no progresso genético, através da maximização reprodutiva da fêmea e superação de obstáculos de eficiência reprodutiva (Carneiro, 2008).

Possibilitam, ainda, a obtenção de descendentes de animais com distúrbios reprodutivos adquiridos sem caracterização genética, impedindo, desta forma, o descarte precoce de fêmeas geneticamente superiores (Gonçalves *et al.*, 2002). Além disso, viabilizam a colheita de oócitos e embriões de fêmeas jovens e pré-púberes, submetidas ao adequado tratamento hormonal (Salles *et al.*, 2000).

Estas biotécnicas associadas à criopreservação de embriões favorecem o intercâmbio genético, ou seja, a introdução de raças exóticas em uma região ou país, minimizando os riscos de transmissão e propagação de doenças exóticas (Stringfellow e Seidel, 1998; Simplício *et al.*, 2007). Permitem, ainda, a formação de bancos de germoplasma favorecendo a preservação de espécies em perigo de extinção, contribuindo para redução dos custos e perdas com transporte de animais vivos e facilitando a importação e exportação genética (Sakul *et al.*, 1993; Stringfellow e Seidel, 1998).

No entanto, apesar dos inúmeros benefícios decorrentes da aplicação de tais biotecnologias, ainda há necessidade de muito estudo e pesquisa a cerca de tal tema, visando a superação dos entraves intrínsecos a estas biotécnicas, os quais dificultam a obtenção de resultados satisfatórios.

Transferência de embriões (TE)

O sucesso da TE está na dependência principalmente da eficiência do tratamento superovulatório. Este por sua vez varia sob a influência de diversos fatores como origem do hormônio, o grau de contaminação de LH, a dosagem da gonadotrofina utilizada, além fatores inerentes ao animal, como raça, idade, peso corporal, nível nutricional, variabilidade individual, sanidade dos animais e a interligação desses fatores com a estação do ano (Traldi, 2008). O tipo de protocolo de sincronização e superovulação utilizado, a qualidade do sêmen empregado e do embrião a ser transferido e as técnicas de colheita e inovulação também são relevantes na obtenção de bons resultados (Yongquist *et al.*, 1997; Bari *et al.*, 2003).

Outro problema inerente a TE, porém mais evidente na espécie caprina, diz respeito à formação de anticorpos anti-FSH de origem suína após sucessivas administrações destas gonadotrofinas no protocolo de superovulação com conseqüente diminuição na resposta ovariana (Carneiro, 2008).

Em ovinos, o grande problema enfrentado em programa de transferência de embriões é a elevada taxa de estruturas não fecundadas, possivelmente devido à maior quantidade de muco produzido durante o estro dos animais superovulados, o que dificulta o transporte espermático, no caso de monta natural. Por esse motivo, recomenda-se que ovelhas superovuladas sejam inseminadas através de laparoscopia, com deposição do sêmen na porção mais cranial dos cornos uterinos, facilitando e favorecendo a fecundação (Traldi, 2008).

Avaliação de receptoras

O maior custo na transferência de embriões pode ser encontrado na aquisição e manutenção das receptoras. Fêmeas receptoras que se tornam prenhes após a primeira transferência são logicamente mais vantajosas que aquelas que necessitam de duas ou três transferências e especialmente mais econômicas que aquelas que são descartadas por falhas em se tornarem prenhes (Looney *et al.*, 2006).

Evidências sugerem que o correto preparo sanitário, nutricional e manejo pré e pós-inovulações das receptoras pode ser responsável por até 50% do sucesso na sobrevivência embrionária nos programas de transferência de embriões. Em caprinos e ovinos a taxa de ovulação das receptoras foi um fator determinante na performance reprodutiva, a qual é altamente dependente da condição corporal, conseqüentemente, do aporte nutricional (Gonzalez *et al.*, 2003).

Além destes fatores, para que o programa tenha sucesso, é fundamental que os embriões, de boa qualidade, sejam transferidos a receptoras que se encontrem absolutamente sincrônicas com as doadoras, quanto ao dia e momento de manifestação do estro (Vieira *et al.*, 2002; Traldi, 2006).

Um dos parâmetros para a avaliação do status destas fêmeas é a condição corporal, que de acordo com Kleemann *et al.* (2006), possui uma correlação forte e positiva com a taxa de ovulação e com os índices de

prenhez segundo Ribeiro *et al.* (2003). Os autores relatam ainda que a manipulação destes dois parâmetros através da nutrição pode aperfeiçoar os ganhos com a eficiência reprodutiva (Kleemann *et al.* 2006). A condição corporal materna também pode levar a um crescimento fetal assimétrico no terço médio da gestação e a uma alteração no peso fetal, produzindo potencialmente implicações na saúde da vida pós-natal destes cordeiros (Osgerby *et al.* 2002). Segundo Nancarrow (1994), embriões de ovelhas com condição corporal baixa no momento da fecundação e no decorrer da gestação estão mais sujeitos à mortalidade embrionária precoce.

Devido à grande variação encontrada nas fêmeas caprinas e ovinas para o intervalo entre o fim do tratamento hormonal de sincronização e início e a duração do estro (Cline *et al.*, 2001; Fonseca *et al.*, 2005, Maffili *et al.*, 2006) e a influência dessa variação na fertilidade das fêmeas (Baril *et al.*, 1996; Rubianes *et al.*, 1998), a avaliação destes parece ser válida para o sucesso do trabalho.

O evento da regressão prematura de corpo lúteo, que ocorre dentro de seis dias após a superovulação, em menores proporções em ovinos do que em caprinos (Schiewe *et al.*, 1990; Jabbour e Evans, 1991), pode afetar a sobrevivência embrionária após a transferência para as receptoras. Segundo Fukui *et al.* (1998) fatores como a estação do ano, raça do animal, número de parições, peso e condição corporal podem influenciar na incidência da regressão prematura do corpo lúteo.

Outros parâmetros como a idade do animal, que segundo Oliveira e Moraes (1991) pode ter relação com a eficiência reprodutiva das ovelhas, assim como com baixas taxas de desmame e o elevado índice de mortalidade perinatal de cordeiros; o histórico reprodutivo, quanto ao número e ordem das parições; os aspectos ultra-sonográficos do trato genital, com o intuito de diagnosticar patologias uterinas (Salles e Araújo, 2008) ou até mesmo verificar o status uterino pós-parto (Hauser e Bostedt, 2002; Ababneh e Degefa, 2005); o número de CL(s) e qualidade destes no ato na ovulação, citado por Alabart *et al.* (2005) por ter relação com a concentração plasmática de P4, e, portanto, à manutenção da gestação nas receptoras; devem ser cuidadosamente analisados com o intuito de maximizar a eficiência reprodutivas das fêmeas selecionadas como receptoras em programas de transferência de embriões, aumentando assim os índices de sucesso dos programas e minimizando seus custos.

Fertilização in vitro (FIV) ou Produção de embriões in vitro (PIV)

Além de todos os benefícios já descritos anteriormente, a FIV permite a recuperação de oócitos desde animais pré-púberes às senis e post-mortem (Simplicio *et al.*, 2007). A possibilidade de obtenção de oócitos de ovários de abatedouros constitui uma fonte barata de oócitos, sendo destinada a pesquisas, uma vez que não se conhece o histórico genético e sanitário das fêmeas (Simplicio *et al.*, 2007; Baldassare, 2008).

Esta biotécnica também serve como instrumento de suporte para produção de animais transgênicos, de extremo interesse para a medicina humana, bem como para os estudos de clonagem, e permite a preservação de animais de excelente nível genético, possibilitando a estocagem de oócitos para fertilização e produção de animais no futuro (Traldi, 2008).

A FIV surge ainda como uma alternativa à TE, uma vez que opta-se preferencialmente pelo método cirúrgico, o qual consiste num processo cruento, resultando em danos aos órgãos genitais internos do animal e aderências no sistema reprodutor, limitando a utilização destas fêmeas como doadoras de embriões por um longo período (Morton *et al.*, 2008)

A natureza laparoscópica de recuperação de oócitos na FIV, se bem executada, permite a utilização destas fêmeas por toda sua vida reprodutiva sem causar danos ao sistema reprodutor do animal, possibilitando a produção mensal de embriões de uma mesma doadora (Kühholzer *et al.*, 1997) Ainda, segundo Wooliams e Wilmut (1989), a fertilização *in vitro* permite a obtenção de maior número embriões por um preço bem mais acessível do que os programas convencionais de múltiplas ovulações e transferência de embriões.

No entanto, segundo Carneiro (2008) a produção *in vitro* de embriões ainda não é utilizada como rotina para pequenos ruminantes, uma vez que existem inúmeros obstáculos a serem superados para que esta biotecnologia alcance resultados satisfatórios.

A FIV envolve desde a obtenção dos oócitos até a fertilização destes por espermatozóides igualmente capacitados *in vitro*, resultando na produção de embriões (Baldassare, 2008). A qualidade e quantidade de oócitos obtidos por aspiração *in vivo* ou *in vitro* são cruciais para o sucesso da FIV, estando na dependência de fatores como tamanho do ovário e do folículo, idade e hígidez da fêmea doadora de oócitos, tratamento hormonal prévio e presença das células *cumulus*, a qual está diretamente relacionada às peculiaridades dos métodos de colheita empregados (Wani, 2002).

A obtenção de oócitos desnudos ou com poucas células do *cumulus* e o reinício espontâneo da maturação nuclear, resultante a remoção dos oócitos do ambiente folicular, independente da maturidade citoplasmática oocitária limitam a aplicabilidade de tal biotecnologia (Le Beux *et al.*, 2003). Como alternativa tem sido proposto a pré-maturação destes oócitos em meio de maturação padrão acrescido de fármacos inibidores da meiose (Jimenez- Macedo *et al.*, 2006). Além disso, a maturação oocitária *in vitro* está na dependência dos constituintes do meio de maturação e das condições de cultivo (Simplicio *et al.*, 2007).

Apesar dos atuais progressos, o cultivo *in vitro* (CIV) após a fecundação dos oócitos é ainda uma das

etapas limitantes na PIV de embriões ovinos. Isto porque, quando cultivados em meios sinteticamente definidos, os embriões de ruminantes apresentam bloqueio no seu desenvolvimento, no estágio de 8-16 células, coincidente com o momento da ativação do genoma embrionário (Crosby *et al.*, 1988; Telford *et al.*, 1990).

Uma estratégia consiste no cocultivo do zigoto ovino com células epiteliais do oviduto, as quais têm capacidade de remover as substâncias nocivas do ambiente de cultivo, além de secretarem fatores de crescimentos benéficos ao desenvolvimento dos embriões (Bernardi, 2005).

Criopreservação de embriões

A criopreservação de embriões é uma biotécnica utilizada em associação com a TE ou PIV e consiste basicamente em 2 diferentes métodos: congelação, que é o método clássico de criopreservação podendo ser rápida ou lenta, de acordo com a taxa de resfriamento e o tipo e concentração do crioprotetor (Shaw *et al.*, 2000); e a vitrificação, que é uma prática mais recente, na qual se obtém a solidificação sem a formação de cristais de gelo intracelulares (Green *et al.*, 2009).

Além dos benefícios já descritos anteriormente, a criopreservação permite a estocagem a longo prazo de embriões, servindo como alternativa quando o número de embriões obtidos supera o número de fêmeas receptoras (Fahning *et al.*, 1992).

Segundo Dattena *et al.* (2004), o sucesso da criopreservação de embriões depende, principalmente, do tipo e concentração do crioprotetor utilizado. Um dos fatores mais importantes a ser considerado na escolha do crioprotetor é a sua toxicidade, que esta diretamente relacionada à sua permeabilidade e ao tempo de exposição do embrião a este crioprotetor.

Embora o processo de criopreservação de mórulas e blastocistos de ovinos seja eficaz, ainda há poucos relatos sobre a taxa de prenhez e nascimento após a TE. Ainda segundo Martínez *et al.* (2006), embriões de FIV são mais sensíveis ao processo de congelamento e vitrificação, em comparação aos produzidos *in vivo*.

Clonagem

Em animais de produção, a clonagem foi feita pela primeira vez em ovinos através da 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, particularmente devido 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 (Simplicio *et al.*, 2007).

Neste processo, a enucleação dos oócitos é a etapa que requer mais cuidado e tempo, sendo a presença da zona pelúcida o maior obstáculo. Novos estudos têm proposto a remoção da zona pelúcida, o que facilita a enucleação e aumenta significativamente o sucesso da fusão celular, sem afetar a viabilidade embrionária (Lagutina *et al.*, 2007).

Esta técnica de transferência nuclear pode ser aplicada na produção de animais transgênicos para pesquisa, exploração pecuária e produção de fármacos, na multiplicação de espécies animais de alto valor genético e ameaçadas de extinção e nos transplantes de órgãos, visando a inativação dos genes envolvidos na expressão das proteínas de histocompatibilidade responsáveis pelas reações de rejeição do órgão transplantado (Baldassare, 2008).

No entanto, a taxa de sucesso da clonagem ainda é muito baixa, na maioria das vezes não superior a 1% (Solter, 2000). Esta baixa viabilidade dos embriões clonados é principalmente expressa pela redução na taxa de implantação, pelo aumento na taxa de mortalidade fetal e perinatal, e pelas diversas anomalias observadas nos animais nascidos (Bordignon, 2003).

Considerações finais

A aplicação das Biotécnicas de Reprodução Assistidas em ovinos tem se desenvolvido sobremaneira no mundo todo e também em nosso país. Diversos são os entraves ainda existentes, alguns deles inerentes as peculiaridades fisiológicas da espécie ovina, outros decorrentes das conjunturas regionais e circunstâncias econômicas. No Brasil a expansão da criação de ovinos tem sido percebida em todas as regiões geográficas, entretanto, a velocidade de crescimento e a organização da assim chamada “cadeia produtiva” ainda são insatisfatórias e têm representado o principal obstáculo à popularização da adoção da Reprodução Assistida e consolidação do emprego das Biotécnicas. Pode-se então considerar que muito embora existam gargalos tecnológicos importantes a serem estudados e superados, é a estruturação do mercado produtivo que permitirá maior lucratividade do setor com reflexos na demanda por Biotécnicas de Reprodução Assistida.

Referências

- Ababneh MM, Degefa T.** Ultrasonic assessment of puerperal uterine involution in Balady goats. *J Vet Med*, v.52, p.244-248, 2005.
- Adams GP, Ko JCH, Smith CA, Ginther OJ.** Effect of the dominante follicle on regression of its subordinates. *Can J Anim Sci*, v.73, p.267-275, 1993.
- Aisen EG, Alvarez HL, Venturino A, Garde JJ.** Effect of trehalose and EDTA on cryoprotective action of ram semen diluents. *Theriogenology*, v.53, p.1053-1061, 2000.
- Aisen EG, Medina VH, Venturino A.** Cryopreservation and post-thawed fertility of ram semen frozen in different trehalose concentrations. *Theriogenology*, v.57, p.1801-1808; 2002
- Aisen EG, Quintana M, Medina V, Morello H, Venturino A.** Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. *Cryobiology*, v.50, p.239-49, 2005.
- Aitken RJ, Baker MA.** Oxidative stress and male reproduction biology. *Reprod Fertil Dev*, v.16, p.581-588; 2004.
- Alabart JL, Olivera JM, Roche A, Cocero MJ, Sánchez P, Folch J.** Fertility of recipient ewes depends on plasmatic progesterone concentration, ovulation rate, and distribution of ovulations between the ovaries. *In: Jornadas sobre Producción Animal*, 11, 2005, Zaragoza, Spain. 2v. (Abstract).
- Ali A.** Effect of time of eCG administration on follicular response and reproductive performance of FGA-treated Ossimi ewes. *Small Rumin Res*, v.72, p.33-37, 2007.
- Amann RP, Pickett BW.** Principle of cryopreservation and a review of stallion spermatozoa. *Equine Vet Sci*, v.7, p.145-174, 1987.
- Anel L, De Paz P, Alvarez M, Chamorro CA, Boixo JC, Manso A, Gonzalez M, Kaabi M, Anel E.** Field and in vitro assay of three methods for freezing ram semen. *Theriogenology*, v.60, p.1293-1308, 2003.
- Azevedo HC, Maia MS, Bicudo SD, Sousa DB, Rodello L, Sicherle CC.** Cinética e integridade dos espermatozoides no sêmen ovino submetido a diferentes ritmos de refrigeração e congelação em sistema automatizado. *In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*, 16, 2005. Goiânia, GO. *Anais... Belo Horizonte - MG: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal*, 2005. (CD-ROM).
- Bailey JL, Bilodeau JF, Cormier N.** Semen, cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J Androl*, v.21, p.1-6, 2000;
- Baird DT, McNeilly AS.** Gonadotrophic control of follicular development and function during the oestrus cycle of the ewe. *J Reprod Fertil Suppl*, v.30, p.119-133, 1981.
- Bakas LS, Disalvo EA.** Effect of Ca²⁺ on the cryoprotective action of trehalose. *Cryobiology*, v.28, p.347-353, 1991.
- Baldassarre H.** Reproducción asistida en la especie caprina: inseminación artificial a clonación. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.274-282, 2007.
- Baldassarre H.** Tecnologias reprodutivas de última geração. *In: Aisen EG. Reprodução ovina e caprina*. São Paulo: MedVet, 2008. p.179-183.
- Bari F, Khalid M, Haresign W, Murray A, Merrell B.** Factors affecting the survival of sheep embryos after transfer within a MOET program. *Theriogenology*, v.59, p.1265-1275, 2003.
- Baril G, Remy B, Leboeuf B.** Synchronization of estrus in goats: the relationship between eCG binding in plasma, time of occurrence of estrus and fertility following artificial insemination. *Theriogenology*, v.45, p.1553-1559, 1996.
- Barrett DMW, Bartlewski PM, Duggavathi R, Davies KL, Huchkowsky SL, Epp T, Rawlings NC.** Synchronization of follicular wave emergence in the seasonally anestrous ewe: The effects of estradiol with or without medroxyprogesterone acetate. *Theriogenology*, v.69, p.826-827, 2008.
- Barrett DMW, Duggavathi R, Davies KL, Bartlewski PM, Bagu ET, Rawlings NC.** Differential Effects of Various Estradiol-17beta Treatments on Follicle-Stimulating Hormone Peaks, Luteinizing Hormone Pulses, Basal Gonadotropin Concentrations, and Antral Follicle and Luteal Development in Cyclic Ewes *Biol Reprod*, v.77, p.252-262, 2007.
- Bartlewski PM, Beard AP, Cook SJ, Rawlings N.** Ovarian follicular dynamics during anoestrus in ewes. *J Reprod Fertil*, v.113, p.275-285, 1998.
- Ben Saïd S, Lomet D, Chesneau D, Lardic L, Canepa S, Guillaume D, Briant C, Fabre-Nys C, Caraty A.** Differential estradiol requirement for the induction of estrus behavior and the luteinizing hormone surge in two breeds of sheep. *Biol Reprod*, v.76, p.673-680, 2007.
- Bernardi ML.** Produção *in vitro* de embriões ovinos. *Acta Sci Vet*, v.33, p.1-16, 2005.
- Bicudo SD, Azevedo HC, Maia M S, Green RE, Rodello L, Meira C.** Avanços na criopreservação do sêmen ovino visando sua aplicação em programas de inseminação artificial e em biotecnologias com embriões. *Acta Sci Vet*, v.35, p.787-798, 2007.
- Bicudo SD, Paganini Filho P, Souza MIL, Sousa DBO.** Taxa de concepção no estro induzido com CIDR[®]/eCG e no estro natural pós-sincronização em programa de inseminação artificial de ovelhas. *Rev Bras Reprod Anim*, v.26, p.171-174, 2002.
- Bicudo SD, Sousa DB.** Associação de progestágeno, prostaglandina e eCG em protocolo de curta duração para indução/sincronização do estro em ovelhas. *In: Mostra Científica da FMVZ da UNESP*, 6, 2002, Botucatu, SP.

Anais... Botucatu: FMVZ-UNESP, 2002.

- Bicudo SD, Biscarde CEA, Monteiro CD, Bittencourt RF, Avelar SR, Oliveira TM, Rodello L, Cesar CNR, Oba E.** The use of metallic implants to facilitate follicular dynamics study in ewes. *Animal Reprod.*, v.6, p.253, 2009. (Abstract).
- Bittencourt RF, Oba E, Vasconcelos MF, Oliveira TM, Biscarde CEA, Ribeiro Filho AL, Bicudo SD.** Efeito de um meio hiperosmótico a base de trealose sobre a viabilidade do espermatozóide ovino criopreservado e para a redução do nível de glicerol no meio diluidor. *Acta Sci Vet*, v.36, p.542-542. 2008a
- Bittencourt RF, Ribeiro Filho, AL, Alves SGG, Vasconcelos MF, Biscarde CE, Leal LS, Oba E.** O efeito de um quelante de cálcio, de um detergente e da lecitina de soja sobre a congelabilidade do sêmen caprino. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.45, p.305-312, 2008b
- Bogart R, Mayer DT.** The effects of egg yolk on the various physical and chemical factors detrimental to Spermatozoa viability. *J Anim Sci*, v.9, p.143-152, 1950.
- Bordignon V.** Clonagem de animais por transferência nuclear: avanços e desafios. In: Reunião Annual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, 17, 2003, Beberibe, CE. *Anais...* Beberibe: SBTE, 2003. p.64-74.
- Bousseau S, Brillard JP, Marquan-Le Guienne B, Guerin B, Camus A, Lechat M.** Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin-based diluents. *Theriogenology*, v.50, p. 699-706, 1998.
- Bucak MN, Ateşşahin A, Yüce A.** Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. *Small Rumin Res*, v.75, p.128-134. 2008
- Bucak MN, Tuncer PB, Sariözkan S, Ulutaş PA.** Comparison of the effects of glutamine and an amino acid solution on post-thawed ram parameters, lipid peroxidation and anti-oxidant activities. *Small Rumin Res*, v.81, p.13-17, 2009
- Byrne GP, Lonergan P, Wade M, Duffy P, Donovan A, Hanrahan JP, Boland MP.** Effect of freezing rate of ram spermatozoa on subsequent fertility in vivo and in vitro. *Anim Reprod Sci*, v.62, p.265-275, 2000.
- Cahill LP, Mariana JC, Mauleon P.** Total follicular populations in ewes of high and low ovulation rates. *J Reprod Fertil*, v.55, p.27-36, 1979.
- Cardoso D, Nogueira GP.** Mecanismos neuroendócrinos envolvidos na puberdade de novilhas. *Arq Ciênc Vet Zool*, v. 10, p.59-67, 2007.
- Carneiro GF.** Biotécnicas da reprodução assistida em pequenos ruminantes. *Tec Ciênc Agropec*, v.2, p.23-28, 2008.
- Chatterjee S, Gagnon C.** Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol Reprod Dev*, v.59, p.451-458, 2001.
- Cline MA, Ralston JN, Seals RC, Lewis GS.** Intervals from norgestomet withdrawal and injection of equine chorionic gonadotropin or P.G. 600 to estrus and ovulation in ewes. *J Anim Sci*, v.79, p.589-594, 2001.
- Contreras-Solis I, Diaz T, Lopez G, Caigua A, Lopez-Sebastian A, Gonzales-Bulnes A.** Systemic and intraovarian effects of corpus luteum on follicular dynamics during estrous cycle in hair breed sheep. *Anim Reprod Sci*, v.104, p.47-55, 2008.
- Corcini CD, Varela Junior AS, Ulguin RR, Bianchi I, Alvarenga MVF, Lucia Jr T, Deschamps JC, Corrêa MN.** Efeito da lipoproteína de baixa densidade da gema de ovo sobre a qualidade do sêmen canino resfriado a 5°C. In: Congresso de Iniciação Científica, Universidade Federal de Pelotas, 13, 2004, Pelotas, RS. *Anais...* Disponível em: http://www.ufpel.edu.br/cic/2004/arquivos/CA_01100.rtf. Acesso em 29 ago. 2008;
- Crosby IM, Gandolfi F, Moor RM.** Control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos. *J Reprod Fertil*, v.82, p.769-775, 1988.
- Dattena M, Accardo C, Pilichi S, Isachenko V, Mara L, Chessa B, Cappai P.** Comparison of different vitrification protocols on viability after transfer of ovine blastocysts in vitro produced and in vivo derived. *Theriogenology*, v.62, p.481-493, 2004
- de Lamirande E, Eiley D, Gagnon C.** Inverse relationship between the induction of human sperm capacitation and spontaneous acrosome reaction by various biological-fluids and the superoxide scavenging capacity of these fluids. *Int J Androl*, v.16, p.258-266, 1993.
- de Lamirande E, Tsai C, Harakat A, Gagnon C.** Involvement of reactive oxygen species in human sperm acrosome reaction induced by A23187, lysophosphatidylcholine, and biological fluid ultrafiltrates. *J Androl*, v.19, p.585-594, 1998.
- Dimitropoulos R.** La signification du test de la thermorésistance dans l'appréciation de la valeur fécondant du sperma congelé. *Ann Méd Vét*, v.4, p.215-24, 1967.
- Evans ACO.** Characteristics of ovarian follicle development in domestic animals. *Reprod Domest Anim*, v.38, p.240-246, 2003.
- Fahning ML, Garcia MA.** Status of cryopreservation of embryos from domestic animals. *Cryobiology*, v.29, p.1-18, 1992.
- Fatchi AN, Bevers MM, Schoevers E, Roelen BAJ, Colenbrander B, Gadella BM.** DNA damage in bovine sperm cells does not block fertilization but induces apoptosis after the first cleavages. *J Androl*, v.27, p.176-88,

2006.

Fiser PS, Fairfull RW. The effect of glycerol concentration and cooling velocity on cryosurvival of ram spermatozoa frozen in straws. *Cryobiology*, v.21, p.542-551, 1984.

Fonseca JF, Bruschi, JH, Zambrini FN, Demczuk E, Viana JHM, Palhão MP. Induction of synchronized estrus in dairy goats with different gonadotrophins. *Anim Reprod*, v.2, p.50-53, 2005.

Fukui Y, Kohno H, Togari T, Hiwasa M, Fukui Y, Kohno H, Togari T, Hiwasa M, Okabe K. Fertility of ewes inseminated with intrauterinally with frozen semen using extender containing bovine serum albumin. *J Reprod Dev*, v.53, p.959-962, 2007.

Fukui Y, Kohno H, Togari T, Hiwasa M, Okabe K. Fertility after artificial insemination using a soybean-based semen extender in sheep. *J Reprod Dev*, v.54, p.286-289, 2008.

Fukui Y, Okada M, Ishida N. Incidence of prematura 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.

Gadea J, Selles E, Marco MA, Coy P, Matas C, Romar R, Ruiz S. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology*, v.62, p.690-701, 2004.

Gibbons JR, Kot K, Thomas DL, Wiltbank MC, Ginther OJ. Follicular and FSH dynamics in ewes with a history of high and low ovulation rates. *Theriogenology*, v.52, p.1005-1020, 1999.

Gil J, Rodriguez-Irazaqui M, Lundeheim N, Söderquist L, Rodríguez-Martínez H. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell[®] and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology*, v.59, p.1157-1170, 2003.

Gil J, Söderquist L, Rodríguez-Martínez H. Influence of centrifugation and different extenders on post-thaw sperm quality of ram semen. *Theriogenology*, v.54, p.93-108, 2000.

Ginther OJ, Kot K, Wiltbank MC. Associations between emergence of follicular waves and fluctuations in FSH concentrations during the oestrus cycle in ewes. *Theriogenology*, v. 43, p.689-703, 1995.

Gonçalves PBD, Barreta MH, Siqueira AQ, Antoniazzi AQ. Biotecnologias da reprodução animal: produção in vitro de embriões bovinos. *Ciênc Vet Tróp*, Recife-PE, v. 11, suplemento 1, p.135-138, 2008.

Gonzalez CIM, Andrioli A, Cunha MGG. Avanços na transferência de embriões em caprinos e ovinos de corte no Brasil. In: Simpósio Internacional sobre o Agronegócio da Caprinocultura Leiteira, 1, II Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte, 2, 2003, João Pessoa. João Pessoa: Emepa, 2003. p.331-352.

Green RE, Santos BFS, Sicherle CC, Landimalvarenga FC, Bicudo SD. Viability of OPS vitrified sheep embryos after direct transfer. *Reprod Domest Anim*, 2009. (in press; doi: 10.1111/j.1439-0531.2008.01088.x).

Gusmão AL, Silva JC, Quintela AT, Andrade Moura JC, Resende J, Gordiano HD, Challhoub M, Ribeiro Filho AL, Bittencourt TCC, Barbosa LP. Colheita transcervical de embriões ovinos da Raça Santa Inês no semi-árido nordestino. *Rev Bras Saúde Prod Anim*, v.8, p.1-10, 2007.

Hammerstedt RH, Graham JK. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology*, v.29, p.26-38, 1992.

Hauser B, Bostedt H. Ultrasonographic observations of the uterine regression in the ewe under different obstetrical conditions. *J Vet Med*, v.49, p.511-516, 2002.

Jabbour HN, Evans G. Ovarian and endocrine responses of Merino ewes to treatment with PMSG and/or FSH-p. *Anim Reprod Sci*, v.26, p.93-106, 1991.

Jeyendran RS, Van Der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil*, v.70, p.219-228, 1984.

Jimenez-Macedo AR, Izquierdo D, Urdaneta A, Anguita B, Paramio MT. Effect of roscovitine on nuclear maturation, MPF and MAP kinase activity and embryo development of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology*, v.65, p.1769-1782, 2006.

Karaca F, Atamanb MB, Çoyan KC. Synchronization of estrus with short- and long-term progestagen treatments and the use of GnRH prior to short-term progestágeno treatment in ewes *Small Rumin Res*, v.81, p.185-8, 2009.

Kleemann DO, Grosser TI, Walker SK. Fertility in South Australian commercial Merino flocks: aspects of management. *Theriogenology*, v.65, p.1649-65, 2006.

Kodama H, Kuribayashi Y, Gagnon C. Effect of sperm lipid peroxidation on fertilization. *J Androl*, v.17, p.151-157, 1996.

Kozumplík J, Sosnová J. The thermoresistance test of spermatozoa and fertility in bulls. *Vet Med (Praha)*, v.30, p.385-92, 1985.

Kühholzer B, Müller S, Treuer A, Seregi J, Besenfelder U, Brem G. Repeated endoscopic ovum pick-up in hormonally untreated ewes: a new technique. *Theriogenology*, v.48, p.545-550, 1997.

Kumar S, Millar JD, Watson PF. The effect of cooling rate on the survival of cryopreserved bull, ram, and boar spermatozoa: a comparison of two controlled-rate cooling machines. *Cryobiology*, v.46, p.246-53, 2003.

Lagutina I, Lazzari G, Duchi R, Turini P, Tessaro I, Brunetti D, Colleoni S, Crotti G, Galli C. Comparative aspects of somatic cell nuclear transfer with conventional and zona-free method in cattle, horse, pig and sheep.

- Theriogenology*, v.67, p.90-98, 2007.
- Lamming GE, Mann GE.** Control of endometrial oxytocin receptors and prostaglandin F₂ α production in cows by progesterone and oestradiol. *J Reprod Fertil*, v.103, p.69-73, 1995.
- Le Beux G, Richard FJ, Sirard M.** Effect of cycloheximide, 6-DMAP, roscovitine and butyrolactone I on resumption of meiosis in porcine oocytes. *Theriogenology*, v.60, p.1049-1058, 2003.
- Leboeuf B, Restall B, Salamon S.** Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim Reprod Sci*, v.62, p.113-141, 2000.
- Letelier CA, Contreras-Solis I, Garcia-Fernandez RA, Ariznavarreta C, Tresguerres JAF, Flores JM, Gonzalez-Bulnes A.** Ovarian follicular dynamics and plasma steroid concentrations are not significantly different in ewes given intravaginal sponges containing either 20 or 40 mg of fluorogestone acetate. *Theriogenology*, v.71, p.676-682, 2009.
- Leyva V, Buckrell BC, Walton JS.** Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous progestagen. *Theriogenology*, v. 50, p.395-416, 1998.
- Liu X, Dai Q, Hart EJ, Barrett DMW, Rawlings NC, Pierson RA, Bartlewski PM.** Ultrasonographic characteristics of ovulatory follicles and associated endocrine changes in cyclic ewes treated with Medroxyprogesterone Acetate (MAP)-releasing intravaginal sponges and Equine Chorionic Gonadotropin (eCG). *Reprod Domest Anim*, v.42, p.393-401, 2007.
- Looney CR, Nelson JS, Schneider HJ, Forrest DW.** Improving fertility in beef cow recipients. *Theriogenology*, v.65, p.201-209, 2006.
- Maffili VV, Torres CAA, Bruschi JH, Fonseca JF, Viana JHM.** Indução de estro em cabras da raça Toggenburg com dois diferentes dispositivos intravaginais. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.58, p.367-372, 2006.
- Maia MS.** Viabilidade espermática e geração de metabólitos reativos do oxigênio (ROS) no sêmen ovino criopreservado em diluidor aditivado de lauril sulfato de sódio (OEP), trolox-c e catalase. 2006. 147f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2006.
- Martínez AG, Valcárcel A, Furnus CC, Matos DG, Iorio G, Las Heras MA.** Cryopreservation of in vitro-produced ovine embryos. *Small Rumin Res*, v.63, p.288-296, 2006.
- Matsuoka T, Imai H, Kohno H, Fukui Y.** Effects of bovine serum albumin and trehalose in semen diluents for improvement of frozen-thawed ram spermatozoa. *J Reprod Dev*, v.52, p.675-683, 2006.
- Maxwell WMC, Landers AJ, Evans G.** Survival and fertility of ram spermatozoa frozen in pellets, straws and minitubes. *Theriogenology*, v.43, p.1201-1210, 1995.
- Maxwell WMC, Watson PF.** Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim Reprod Sci*, v.42, p.55-65, 1996.
- Mellado M, Olivas R, Ruiz F.** Effect of buck stimulus on mature and pre-pubertal norgestomet-treated goats. *Small Rumin Res*, v.36, p.269-274, 2000.
- Morris ID, Ilott S, Dixon L, Brison DR.** The spectrum of DNA damage in human sperm assessed by single cell gel electrophoresis (Comet assay) and its relationship to fertilization and embryo development. *Hum Reprod*, v.17, p.990-998, 2002.
- Morton KM, Maxwell WMC, Evans G.** Effect of aspiration pressure during oocyte harvesting on oocyte recovery and *in vitro* development of ovine oocytes. *Reprod Domest Anim*, v.43, p.106-110, 2008.
- Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M.** Low density lipoproteins extracted from hen Egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, v.57, p.1695-1706, 2002.
- Moustacas V.S.** Viabilidade *in vitro* de espermatozoides ovinos criopreservado em meios contendo Lipoproteína de baixa densidade fresca e liofilizada. 2009. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 2009;
- Nagy Sz, Házás G, Papp A B, Iváncsics J, Szász F, Szász F Jr, Kovács A, Foote RH.** Evaluation of sperm tail membrane integrity by light microscopy. *Theriogenology*, v. 52, p.1153-1159, 1999.
- Nagy S, Jansen J, Topper EK, Gadella BM.** A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biol Reprod*, v.68, p.1828-1835, 2003.
- Nancarrow CD.** Embryonic mortality in the ewe and doe. In: Zavy MT, Geisert RD (Ed). *Embryonic mortality in domestic species*. London: CRL Press, 1994. p.79-97.
- Neild DM, Brouwers JF, Colenbrander B, Aguero A, Gadella BM.** Lipid peroxide formation in relation to membrane stability of fresh and frozen-thawed stallion spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, v.72, p.230-238, 2005.
- Noël B, Bister JL, Pierquin B, Paquay R.** Effect of FGA and PMSG on follicular growth and LH secretion in Suffolk ewes. *Theriogenology*, v.41, p.719-727, 1994.
- Noël B, Bister J.L, Paquay R.** Ovarian follicular dynamics in Suffolk ewes at different periods of the year. *J Reprod Fertil*, v.99, p.695-700, 1993.
- Nordstoga AB, Söderquist L, Adnoy T, Paulenz H.** Effect of different packages and freezing/thawing protocols on fertility of ram semen. *Reprod Domest Anim*, 2009. (in press; 10.1111/j.1439-0531.2008.01284.x).
- Oberst ER, Jobim MIM, Mattos RC, Kroth E, Lara G, Smiderie W, Bronzatto M.** Teste hiposmótico e sua

- relação com outros métodos para avaliação da integridade da membrana plasmática do carneiro. *Rev Bras Reprod Anim*, v.27, p.375-376, 2003.
- Oldham CM, Knight TW, Lindsay DR.** Comparison of the effects on reproductive performance in sheep, two methods of the estimation of ovulation rate. *Aust J Exp Agric Anim Husb*, v.16, p.24-27, 1976.
- Oliveira NM, Moraes CF.** Age and age structure on the reproductive performance of corriedale ewes in southern Brazil. *Rev Bras Reprod Anim*, v.15, p.143, 1991.
- Osgerby JC, Wathes DC, Howard D, Gadd TS.** The effect of maternal undernutrition on ovine fetal growth. *J Endocrinol*, v.173, p.131-141, 2002.
- Pace MM, Graham EF,** Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *J Anim Sci*, v. 39, p.1144-1149, 1974
- Peris SI, Bilodeau JF, Dufour M, Bailey JL.** Impact of cryopreservation and reactive oxygen species on DNA integrity, lipid peroxidation, and functional parameters in ram sperm. *Mol Reprod Dev*, v.74, p.878-892, 2006.
- Ravindra JP, Rawlings NC.** Ovarian follicular dynamics in ewes during the transition from anoestrus to the breeding season. *J Reprod Fertil*, v.110, p.279-289, 1997.
- Rawlings NC, Evans ACO, Honaramooz A, Bartlewski PM.** Antral follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and goats. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.259-270, 2003.
- Ribeiro LAO, Fontana CS, Wald VB, Gregory RM, Mattos RC.** Relação entre a condição corporal e a idade das ovelhas no encarneamento com a prenhez. *Cienc Rural*, v. 33, p.357-361, 2003.
- Rivlin J, Mendel J, Rubinstein S, Ektovitz N, Breitbart H.** Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. *Biol Reprod*, v.70, p.518-522, 2004.
- Rubianes E.** Nociones básicas de fisiología reproductiva em cabras y ovejas. In: Simpósio sobre Controle Farmacológico do Ciclo Estral em Ruminantes, 2000. São Paulo, SP. *Anais...* São Paulo, SP: FMVZ-USP, 2000.
- Rubianes E, De Castro T, Kmaid S.** Estrous response after a short progesterone priming in seasonally anestrous goats. *Theriogenology*, v.49, p.345, 1998. (Abstract).
- Sakul H, Bradford GE, Bondurant RH, Anderson GB, Donahue SE.** Cryopreservation of embryos as a means of germ plasm conservation in sheep. *Theriogenology*, v.39, p.401-409, 1993.
- Salamon S, Maxwell WMC.** Frozen storage of ram semen. I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim Reprod Sci*, v.37, p.185-249, 1995.
- Salamon S, Maxwell WMC.** Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci*, v.62, p.77-111, 2000.
- Salles HO, Santos DO, Simplício A.A.** Superovulação em fêmeas caprinas pré-púberes e púberes da raça Anglo-Nubiana. *Ciênc Anim*, v.10, supl.1, p.137-138, 2000.
- Salles MGF, Araújo AA.** Pseudogestação em cabras leiteiras – Relato de caso. *Vet Zootec*, v.15, p.251-256, 2008.
- Sangha GK, Sharma RK, Guraya SS.** Biology of corpus luteum in small ruminant. *Small Rumin Res*, v.43, p.53-54, 2002.
- Scaramuzzi RJ, Campbell BK, Downing JA, Kendall NR, Khalid M, Munoz-Gutiérrez M, Somchit A.** A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. *Reprod Nutr Dev*, v.46, p.339-354, 2006.
- Schiewe MC, Howard JG, Goodrowe KL.** Human menopausal gonadotrophin induces ovulation in sheep, but embryo recovery after prostaglandin F_{2α} synchronization is compromised by premature luteal regression. *Theriogenology*, v.34, p.469-86, 1990.
- Schillo KK, Halls JB, Hileman SM.** Effects of nutrition and season on the onset of puberty in the beef heifer. *Anim Reprod Sci*, v.70, p.3994-4005, 1992.
- Schrick FN, Surface RA, Pritchard JY, Dailey RA, Townsend EC, Inskoop EK.** Ovarian structures during the estrous cycle and early pregnancy in ewes. *Biol Reprod*, v. 49, p.1133-40, 1993.
- Senger PL.** Puberty. In: Senger PL. *Pathways to pregnancy and parturition*. 2.ed. Pullman, WA: Current Conceptions, 2003.p.128-143,
- Setchell BP.** Domestication and reproduction. In: Dieleman SJ, Colenbrander B, Booman P, Van Der Lende T. (Ed.). *Clinic trends and basic research in animal reproduction*. Amsterdam: Elsevier, 1992. p.195-202.
- Shaw JM, Oranratnachay A, Trouson AO.** Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissues. *Theriogenology*, v.53, p.59-72, 2000.
- Silva PFN, Gadella BM.** Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology*, v.65, p.958-978, 2006.
- Simplício AA, Freitas VJF, Fonseca JF.** Biotécnicas da reprodução como técnicas de manejo reprodutivo em ovinos. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.234-246, 2007.
- Snoeck PPN.** Aspectos da criopreservação de sêmen equino: composição do meio diluidor, curvas de congelamento e fertilidade. 2003, 116f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, MG, 2003.
- Solter D.** Mammalian cloning: advances and limitations. *Nat Rev Genet*, v.1, p.199-207, 2000.
- Sousa DB, Bicudo SD, Azevedo HC, Maia MS, Rodello L, Sicherle CC.** Ranqueamento qualitativo do sêmen



- congelado de carneiros através da análise estatística multivariada avaliado pelo sistema Casa e sondas fluorescentes. *In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*, 17, Curitiba, PR, 2007. *Anais...* Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2007. Disponível em: <http://www.cbra.org.br>.
- Souza CJH, Campbell BK, Baird DT.** Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during anoestrus. *J Reprod Fertil*, v. 108, 101-106, 1996.
- Stringfellow DA, Seidel SM.** *Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões*. 3.ed. Savoy, IL: IETS, 1998. 180p.
- Telford NA, Watson AJ, Schultz GA.** Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. *Mol Reprod Dev*, v.26, p.90-100, 1990.
- Traldi AS.** Biotécnicas aplicadas em reprodução animal de pequenos ruminantes *In: FEINCO*, 3, São Paulo. *Anais...* São Paulo, 2006. (disponível eletrônico)
- Traldi AS.** Biotécnicas aplicadas em reprodução de pequenos ruminantes. *In: Congresso Internacional FEINCO*, 3, 2008, São Paulo. *Anais...* São Paulo, 2008. p.1-11.
- Ungerfeld R, Suárez G, Carbajal B, Silva L, Laca M, Forsberg M, Rubianes E.** Medroxyprogesterone priming and responses to the ram effect in Corriedale ewes during the nonbreeding season. *Theriogenology*, v.60, p.35-45, 2003.
- Valleriote, P.S, Dias, A.J.B, Paes De Carvalho, F, Paes Sobrinho, C.** Criopreservação de sêmen ovino em solução de trealose. *Acta Sci Vet*, v.33, supl.1, p.310, 2005. (Resumo).
- Vieira RC, Franco RVR, Diniz EG, Jacomini JO.** Relação entre a morfologia do corpo lúteo e índices de prenhez em receptoras de embriões bovinos. *Biosci J*, v.18, p.99-102, 2002.
- Wani NA.** In vitro maturation an in vitro fertilization of sheep oocytes. *Small Rumin Res*, v.44, p.89-95, 2002.
- Watson, P. F, Martin, C. A.** The influence of some fractions of egg yolk on the survival of ram spermatozoa at 5°C. *Aust J Biol Sci*, v.28, p.145-52, 1975.
- Willadsen SM.** Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature*, v.320, p.63-5, 1986.
- Wilmot I, Schnieke AE, Mcwhir J, Kind AJ, Campbell KHS.** Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*, v.385 :.810-3, 1997.
- Wooliams JA, Wilmot T.** Embryo manipulation in cattle breeding and production. *Anim Prod*, v.48, p.3-30, 1989.
- Yongquist RS.** *Current therapy in large animal theriogenology*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1997, 898 p.
-