



Superovulação e transferência de embriões em ovelhas

Multiple ovulation and embryo transfer in the ewe

A.L. Gusmão¹, C.E.A. Biscarde, C.K. Kiya

Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil.

¹Correspondência: gusmao@ufba.br

Resumo

A ovinocultura possui posição de destaque atualmente na pecuária brasileira, devido a uma crescente necessidade dos centros urbanos em cortes especiais de ovinos. Isto impõe que a ovinocultura eleve os seus índices produtivos, o que aumenta a relevância das biotecnologias da reprodução animal no melhoramento genético da espécie ovina. A superovulação com posterior transferência de embriões entre essas biotecnologias, ganha importância na multiplicação de indivíduos de elevado mérito produtivo. Por outro lado, há grandes limitações na sua utilização, nos custos do procedimento, no método de colheitas das estruturas embrionárias, na dificuldade de se promover um crescimento folicular uniforme, levando-a a apresentar uma extensa variabilidade na resposta superovulatória. A colheita dos embriões via transcervical esbarra na barreira natural da cérvix, que apresenta uma conformação de anéis acêntricos de difícil transposição, promovendo uma limitação no seu uso em escala comercial. O objetivo desta revisão é demonstrar alguns dos fatores limitantes na utilização dessa biotécnica para que, com isto, novas alternativas venham a ser utilizadas, a fim de que a superovulação e a transferência de embriões se tornem uma realidade na criação de ovinos do Brasil.

Palavras-chave: biotecnologia, ovinos, reprodução animal.

Abstract

The sheep industry has a prominent position in the Brazilian livestock industry today due to a growing need in urban centers for special cuts of meat. This sets higher standards for the industry and the need for better production rates, increasing the importance of animal reproduction biotechnologies as a way to achieve genetic improvement when breeding sheep. Multiple ovulation and subsequent embryo transfer (MOET), takes great importance in the multiplication of individuals of high productive levels. On the other hand, there are major limitations using this technique, the cost of the procedure, the method of harvesting embryonic structures, the difficulty in promoting a uniform follicular growth, resulting in great response variability. The transcervical embryo collection touches the natural barrier of the cervix, which has a conformation of acentric rings of difficult access, providing limitations to its use on a commercial scale. This review demonstrates some of the limiting factors in using this biotechnology in hopes to inspire new alternatives that will make MOET a viable reality in the sheep industry in Brazil.

Keywords: animal reproduction, biotechnology, sheep.

Introdução

Com a crescente demanda por carne de cordeiro, em especial nos grandes centros urbanos, a ovinocultura brasileira, que em outras épocas foi tida como importante instrumento socioeconômico e ferramenta de fixação do homem no campo, em especial os pequenos criadores e praticantes da agricultura familiar, vem demonstrando sua incapacidade de atender à demanda do mercado interno em requisitos básicos. Segundo informações obtidas de Souza (2012), no Brasil não existe um número suficiente de ovelhas para satisfazer as necessidades do mercado interno de cordeiros. Ainda de acordo com o autor, faltam cordeiros em todos os estados e frigoríficos do país, em especial para aqueles que atendem a dois pontos muito importantes para o mercado: qualidade e escala. Essa situação impõe a busca por cordeiros com a qualidade exigida em outros centros de produção.

No Brasil, a maior movimentação da ovinocultura tem se restringido ao segmento de alta genética, os chamados “animais de elite”, em detrimento do setor produtivo com qualidade e escala, fato que não tem impedido de fazer com que a ovinocultura tenha se destacado no cenário nacional como uma atividade de grande impacto socioeconômico.

Apesar das limitações existentes, tem havido uma crescente demanda, por parte da iniciativa privada, por biotécnicas da reprodução que visem ao incremento da produtividade e da rentabilidade dos rebanhos e das unidades produtivas. Entre essas biotécnicas, pode-se ressaltar a sincronização de estros, a inseminação artificial, o diagnóstico precoce de prenhez, transferência de embriões (TE) e, mais recentemente, a colheita de ovócitos e



a produção de embriões em laboratório por meio da fertilização *in vitro*.

A principal limitação da TE em pequenos ruminantes sempre esteve relacionada a dois fatores: os custos e a metodologia cirúrgica de colheita de embriões (Fonseca et al., 2010). O estabelecimento de um protocolo para superovulação, capaz de oferecer uma segurança mínima na resposta superovulatória, também constitui um fator limitante.

Superovulação na ovelha

A grande variação na resposta ovariana de ovelhas submetidas a programas de superovulação é uma das mais frustrantes e limitantes causas da implementação comercial da TE nessa espécie. Apesar dos conhecimentos obtidos nos últimos tempos sobre a dinâmica folicular na ovelha e do avanço na produção de hormônios com qualidade e pureza, a busca por um protocolo capaz de fornecer uniformidade na resposta superovulatória e na produção de embriões viáveis, transferíveis e criopreserváveis após estímulo hormonal tem sido o motivo de investigações por inúmeros grupos de pesquisadores, uma vez que corresponde a um dos passos mais críticos do processo (Amirides e Cseh, 2012).

As primeiras informações relativas à superovulação em ovelhas utilizaram a gonadotrofina coriônica equina (eCG), administrada 48 horas antes da remoção da fonte exógena de progesterona, em dose única, devido a sua longa meia-vida. Na verdade, esse fato tem justificado a marginalização dessa gonadotrofina para fins de superovulação, uma vez que a longa meia-vida pode promover uma elevada incidência de folículos não ovulados, provocando, assim, um aumento dos níveis plasmáticos de estrógenos e, por consequência, uma alteração no transporte de gametas no trato genital, o que resulta em baixa taxa de coleta de embriões viáveis. Além das alterações endócrinas descritas, uma precoce maturação dos ovócitos explica a baixa eficiência do eCG (Whyman e Moore, 1980; Evans e Armstrong, 1984; Moor et al., 1985; Jabbor e Evan, 1991).

Com a disponibilização do hormônio foliculo estimulante (FSH), inúmeros estudos foram desenvolvidos no sentido de se comparar a eficiência desse produto com o eCG. Um achado comum entre os diversos experimentos, em diferentes espécies, foi a superioridade do FSH no que diz respeito à taxa de superovulação e fertilização, assim como na produção de embriões de boa qualidade. Uma ampla revisão sobre esse tema e sobre diferentes protocolos e doses aplicadas foi disponibilizada por Gordon (1997) e Cognie (1999), com informações de que o FSH, em razão da sua curta meia-vida (5 h), foi administrado em seis a oito aplicações em intervalo de 12 horas, sendo iniciado o tratamento dois a três dias antes da remoção da fonte exógena de progesterona.

A resposta do ovário de ovelhas ao tratamento superovulatório depende de fatores endógenos (genética, plano nutricional, *status* folicular, estação do ano) e exógenos (tipo, dose e protocolo de aplicação da gonadotrofina utilizada, método de inseminação e intervalo entre tratamentos). A contribuição individual de cada um desses fatores sobre a resposta superovulatória é, todavia, impossível de ser quantificada (Cognie et al., 2003; González-Bulnez et al., 2004; Bartlewski et al., 2008; Amirides e Cseh, 2012).

Exames ultrassonográficos e endoscópicos, realizados em ovelhas cíclicas, permitiram concluir que o *status* ovariano no início do tratamento superovulatório pode interferir no resultado da superovulação. O início do tratamento superovulatório na presença de folículos com diâmetro ≥ 6 mm no ovário de ovelhas tem sido descrito por muitos autores como causa de redução no número de ovulações (Rubianes et al., 1997; González-Bulnez et al., 2004).

Foi possível incrementar a resposta superovulatória, bem como uma produção maior de embriões em ovelhas, quando se observou que um grande número de folículos antrais pequenos (2 a 3 mm de diâmetro) estava presente e que folículos grandes estavam ausentes dos ovários no início do tratamento (Cognie et al., 2003).

Sendo assim, é desejável que o tratamento superovulatório seja iniciado na emergência de uma onda de desenvolvimento folicular ou na ausência de um folículo dominante, o que pode ser alcançado por ablação mecânica ou por inibição medicamentosa do desenvolvimento folicular previamente ao início do tratamento superovulatório (Cognie et al., 2003; González-Bulnez et al., 2004; Amirides e Cseh, 2012).

A aspiração folicular por meio da ultrassonografia de folículos dominantes é uma abordagem que tem sido pouco estudada na ovelha, certamente devido à necessidade de realização de endoscopia, o que dificultaria e oneraria ainda mais a utilização da técnica (Amirides e Cseh, 2012). Estudos desenvolvidos em vacas por Bó et al. (1996), que associaram a administração de benzoato de estradiol a dispositivos intravaginais liberadores de progesterona (CIDR), permitiram desenvolver uma promissora estratégia capaz de sincronizar a onda de desenvolvimento folicular previamente ao início do tratamento superovulatório.

Ao estudar a ação do benzoato de estradiol sobre a população de folículos nos ovários de ovelhas Santa Inês, Biscarde (2010) constatou que, ao contrário da vaca, na ovelha o tratamento não foi capaz de diminuir a população de nenhum folículo, independentemente do diâmetro, e também não foi capaz de induzir a emergência de uma nova onda de crescimento folicular, além de promover uma dispersão maior no tempo de ovulação.

Cognie et al. (2003) suprimiram com sucesso o desenvolvimento de folículos grandes por meio da administração de agonista de hormônio liberador de gonadotrofinas - GnRH (Buserelina) e com antagonista de GnRH (antarelix). Ambos os tratamentos suprimiram o crescimento de folículos grandes e aumentaram



significativamente a população de folículos pequenos. O mesmo sucesso não foi alcançado por Martins e Gusmão (2005) quando repetiram o protocolo descrito por Cognie et al. (2003) em ovelhas Santa Inês.

Em um experimento bastante atual, Gharbi et al. (2012) injetaram diariamente, por 14 dias, pela via subcutânea, 40 µg de buserelina como pré-tratamento superovulatório com 320 µg de FSHp, divididos em oito aplicações decrescentes em intervalo de 12 horas, acrescidos de 60 e 90 µg de hormônio luteinizante (LH) nos dois últimos dias de tratamento. Os autores relataram uma taxa de sucesso significativa, quando compararam seus achados experimentais aos resultados apresentados pelo grupo-controle, tratado convencionalmente com 200 µg de FSHp em doses decrescentes (seis injeções em intervalos de 12 h), acrescidos de 60 e 90 µg de LH nos dois últimos dias de tratamento.

Em um estudo recente, Mayorga et al. (2011) conduziram um experimento em que ovelhas foram tratadas pela via intramuscular, com 350UI de FSH divididas em oito doses decrescentes, em intervalos de 12 horas, iniciando-se quatro dias após a observação do estro natural (dia 0; Menchaca et al., 2007), e compararam esse protocolo com o regime convencional, que constou da deposição de esponja intravaginal contendo 40 mg de acetato de fluorogestona (FGA), por 12 dias, seguido do mesmo regime de administração do FSH, iniciando-se 48 horas antes da remoção do dispositivo. Os animais foram cobertos naturalmente, por um carneiro com fertilidade comprovada, 24 horas após a administração de prostaglandina F2α (PGF2α) no grupo (dia 0) e no mesmo período após a retirada das esponjas. Os autores concluíram que o protocolo superovulatório alternativo foi efetivo quando comparado ao tradicional, com as vantagens de menor custo, menos trabalho e ausência dos efeitos colaterais provocados pela esponja.

Convencionalmente, nos trabalhos de campo, os autores da presente revisão fazem uso do procedimento descrito a seguir. Utiliza-se a inserção do dispositivo vaginal (CIDR), que é trocado no sétimo dia, e são administrados 125 µg de PGF2α. Cinco dias após a troca do dispositivo, segue o tratamento com 200 mg de FSHp (follitropin), divididos em duas aplicações diárias de 2,0-1,5-1,0 e 0,5 mL, pela via intramuscular, associado a 200UI de eCG na sexta administração do FSH, momento em que se retira o dispositivo vaginal. Juntamente com a última administração de FSH, administram-se 100 µg de GnRH. No mesmo dia, os animais são mantidos em jejum, e a IA é realizada 12 a 14 horas após a última injeção, o que corresponde a 36-38 horas após a remoção do CIDR. Quando é utilizado sêmen congelado, repete-se a IA oito horas após.

O fato de manejar-se excessivamente os animais para a administração diária do FSH despertou o interesse em se desenvolverem protocolos mais simplificados, a fim de se reduzir o estresse sobre doadoras e os custos de administração. Na revisão realizada por Cognie (1999) e Cognie et al. (2003), estão disponibilizados diferentes estudos sobre o tema.

Silva e Gusmão (2002), ao trabalharem com ovelhas Santa Inês, administraram 200 mg de FSHp (1,0 mL), dissolvidos em 9,0 mL de uma solução de polivinilpirrolidona (PVP) a 30% w/v, aplicada em dose única, pela via subcutânea, 12 dias após a introdução do CIDRg. Quarenta e oito horas após a administração da mistura, injetaram 125 µg de PGF2α e removeram o dispositivo vaginal. Foi alcançada, após colheita cirúrgica, uma média de 5,4 embriões por ovelha.

Colheita e transferência de embriões

Na ovelha, um fator que limita a utilização da TE em escala comercial é a dificuldade de serem realizadas colheitas pelo método transcervical, devido ao obstáculo representado pela grande dificuldade de transposição do canal cervical, já que este é longo, sinuoso, com abertura dos anéis de forma excêntrica e com diâmetro reduzido. O orifício externo apresenta diferentes formatos em bico de pato, *flap*, roseta e espiral (Halbert et al., 1990b; Silva et al., 2004), criando um obstáculo à passagem de instrumentos que permitam o acesso ao útero pela via transcervical. Sendo assim, a utilização comercial dessas biotécnicas fica limitada aos procedimentos cirúrgicos e laparoscópicos, que trazem como grande desvantagem a predisposição à formação de aderências do sistema genital das doadoras, reduzindo o número de colheitas efetuadas em uma mesma fêmea e, em algumas vezes, até comprometendo a vida reprodutiva futura do animal (González et al., 1991, 2004; Mayorga et al., 2011).

O sucesso da transposição da barreira cervical parece depender de vários fatores, como a raça, o número de partos ocorridos anteriormente à colheita, bem como de fatores inerentes ao indivíduo (Almeida et al., 2002).

O relaxamento da cérvix em ovelhas em cio foi descrito como sendo o resultado da ação pré-ovulatória dos hormônios progesterona, estradiol e ocitocina atuando sobre a cérvix. Foi possível detectar uma elevação da expressão de receptores para ocitocina nas células do epitélio luminal da cérvix durante o estro. Na vaca, o efeito potencial da ocitocina sobre o relaxamento cervical é mediado pela elevação local da ciclo-oxigenase-2 (COX2), com subsequente elevação na síntese de prostaglandina E2 (PGE2; Rickords e White, 1988; Ayad et al., 2004).

O amolecimento natural da cérvix tem sido descrito como resultado de alterações intrínsecas dos componentes extracelulares do estroma. A mais marcante das mudanças é provocada por uma redução na concentração de colágeno e glicosaminoglicanos (GAGS), associada a uma significativa elevação de um dos GAGS primários, o ácido hialurônico (HA), que tem elevada afinidade por moléculas de água. O relaxamento da



cérvix observado durante o estro está associado a um elevado conteúdo de HA e água (Kershaw et al., 2005; Stern et al., 2006).

Perry et al. (2010) investigaram o efeito da aplicação local de HA sobre a profundidade de penetração da pipeta para inseminação na cérvix de ovelhas em cio e sugeriram que a aplicação de HA com baixo peso molecular é um passo adiante para tornar inseminação transcervical mais acessível na ovelha.

O influxo de neutrófilos na cérvix parece ser um importante componente para o amolecimento cervical. Postula-se que a collagenase liberada por neutrófilos recrutados para o interior da cérvix é muito importante para o rompimento das fibras colágenas, que são os principais elementos estruturais da cérvix. Em cobaias, coelhos e humanos, a interleucina 8 têm sido associada com o recrutamento de leucócitos e a elevação da collagenase cervical no final da gestação (Rajabi, 1991).

Alguns estudos testaram uma grande variedade de fármacos com o propósito de promover o relaxamento cervical em ovelhas, com o objetivo de ultrapassar a barreira do canal cervical. A administração de ocitocina isoladamente ou em combinação com estradiol produziu resultados incompatíveis com as necessidades para adoção do método em escala comercial (Khalifa, 1992; Sayre e Lewis, 1996; Wulster-Radcliffe et al., 1999). Resultado semelhante foi descrito quando da utilização da interleucina 8, que produziu efeito insignificante sobre o relaxamento e a abertura da cérvix (Croy et al., 1999). Resultados promissores foram obtidos mediante a introdução vaginal de um dispositivo contendo PGE₂, que possibilitou a penetração da cérvix 12 horas após o tratamento (Rickords e White, 1988; Barry et al., 1990; Halbert et al., 1990a; McKelvey et al., 1997; Candappa et al., 2009).

Leethongdee et al. (2007) verificaram o efeito da administração do análogo da PGE₂, misoprostol e do FSH sobre a penetrabilidade da cérvix de ovelhas durante o período periovulatório e concluíram que FSH ou misoprostol foram capazes de aumentar o relaxamento natural da cérvix ao ponto de permitir uma efetiva penetração intrauterina no momento da inseminação artificial.

Durante a prenhez, a PGE₂ é liberada continuamente pela placenta e desempenha um importante papel nos eventos que conduzem ao parto. É conhecido que PGE₂ estimula a produção de PGF₂ α , que, por sua vez, sensibiliza o miométrio à ocitocina endógena ou à administração exógena, entretanto as evidências disponíveis indicam que a PGE₂ desempenha seu principal papel na preparação e no amadurecimento da cérvix para o parto, sem afetar a contratilidade uterina (Barry et al., 1990; Pereira et al., 1998; Perry et al., 2010), promovendo um complexo conjunto de alterações estruturais e bioquímicas envolvidas no processo.

O amadurecimento e a abertura da cérvix envolvem um marcado relaxamento das fibras da musculatura lisa cervical, que necessitam serem transformadas de uma estrutura rígida em uma estrutura amolecida, complacente e com configuração dilatada. Esse processo envolve a ativação da enzima collagenase, que é responsável pela digestão de parte da cadeia estrutural de colágeno da cérvix. Tal mecanismo está associado a uma concomitante elevação nos níveis cervicais de glicosaminoglicanos e HA (Pritchard et al., 1985).

Com base nas informações acima descritas, estudos desenvolvidos por Gusmão et al. (2009) obtiveram promissores resultados quando foram depositados 200 μ g de misoprostol (Cytotec®) no fundo de saco vaginal de ovelhas Santa Inês e Dorper. Foi observado que a utilização do misoprostol cinco horas antes das colheitas, associada à tração e dilatação mecânica da cérvix foi efetiva, possibilitando a transposição cervical. Além da utilização da PGE₂, a tração cervical com pinças de Pozzi e o emprego de velas tipo Hegar para promover a dilatação mecânica do canal cervical foram indispensáveis para a execução da técnica com sucesso. O calibre da vela (nº 2 ou 3) variou de acordo com o diâmetro do canal cervical do animal trabalhado. Apesar da dificuldade em se obter no mercado nacional, a sonda modelo Nelaton-Robinson (Rusch® ref. 220500 nº 10) com via única, fabricada pela Rusch, produziu bons resultados, com raros episódios de dobramento (Gusmão et al., 2009).

Transposta a barreira cervical, o prosseguimento da lavagem uterina pode ser executado em circuito fechado ou não. Importante salientar que, em razão dos cateteres usados serem desprovidos de balão, uma vez que necessitam ser manipulados durante a lavagem, o volume de meio a ser injetado no útero da doadora depende do seu porte. Em ovelhas, é seguro utilizarem-se porções de 20 mL, podendo chegar a 30 mL em ovelhas maiores, no final das lavagens (Gusmão et al., 2009).

A classificação dos embriões de ovinos segue o mesmo padrão descrito para bovinos, de acordo com o método relatado por Lindner e Wright (1983) e baseado nas normas da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS).

A transferência é realizada pelo método semilaparoscópico, utilizando-se uma mistura de ketamina e xilazina para sedação (250 mg de ketamina, 20 mg de xilasina em 19 mL de soro fisiológico – 1 mL/ 10 KPV \pm 5,0 mL/animal). Após a depilação e assepsia da região pré-mamária do abdômen, administra-se o equivalente a 5,0 mL de lidocaína a 1%, pela via subcutânea, no ponto de introdução de um trocar que vai dar acesso à ótica com fonte de luz e permitir a visualização do interior da cavidade abdominal e no ponto onde se faz uma abertura que permite a introdução da pinça modelo Babcock (25 cm). Os pontos de anestesia local são feitos na linha das tetas.

Visualmente, faz-se a avaliação da presença e da qualidade do copo lúteo (CL). Posteriormente, é feita a exteriorização do corno uterino ipsilateral à ovulação, e o embrião é injetado no útero com o auxílio de um unopette®. Receptoras caprinas e ovinas que apresentem CLs muito pequenos ou pálidos não devem ser



utilizadas, pois CL rosa pálido é um sinal típico de regressão precoce.

Os animais submetidos à transferência semilaparoscópica recebem previamente a injeção de 1,0 mL/10 KPV de oxitetraciclina, preventivamente, e devem ser diariamente tratados com repelente no local da ferida até completa recuperação.

Referências

- Almeida VM, Câmara DR, Salles HO, Oliveira DPF, Medeiros JN, Alves OMM.** Colheita de embriões via transcervical em ovinos. *Rev Bras Reprod Anim*, supl 5, p.82-84, 2002.
- Amiridis GS, Cseh S.** Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. *Anim Reprod Sci*, v.130, p.152-161, 2012.
- Ayad VJ, Leung ST, Parkinson TJ, Wathes DC.** Coincident increases in Oxytocin receptor expression and EMG responsiveness to Oxytocin in the ovine cervix at oestrus. *Anim Reprod Sci*, v.80, p.237-250, 2004.
- 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. Resumo.
- Bartlewski PM, Alexander BD, King WA.** Ovarian and endocrine determinants of superovulatory responses in anestrus ewes. *Small Rumin Res*, v.75, p.210-216, 2008.
- Biscarde CEA.** Efeitos do benzoato de estradiol e/ou GnRH na função ovariana de ovelhas Santa Inês. 2010. 101f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, SP, 2010.
- Bó GA, Adams GP, Pierson RA, Mapletoff RJ.** Effects of progestogen plus estradiol-17 β treatment on superovulatory response in beef cattle. *Theriogenology*, v.45, p.897-910, 1996.
- Candappa IB, Bainbridge HC, Price NT, Hourigan KR, Bartlewski PM.** A preliminary study on the suitability of Cervidil to induce cervical dilation for artificial insemination in ewes. *Res Vet Sci*, v.87, p.204-206, 2009.
- Cognie Y.** State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*, v.51, p.105-116, 1999.
- Cognie Y, Baril G, Poulin N, Mermillod P.** Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*, v.59, p.171-188, 2003.
- Croy B, Prudencio J, Minhas K, Ashkar A, Galligan C, Foster R, Buckrell B, Coomber B A.** A preliminary study on the usefulness of hui-8 in cervical relaxation of the ewe for artificial insemination and for embryo transfer. *Theriogenology*, v.52, p.271-287, 1999.
- Evans G, Armstrong DT.** Reduction of sperm transport in ewes by superovulation treatments. *J Reprod Fertil*, v.70, p.47-53, 1984.
- Fonseca JF, Souza, JMG, Camargo LSA.** Produção de ovócitos e embriões de pequenos ruminantes: passado, presente e futuro. *Acta Sci Vet*, v.8, suppl 2, p.337-369, 2010.
- Gharbi I, Ferrouk M, Dechicha A, Baril G, Bekers JF, Guetarni D.** Follicular status and embryo production in Ouled Djellal (Algeria) ewes breed pretreated with a GnRH agonist. *J Anim Vet Adv*, v.11, p.791-798, 2012.
- Gonzales CIM, Oliveira VS.** Técnicas para incrementar a eficiência reprodutiva de caprinos e ovinos. *Rev Soc Bras Zootec*, v.28, p.71-102, 1991.
- González-Bulnez A, Baird DT, Campbell BK, Cocero MJ, García-García RM, Inskoop EK, López-Sebastián A, McNeilly AS, Santiago-Moreno J, Souzac JH, Veiga-López A.** Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. *Reprod Fertil Dev*, v.16, p.421-435, 2004.
- Gordon I.** Controlled reproduction in sheep and goats. Walingford: CAB International, 1997.
- Gusmão AL, Silva JC, Bittencourt TCC, Martins LEP, Gordiano HD, Barbosa LP.** Coleta transcervical de embriões em ovinos da raça Dorper no semiárido do Nordeste Brasileiro. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.61, p.313-318, 2009.
- Halbert GW, Dobson H, Walton JS, Buckrell BC.** A technique for trans-cervical intrauterine insemination of ewes. *Theriogenology*, v.33, p.993-1010, 1990a.
- Halbert GW, Dobson H, Walton JS, Buckrell BC.** The structure of the cervical canal of the ewe. *Theriogenology*, v.33, p.977-992, 1990b.
- Jabbour HN, Evans G.** Ovarian and endocrine responses of Merino ewes following treatment with PMSG and GnRH or PMSG antiserum. *Anim Reprod Sci*, v.24, p.259-270, 1991.
- Kershaw CM, Khalid M, McGowan MR, Ingram K, Leethongdee S, Wax G, Scaramuzzi RJ.** The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology*, v.64, p.1225-1235, 2005.
- Khalifa R, Sayre B, Lewis G.** Exogenous oxytocin dilates the cervix in ewes. *J Anim Sci*, v.70, p.38-42, 1992.
- Leethongdee S, Khalid M, Bhatti A, Ponglowhapan S, Kershaw, CM, Scaramuzzi RJ.** The effects of the prostaglandin E analogue Misoprostol and follicle-stimulating hormone on cervical penetrability in ewes during the peri-ovulatory period. *Theriogenology*, v.67, p.767-777, 2007.
- Lindner GM, Wright RW.** Ovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*, v.20, p.407-416, 1983.



- Martins LEP, Gusmão AL.** Comparação entre o método convencional e o bloqueio hipofisário com GnRH na superovulação de ovelhas Santa Inês criadas em ambiente tropical e semiárido. In: Seminário Estudantil de Pesquisa, 24, 2005, Salvador. Salvador, BA: UFBA, 2005. Resumo.
- Mayorga I, Mara L, Sanna D, Stelletta C, Morgante M, Casu S, Dattena M.** Good quality sheep embryos produced by superovulation treatment without the use of progesterone devices. *Theriogenology*, v.75, p.1661-1668, 2011.
- McKelvey WAC, McEvoy TG, Dingwall WS, Robinson JJ, Lindsay E, King ME, Fitzsimons J, Mylene MJA.** The use of exogenous hormones to facilitate transcervical embryo recovery in sheep and their effect on embryo development. *Theriogenology*, v.47, p.369, 1997. Resumo.
- Moor RM, Osborn JC, Crosby IM.** Gonadotrophin-induced abnormalities in sheep oocytes after superovulation. *J Reprod Fertil*, v.74, p.167-172, 1985.
- Menchaca A, Vilariño M, Crispo M, Pinczak A, Rubianes E.** Day 0 protocol: Superstimulatory treatment initiated in the absence of a large follicle improves ovarian response and embryo yield in goats. *Theriogenology*, v.68, p.1111-1117, 2007.
- Pereira RJTA, Sohrey B, Holtz, W.** Nonsurgical embryo collection in goats treated with prostaglandin F2 α and oxytocin. *J Anim Sci*, v.76, p.360-363, 1998.
- Perry K, Haresign W, Wathes DC, Khalid M.** Intracervical application of hyaluronan improves cervical relaxation in the ewe. *Theriogenology*, v.74, p.1685-1690, 2010.
- Pritchard JA, MacDonald PC, Gant NF.** Physiology of labor. In: Williams obstetrics. Aplenton Century-Crofts, 1985. p.295-321.
- Rajabi MR.** Biochemical evidence of collagenase-mediated collagenolysis as a mechanism of cervical dilation at parturition in the guinea-pig. *Biol Reprod*, v.45, p.764-772, 1991.
- Rickords LF, White KL.** Dinoprostone induced cervical dilation in the ewe. *Theriogenology*, v.29, p.296, 1988. Resumo.
- Rubianes E, Ungerfeld R, Vinales C, Rivero A, Adams GP.** Ovarian response to gonadotropin treatment initiated relative to wave emergence in ultrasonographically monitored ewes. *Theriogenology*, v.47, p.1479-1488, 1997.
- Sayre B, Lewis G.** Cervical dilation with exogenous oxytocin does not affect sperm movement into the oviducts in ewes. *Theriogenology*, v.45, p.1523-1533, 1996.
- Silva JC, Gusmão AL.** Superovulação de ovelhas Santa Inês através de uma única injeção subcutânea de FSH dissolvido em polivinilpirrolidona. In: Seminário Estudantil de Pesquisa, 20, 2002, Salvador, Salvador: UFBA, 2002. p.187. Resumo.
- Silva JC, Quintela A, Andrade Moura JC, Resende J, Gordiano HD, Martins LEP, Chalhoub M, Ribeiro Filho AL, Gusmão AL.** Avaliação da colheita transcervical de embriões ovinos da raça Santa Inês. *Acta Sci Vet*, v.32, p.90, 2004. Resumo.
- Souza SC.** Uruguai mostra o caminho. *O Berro*, v.157, p.58-65 2012.
- Stern R, Asari A, Sugahara KN.** Hyaluronan fragments: na information-rich system. *Eur J Cell. Biol*, v.85, p.699-715, 2006.
- Whyman D, Moore RW.** Effects of PMSG and the PGF2 α analogue, Cloprostenol, on superovulation, fertilization and egg transport in the ewe. *J Reprod Fertil*, v.60, p.267-272, 1980.
- Wulster-Radcliffe M C, Costine BA, Lewis GS.** Estradiol-17 β - oxytocin-induced cervical dilation in sheep: application to transcervical embryo transfer. *J Anim Sci*, v.77, p.2587-2593, 1999.