



Produção *in vivo* de embriões ovinos

In vivo production of ovine embryos

Pedro Henrique Nicolau Pinto¹, Mario Felipe Alvarez Balara¹, Eduardo Kenji Nunes Arashiro¹, Ríbrion Ivan Tavares Pereira Batista¹, Maria Emília Franco Oliveira², Gláucia Mota Bragança¹, Jeferson Ferreira Fonseca³, Felipe Zandonadi Brandão^{1,4}

¹Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro.

²Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Jaboticabal, São Paulo.

³Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral, Ceará.

⁴Correspondência: fzbrandao@id.uff.br

Resumo

A presente revisão tem por objetivo abordar os aspectos técnicos em estudos nas diferentes etapas da múltipla ovulação e transferência de embriões em ovinos (MOTE). Apesar dos inúmeros avanços a alta variabilidade de resposta à superovulação ainda é um entrave para esta biotécnica. Visando driblar este gargalo diferentes estratégias têm sido testadas para selecionar fêmeas com melhor potencial de resposta, como a contagem de folículos antrais, pré-seleção com eCG, repetibilidade de resposta, dosagem do hormônio anti-Mülleriano e sincronização da onda folicular. Ajustes de protocolos superovulatórios modificando a frequência, o número de aplicações e a diminuição da dose total de FSH, têm sido testados. Outra tendência é a substituição de procedimentos cirúrgicos por técnicas menos invasivas, prezando pelo bem estar animal e também pela simplificação de processos. Resultados satisfatórios para avaliação de doadoras por ultrassonografia ao invés de laparoscopia ilustram esta tendência. Adicionalmente, a inóvulação não cirúrgica já se mostra exequível. Porém, etapas como a seleção de receptoras e a criopreservação de embriões também têm potencial para melhorar os índices. Associando os esforços e resultados de diferentes linhas de pesquisas, a MOTTE em ovinos têm evoluído e seu uso para pesquisa ou produção animal tem-se ampliado.

Palavras-chave: transferência de embriões, coleta de embriões, superovulação, ultrassonografia, ovelha.

Abstract

This review address technical aspects that are being studied in multiple ovulation and embryo transfer in sheep (MOTE). Despite the numerous advances the high variability of response to superovulation still a barrier for this biotechnology. Aiming to suppress this limitation, different strategies have been tested to select ewes with high ovulatory response such as antral follicle count, pre-selection with eCG, repeatability of response, anti-Müllerian hormone, and follicular wave synchronization. Adjustments of superovulatory protocols modifying the frequency, the number of applications and a decrease in the total FSH dose are also being tested. Another trend is the replacement of surgical procedures for less invasive techniques, focusing animal welfare and simplification of procedures. Satisfactory results using ultrasonography to evaluate donors, rather than laparoscopy illustrate this trend. Also non-surgical embryo transfer is already feasible in ewes. However, adjustments in recipients selection and embryo cryopreservation can potentially improve pregnancy rates. By linking the efforts and results of different lines of research, MOTTE in sheep has improved and it is use for research or animal production increased.

Keywords: Embryo transfer, embryo collection, superovulation, ultrasonography, sheep.

Introdução

As criações de ovinos fornecem uma importante fonte de proteína animal e constituem uma opção de negócio para propriedades de diferentes tamanhos e níveis de tecnificação. Podem ser utilizadas para a produção de biofármacos e servem como modelo experimental em diversas áreas de pesquisa, incluindo medicina humana.

O rebanho brasileiro de ovinos ultrapassa atualmente os 18 milhões de cabeças, desde 2012 o número de animais vem aumentando (IBGE, 2015) e hoje a raça Santa Inês é a mais criada no território nacional (Aguirre et al., 2016). Algumas características desta raça como habilidade materna, boa prolificidade e precocidade fazem dela uma ótima opção como base materna para cruzamentos com outras raças (Balara et al., 2014).

Dentro da produção de pequenos ruminantes, as biotecnologias da reprodução como a múltipla ovulação e transferência de embrião (MOTE) foram introduzidas para transpor limitações inerentes às cabras e ovelhas e acelerar o ganho genético (Cognié et al., 2003). Em sistemas de produção de ovinos, o impacto da MOTTE é evidente nos programas de melhoramento genético, zootécnicos e sanitários, bem como no resgate e



conservação de raças ameaçadas de extinção, no apoio a outras biotécnicas relacionadas e principalmente para a disseminação de genética de fêmeas superiores (Oliveira, 2011; Brasil et al., 2014).

Em ovinos, um dos grandes entraves para aplicação desta biotécnica é a grande variabilidade de resposta frente à superovulação (SOV). Esta variação é o maior desafio para o aumento da eficiência dos programas de MOTE e é responsável também por incremento de custo por embrião produzido (Cognié et al., 2003; Bartlewski et al., 2008; Gibbons et al., 2010; Oliveira, 2011; Bruno Galarraga et al., 2015). Associado a este gargalo, temos ainda a necessidade de uso de cirurgia e falta de mão de obra especializada, que também dificultam a disseminação da MOTE na ovinocultura.

Observados estes pontos, esta revisão irá apresentar e discutir técnicas que possam minimizar os efeitos da alta variabilidade de resposta à superovulação, a aplicação de técnicas não cirúrgicas para a MOTE, procedimentos para avaliação da doadora, receptora e criopreservação de embriões ovinos. Procuramos incluir os resultados do nosso grupo de pesquisa, especialmente com ovinos da raça Santa Inês, vinculados ao tema desta revisão.

Seleção de doadoras

Visando atenuar o problema da variabilidade de resposta em ovelhas, tem-se buscado metodologias que permitam selecionar os animais com maior potencial de resposta à SOV. Algumas das técnicas em estudo com esta finalidade são: a contagem de folículos antrais por ultrassonografia, pré-estimulação com eCG, repetibilidade de resposta à SOV e dosagem do hormônio anti-Mülleriano (AMH).

Contagem de folículos antrais (CFA)

Comumente tem-se uma maior produção de embriões em vacas com maior contagem de folículos antrais (CFA) (Pontes et al., 2009; Silva-Santos et al., 2014; Baruselli et al., 2015) e menor desempenho reprodutivo em fêmeas bovinas com menor CFA (Irland et al., 2007; Mossa et al., 2012). Assim, atualmente em bovinos cruzados (*indicus x taurus*), é possível selecionar fêmeas com maior potencial para produção de embriões (tanto *in vivo* como *in vitro*) por meio de uma única avaliação ultrassonográfica, onde se busca apenas os animais com maior população folicular (Silva-Santos et al., 2014).

Também em ovinos, tem-se avaliado as correlações entre CFA e potencial de resposta à superovulação, mas os resultados até agora obtidos apontam para algumas particularidades. Alguns grupos verificaram correlações significativas entre a CFA, no momento da superestimulação, com o número de embriões produzidos *in vivo* (Cognié et al., 2003; Gonzales-Bulnes et al., 2002). Porém, Bartlewski et al. (2008) trabalhando na contra estação reprodutiva, não encontraram correlação entre a CFA na primeira dose de FSH, com a resposta à superovulação. No entanto, 12 h após a primeira aplicação de FSH o número de folículos de tamanho mediano (≥ 4 mm) apresentou correlação com o número de corpos lúteos (CLs) e estruturas viáveis recuperadas. Outro estudo avaliando CFA e resposta à SOV encontrou correlação positiva significativa ($P < 0,005$) entre CFA (medindo de 2 a 3 mm) e taxa de ovulação, entretanto, somente a população de folículos de 3 mm mostrou correlação positiva ($P < 0,05$) com o número de embriões produzidos e sua viabilidade (Veiga-Lopez et al., 2005). Indicando também que talvez apenas um grupo específico de folículos possa ser relacionado à resposta à SOV em ovinos.

Além destas particularidades, o efeito benéfico da maior CFA no início da superovulação em ovinos não tem se mostrado constante. Bruno-Galarraga et al. (2015) não encontraram, na estação reprodutiva, correlação significativas entre CFA e taxa de ovulação. Ainda, em um estudo recente realizado pelo nosso grupo de pesquisa somente correlações medianas entre CFA e número de CLs ($r = 0,41$; $P < 0,05$) e entre CFA e número de embriões produzidos ($r = 0,41$; $P < 0,05$) foram encontradas (Saraiva et al., 2016).

Ainda com relação à CFA no início do tratamento superovulatório, diferentes grupos de pesquisa têm demonstrado o efeito negativo da presença de folículos grandes no início da SOV com a posterior produção de embriões viáveis (Rubianes et al., 1995; Gonzalez-Bulnes et al., 2002; Veiga-Lopez et al., 2005; Bruno-Galarraga et al., 2015). Na contra estação o efeito deletério da presença de folículos grandes não parece ter um impacto negativo, conforme demonstrado por Gonzalez-Bulnes et al. (2003).

Assim, apesar dos vários relatos de que a maior contagem de pequenos folículos antrais favorece e que a presença de folículos grandes (≥ 4 mm) prejudica a resposta à SOV em ovelhas, mais estudos precisam ser conduzidos para que estes fenômenos sejam esclarecidos e seu uso para seleção de doadoras devidamente orientado.

Pré seleção com eCG

Uma abordagem considerada barata e de fácil realização à campo é a pré-seleção de doadoras por meio de uma superovulação utilizando eCG. A idéia recentemente proposta por Bruno-Galarraga et al. (2015) sugere que os animais que apresentarem maior número de CLs após a indução com eCG (800UI) teriam maior potencial

de resposta à uma posterior superovulação. Estes autores encontraram uma correlação significativa ($P < 0,05$) entre o número de CLs após o eCG com o número de CLs produzidos após uma SOV padrão à base de FSH ($r=0,79$), elevada taxa de recorrência (84%) e maior produção de embriões pelas fêmeas classificadas como de alta resposta em relação às de baixa ($7,2 \pm 3,7$ e $4,0 \pm 3,9$, respectivamente) ($P < 0,05$). Um estudo publicado pelo nosso grupo, utilizando o mesmo conceito, mas para seleção de cabras, relatou que 70% dos animais mantiveram sua classificação (alta ou baixa resposta) após este procedimento de triagem. Indicando uma correlação moderada pelo coeficiente Kappa ($\kappa=0,40$; $P < 0,05$) e apenas uma tendência pelo coeficiente de Spearman ($r_s = 0,39$; $P < 0,08$) (Balara et al., 2016a). No entanto, em ovelhas da raça Santa Inês não encontramos valores significativos ao usar triagem pelo eCG (Kappa 0,03; $P > 0,05$ e Spearman 0,02; $P > 0,05$) (dados não publicados) mas treze das vinte e cinco ovelhas (52%; 13/25) apresentaram manutenção da resposta, alta ou baixa, após o tratamento com FSH.

Repetibilidade de resposta

Outro fator limitante em programas MOET é a possibilidade de animais diminuírem a produção de embriões quando submetidos a sucessivos tratamentos (Cognié et al., 1999; Bari et al., 2001; Bruno-Galarraga et al., 2014). No entanto, tem sido observado em bovinos e caprinos uma alta repetibilidade de resposta das doadoras. Ou seja, animais que respondem de forma satisfatória tendem a manter este padrão de resposta em protocolos consecutivos (Monniaux et al., 2010; Monniaux et al., 2011).

Apesar da aplicabilidade desta informação, pouco tem sido publicado sobre o tema em ovelhas. Investigando este tema, Bari et al. (2001) encontraram um nível mediano de repetibilidade para resposta à superovulação e número de embriões recuperados ($r = 0,55$; $r = 0,38$ respectivamente). Também, Bruno-Galarraga, et al. (2014), trabalhando com ovelhas, encontraram alta repetibilidade para taxa de ovulação, mas baixa repetibilidade para número de embriões recuperados ($r = 0,84$; $r = 0,13$, respectivamente). Em nosso laboratório, encontramos correlações médias e altas para taxa de ovulação em ovelhas Santa Inês submetidas a consecutivas superovulações ($r = 0,32$ entre 1ª e 2ª SOV e $r = 0,86$ entre 2ª e 3ª SOV) (dados não publicados). Apesar dos bons índices de repetibilidade para taxa de ovulação, o número de embriões viáveis recuperados por ovelha não tem se mantido constantes, ao contrário, os trabalhos têm apontado uma drástica redução nas superovulações consecutivas, como apresentado por Forcada et al. (2011) (7,8; 3,8 e 2,5 para 1ª, 2ª e 3ª superovulações, respectivamente). Observando estes dados, e levando em consideração que um desempenho ruim em uma etapa não exclui a possibilidade de sucesso em outra superovulação (Bari et al., 2001), a seleção de doadoras baseada exclusivamente na sua resposta a uma superovulação anterior não garante maiores taxas de sucesso.

Dosagem de AMH

Estudos recentes, voltados à reprodução animal têm avaliado a dinâmica de produção e ações do AMH a nível ovariano. Monniaux et al. (2011) e Rico et al. (2009) demonstraram que a produção de AMH acontece principalmente em folículos pré-antrais e antrais pequenos. Sendo que as maiores concentrações plasmáticas de AMH são encontradas em vacas com maior número de folículos entre 3 à 7 mm, em cabras com maior população de folículos entre 1 à 5 mm, e 1 à 3 mm em ovelhas (Monniaux et al., 2011; Rico et al., 2009). Um estudo recente também encontrou correlações positivas e significativas entre CFA e concentração plasmática de AMH em búfalos, bovinos taurinos e zebuínos ($r = 0,62$; $r = 0,66$; $r = 0,88$; respectivamente) (Baldrighi et al., 2014). Estes achados permitiram concluir que a dosagem sérica de AMH se configura como um marcador endócrino da população de pequenos folículos antrais nos ruminantes (Monniaux et al., 2011; Rico et al., 2009; Baldrighi et al., 2014).

Em bovinos, as concentrações séricas de AMH podem ser utilizadas para selecionar fêmeas com melhor desempenho em protocolos superovulatórios e maior produção de embriões (Rico et al., 2009; Monniaux et al., 2010; Guerreiro, et al., 2014). Tem-se demonstrado alta correlação entre as concentrações séricas de AMH e fertilidade também em humanos (Zec et al., 2011), equinos (Vernunft et al., 2013) e búfalos (Liang et al., 2016). Ainda, em cabras já se comprovou que o AMH pode ser utilizado para selecionar doadoras com maior potencial de produção (*in vivo*) de embriões de alta qualidade (Monniaux et al., 2011).

Já foi constatada em ovelhas jovens correlação diretamente proporcional entre CFA e concentração de AMH, além de maior capacidade de resposta a protocolos superovulatórios e maior produção de oócitos em ovelhas com maior concentração sérica de AMH (Lahoz et al., 2014). Recentemente observamos em nosso laboratório que ovelhas com AMH sérico elevado, aferido no mesmo momento do ciclo estral, tiveram maior número de estruturas recuperadas e também de embriões viáveis ($P < 0,05$) ($r = 0,69$; $r = 0,57$ respectivamente) (dados não publicados).



Sincronização da onda de crescimento folicular

Conforme comentado anteriormente a condição folicular ovariana no início do tratamento superovulatório afeta a taxa de ovulação e produção de embriões. Os resultados até agora encontrados apontam para um benefício da maior CFA e efeito deletério da presença de folículos grandes no início do tratamento superovulatório (Gonzalez-Bulnes et al., 2002; Cognié et al., 2003; Oliveira, 2011; Bruno-Galarraga, 2015; Balaro et al., 2016a). Apesar destes achados, os protocolos tradicionais de superovulação, e ainda hoje amplamente utilizados, incluem longos períodos (12 a 14 dias) de uso de progestágenos. O uso prolongado de progestágenos não sincroniza a atividade ovariana satisfatoriamente o que faz com que a superovulação inicie em um momento aleatório da onda de crescimento folicular (Oliveira et al., 2016). Isto explica parte da grande variabilidade de respostas à SOV (Bartlewski et al., 2008). Ainda, em ovinos, diferentes condições ovarianas no momento da inserção dos dispositivos de progesterona, interferem de maneiras distintas no padrão de recrutamento folicular (Gonzalez-Bulnes et al., 2002; Oliveira et al., 2016) e posteriormente na produção de embriões (Gonzalez-Bulnes et al., 2005). Um dos efeitos indesejáveis induzidos por protocolos longos, quando se visa a superovulação, a de folículos grandes que pode atingir até 68% dos animais (Veiga-Lopes et al., 2005).

Com o intuito de contornar a falta de sincronia inerente aos protocolos longos e também eliminar a presença de folículos grandes no início da superovulação, Menchaca et al. (2009 e 2010) propõem que previamente ao tratamento superovulatório seja realizado um protocolo curto de sincronização de estro. Este protocolo consiste na manutenção por 5 a 7 dias de um progestágeno associado a utilização de eCG e PGF2 α no momento da retirada e uma aplicação de GnRH 36 horas após a retirada do CIDR. Segundo os autores este protocolo induz ovulação sincrônica em torno de 90% dos animais em até 72 horas após a retirada do implante. Desta forma, seria possível minimizar a falta de previsibilidade das ondas foliculares, uma vez que logo após a ovulação tem-se a primeira onda de crescimento folicular (dia 0) e fisiologicamente o melhor momento para início da SOV. Utilizando esta estratégia, foi possível aumentar, em média, dois embriões por cabra ou ovelha superovulada (Menchaca et al., 2010).

Para avaliar a aplicabilidade do conceito do protocolo dia 0 às condições tropicais e à fisiologia da raça Santa Inês, testamos recentemente diferentes momentos para aplicação de lecirelina (agonista do GnRH) após a sincronização do estro utilizando um protocolo curto de conhecido padrão de sincronia em Santa Inês (esponja por seis dias, eCG e PGF2 α 1 dia antes da retirada). Similarmente ao proposto por Menchaca et al. (2010), observamos que a aplicação de lecirelina 36 horas após a retirada da esponja favorece a condição ovariana em dois aspectos: (1) induz uma eficiente taxa de ovulação após protocolo de sincronização e (2) promove ausência de folículos dominantes entre 36 e 80 horas após a ovulação. Baseados nestes dados, temos também sugerido o início da superovulação em doadoras da raça Santa Inês 80 horas após a remoção da esponja após um protocolo curto de sincronização seguido de GnRH 36h após a retirada do pressário (Balaro et al., 2016b).

Além de favorecer a condição ovariana para a superovulação, a aplicação de GnRH ao final de protocolos de sincronização induz ovulação em um número expressivo de animais (Teixeira et al., 2016), podendo atingir taxas de até 100% de ovulação (Silva et al., 2015). Apesar da possibilidade da aplicação de GnRH induzir a ovulação de folículos menores, foi observado que este fenômeno não interfere no volume do corpo lúteo e nem mesmo na produção de progesterona (Silva et al., 2015) e, quando utilizado no início do protocolo para sincronização da onda folicular não interfere no período para início da onda de crescimento folicular (Rosa et al., 2016).

Superovulação

Uma série de estratégias tem sido definidas visando alcançar maior homogeneidade e otimização das respostas superovulatórias e da produção *in vivo* de embriões ovinos. A dose total empregada, o número e frequência de administrações são as principais variações encontradas entre os protocolos hormonais disponíveis. As pesquisas têm demonstrado que estes fatores são determinantes para a eficiência das respostas em ovinos.

O FSH é atualmente a gonadotrofina de primeira escolha para a superovulação em ovinos, mesmo apresentando o inconveniente de requerer múltiplas aplicações a intervalos curtos. As concentrações deste hormônio decaem a valores basais após aproximadamente 10 horas de sua administração (Demoustier et al., 1988). As doses totais de FSH exógeno variam de 176 a 256 mg (Simonetti et al., 2008; Oliveira et al., 2012; Oliveira et al., 2014) e usualmente são fracionadas em múltiplas (6 a 8) e consecutivas aplicações.

Apesar de mundialmente utilizadas, estas doses totais são consideradas altas (Fonseca et al., 2007; Oliveira, 2011) e podem estar associadas a variabilidade das respostas superovulatórias e ocorrência de falhas anovulatórias e de regressão prematura de CL, resultando na diminuição do número de embriões viáveis produzidos. As pesquisas neste cenário ainda são poucas e recentes. Utilizando 80 mg ou 200 mg de FSH, Gibbons et al. (2010) não encontraram diferença para número de embriões recuperados ou transferíveis, entretanto, houve menor taxa de ovulação para as ovelhas que receberam a menor dose. Em recente pesquisa realizada por nosso grupo, também com ovelhas Santa Inês, o número de ovulações e de folículos anovulatórios também não variou entre as ovelhas que receberam 100, 133 ou 200 mg de FSH, entretanto, a menor dose



resultou em taxa de ovulação superior e menor percentual de falhas anovulatórias (Maciel et al., 2016a). Apesar disso, a dose de 100 mg foi relacionada a maior número de estruturas não fecundadas (Maciel et al., 2016b).

As doses empregadas, em geral, desconsideram o peso corporal das fêmeas. Lima et al. (2015) realizaram a superovulação de ovelhas utilizando a dose de 5 UI de FSH por cada quilo de peso vivo, e obtiveram número de embriões viáveis produzidos similar ao descrito na literatura para doses fixas por animal (média de 3 a 4 embriões/ovelha). Os animais mais pesados do grupo experimental receberam a dose total de 270 UI enquanto os mais leves receberam 207 UI de FSH.

O número de aplicações (6 ou 8) de FSH para o tratamento superestimulatório de ovelhas é usual há vários anos e tem resultado em eficiência similar (Oliveira, 2011). Mais recentemente foi apontado, em estudo sobre a vascularização folicular durante superestimulação de ovelhas, que o protocolo de estimulação ovariana de quatro dias (8 aplicações) seja menos provável de ser bem sucedido em comparação com tratamento de três dias (6 aplicações), pois foi observada correlação negativa entre o fluxo vascular dos folículos no quarto dia de tratamento gonadotrófico com o número e percentual de estruturas não fecundadas (Oliveira et al., 2014).

Além destes fatores citados como causadores da variabilidade nas respostas superovulatórias, a origem de extração da preparação hormonal (ovina ou suína), percentual de purificação do hormônio FSH (relação FSH:LH), lote de fabricação e a indução ou não das ovulações ao final do tratamento superovulatório, também afetam o desempenho da SOV e precisam ser considerados na MOTE de ovinos.

Coleta dos embriões

A dificuldade na penetração cervical em ovelhas levou ao estudo de diversas técnicas visando o relaxamento da mesma, tais como a administração de hormônios como FSH, ocitocina, estradiol e misoprostol um análogo sintético da prostaglandina E2 (Wulster-Radcliffe et al., 1999; Falchi et al., 2012; Masoudi et al., 2012; Candappa e Bartlewski, 2014).

Os resultados dos estudos avaliando relaxamento cervical promovido pela administração de hormônios em ovelhas ainda são controversos. Um aspecto notório é a influência da raça na facilidade ou dificuldade de penetração cervical, o que reflete um padrão anatômico racial (Kaabi et al., 2006; Falchi et al., 2012; Masoudi et al., 2012).

Os hormônios utilizados nos estudos citados, embora induzam adequado relaxamento cervical não promovem analgesia, o que os torna, quando utilizados sozinhos, impróprios para a realização de procedimentos tais como inseminação artificial (IA), coleta de embriões e TE via transcervical, onde a manipulação da vagina e tração da cérvix fazem-se necessárias. Tais procedimentos promovem um estímulo algíco considerável e os animais, especialmente as nulíparas, apresentam reações aversivas exacerbadas tais como vocalização, tentativa de fuga ou mesmo deitam-se para se livrar da manipulação. Alguns estudos com o uso de fármacos anestésicos e analgésicos por via epidural e subaracnóidea para a realização de procedimentos obstétricos em pequenos ruminantes já foram realizados (DeRossi et al., 2009; Santos et al., 2009). No nosso laboratório, verificamos que o uso de cetamina associada ou não com morfina e/ou xilazina por via epidural promoveu analgesia, mas não dilatação cervical em ovelhas (Leite et al., 2014). Entretanto, ao associar anestesia epidural (2,0 mg.kg⁻¹ cetamina) com o uso de ocitocina (100 UI – 15 minutos antes, IV) e estradiol (100 µg por animal, IV), obteve-se uma taxa de passagem de 90% (Brandão et al., 2015). A injeção subaracnóidea de cetamina sozinha ou em combinação com o misoprostol tópicamente sobre o óstio cervical obteve sucesso em 100% dos animais mestiços tratados (DeRossi et al., 2009).

Criopreservação de embriões

Basicamente os procedimentos de criopreservação de embriões são divididos em duas grandes estratégias: congelamento lento e vitrificação. A congelamento lento é mais amplamente aplicada em ovinos e caprinos em programas comerciais de MOTE (Menchaca et al., 2016).

Em geral, para lidar com os resultados decepcionantes da criopreservação, duas abordagens têm sido adotadas. Para embriões produzidos *in vitro*, foca-se na qualidade embrionária, modificando as condições de cultivo para tornar os embriões mais criopreserváveis. Enquanto que para os embriões desenvolvidos *in vivo* (DIV), a abordagem mais comum é variar os procedimentos de criopreservação alterando, por exemplo, a concentração e o tipo de crioprotetores, o tempo e a temperatura do protocolo e o uso de aditivos como antioxidantes na solução de criopreservação.

Em relação a esta última abordagem, realizamos dois experimentos no nosso laboratório com embriões ovinos DIV, visando melhorar a taxa de sobrevivência após a criopreservação (dados não publicados). No experimento 1 a solução de vitrificação (SV) foi suplementada com 3,72 mM de L-carnitina, enquanto que no experimento 2 a solução de reaquecimento (SR) foi suplementada com a mesma concentração de L-carnitina. Após o reaquecimento, os embriões foram cultivados *in vitro* por 72h. Independentemente da estratégia de suplementação SV (82% vs. 69%, para grupo L-carnitina vs. Controle, respectivamente) ou SR (65% vs. 49%, para grupo L-carnitina vs. Controle) não foi observado diferença na taxa de sobrevivência embrionária em relação



ao grupo controle.

Seleção de receptoras

Em pequenos ruminantes a avaliação do CL para seleção de receptoras é realizada por laparoscopia, permitindo avaliar o tamanho, o número e a coloração do CL. Contudo, por ser uma técnica invasiva que requer cuidados cirúrgicos, ela vem caindo em desuso e sendo substituída pela ultrassonografia (US). Recentemente obtivemos índices excelentes de correlação entre número de CLs obtidos por laparoscopia e CLs contabilizados por US ($r = 0,92$; $r^2 = 0,85$; $P < 0,01$) (Pinto et al., 2016).

Com auxílio da US, além de ser possível determinar o número e o tamanho do CL, também é possível avaliar outras características diretamente relacionadas com a funcionalidade do CL, como a ecotextura e a vascularização luteal. Estudos em pequenos ruminantes mostraram uma correlação positiva entre a área de tecido luteal e a concentração plasmática de progesterona, entretanto esta correlação não foi observada entre o número de CL e a concentração plasmática de progesterona (Arashiro et al., 2010a; Figueira et al., 2015). Similarmente, a ecotextura do CL está positivamente correlacionada com a concentração plasmática de progesterona (Gonzalez-Bulnes et al., 2000; Arashiro et al., 2010b). Esta correlação positiva também é observada entre a concentração plasmática de progesterona e a área de vascularização luteal (Figueira et al., 2015). A seleção das receptoras mais aptas a receberem os embriões, ou seja, com boa função luteal e livre de enfermidades aumenta as chances de gestação, permitindo alcançar taxas de gestação de até 80% (Santiago-Moreno et al., 2001).

Dentro deste contexto, diversas estratégias para elevar a concentração circulante de progesterona na receptora vêm sendo desenvolvidas e avaliadas. Dentre estas estratégias podemos citar: suplementação exógena de progesterona, formação de corpos lúteos acessórios e uso de agentes luteotróficos (Looney et al., 2006). Apesar de estar clara a importância da progesterona para o estabelecimento e manutenção da gestação, as relações entre tamanho e número de CL, concentração plasmática de progesterona e taxa de gestação nas receptoras ainda são controversas e precisam ser mais bem esclarecidas.

Inovulação não-cirúrgica em ovelhas

A redução do uso de drogas anestésicas/analgésicas associado à sua baixa invasividade e não secção de tecidos implica em uma condição de bem-estar relativamente superior para animais submetidos à técnica não cirúrgica de transferência de embriões. A eficiência da técnica ainda depende da colocação precisa do embrião no local desejado. No caso da transferência de embriões não-cirúrgica, isso dependerá obviamente do adequado instrumental utilizado para depositar o embrião no útero.

Embora atualmente possa ser desenvolvida com relativa facilidade em caprinos (Fonseca et al., 2014), há relatos restritos do uso da via cervical para transferência de embriões em ovelhas (Fonseca, 2006; Candappa e Bartlewski, 2014). Possivelmente, há um único relato de sucesso de inovulação transcervical com o animal em estação e que resultou no nascimento de um cordeiro. Neste caso, a ovelha foi inicialmente avaliada por US transretal para localização do CL, submetida à sedação leve e anestesia epidural entre as vértebras S5 e C1 além de anestesia cervical tópica. Os procedimentos de localização e pinçamento cervical foram os mesmos descritos para caprinos (Fonseca et al., 2014). Deste procedimento resultou o nascimento de um cordeiro da raça Texel (Fonseca, 2006).

Considerações finais

O conhecimento das novas técnicas e aplicabilidade das mesmas quanto à avaliação prévia das doadoras de embriões tornam-se ferramentas importantes para o sucesso em que um programa de produção *in vivo* de embriões. Por outro lado, o uso da ultrassonografia Doppler na avaliação de doadoras e receptoras é um importante passo para o desenvolvimento de protocolos menos invasivos visando a produção de embriões *in vivo*. Sendo assim, acreditamos que a utilização destes procedimentos pode incrementar os resultados de produção de embriões na espécie ovina e promover um melhor bem-estar para os animais.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos apoios recebidos pela Faperj, CNPq, Embrapa (Projeto 02.13.06.026.00.00). FZB é bolsista do CNPq.

Referências

- Aguirre EL, Mattos EC, Elerl JP, Barreto Neto AD, Ferraz JB. Estimation of genetic parameters and genetic changes for growth characteristics of Santa Ines sheep. *Genet Mol Biol*, v.15, p.1-12, 2016.
- Arashiro EK, Fonseca JF, Siqueira LGB, Fernandes CA, Brandao FZ, Oba E, Viana JH. Assessment of



- luteal function in goats by ultrasonographic image attribute analysis. *Small Ruminant Res*, v.94, p.176-179, 2010b.
- Arashiro EKN, Viana JHM, Fonseca JF, Camargo LSA, Fernandes CAC, Brandão FZ.** Luteal dynamics in goats: morphological and endocrine features. *Rev Bras Zootec*, v.39, p.1937-1942, 2010a.
- Balaro MFA, Fonseca JF, Oba E, Cardoso EC, Brandão FZ.** Is the Santa Inês sheep a typical non-seasonal breeder in the Brazilian Southeast? *Trop Anim Health Prod*, v. 46, p. 1533-1537, 2014.
- Balaro MFA, Brandão FZ, Maia ALRS, Souza-Fabjan JMG, Cueto MI, Gibbons AE, Fonseca JF.** Pre-selection test to identify high responder donors goats. *Reprod Domestic Anim*, v. 51, p.386-391, 2016a.
- Balaro MFA, Fonseca JF, Barbosa TGB, Souza-Fabjan JMG, Figueira LM, Teixeira TA, Cavalleira LR, Brandão FZ.** Potential role for GnRH in the synchronization of follicular emergence before the superovulatory Day 0 protocol. *Domestic Anim Endocrin*, v.54, p.10-14, 2016b.
- Baldrighi JM, Sá Filho MF, Batista EOS, Lopes RNVR, Visintin JA, Baruselli PS, Assumpção MEOA.** Anti-Mullerian Hormone Concentration and Antral Ovarian Follicle Population in Murrah Heifers Compared to Holstein and Gyr Kept Under the Same Management. *Reprod Dom Anim*, v.49, p.1015-1020, 2014.
- Bari F, Khalid M, Wolf B, Haresing W, Murray TMA, Merrell B.** The repeatability of superovulatory response and embryo recovery in sheep. *Theriogenology*, v.56, p.147-155, 2001.
- Bartlewski PM, Alexander BD, King WA.** Ovarian and endocrine determinants of superovulatory responses in anestrus ewes. *Small Ruminant Res*, v.75, p.210-216, 2008.
- Baruselli PS, Batista EOS, Vieira LM, Souza AH.** Relationship between follicle population, AMH concentration and fertility in cattle. *Anim. Reprod*, v.12, n.3, p.487-497, 2015.
- Brasil OO, Moreira NH, Ramos AF.** Situação atual da superovulação em ovinos. *Rev Bras Reprod Anim*, v.38, n.3, p.147-153, 2014.
- Brandão FZ, Leite, CR, Fonseca JFF, Fernandes DAM, Balaro MFA, Sarzedas AC, Olivares CCS.** Cervical dilatation in Santa Inês ewes induced with misoprostol, oxytocin and estradiol for development of non-surgical method for embryo recovery. In: XXXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões. A150, 2015, Gramado. *Anais...* Gramado: SBTE, 2015, resumo
- Bruno-Galarraga M, Cueto M, Gibbons A, Pereyra-Bonnet F, Subiabre M, González-Bulnes A.** Pre-selection of high and low ovulatory responders in sheep MOET programs, *Theriogenology*, v. 85, p.784-790, 2015.
- Bruno-Galarraga MM, Cueto M, Gibbons AE, Pereyra-Bonnet F, Catalano R, González-Bulnes A.** Repeatability of superovulatory response to successive FSH treatments in Merino sheep. *Small Ruminant Res*, v.124. p. 84-89, 2014.
- Candappa IBR, Bartlewski PM.** Induction of cervical dilation for transcervical embryo transfer in ewes. *Reprod Biol Endocrinol*, v.8, p. 1-9, 2014.
- Cognié Y, Baril G, Poulin N, Mermillod P.** Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*, v.59, p.171-188, 2003.
- Cognié Y.** State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*, v.51, p.105-116, 1999.
- Demoustier MM, Beckers J-Fr, Van Der Zwalmen P, Closset J, Gillard j-f, Ectors Fr.** Determination of porcine plasma follitropin levels during superovulation treatment in cows. *Theriogenology*, v.30, p.379-386, 1988.
- DeRossi R, Carneiro RPB, Ossuna MR, Zanenga NF, Alves OD, Jorge TP, Vasconcelos J.** Sub-arachnoid ketamine administration combined with or without misoprostol/oxytocin to facilitate cervical dilation in ewes: A case study. *Small Ruminant Res*, v.83, p.74-78, 2009.
- Falchi L, Taema M, La Clanche S, Scaramuzzi RJ.** The pattern of cervical penetration and the effect of topical treatment with prostaglandin and/or FSH and oxytocin on the depth of cervical penetration in the ewe during the peri-ovulatory period. *Theriogenology*, v.78, p.376-384, 2012.
- Figueira LM, Fonseca JF, Arashiro EKN, Souza-Fabjan JMG, Ribeiro ACS, Oba E, Viana JHM, Brandão FZ.** Colour Doppler ultrasonography as a tool to assess luteal function in Santa Inês ewes. *Reprod Domestic Anim*, v.50, p.643-650, 2015.
- Fonseca JF, Esteves LV, Zambrini FN, Brandão FZ, Peixoto MGCD, Verneque RS, Siqueira LGB, Viana JHM.** Viable offspring after successful non-surgical embryo transfer in goats. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.66, p.613-616, 2014.
- Fonseca JF, Souza JMG, Bruschi JH.** Sincronização de estro e superovulação em ovinos e caprinos. In: Simpósio de Caprinos e Ovinos da EV-UFMG, 2., 2007, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: UFMG, p.167-194, 2007.
- Fonseca JF.** Biotecnologias da reprodução em ovinos e caprinos. Sobral, CE: Embrapa Caprinos, 2006. (Documentos, n. 64).
- Forcada F, Amer-Meziane A, Abecia M, Maurel JA, Cebrián-Pérez MC, Muñio-Blanco JA, Asenjo T, Vázquez B, Casao MI.** Repeated superovulation using a simplified FSH/eCG treatment for *in vivo* embryo production in sheep. *Theriogenology*, v.75, p.769-776, 2011.
- Gibbons A, Pereyra-Bonnet F, Escobar L, Cueto M.** Eficiencia de um tratamento de ovulación múltiple con dosis reducida de FSHp en ovejas Merino. In: Resúmenes de las Segundas Jornadas Internacionales del Instituto de Investigaciones y Tecnología en Reproducción Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias. Buenos Aires.



2010.

Gonzalez-Bulnes A, Berlinguer F, Cocero MJ, Garcia-Garcia RM, Leoni G, Naitana S, Rosati I, Succu S, Veiga-Lopez A. Induction of the presence of corpus luteum during superovulatory treatments enhances *in vivo* and *in vitro* blastocysts output in sheep. *Theriogenology*, v.64, p.1392–1403, 2005.

González-Bulnes A, García-García RM, Santiago-Moreno J, Dominguez V, López-Sebastián A, Cocero MJ. Reproductive season affects inhibitory effects from large follicles on superovulatory response in ewes. *Theriogenology*, v.60, 281–288, 2003.

González-Bulnes A, García-García RM, Santiago-Moreno J, López-Sebastián A, Cocero M. Effects of follicular status on superovulatory response in ewes is influenced by presence of corpus luteum at first FSH dosage. *Theriogenology*, v.58, p.1607–1614, 2002.

González-Bulnes A, Santiago-Moreno J, Gómez-Brunet A, López-Sebastián A. Relationship between ultrasonographic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration during the oestrous cycle in monovular ewes. *Reprod Domestic Anim*, v.35, p.65–68, 2000.

Guerreiro BM, Batista EOS, Vieira LM, Sá Filho MF, Rodrigues CA, Castro Netto A, Silveira CRA, Bayeux BM, Dias EAR, Monteiro FM, Accorsi M, Lopes RNVR, Baruselli PS. Plasma anti-mullerian hormone: an endocrine marker for *in vitro* embryo production from *Bos taurus* and *Bos indicus* donors. *Domestic Anim Endocrinol*, v. 49, p. 96-104, 2014.

IBGE 2015. Disponível em: http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2015_v43_br.pdf.

Ireland JJ, Ward F, Jimenez-Krassel F, Ireland JHL, Smith GW, Lonergan NP, Evans ACO. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Hum Reprod*, v.22, p.1687-1695, 2007.

Kaabi M, Alvarez M, Anel E, Chamorro CA, Boixo JC, De Paz P, Anel L. Influence of breed and age on morphometry and depth of inseminating catheter penetration in the ewe cervix: A postmortem study. *Theriogenology*, v.66, p.1876-1883, 2006.

Lahoz B, Alabart JL, Cocero MJ, Monniaux D, Echegoyen E, Sánchez P, Folchi J. Anti-Müllerian hormone concentration in sheep and its dependence of age and independence of BMP15 genotype: An endocrine predictor to select the best donors for embryo biotechnologies. *Theriogenology*, v.81, p.347-357, 2014.

Leite CR, Fonseca JF, Fernandes DAM, Mayer L, Delgado KF, Sarzedas AC, Paneiras ABV, Ascoli FO, Brandão FZ. Evaluation of different protocols of epidural anesthesia for relaxing cervical in Santa Inês sheep. In: XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões. A130, 2014, Natal. Anais... Natal: SBTE, 2014, resumo.

Liang A, Salzano A, D'Esposito M, Comin A, Montillo M, Yang L, Campanile G, Gasparrini B. Anti-Müllerian hormone (AMH) concentration in follicular fluid and mRNA expression of AMH receptor type II and LH receptor in granulosa cells as predictive markers of good buffalo (*Bubalus bubalis*) donors. *Theriogenology*, v.86, p.963-970, 2016.

Lima JTM, Fonseca JF, Balara MFA, Esteves LV, Ascolia FO, Leite CR, Ribeiro ACS, Delgado KF, Souza-Fabja JMG, Torres Filho RA, Brandão FZ. Effect of natural mating or laparoscopic artificial insemination in superovulated Santa Inês ewes on superovulatory response, fertility and embryo viability. *Anim Prod Sci*, v. 56, p. 1463-1468, 2015.

Looney CR, Nelson JS, Schneider HJ, Forrest DW. Improving fertility in beef cows recipients. *Theriogenology*, v.65, p.201–209, 2006.

Maciel GS, Rodriguez MGK, Maronezi MC, Campos GR, Silva P, Trevizan JT, Uscategui RAR, Fonseca JF, Feliciano MAR, Vicente WRR, Oliveira MEF. Effect of the FSH dose on superovulatory response in Santa Inês ewes. *Reprod Domestic Anim*, v.51, p.114-114, 2016a.

Maciel GS, Rodriguez MGK, Nonato A, Lima MR, Uscategui RAR, Santos VJC, Vrisman DP, Fonseca JF, Feliciano MAR, Vicente WRR, Oliveira MEF. Effect of the exogenous porcine FSH dose on embryo yields in superovulated Santa Inês ewes. In: 18th International Congress on Animal Reproduction, P42, 2016, Tours. Abstract book... Tours: ICAR, 2016b, resumo.

Masoudi R, Kohram H, Shahne AZ, Davoud SDMA. Effect of estradiol and oxytocin on ovine cervical relaxation. *African J Biotech*, v.11, 2012.

Menchaca A, Barrera N, Dos Santos-Neto PC, Cuadro F, Crispo M. Advances and limitations of *in vitro* embryo production in sheep and goats. *Anim Reprod*, v. 13, p. 273-278, 2016.

Menchaca A, Vilariño M, Crispo M, De Castro T, Rubianes E. New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. *Reprod Fert Dev*, v.22, n.1, p.113–118, 2010.

Menchaca A, Vilariño M, Pinczak A, Kmaid S, Saldaña JM. Progesterone treatment, FSH plus eCG, GnRH administration, and Day 0 Protocol for MOET programs in sheep. *Theriogenology*, v.72, p.477–483, 2009.

Monniaux D, Baril G, Laine A, Jarrier P, Poulin N, Cognie J, Fabre S. Anti-Müllerian hormone as a predictive endocrine marker for embryo production in the goat. *Reproduction*, v.142, p.845–854, 2011.

Monniaux D, Rico C, Larroque H, Dalbiés-Tran R, Médigue C, Clément F, Fabre S. L'hormone antimüllérienne, prédicteur endocrinien de la réponse à une stimulation ovarienne chez les bovins. *Gynecol Obstet Fertil*, v.38, p.465-470, 2010.



- Mossa F, Walsh SW, Butler ST, Berry DP, Carter F, Lonergan P, Smith GW, Ireland JJ, Evans AC. Low numbers of ovarian follicles ≥ 3 mm in diameter are associated with low fertility in dairy cows. *J Dairy Sci*, v.95, p.2355-2361, 2012.
- Oliveira MEF, Ayres H, Oliveira LG, Oba E, Kridli RT, Bartlewski PM, Fonseca JF, Bicudo SD, Vicente WRR. Follicular wave emergence in Santa Inês ewes subjected to long-term, progesterone-based estrous synchronization protocols at different times of the year. *Anim Reprod Sci*, v.174, p. 80-86, 2016.
- Oliveira MEF, Cordeiro MF, Ferreira RM, Souza SF, Pieroni JSP, Rodrigues LFS, Fonseca JF, Vicente WRR. Does supplemental LH changes rate and time to ovulation and embryo yield in Santa Inês ewes treated for superovulation with FSH plus eCG? *Cienc Rural*, v.42, p.1077-1082, 2012.
- Oliveira MEF, Feliciano MAR, D'Amato CC, Oliveira LG, Bicudo SD, Fonseca JF, Vicente WRR, Visco E, Bartlewski PM. Correlations between ovarian follicular blood flow and superovulatory responses in ewes. *Anim Reprod Sci*, v.144, p.30–37, 2014.
- Oliveira MEF. State-of-the-art in the superovulation of ewes. *Acta Scient Vet*, v.39, Suppl. 1, p.29–35, 2011.
- Pinto PHN, Bragança GM, Leite CR, Souza-Fabjan JMG, Santos GB, Rosa RM, Alfradique VAP, Gonçalves LHS, Balaro MFA, Fonseca JF, Brandão FZ. Ultrassonografia em modo Doppler colorido como substituta à laparoscopia na contagem de CLs em ovelhas superovuladas. *O Embrião*, edição 58 anoXXX/2º semestre, p.30-36, 2016.
- Pontes JHF, Nonato-Junior I, Sanches BV, Ereno-Junior JC, Uvo S, Barreiros TRR, Oliveira JA, Hasler JF, Seneda MM. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology*, v.71, p.690-697, 2009.
- Rico C, Fabre S, Medigue C, Clemente N, Clemente F, Bontoux M, Touzé JL, Dupont M, Briant E, Rémy B, Beckers JF, Monniaux D. Anti-Müllerian hormone is an endocrine marker of ovarian gonadotropin-responsive follicles and can help to predict superovulatory responses in the cow. *Biol Reprod*, v.80, p.50-59, 2009.
- Rosa R, Balaro MF, Pinto PH, dos Santos G, Santos A, Cavalcante L, Souza-Fabjan JM, Fonseca J, Ungerfeld R, Brandão F. Wave Follicular Synchronization in Santa Inês Ewes. In: 18 international congress on animal reproduction. Pw1513, 2016, France. Anais... France: 2016: ICAR, 2016, resumo.
- Rubianes E, Ibarra D, Ungerfeld R, Carbajal B, Castro T. Superovulatory response in anestrous ewes is affected by the presence of a large follicle. *Theriogenology*, v.43, p.465-472, 1995.
- Santiago-Moreno J, González-Bulnes A, Gómez-Brunet A, Cocero MJ, Del Campo A, García-García RM, López-Sebastián, A. Procedure for successful interspecific embryo transfer between mouflon (*Ovis gmelinus*) and Spanish Merino sheep (*Ovis aries*). *J. ZooWildl. Med*, v.32, p.336–341, 2001.
- Santos ADF, Santos DC, Conceição JC, Carvalho ÁLC, Lisboa MLO. Taxa de gestação em fêmeas Santa Inês inseminadas pela via transcervical com sêmen fresco associada ou não à anestesia epidural. *Rev Bras Saúde Prod Anim*, v.10, p.224–230, 2009.
- Saraiva HFRA, Pinto PHN, Bragança GM, Santos GB, Rosa RM, Ribeiro LS, Batista RITP, Consentino IO, Souza-Fabjan JMG, Fonseca JF, Brandão FZ. População folicular na estimação da resposta superovulatória em ovelhas da raça Santa Inês. In: xxx reunião anual da sociedade brasileira de transferência de embriões. 1538, 2016, Foz do Iguaçu. Anais... Foz do Iguaçu: SBTE, 2016, p 272, resumo.
- Silva BDM, T.A.S.N. Silva TASN, Moreira NH, Teixeira HCA, Paiva Neto MA, Neves JP, Ramos AF. Ovulation induction in ewes using GnRH in long and short-term synchronization protocols. *Anim. Reprod.*, v.12, n.2, p.312-315, 2015.
- Silva-Santos KC, Santos GMG, Koetz Júnior C, Morotti F, Siloto LS, Marcatonio TN, Urbano MR, Oliveira RL, Lima DC, Seneda MM. Antral follicle populations and embryo production – *in vitro* and *in vivo* – of *Bos indicus*–*taurus* donors from weaning to yearling ages. *Reprod Domest Anim*, v. 49, p. 228–232, 2014.
- Simonetti L, Forcada F, Rivera OE, Carou N, Alberio RN, Abecia JA, Palacin I. Simplified superovulatory treatments in Corriedale ewes. *Anim Reprod Sci*, v.104, p.227–237, 2008.
- Teixeira TA, Fonseca JF, Souza-Fabjan JMG, Carvalheira, LR, Fernandes DAM, Brandão FZ. Efficiency of different hormonal treatments for estrus synchronization in tropical Santa Inês sheep. *Trop Anim Health Prod.*, v. 48, p.545-551, 2016.
- Veiga-Lopez A, Gonzalez-Bulnes A, Garcia-Garcia RM, Dominguez V, Cocero MJ. The effects of previous ovarian status on ovulation rate and early embryo development in response to superovulatory FSH treatments in sheep. *Theriogenology*, v.63, p.1973–1983, 2005.
- Vernunft A, Löhrke B, Tuchscherer A, Weitzel JM, Viergutz T. Concentrations of anti-Muellerian-hormone in follicular fluid from antral follicles and their relation to functional characteristics of follicle development in mares. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, v. 126(1-2), p.77-82, 2013.
- Wulster-Radcliffe MC, Costine BA, Lewis GS. Estradiol-17 beta-oxytocin-induced cervical dilation in sheep: application to transcervical embryo transfer. *J Anim Sci*, v.77, p.2587–2593, 1999.
- Zec I, Tislaric-Medenjak D, Megla ZB, Kuk I. Anti-Müllerian hormone: A unique biochemical marker of gonadal development and fertility in humans. *Biochem Medica*, v. 21(3), p.219-230, 2011.