

## **Inseminação Artificial e Transferência de Embriões em Ovinos e Caprinos**

Jeferson Ferreira da Fonseca

Médico Veterinário DS, Pesquisador da Embrapa Caprinos

Campo Experimental Coronel Pacheco, Rodovia MG 133, km 42, Coronel Pacheco – MG

*jeferson@cnpq.embrapa.br*

Aurino Alves Simplício

CNPq-FAPERN-EMPARN, Ex-Pesquisador da Embrapa

*aa.simplicio@uol.com.br*

### **1. INTRODUÇÃO**

A caprino-ovinocultura brasileira tem apresentado substancial crescimento de interesse no contexto do agronegócio brasileiro. Todavia, sua expansão sustentável e consolidação enquanto atividade pecuária rentável dependem de arranjos e estudos regionalizados que considerem os diferentes biomas, bem como, as raças mais indicadas para este ou aquele sistema de produção. Apesar das cifras cada vez maiores movimentadas pela aquisição de material genético, isto é, reprodutores, matrizes, sêmen e embriões, denominados de *elite*, há poucos indicativos zootécnicos que garantam que a referida genética reflita efetivamente em aumento de produtividade. Assim, enfatiza-se insistentemente o fator raça, ignorando quase que por completo o ambiente e o regime de manejo, o que pode, a médio e longo prazo, representar um grande risco para a atividade.

A produtividade de um rebanho depende fortemente do potencial genético dos animais explorados. Entretanto, por vezes, esquece-se que os animais precisam dispor de sistema de produção compatível com suas exigências para que possam expressar o potencial produtivo, independente da função explorada, carne ou leite. Neste contexto, certamente as instalações, as práticas de manejo alimentar, da nutrição e da promoção da saúde são de importância fundamental. Uma vez atendidos ou considerados estes aspectos, as biotecnologias da reprodução podem ser ferramentas importantes para potencializar a produtividade dos rebanhos.

Esta revisão abordará os aspectos básicos que podem fundamentar a adoção da inseminação artificial e transferência de embriões em caprinos e ovinos.

## **2. INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL**

A inseminação artificial representa a primeira linha de biotecnologias da reprodução. Seu uso ainda está restrito, quase que exclusivamente, aos caprinos leiteiros e os de corte, denominados de elite. Isto ocorre em parte, devido às dificuldades e peculiaridades da técnica, em particular na fêmea ovina. Por outro lado, independente da espécie, a pequena disponibilidade de sêmen, principalmente oriundo de animais geneticamente testados e aprovados agrava o quadro.

A inseminação artificial quando efetuada com base na observação de estro estará inevitavelmente associada ao uso de rufiões. Entretanto, a exemplo de bovinos, pode ser realizada em tempo fixo (IATF) desde que também associada à sincronização/indução de estro conforme descrito por Machado & Simplicio (2001) e Fonseca (2006a). No entanto, parte do conhecimento sobre os protocolos em uso no Brasil não foi desenvolvido no país, carecendo, portanto de validação, adequação ou mesmo de novos estudos compatíveis com as condições brasileiras. Isto inclui a interação da raça com o bioma onde é explorada, envolvendo todo o contexto da técnica, desde a preparação das fêmeas até a deposição do sêmen.

### **2.1. Técnicas de Inseminação Artificial**

A inseminação artificial pode ser realizada de variadas formas que incluem desde a deposição do sêmen na vagina, semelhante ao acasalamento natural, à deposição do sêmen no corno uterino. O espermatozóide (gameta masculino) fertiliza o ovócito (gameta feminino) na ampola da tuba uterina (oviduto; Fig. 1: 5). Conforme ilustrado na Figura 1, de acordo com o local de deposição do sêmen, a inseminação pode ser vaginal (1), cervical superficial (1), intra-cervical (2), intra-uterina efetuada no corpo do útero (3) ou intra-uterina efetuada no corno uterino (4). Quanto mais próxima for a deposição do sêmen do local de fertilização (5), maior será a taxa de gestação resultante.

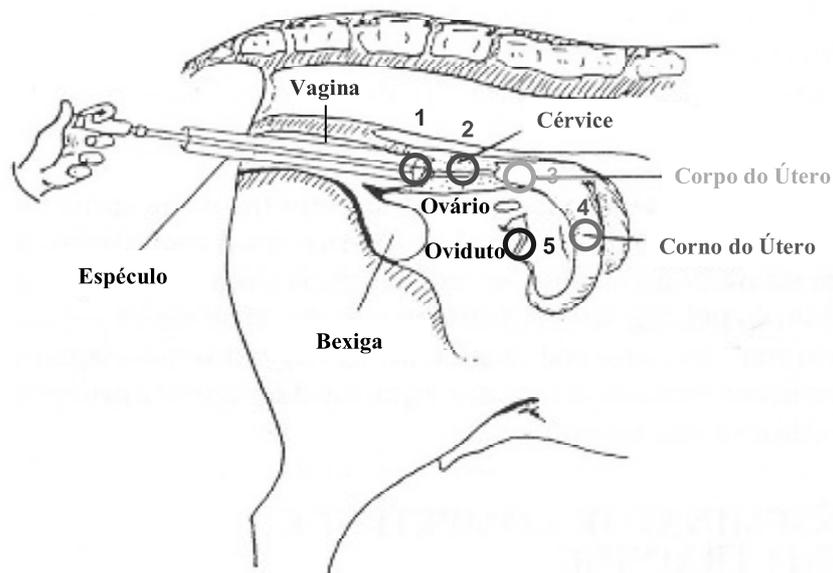


Figura 1. Local de deposição do sêmen na cabra e na ovelha. Explicação no texto.

Técnicas de inseminação artificial em pequenos:

1- Intra-Vaginal (Fig. 1: 1):

- Feita com auxílio de vaginoscópio;
- Sêmen fresco com baixas diluições com sêmen fresco ( $500 \times 10^6$  espermatozoides por dose);
- Não indicada para sêmen congelado;
- Não se observa o local de deposição do sêmen;
- Baixa exigência em contenção e tempo de manipulação;
- Baixos índices de prenhez.

2- Inseminação pericervical (Fig. 1: 1):

- Localização do orifício caudal da cervix (especulo / luz);
- Deposição de sêmen mais profunda possível (1 – 2 cm);
- Sêmen fresco ( $200$  a  $300 \times 10^6$  espermatozoides por dose)
- Não indicada para sêmen congelado;
- Fertilidade superior à vaginal.

3- Inseminação cervical profunda (Fig. 1: 2) ou intra-uterina pela via cervical (Fig. 1: 3):

- Localização do orifício caudal da cérvix (especulo / luz);
- Uso de instrumentos facilitadores (espéculos, aplicadores, pinças...);
- Deposição de sêmen mais profunda possível (2 – 4 cm);
- Requer técnicos mais bem treinados;
- Em cabras 60 % e em ovelhas 6 % de sucesso (deposição);
- Sêmen fresco (100-150 x 10<sup>6</sup> espermatozoides por dose) ou congelado (100 x 10<sup>6</sup> espermatozoides por dose);
- Requer cuidado maior para não perfurar a cérvix e o corpo do útero;
- Fertilidade diretamente proporcional à penetração.

4- Inseminação intra-uterina por laparoscopia (Fig. 1: 4)

- Uso de instrumental de custo elevado
- Feita exclusivamente por veterinários;
- Deposição de sêmen nos cornos uterinos;
- Uso de instrumentos facilitadores (espéculos, aplicadores, pinças...);
- Requer anestesia / sedação / tricotomia / antibióticoterapia);
- Sêmen fresco ou congelado (100 x 10<sup>6</sup> espermatozoides por dose);
- Risco de perfurações gastrintestinais, de bexiga (estimular reflexo de micção antes da inseminação) e de vasos sanguíneos;
- Fertilidade superior a todas as outras técnicas (González, 2008).

**2.1. Raça**

Existem variações entre as raças nos parâmetros reprodutivos após as fêmeas terem sido submetidas à indução do estro (Tab. 01). Adicionalmente, a expressividade no comportamento reprodutivo é influenciada pela região do país / bioma onde os animais são explorados.

Tabela 01. Parâmetros comportamentais e ovulatórios de cabras leiteiras submetidas à indução de estro

Parâmetro	SAANEN	PARDO ALPINA	TOGGENBURG
Animais em estro (%)	90,0	87,5	96,1
Retirada / Estro (h)	37,3 ± 12,6	30,4 ± 3,6	30,7 ± 10,6
Duração do Estro (h)	---	31,2 ± 3,1	33,3 ± 22,3
Retirada / Ovulação (h)	58,0 ± 9,8	58,8 ± 2,7	54,4 ± 10,1
Estro / Ovulação (h)	22,0 ± 11,3	28,8 ± 8,2	26,8 ± 8,7
Fonte	Souza et al., (2007) <sup>1</sup>	Menchaca et al., (2007) <sup>2</sup>	Zambrini (2006) <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cloprostenol no dia zero (DO), esponja com 60 mg de MAP por seis dias e 200 UI de eCG no dia cinco (D5).

<sup>2</sup>Cloprostenol no dia zero (DO), CIDR contendo 0,33 g de P4 por cinco dias e 250 UI de eCG no dia cinco (D5).

A caracterização da dinâmica ovulatória dos animais desafiados com o protocolo para indução de estro é um parâmetro imprescindível para a exequibilidade da técnica em programas iniciais de inseminação. Estes, muitas vezes, demandam o deslocamento de mão-de-obra especializada e inseminação de um número relativamente grande de animais por unidade de tempo. Adicionalmente, a caracterização da dinâmica da ovulação em animais em estro natural é um importante parâmetro para se definir o momento mais adequado à inseminação. Os dados inerentes ao estro natural ou induzido podem garantir o sucesso da técnica independentemente do sistema de produção em uso e do estágio fisiológico dos animais, isto é, estação reprodutiva ou de anestro (Fonseca et al., 2007b). De forma geral, o sucesso da inseminação artificial depende de alguns parâmetros. A seguir, são listados os principais:

## 2.2. Local de Deposição do Sêmen

Há obstáculos, particularmente na ovelha, que comprometem o sucesso da técnica. Um dos mais importantes é o local de deposição do sêmen, que influencia diretamente na fertilidade ao parto. Desta forma, características anatômicas das fêmeas devem ser consideradas (Tab. 2).

Tabela 2. Dados anatômicos da cérvix da cabra e da ovelha

Variável / Fêmea	CABRA	OVELHA
Largura (cm)	3,15	3,53
Número de anéis	4,00	5,00
Penetração do aplicador (cm)	2,40	1,90
Penetração do aplicador (%)	76,00	54,00
Penetração completa do aplicador (%) <sup>1</sup>	60,00	6,00

<sup>1</sup>Das cabras (76%) e ovelhas (54%) nas quais se consegue algum grau de penetração, em 60,00 e 6,00% (respectivamente), o aplicador alcança o útero. Adaptado de Santoyo & Trejo, 1991.

Preferencialmente, o sêmen deve ser depositado no corpo do útero, caracterizando a inseminação intra-uterina. Mas, em geral, em mais de 50,00% das tentativas, o sêmen é depositado fora do útero (Tab. 03).

Tabela 03. Porcentagem de partos em função da profundidade da inseminação artificial transcervical em cabras mestiças da raça Angorá

Profundidade	Sêmen fresco diluído	Sêmen Congelado / descongelado	Total
Até 1,0 cm	42,00 (37/88)	27,00 (17/63)	35,80 (54/151)
1,1 a 3,0 cm	58,30 (74/127)	45,90 (39/85)	53,30 (113/212)
Útero	69,10 (56/81)	68,60 (70/102)	68,90 (126/183)
Geral	56,40 (167/296)	50,40 (126/250)	53,70 (293/546)

( ) Número de fêmeas gestantes / fêmeas inseminadas. Adaptado de Evans & Maxwell, 1987.

Da avaliação dos dados, pode-se concluir que 66,50 % foram cervicais (363 / 546) e resultaram em 46,00 % (167 / 363) de gestação e que 33,50 % foram uterinas (183 / 546) e resultaram em 68,90 % (de gestação 126 / 183).

Também, Andrade (1996) e Frazão Sobrinho et al. (2005) reportaram, respectivamente, 17 e 13 inseminações artificiais cervicais superficiais, 20 e 17 cervicais profundas e 29 e 10 uterinas com 29,00% e 23,10%; 45,00% e 23,50% e 58,00 e 70,00% de gestação, respectivamente. Apenas 44,00 e 25,00% (29/66 e 10/40) das inseminações foram intra-uterinas, reiterando a dificuldade da técnica e chamando a atenção para a importância da qualificação técnica e experiência do profissional para depositar o sêmen no útero, situação que compromete fortemente os resultados.

As inseminações além dos 3 cm de profundidade provavelmente alcançam o corpo do útero. Isto significa que a parte do aplicador de sêmen que transpassa a cérvix, não necessita ser superior a 5 cm. O aplicador de sêmen caprino mede 30 cm e não dispõe de nenhum sistema de travamento que limite sua penetração além do corpo do útero. A inabilidade na inseminação associada à técnica tradicional onde o animal fica em apoio bi-pedal anterior, pode favorecer a perfuração do útero ou, mais comumente, a inseminação intra-cornual, que também não é desejada, uma vez que não se pode predizer o ovário, direito ou esquerdo, onde ocorrerá a ovulação. Mesmo se tratando de espécies que frequentemente apresentam taxa de ovulação superior a um (1,0) e ovulam em ambos os ovários, alguns animais podem ter apenas uma ovulação (Fonseca, 2002). Em ovinos, já existem aplicadores com tamanhos reduzidos (12 cm) e boa penetração da cérvix. Mas, a necessidade de pinçamento e tracionamento da cérvix ainda são obstáculos à obtenção de resultados satisfatórios quando do uso de sêmen congelado ou fresco e diluído com uma dose inseminante de 100x10 espermatozoides em palheta de 0,25 ml. Este tipo de manipulação da cérvix pode alterar o perfil de liberação de oxitocina e contratilidade uterina após a inseminação, o que pode comprometer a fertilidade dos animais (Houdeau et al., 2002).

### **2.3. Tempo de Execução e Número de Inseminações**

O tempo de execução e a posição na qual o animal é contido podem ser indicadores de sucesso e eficiência da técnica e do bem-estar animal durante o processo. Andrade (1996) descreve que 43,20% dos animais foram inseminados com menos de cinco minutos (apoio bi-pedal anterior), resultando em 58% de gestação e o restante (56,8%) entre cinco e 10 minutos, resultando em 48%. Em cabras com estro induzido e inseminadas em estação (apoio quadripedal, com pinçamento, mas sem tração cervical) e em tempo fixo às 54 horas após remoção da esponja, Fonseca et al. (2007a) reportaram que o útero foi alcançado em 100,00 % das pluríparas com uma duração de 21 segundos e em 68,75 % das nulíparas com uma duração de 44 segundos. A taxa de gestação resultante foi de 62,50%.

O número de inseminações também deve ser considerado. Tanto em cabras (Machado & Simplicio, 2001) quanto em ovelhas (Gordon, 1997) não há efeito adicional em termos de taxa de gestação quando uma segunda inseminação é realizada 12 horas após a primeira. Isto, inclusive, pode onerar a técnica, uma vez que maior quantidade de sêmen estaria sendo utilizada.

Assim, investigações que incluem maior facilidade de contenção e bem-estar animal e que propiciem maior eficiência na deposição de sêmen no útero podem ser importantes parâmetros a serem observados para a expansão e consolidação da técnica.

#### 2.4. Tipo de Sêmen e Horário da Inseminação

Basicamente, uma vez coletado, o sêmen pode ser utilizado a fresco; fresco diluído; fresco diluído resfriado e congelado. O sêmen fresco requer um período maior de tempo no sistema genital para se tornar apto a fecundar que o sêmen congelado, fenômeno conhecido como capacitação espermática. Todavia, o sêmen fresco tem uma menor viabilidade ou longevidade quando comparado ao congelado. O sêmen resfriado apresenta condição intermediária entre o dois. O estro em ovelhas dura de 24 a 36 horas e de 24 a 48 horas nas cabras e a ovulação ocorre no final estro (Gordon, 1997; Fonseca, 2002, Cavalcanti et al., 2006a). Este parâmetro deve ser considerado em função da forma de apresentação e local de deposição do sêmen e do horário da inseminação (Cavalcanti et al., 2006 a,b). Para uma maior fertilidade, a inseminação deve ser feita de forma a permitir que os espermatozoides estejam aptos a fecundar quando o ovócito for liberado (ovulação) e estiver apto a ser fecundado (Pinna et al., 2008). A viabilidade da inseminação artificial em ovinos e caprinos pode ser observada nas tabelas 04 e 05.

Tabela 04. Eficiência (%) da inseminação artificial em ovelhas no México

Variável	ESTRO		
	NATURAL	SINCRONIZADO	INDUZIDO
SÊMEN			
Fresco	70 – 90	50 – 70	30 – 50
Resfriado	50 – 70	40 – 50	30 – 40
Congelado, transcervical	30 – 50	30 – 40	25 – 30
Congelado, por laparoscopia	90 – 95	80 – 90	70 – 80

Adaptado de Trejo & Valencia, 1988.

Tabela 05. Eficiência (%) da inseminação artificial em cabras no México

SÊMEN	ESTRO		
	NATURAL	SINCRONIZADO	INDUZIDO
Fresco	70 – 90	60 – 70	50 – 60
Resfriado	70 – 80	50 – 60	40 – 50
Congelado cervical	70	60	50

Adaptado de Trejo & Valencia, 1988.

Em ambas as espécies, o tipo de sêmen a ser usado também deve ser considerado em função do momento da inseminação referente ao início do estro. Ovelhas e cabras, em estro, apresentam comportamento semelhante quanto à drenagem de muco através da vagina. Em geral, quanto ao aspecto, o muco é classificado de um (1) a cinco (5), ocorrendo mudanças do início (cristalino) para o final (caseoso) do estro: 1 = cristalino; 2 = cristalino / estriado; 3 = estriado; 4 = estriado / caseoso e 5 = caseoso. Este conhecimento é de grande praticidade e de fácil assimilação. Na Figura 02 e Tabela 06 são apresentados alguns resultados referentes a estes parâmetros.

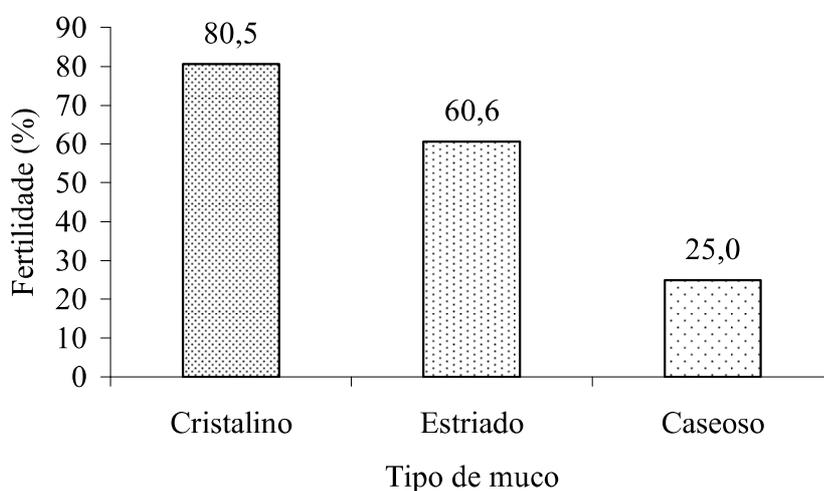


Figura 02. Relação entre o aspecto do muco e a fertilidade em ovelhas inseminadas com sêmen fresco diluído. Adaptado de Aisen et al. (1994).

Tabela 06. Efeito da técnica e do horário de inseminação, com sêmen fresco diluído, sobre a porcentagem de partos em cabras

Horas após o início do estro	Técnica de inseminação	
	Cervical e Uterina	Intra-vaginal
≤ 12 horas	74,8% (298)	66,9% (444)
12 a 24 horas	66,2% (320)	60,7% (326)
> 24 horas	51,0% (100)	44,6% (148)

( ) Número de fêmeas inseminadas. Adaptado de Dauzier (1966).

Conhecendo-se que a ovulação ocorre no final do estro e que o aspecto do muco informa que estágio do estro a fêmea se encontra, recomenda-se o uso de sêmen fresco para muco 1 e 2, até 12 horas do início do estro e sêmen congelado para muco 3 e 4 entre 18 e 24 horas após o início do estro. Para sêmen resfriado considerar o muco 3 a partir de 12 horas do início do estro (Siqueira et al., 2007).

Na Figura 03 pode-se observar a relação entre o tipo de muco e o horário ideal de inseminação relativo ao tipo de sêmen utilizado.

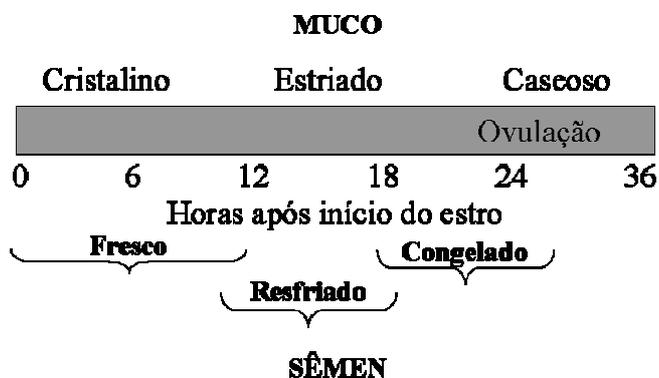


Figura 03. Variação do tipo de muco do início ao final do estro em cabras e ovelhas e sua relação com a ovulação e o horário ideal para inseminação com sêmen fresco, resfriado ou congelado.

### **3. TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES**

A transferência de embriões representa a segunda geração de biotecnologias da reprodução. Contextualmente abrange desde a escolha das matrizes, sincronização do estro, acasalamento ou inseminação artificial, superovulação, colheita, avaliação e inovulação dos embriões nas receptoras. A primeira transferência de embriões caprinos com sucesso foi reportada no início dos anos 1930 (Warwick et al., 1934). Entretanto, estudos sobre a biotecnologia de embriões caprinos foram intensificados apenas a partir de 1970 (Gordon, 1997). Na atualidade, a transferência de embriões caprinos e ovinos é uma realidade mundial e o comércio de embriões aumenta anualmente (Fonseca et al., 2007b). No Brasil, os primeiros caprinos da raça Toggenburg produzidos por transferência de embriões foram reportados por Jaume & Bruschi (1985). Nos últimos dez anos, o número de embriões transferidos aumentou de forma significativa, principalmente em função da importação de animais e embriões de caprinos de corte. Estas ações contribuíram fortemente para a popularização da transferência de embriões, tornando-a acessível, particularmente aos produtores que se auto identificam como “produtores de genética”. A simplificação da tecnologia, bem como, o aumento no número de técnicos qualificados pode potencializar ainda mais esta expansão (Fonseca et. al., 2007b).

#### **3.1. Doadora**

A fêmea a ser incorporada a um programa de superovulação e colheita de embriões deve ser avaliada e escolhida a partir de critérios zootécnicos e foco no mercado. Em geral, as características genéticas e produtivas que levam uma ovelha ou cabra a participar deste processo não são estabelecidas pelo técnico responsável pela transferência dos embriões. Apesar disto, o técnico responsável pelas transferências deve tomar alguns cuidados sob pena de interferência negativa sobre os resultados esperados (Fonseca, 2006a):

- Sanidade: a doadora deve estar com o calendário sanitário atualizado em função da raça, estágio fisiológico, região do país em que se encontra ou de onde teve origem. Controle de ecto e endoparasitos e tratamento de infecções e vacinações devem ser feitos com, pelo menos, 15 dias de antecedência da data prevista para o início do protocolo de sincronização do estro e superovulação;
- Nutrição: Os animais devem receber alimentos volumosos, concentrados, minerais e água de boa qualidade e compatíveis com seus requerimentos e ao longo do uso de todo o protocolo, isto é, da sincronização das fêmeas à transferência dos embriões. Quaisquer

alterações no manejo alimentar e da nutrição devem ser feitas com, pelo menos, duas semanas de antecedência;

- Estádio fisiológico e escore da condição corporal (ECC): no momento do início da sincronização do estro as doadoras devem estar recuperadas do parto, preferencialmente com, no mínimo, 100 dias pós-parto, encontrar-se em balanço energético positivo e apresentar ECC superior a 2,5 numa escala de 1 a 5. Animais obesos ou excessivamente magros não devem ser incorporados ao processo.
- Instalações: adequadas para prover o máximo de bem-estar animal, facilitar as intervenções suscitadas ao longo da execução das atividades e conforto aos operadores.
- Exame ginecológico: fazer a vaginoscopia e a ultra-sonografia objetivando identificar animais gestantes, portadores de infecções genitais, dentre outros problemas reprodutivos. Quando disponível, analisar o histórico de fertilidade da doadora e do reprodutor e o sêmen congelado.

### **3.2. Superovulação**

Durante um ciclo estral fisiológico “normal” na cabra e na ovelha, um a quatro folículos podem alcançar diâmetro ovulatório (Ginther & Kot, 1994; Deshpande et al., 1999; Evans, 2003). Estes folículos, ditos dominantes, estabelecem a dominância, dentre outros aspectos, privando os demais folículos, denominados subordinados, do hormônio folículo estimulante (FSH) (Ginther et al., 1996). Desta forma, o princípio básico da superovulação é o fornecimento de grandes quantidades de FSH, visando obterem-se ovulações múltiplas. Os hormônios usados são FSH, eCG e hMG (gonadotrofina menopausal humana). Os protocolos com a administração de seis a oito aplicações de FSH são mais comuns. A dose total de FSH usada é relativamente elevada. A ampla variabilidade das respostas superovulatórias aos tratamentos gonadotróficos é, sem dúvida, o principal fator limitante da transferência de embriões em ovinos (Cognié et al., 1999; Driancourt, 2001). Diferentes fatores como perfil folicular ovariano no início das aplicações de FSH e preparações hormonais, têm sido associados a esta elevada variabilidade. Isto evidencia a necessidade do desenvolvimento de protocolos mais simples, eficientes, menos estressantes, menos onerosos, que garantam taxas de recuperação elevadas e constantes e embriões de qualidade.

O desafio gonadotrófico para se obter a superovulação pode ser feito com base na observação de estro natural durante a estação reprodutiva. Todavia, a sincronização de estro facilita e otimiza os eventos envolvidos na superovulação e colheita de embriões. Na maioria

das vezes, usa-se progesterona ou progestágeno impregnado em dispositivos vaginais ou auriculares por um período de exposição igual ou superior a 10 dias. No entanto, a diminuição deste período pode facilitar e encurtar o processo e resultados positivos têm sido descritos. A administração de prostaglandina ou do seu análogo sintético (cloprostenol), por via intramuscular, durante o desafio gonadotrófico é também necessária. Todavia, variações no momento da aplicação relativo ao tempo da inserção do dispositivo devem ser consideradas.

A regressão lútea precoce (RLP) é um fenômeno comum nos pequenos ruminantes domésticos, particularmente nas cabras (Gordon, 1997). Todavia, este fato é negligenciado ou ignorado, já que nos protocolos para superovulação não se usam agentes anti-luteolíticos (antiinflamatório), luteotróficos (hCG, GnRH, LH) ou progesterona exógena (Saharrea et al., 1998; Soares et al., 1998; Salles et al., 2002). A RLP é exacerbada em cabras e ovelhas superovuladas e parece estar associada a elevadas concentrações plasmáticas de estrógenos durante a fase lútea inicial. Como consequência, nota-se um decréscimo na resposta superovulatória. A RLP é evidente cerca de quatro dias após o estro, mas as concentrações plasmáticas de progesterona incompatíveis com a atividade lútea fisiológica “normal” já são observadas aos três dias após o estro em cabra (Saharrea et al., 1998). Em ovelhas superovuladas, a RLP pode variar de 6,00% a 75,00 % (Fukui et al., 1998; Lopes Junior et al., 2006). As principais consequências da RLP são a diminuição na taxa de recuperação e a má qualidade dos embriões recuperados.

Dentre os fatores que podem afetar a resposta superovulatória destacam-se a raça, idade, a condição reprodutiva fisiológica, condição corporal, estresse e protocolo (Gordon, 1997). Todavia, um dos principais fatores é a presença de folículos maiores que 5 a 6 mm de diâmetro no início da aplicação do FSH ou outros hormônios com atividade folículo-estimulante. A presença destes folículos tem sido associada a respostas inferiores (Rubianes et al., 1995; Gonzalez-Bulnes et al., 1999; 2002; 2003). Desta forma, o “ideal” seria iniciar as aplicações de FSH paralelamente a emergência folicular. Como um ciclo estral pode apresentar várias ondas e a (s) onda (s) intermediária (s) entre a primeira e última onda folicular aparece a intervalos irregulares, apenas a primeira onda poderia ser usada para este propósito. Neste sentido, com o auxílio do acompanhamento ultra-sonográfico têm sido testados os protocolos do “dia 0”. Assim, a primeira aplicação de FSH é feita paralelamente à ovulação e emergência da primeira onda folicular (Rubianes & Menchaca, 2006; Fonseca et al., 2006c). Os protocolos tradicionais têm por base a duração do ciclo estral, ao passo que os protocolos do “Dia 0” pautam-se nos recentes conhecimentos de dinâmica folicular associada

à manipulação do ciclo estral. Protocolos do “dia 0” tendem a simplificar o processo superovulatório, já que o período total entre o início da preparação e a colheita dos embriões é mais curto. Outrossim, o reduzido período de permanência dos dispositivos minimizam os riscos de perda, além de reduzir vaginites decorrentes do uso de dispositivos intravaginais. Outra forma de se simplificar a superovulação é reduzir o número de aplicações de FSH. Isto pode ser obtido associando ao diluente hormonal moléculas que permitem a liberação lenta de FSH. A associação de FSH com polivinilpirrolidina (PVP), em aplicação única, propiciou taxa de recuperação embrionária idêntica ao protocolo de múltipla administração (D’Alessandro et al., 2001). Outras tentativas de melhoria da eficiência da superovulação incluem a adição de outros hormônios aos protocolos tradicionais. Tentativas de associação de GnRH seja como indutor de ovulação (Okada et al., 2001) seja como pré-tratamento (Bem Said et al., 2004) não resultaram em incremento significativo ou por vezes foram deletérias ao processo. Por outro lado, ovelhas tratadas com hormônio do crescimento apresentaram menor proporção de oócitos e embriões degenerados, maior número de embriões transferíveis (3,9 vs 1,7) e de crias nascidas por doadora (2,28 vs 0,84) quando comparadas com ovelhas controle (Folch et al., 2001).

### **3.3. Acasalamento**

A tentativa de fecundação dos oócitos pode ser feita por da monta natural (comum em caprinos e pouco utilizada em ovinos) ou pela inseminação artificial. No caso da monta natural ou inseminação com sêmen a fresco, o macho deve ser previamente submetido ao exame clínico-exame andrológico. Em ovelhas submetidas ao desafio gonadotrófico para superovulação a inseminação artificial é mais recomendável. As inseminações devem ser feitas por via laparoscópica em ovelhas e transcervical em cabras. O número de inseminações é variável e o intervalo entre elas deve ser de 6 a 12 horas, dependendo do protocolo utilizado (Fonseca et al., 2007b). Quando do uso de uma única inseminação esta deve ser feita 36 horas após a retirada do dispositivo (Gusmão, 2006).

### **3.4. Colheita e Avaliação de Embriões**

A colheita de embriões em ovelhas é predominantemente executada por laparotomia ou por laparoscopia com os animais sendo submetidos à anestesia geral (Gordon, 1997). Apesar de serem técnicas seguras e precisas, apresentam todos os riscos e seqüelas inerentes aos processos cirúrgicos que envolvem exploração de órgãos abdominais, principalmente aderências (Andrioli et al., 1999). Ovelhas superovuladas e coletadas repetidamente não

apresentam queda significativa na resposta. Todavia, o procedimento cirúrgico não é rotineiramente repetido mais de três vezes (Bari et al., 2001; Cordeiro et al., 2003). Este parece ser o limite das colheitas por laparotomia.

No início da década passada, o procedimento de colheita não-cirúrgica transcervical foi desenvolvido em cabras, sendo atualmente o mais usado no Brasil (Fonseca, 2006b). A colheita não cirúrgica transcervical em ovelhas também foi reportada com sucesso (Barry et al., 1990; Almeida et al., 2002; Silva et al., 2005). O procedimento pode ser executado com o animal em estação. Anestesia epidural e local (cérvice), bem como leve sedação, minimizam o desconforto animal, facilitando o processo (Fonseca, 2006b). A colheita deve ser efetuada seis a oito dias após o início do estro. Em média, cinco embriões viáveis são recuperados por colheita. A avaliação embrionária segue os princípios utilizados para bovinos (IETS, 1998; Strinfellow e Seidel, 1999). Jejum hídrico/alimentar por, no mínimo, 24 horas antes da colheita, é recomendável.

### **3.5. Criopreservação de Embriões**

A criopreservação e estocagem de embriões a temperatura de  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$  é desejável, tanto por razões biológicas quanto comerciais. Sua aplicabilidade é ressaltada pelo significativo número de transferências de embriões nos pequenos ruminantes registrado anualmente (Fonseca et al., 2007b). A TE minimiza a transmissão de doenças, custos de transporte e perdas genéticas, normalmente associados à manutenção de animais vivos. Os protocolos de criopreservação podem ser classificados basicamente em lentos ou rápidos, de acordo com a taxa de resfriamento e com o tipo e concentração dos crioprotetores utilizados (Shaw et al., 2000; Fonseca et al., 2002). As taxas de gestação em cabras e ovelhas involuadas variam de 30 a 70 % em função da qualidade embrionária (Gordon, 1997; Fonseca et al., 2005 a). Várias técnicas utilizam diferentes agentes crioprotetores ou mesmo associação destes (Fonseca et al., 2002). A técnica mais usada para a criopreservação de embriões ovinos é a congelação em glicerol com desidratação (pré-congelação) e re-hidratação (pós-descongelação) em vários passos (*steps*) (Gordon, 1997). Os embriões, após desidratação e envase, são colocados em máquinas à temperatura entre  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ , submetidos após tempo de equilíbrio (5 min) e indução de cristalização (*seeding*) a taxas de resfriamento entre 0,3-0,6 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$  até  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , a  $-32\text{ }^{\circ}\text{C}$ , quando as palhetas contendo os embriões são imersas em nitrogênio líquido. Tentativas de substituição do glicerol pelo etileno glicol tem sido reportadas com sucesso. Outra alternativa é a queda de temperatura lenta a partir da temperatura ambiente ( $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) até  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}/-7\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Blastocistos ovinos grau I-II congelados em

etileno glicol (1,5M / -1 °C/min 0 °C até -6,5 °C) apresentaram elevada taxa de sobrevivência pós-descongelamento (McGinnis et al., 1989). Utilizando-se mórulas e blastocistos caprinos grau I-II congelados em etileno glicol (1,5M / 3 °C/min até -6 °C) foram obtidos 67% de taxa de gestação quando transferidos diretamente (re-hidratação na própria palheta) para receptoras (Fonseca et al., 2005a). Esta metodologia tem alcançados resultados semelhantes em ovinos (Fonseca, 2007<sup>1</sup>).

Vitrificação é um processo de criopreservação onde se obtém solidificação sem formação ou separação de cristais de gelo e sem concentração de solutos (evita choque osmótico), fatos que podem ocorrer em maior ou menor proporção nos métodos tradicionais de congelamento. Há uma grande viscosidade do meio de vitrificação (congelamento) e altas taxas de resfriamento são conseguidas (2.500 °C/min). Em ovinos, Baril et al. (2001) obtiveram 53 % de crias nascidas oriundas de transferência direta de embriões vitrificados. Estes resultados podem ser ainda mais significativos, considerando que a vitrificação não envolve processos mais laboriosos e nem o uso de equipamentos sofisticados.

### **3.6. Receptora**

O sucesso da transferência de embriões recai igualmente sobre a doadora e a receptora. O padrão de seleção das receptoras ovinas e caprinas deve seguir as mesmas premissas citadas para as doadoras de embriões:

- Receptora deve apresentar condição clínica saudável. Recomendam-se receptoras com vacinas atualizadas para as diferentes enfermidades. Nenhuma intervenção sanitária, a não ser emergencial, deve ser feita entre duas semanas antes do início da sincronização do estro e antes dos 90 dias após a inovulação;
- Deve-se atentar para um plano nutricional adequado e contínuo, incluindo suplementação mineral e fornecimento de água de boa qualidade;
- Não usar receptoras com peso inferior a 70% do peso de ovelha adulta da raça e o ECC deve estar, preferencialmente, entre 3 e 4;
- O protocolo de sincronização de estro deve embasar-se no tempo de permanência do implante (progestágeno ou progesterona) nas doadoras ou ainda no dia do estro estimado das doadoras. Sugere-se que a inserção e remoção do dispositivo sejam efetuadas entre 10:00 horas e 12:00 horas. Estros naturais também podem ser usados, desde que atendam à sincronia com a doadora. Em geral, sete a 10 receptoras são sincronizadas para cada doadora;

---

<sup>1</sup> Dados não publicados.

### 3.7. Inovulação Embrionária

A inovulação dos embriões na ovelha e na cabra pode ser feita por laparotomia, laparoscopia, semi-laparoscopia e transcervical, sendo a última pouco relatada. Normalmente, observam-se taxas de gestação que variam de 40 a 80 %. Os mesmos fatores que interferem na taxa de gestação em bovinos também atuam em ovinos e caprinos. Todavia, técnicas que possibilitam a observação e avaliação do corpo lúteo têm expectativas de taxas de gestação superiores, uma vez que receptoras com regressão lútea ou corpos lúteos de baixa qualidade morfológica possam ser eliminadas. A transferência de apenas um embrião por receptora é preferível, mas os embriões podem também ser transferidos aos pares, sempre do mesmo lado (ipsilaterais) do (s) corpo (s) lúteo (s). Devem-se preferir animais com sincronia total com a doadora (estro no mesmo dia) e em seguida animais com um dia de assincronia. A inovulação transcervical, executada de forma semelhante à colheita de embriões transcervical, pode ser uma tendência futura, a exemplo do que ocorreu em bovinos. Neste caso, o corpo lúteo deve ser localizado por ultra-sonografia para determinação de qual corno receberá o embrião. O uso de drogas dilatadoras da cérvix (oxitocina e estrógeno) e que não afetam a função lútea favorecem a inovulação transcervical (Khalifa et al., 1992; Wulster-Radcliffe et al 1999). A inovulação é semelhante à colheita transcervical. Todavia, o diâmetro do inovulador, a idade, o tamanho e a ordem de parto poderão conferir maior ou menor facilidade à técnica, o que permanece como objeto de estudo. Na Figura 4, pode-se observar a caracterização ultra-sonográfica do corpo lúteo e passagem do aplicador através da cérvix que resultou em prenhez e nascimento de uma cria, na raça Texel (Fonseca, 2006a).

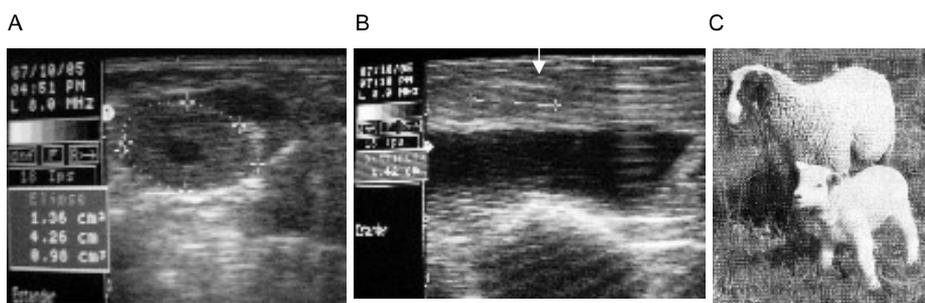


Figura 4. Caracterização ultra-sonográfica de corpo lúteo cavitário em receptora ovina, Sem Padrão Racial Definido, no sexto dia do ciclo estral (A), identificação (seta branca) do cateter transpassando o canal cervical (B) e produto da técnica de inovulação transcervical (C).

#### 4. CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS

A inseminação artificial e a transferência de embriões são amplas e promissoras ferramentas de manipulação e incremento genético nos rebanhos caprinos e ovinos. Podem ser implantadas de forma isolada, seqüencial ou simultaneamente. Todavia, antes de sua implantação, há a necessidade de uma avaliação detalhada do sistema de produção onde serão utilizadas. O conhecimento da reprodução destes animais, bem como, o emprego de profissionais devidamente treinados e habilitados são pontos iniciais. Mas, para que alcancem seu objetivo máximo, o aumento da produtividade, é necessário dar aos produtos as condições ótimas para que possam expressar seu potencial genético em potencial produtivo. A utilização de animais testados é, portanto, imprescindível. A inobservância destes parâmetros pode comprometer os resultados finais de ambas as biotecnologias, comprometendo, inclusive, sua expansão e consolidação.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aisen EG. 2004. Reproducion ovina y caprina. Buenos Aires : Inter-Médica.
- Almeida VM, Câmara DR, Salles HO, Oliveira DPF, Medeiros JN, Alves OMM. 2002. Colheita de embriões via transcervical em ovinos. *Rev Bras Reprod Anim*, 5:82-84.
- Andrade JS. Sêmen caprino congelado: Efeito de dois diluentes sobre a taxa de fertilidade. 1996. Dissertação Mestrado – Escola de Veterinária Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 1996. 53p.
- Andrioli A, Simplicio AA, Soares AT, Visintin JA. 1999. Eficiência da recuperação de embriões e os efeitos de consecutivas colheitas sobre o aparelho reprodutor de doadoras da espécie caprina. *Braz J Vet Res Anim Sci*, 36:136-143.
- Bari F, Khalid M, Wolf B, Haresign W, Murray TMA, Merrell B. 2001. The repeatability of superovulatory response and embryo recovery in sheep. *Theriogenology*, 56:147-155.
- Baril G, Traldi A-L, Cogni Y, Leboeu B, Beckers JF, Mermillod P. 2001. Successful direct transfer of vitrified sheep embryos. *Theriogenology*, 56:299-305.
- Barry DM, Van Niekerk CH, Rust J, Van Der Walt T. 1990. Cervical embryo collection in sheep after ripening of the cervix with prostaglandin E2 and estradiol. *Theriogenology*, 33:190.
- Cavalcanti AS, Fonseca JF, Nogueira LAG, Brandão FZ, Silva ALS, Pinho TG, Pinna AE, Carvalho BC. 2006a. Efeito do GnRH na taxa de gestação em protocolos de sincronização de estro em ovelhas. *Acta Vet Sci*, 34:384.
- Cavalcanti AS, Fonseca JF, Nogueira LAG, Brandão FZ, Silva ALS, Pinho TG, Boité MC, Carvalho BC. 2006b. Taxa de ovulação em protocolos de sincronização com progestágenos associados ao GnRH em ovelhas. *Acta Vet Sci*, 34:385.
- Cogni Y. 1999. State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*, 51:105-116.
- Cognié, Y., Baril, G., Poulin, N. Mermillod, P., 2003. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology* 59, 171-188.
- Cordeiro MF, Lima-Verde JB, Lopes-Júnior ES, Teixeira DIA, Farias LN, Sales HO, Simplicio AA, Rondina D, Freitas VJF. 2003. Embryo recovery rate in Santa Inês ewes subjected to successive superovulatory treatments with pFSH. *Small Rumin Res*, 49:19-23.

- D'Alessandro AG, Martemucci G, Colonna MA, Borghese A, Terzano MG, Bellitti A. 2001. Superovulation in ewes by a single injection of pFSH dissolved in polyvinylpyrrolidone (PVP): effects of PVP molecular weight, concentration and schedule of treatment. *Anim Reprod Sci*, 65:255–264.
- Dauzier, L., 1966. Artificial insemination in the goat. In: Dalling Ed., *Int. Encyclopedia of Veterinary Medicine*. W. Green and Soon, pp. 269–271.
- Deshpande D, Ravindra JP, Narendranath R, Narayana K. 1999. Ovarian antral follicular dynamics and serum progesterone concentration during the oestrous cycle of Bannur ewes. *Indian J Anim Sci*, 69:932-934.
- Driancourt DA. 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals: implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*, 55:1211-1239.
- Evans ACO. 2003. Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. *Anim Reprod Sci*, 78:289-306.
- Evans G, Maxwell VMC. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. Adelaide, AUS: Butterworths Pty Limited, 1987.
- Folch J, Ramón JP, Cocero MJ, Alabart JL, Bechers JF. 2001 Exogenous growth hormone improves the number of transferable embryos in superovulated ewes. *Theriogenology*, 55:1777-1785.
- Fonseca JF, Bruschi JH, Viana JHM, Zambrini FN, Palhão MP, Santos AFA. 2005a. Freezing goat embryos using ethylene glycol and a slow cooling rate. In: 9TH ANNUAL CONFERENCE OF THE EUROPEAN SOCIETY FOR REPRODUCTION IN DOMESTIC, 2005, Murcia. Proceedings of the 9th annual conference of the European Society for Reproduction in Domestic Animals. ESDAR. *Reprod Dom Anim*, 40:350.
- Fonseca JF, Bruschi JH, Zambrini FN, Viana JHM, Amorim LS, Camargo LSO. 2006c Superovulação de cabras utilizando a primeira onda folicular do ciclo estral. *Acta Sci Vet*, 33.
- Fonseca JF, Lobo RNB, Facó O, Villela LCV, Couto JF. 2007a. Timed artificial insemination (TAI) in Saanen goats. In: Annual Conference of ESDAR, 2007, Celle. Proceedings of Annual Conference of ESDAR. Upsala: Reproduction in Domestic Animals, 42:139.
- Fonseca JF, Souza JMG, Bruschi JH. 2007b. Sincronização de estro e superovulação em ovinos e caprinos. In: II Simpósio de Caprinos e Ovinos da EV-UFGM, 2007, Belo Horizonte. Anais do II Simpósio de Caprinos e Ovinos da EV-UFGM. Belo Horizonte : CENEx - EV/UGMG, p. 167-195.
- Fonseca JF. 2002. Controle e perfil hormonal do ciclo estral e performance reprodutiva de cabras Alpinas e Saanen. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 108p. (PhD Thesis).
- Fonseca JF. 2006 a. Biotecnologias da reprodução em ovinos e caprinos. Embrapa Caprinos, Documentos 64.
- Fonseca JF. 2006 b. Alguns aspectos da transferência de embriões em caprinos. *Acta Sci Vet*, 34:65-70.
- Frazão Sobrinho JM, Vieira RJ, Macedo NA, Júnior AS, Cavalcante VC, Silva JM. Fertilidade de cabras SRD inseminadas por via transcervical de acordo com o local de deposição do sêmen e número de inseminações. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2005, Goiânia, GO. Anais: Resumos.
- Fukui Y, Okada M, Ishida M. 1998. Incidence of premature luteal regression in ewes superovulated with a single injection of follicle-stimulating hormone combined with equine chorionic gonadotropin. *J Reprod Dev*, 44:407-412.
- Ginther OJ, Kot K. 1994. Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. *Theriogenology*, 42:987-1001.

- Ginther OJ, Wiltbank MC, Friche PM, Gibbons JR, Kot K. 1996. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol Reprod*, 55:1187-1194.
- González AAT. 2008. Reproducción de ovejas y cabras. In: González S, Hernández JAM. México DF: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Técnicas de inseminación artificial y sitio del depósito del sêmen. p. 192-200.
- Gonzalez-Bulnes A, Garcia-Garcia RM, Santiago-Moreno J, Dominguez V, Lopez-Sebastian A, Cocero MJ. 2003. Reproductive season affects inhibitory effects from large follicles on the response to superovulatory FSH treatments in ewes. *Theriogenology*, 60:281–288.
- Gonzalez-Bulnes A, Garcia-Garcia RM, Santiago-Moreno J, Lopez-Sebastian A, Cocero MJ. 2002. Effect of follicular status on superovulatory response in ewes is influenced by presence of corpus luteum at first FSH dose. *Theriogenology*, 58:1607-1614.
- Gonzalez-Bulnes A, Santiago-Moreno J, Cocero MJ, Souza CJH, Garcia-Garcia RM, Lopez-Sebastian A, Baird DT. 1999. Effect of follicular status on superovulatory response in ewes is influenced by presence of corpus luteum at first FSH dose. *J Reprod Fertil*, 24:6.
- Gordon, I., 1997. Controlled reproduction in sheep and goats. Cambridge, UK: University Press.
- Gusmão AL. 2006. Transferência de embriões em pequenos ruminantes. *O Embrião*, 25:6-9.
- Houdeau E, Raynal P, Marnet PG, Germain G, Mormède P, Rossano B, Monnerie R, Prud'homme MJ. 2002. Plasma levels of cortisol and oxytocin, and uterine activity after cervical artificial insemination in the ewe. *Reprod Nutr Dev*, 42:381-392.
- Jaume, C.M., Bruschi, J.H., 1985. Cabras sem limites. In: *Jornal "O Estado de Minas"*, 26 de outubro, 6-7.
- Khalifa RME, Sayre BL, Lewis GS. 1992. Exogenous oxytocin dilates the cervix in ewes. *J Anim Sci*, 70:38-42.
- Lopes Júnior ES, Maia ELMM, Almeida KC, Paula NRO, Teixeira DIA, Rondina D, Selaive-Villaroel AB, Freitas VJF. 2006. Influência dos níveis plasmáticos de progesterona sobre a resposta ovariana e produção embrionária de ovelhas Morada Nova (variedade branca). *Acta Vet Sci*, 34:510.
- Machado R, Simplício AA. 2001. Avaliação de programas hormonais para a indução e sincronização do estro em caprinos. *Pesq Agropec Bras*, 36 (1):171-178.
- Menchaca A, Miller V, Salveraglio V, Rubianes E. Endocrine, luteal and follicular responses after the use of the Short-Term Protocol to synchronize ovulation in goats. *Anim Reprod Sci*, 102 (1-2):76-87, 2007.
- Okada A, Andoh T, Mizuochi Y, Yoshii K, Ishida N, Fukui Y. 2001. Effects of dosage and treatment phase with GnRH analogues at the estrous stage on superovulation ewes. *J Reprod Dev*, 47:275-281.
- Pinna, AE, Brandão FZ, Cavalcanti AS, Borges AM, Loureiro APP, Fonseca JF. 2008. Fertilidade de ovelhas cíclicas submetidas à sincronização de estro utilizando implantes intravaginais (CIDR) novos e reutilizados. *Acta Vet Sci*, 36 (2):581.
- Rubianes E, Menchaca A. 2006. Dinâmica folicular, sincronização de estro e superovulação em ovinos. *Acta Vet Sci*, 34:251-261.
- Saharrea A, Valencia J, Balcázar A, Medja O, Cerbón JL, Caballero V, Zarco L. 1998. Premature luteal regression in goats superovulated with PMSG: effect of hCG or GnRH administration during the early luteal phase. *Theriogenology*, 50:1039-1052.
- Sales HO, Andrioli A, Simplício AA, Medeiros JN, Machado OM. 2002. Manual de transferência de embriões em caprinos. Embrapa Caprinos, Documentos 40.
- Santoyo A, Trejo A. 1991. Aspectos anatómicos comparativos del cervix ovino y caprino em relación a la inseminación artificial. *Memórias IV Congreso Nacional de Producción Ovina*. Universidad Autónoma Chiapas. San Cristobal de las Casas, Chiapas, 130-133.

- Shaw JM, Oranratnachay A, Trouson AO, 2000. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissues. *Theriogenology*, 53:59-72.
- Silva JC, Quintela A, Andrade Moura JC. et al. 2005. Colheita transcervical de embriões ovinos da raça Dorper no semi-árido nordestino. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16, 2005, Goiânia, **Anais...**, Goiânia.
- Siqueira AP, Fonseca JF, Silva Filho JM, Bruschi JH, Viana JHM, Palhares MS, Bruschi MCM, Peixoto MP. 2007. Parâmetros reprodutivos de cabras Toggenburg inseminadas com sêmen resfriado, após diluição em meio a base de gema de ovo. *Acta Sci Vet*, 35(3):1036.
- Soares, AT; Simplício, AA; Andrioli-Pinheiro, A; Salles, HO; Moura Sobrinho, PA; Azevedo, HC. Eficiência do flunixin meglumine no controle da regressão lútea prematura em cabras superovuladas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.50, n.1, p.35-39, 1998.
- Souza JMG, Couto JF, Bruschi JH, Viana JHM, Camargo LSA, Fonseca JF. Estrus and ovulation in anestrus Saanen Goats submitted to short-term estrous induction protocols. In: XXI Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society, 2007, Costa do Sauípe. *Proceedings of XXI Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society*. Porto Alegre : Acta Scientiae Veterinariae, 2007. v. 35. p. 1289.
- Stringfellow DA, Seidel SM. 1999. *Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões*. Savoy: IETS, 3 ed.
- Trejo A, Valencia J., 1988. Avances en la inseminación artificial em ovinos. In: Primer Simposium Internacional de Ovinocultura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad nacional Autónoma de México. 30-38.
- Warwick BL, Berry RO, Horlacher WR. 1934. Results of mating rams to Angora female goats. In: *Proceedings of the American Society of Animal Production*, p.225.
- Wulster-Radcliffe MC, Costine BA, Lewis GS. 1999. Estradiol-17-Oxytocin-induced cervical dilation in sheep: application to transcervical embryo transfer. *J Anim Sci*, 77:2587-2593.
- Zambrini FN. Dinâmica ovulatória e inseminação artificial em tempo pré-determinado em cabras com estro induzido. 2006. *Dissertação Mestrado – Universidade Federal de Viçosa*, Viçosa, MG, 2006. 44p.