

MANEIO REPRODUTIVO EM OVINOS E CAPRINOS

9. OVULAÇÃO MÚLTIPLA E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES (MOET)

Por Teresa Montenegro², Sandra Sacoto^{3,4},
Maria José Gomes⁴, Ramiro Valentim²,
Isilda Rodrigues⁴, Jorge Azevedo^{1,3,4}

¹ jazevedo@utad.pt

² CIMO, ESAB, IPB;

³ CECAV

⁴ UTAD

INTRODUÇÃO

A ovulação múltipla e a transferência embriónica (MOET), assim como a produção *in vitro* de embriões (IVEP), são tecnologias reprodutivas que permitem a manipulação estratégica para o incremento do melhoramento genético dos rebanhos. São poderosas ferramentas para a produção ovina e caprina, capacitando-a para responder às exigências crescentes de aumento da produtividade e da qualidade.

Em pequenos ruminantes - ovinos e caprinos, estas tecnologias reprodutivas [1] representam um grande potencial para o melhoramento, quer em animais de leite, quer em animais de carne. Importa salientar ainda, a sua importância em programas de recuperação de raças em perigo de extinção ([2], [3], [4]).

A inseminação artificial é uma técnica convencional para acelerar o ganho genético através da difusão do potencial de machos selecionados. Já a comercialização de embriões, produzidos *in vivo* ou *in vitro*, teria a vantagem da combinação de machos melhoradores para fertilização de oócitos de fêmeas selecionadas. Nos pequenos ruminantes, em que o seu pequeno tamanho corporal não permite o manuseamento retal e, no caso particular da ovelha, ainda a complexidade da anatomia cervical, para além da grande variabilidade na resposta a programas de superovulação e qualidade dos embriões assim obtidos, levam a que a técnica de MOET evolua de forma mais lenta ([2], [5]). Assim, se o comércio de embriões representa uma atividade importante que se está a desenvolver rapidamente em bovinos, já em pequenos ruminantes é praticamente inexistente. De acordo com a “Comissão de Recuperação de Dados da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões”, não existem dados disponíveis sobre esta comercialização, presumidamente por causa do pequeno número de países a praticá-la. A MOET em pequenos ruminantes é praticada em apenas doze países, destacando-se a nível mundial a Argentina e, a nível europeu, a França [6].



Parâmetros a ter em conta antes de estabelecer um programa de MOET em ovinos e caprinos

Na implementação de um programa de MOET em ovinos e caprinos devem ser acautelados os seguintes parâmetros:

- as fêmeas dadoras devem ser escolhidas segundo o seu valor genético;
- dadoras e recetoras devem estar em boas condições reprodutivas, nutricionais e sanitárias;
- as fêmeas devem já ter parido pelo menos uma vez e deve existir um período mínimo de dois meses entre a parição e o próximo tratamento de superovulação;
- sempre que necessário, deve ser usada uma malata ou chiba como dadora, que devem ter pelo menos 75% do seu peso adulto;
- sempre que possível as recetoras devem ser adultas;
- os machos devem ser melhoradores, prestando-se especial atenção à qualidade seminal [7].

ETAPAS DO PROGRAMA MOET EM OVINOS E CAPRINOS

Ovulação múltipla

Existem vários tratamentos possíveis para se induzir a superovulação em ovinos e caprinos. No entanto, até à data, não se conseguiu adotar um protocolo único para utilização em MOET [8]. Isto deve-se ao facto de fatores extrínsecos e intrínsecos ao animal interagirem de uma forma integrada durante a superovulação, obtida por tratamentos hormonais, levando muitas vezes a uma incapacidade de previsão de resultados ([1], [8]).

Relativamente às diferentes respostas obtidas na superovulação em ovinos, e apesar do progresso significativo no controlo de fatores extrínsecos (e.g. fonte e pureza das hormonas e protocolos de administração) e intrínsecos (raça, idade, estado nutricional e reprodutivo), a eficiência e sucesso dos protocolos de MOET, continua dependente da grande variabilidade individual da taxa ovulatória e do número de embriões recolhidos,

comprometendo a difusão da implantação dos programas de transferência de embriões [5]. Alguns autores preconizam a necessidade e o sucesso da introdução de um teste com uma boa relação custo: eficiência e de fácil aplicação, que permita fazer uma pré-seleção de ovelhas com alta e baixa resposta aos protocolos de superovulação, podendo desta forma pré-selecionar as dadoras [5]. O teste baseia-se na avaliação do número de ovulações obtido em resposta à administração de um único tratamento de “equine Chorionic Gonadotropin” eCG. O valor preditivo do teste é determinado comparando o número de ovulações do animal com a produção obtida em resposta a tratamentos com múltiplas doses de “Follicle stimulating hormone” (FSH) [9]. Adicionalmente, o estudo determina possíveis efeitos do “status” folicular aquando da aplicação da primeira dose de FSH e a sua relação com a subsequente resposta ovárica [5]. Alguns estudos reforçam [8] a necessidade da pré-seleção de fêmeas com boa resposta aos tratamentos de superovulação, demonstrando que alterações nas populações foliculares antrais, no fornecimento sanguíneo, para além da concentração de certas hormonas reprodutivas doseadas em determinados momentos específicos, imediatamente antes ou durante o tratamento superovulatório, estão associadas com o seu sucesso.

Outro dos grandes problemas é a regressão precoce do corpo lúteo em pequenos ruminantes. Esta ocorre em situações diversas como no início da puberdade, na transição do anestro sazonal para a época reprodutiva e em fêmeas sujeitas a programas de superovulação. Neste último caso, a regressão prematura do corpo lúteo ocorre, em geral, entre o 4º e 5º dias pós-estro, causando o retorno da dadora ao estro, antes da colheita dos embriões (5 a 6 dias, pós-estro) ([1]), [7]). Desta forma, no momento da recolha dos embriões, podem ser observados corpos lúteos pequenos, de coloração pálida ou acinzentada, apontando para a ausência ou comprometimento na irrigação sanguínea do corpo lúteo e, eventualmente com pouca ou nenhuma protrusão na superfície do ovário. Estes corpos lúteos, geralmente, estão associados a baixas concentrações circulantes de progesterona e a indesejáveis taxas de recuperação de embriões viáveis [7].

Para os pequenos ruminantes, há pouca informação quanto ao perfil endócrino relacionado com a regressão prematura do corpo lúteo nos programas de MOET. No entanto, aponta-se que possa ocorrer em virtude do desenvolvimento inadequado do folículo ovulatório ou pela ativação do mecanismo de

luteólise, promovido por um incremento dos níveis de estradiol no início do ciclo éstrico. O elevado número de folículos anovulatórios e corpos lúteos regredidos precocemente que aparecem em programas de MOET podem estar associados ao estado ovárico observado no início do programa de ovulação múltipla [5]. Assim, os corpos lúteos não normais podem resultar da inadequação entre a FSH e o “nível de desenvolvimento do reservatório de folículos” com capacidade de responder no início do tratamento. Quando os folículos com capacidade de responder apresentam tamanhos similares de maturação, a estimulação gonadotrófica conduz a um processo adequado de superovulação; em caso contrário, dá-se uma assincronia no processo de crescimento e luteinização [10].

Dentro dos protocolos possíveis, podemos ser utilizadas substâncias como “Pregnant Mare Serum Gonadotropin” (PMSG) ou o “equine Chorionic Gonadotropin” (eCG), 48h antes do fim do tratamento com progestagénios. Neste caso, a superovulação será alcançada 54 horas após a retirada das esponjas (tratamento com progestagénios) [11].

É possível também usar FSH de origem suína ou ovina em doses decrescentes (6 aplicações em intervalos de 12h) ao longo do tratamento progestagénico, conseguindo-se em relação ao uso da PMSG, melhor migração

espermática, melhores taxas de fertilização com a inseminação artificial e uma maior produção de embriões ([12], [13]).

Os tratamentos em caprinos são semelhantes, usando-se tratamentos de progestagénios mais curtos (11 dias) e uma dose de prostaglandina F2 α (50 μ g de closprotenol) aplicada 48h antes da retirada das esponjas ([14], [15]).

Alguns autores ([16], [17], [18]) afirmam obter melhores resultados em ovinos, quando administram uma dose de “Gonadotropin-Releasing Hormone” (GnRH) depois do tratamento com a FSH, isto é, 24h após a remoção das esponjas.

Outros autores apontam também a utilização de doses crescentes de “Lutenizing hormone” (LH) ao longo do tratamento progestagénico [19].

Com o conhecimento da dinâmica folicular, muitos autores e em várias espécies, desaconselham o início do tratamento com FSH em presença de grandes folículos, pois reduz o recrutamento folicular, a resposta ovárica e consequentemente a produção de embriões ([16], [20], [21], [22]).

É possível ainda aplicar outros protocolos, utilizando as hormonas supramencionadas. É importante realçar que as doses hormonais deverão ser sempre ajustadas à espécie, à raça, à época do ano e ao sistema de produção, entre outros fatores.



Figura 1

Inseminação cervical na raça Churra Galega Bragançana. Fonte Própria.

SINCRONIZAÇÃO ENTRE DADORA E RECETORA

A sincronização das fêmeas recetora e da dadora é feita ao mesmo tempo, garantindo que tanto a dadora como a recetora estejam no mesmo dia do ciclo éstrico aquando da recolha e implantação do embrião.

Esta sincronização normalmente é feita com esponjas impregnadas em “Fluorogestone Acetate” (FGA) ou “Medroxyprogesterone Acetate” (MAP), sendo o habitual proceder a 14 dias de tratamento para os ovinos e 17 para os caprinos, podendo o número de dias ser um pouco mais curto, quando aplicamos tratamentos combinados de progesterónios e prostaglandina F2 α [23]. No fim do tratamento progesterónico, aplica-se PMSG ou a eCG (tem efeito de FSH e um pouco de LH) para sincronizar o cio. Embora estes tratamentos sejam muito eficazes, é de salientar que a repetição, num curto espaço de tempo, pode determinar uma redução da sua eficácia, derivada do desenvolvimento de anticorpos [23].

Inseminação da dadora

A dadora pode ser inseminada pelo macho escolhido ou artificialmente (com sémen fresco ou congelado). Neste último caso, recomenda-se a laparoscopia.

As doses recomendáveis serão:

- se inseminação artificial cervical: 800 milhões de espermatozoides (ovinos) e 400 a 600 milhões de espermatozoides (caprinos);
- se inseminação por laparoscopia: 80 milhões de espermatozoides (ovinos) e 100 milhões de espermatozoides em caprinos [19], [24]. No caso de se utilizar sémen

congelado na laparoscopia, deverá utilizar-se 100 milhões de espermatozoides tanto em ovinos como em caprinos [25].

Momento da inseminação

Nos ovinos, o momento ótimo para inseminar com sémen fresco e por laparoscopia é 32h após o início do cio [24]. Se o sémen for congelado dever-se-á inseminar 40 a 55h após a retirada das esponjas [26].

Nos caprinos, a inseminação por laparoscopia com sémen fresco deverá ser realizada 20 a 24 horas após o início do cio [27]. No caso de se utilizar sémen congelado, deverá ser feita 46 horas após a retirada das esponjas [28].

TRANSFERÊNCIAS DE EMBRIÕES- DIFERENTES TÉCNICAS

Nos ovinos, a recolha de embriões é feita maioritariamente entre o 7º e 8º dias após a remoção das esponjas. Nos caprinos, a recolha de embriões é feita entre o 8º e o 9º dias após a remoção das esponjas [7].

As técnicas mais utilizadas nas transferências de embriões em pequenos ruminantes, estão baseadas em procedimentos cirúrgicos (laparotomia) sob anestesia geral, o que implica um período de jejum e a utilização de fármacos para uma manipulação cirúrgica segura. No entanto, tudo isto envolve riscos para o animal. As maiores sequelas são as aderências causadas pelas cirurgias abdominais, nos ovários, útero ou entre eles. Estas ocorrências podem comprometer o acesso uterino e a captura de oócitos limitando o número de vezes que se pode repetir o processo, em cada animal.

Desta forma, um grupo de investigadores [29] está a desenvolver técnicas menos invasivas como a laparoscopia e os métodos transcervicais, com imensas vantagens tais como menor período de jejum, redução nos fármacos utilizados e as dadoras em posição de estação. Na laparoscopia não são necessárias grandes incisões, podendo-se utilizar esta técnica várias vezes em caprinos e ovinos superovulados ou não, para a recolha de embriões. Depois destes procedimentos, a recuperação das dadoras é imediata.

Nos caprinos, diversos investigadores [30], indicam vários trabalhos nos quais foram obtidas taxas de recuperação de embriões por métodos transcervicais que variam entre os 53,2% [29] e os 89,5% [31]. Recentemente, utilizando a técnica transretal, ficou demonstrada a viabilidade da deposição embrionária, no corno uterino desejado, após localização do corpo lúteo por ultrassonografia transretal, tornando-se esta técnica não traumática, comparável em termos de resultados, com os métodos cirúrgicos [32].

Nos ovinos as técnicas não cirúrgicas estão mais limitadas pela anatomia do cérvix. Embora existam alguns registos de sucesso da recolha de embriões pelo método não cirúrgico - 42% (11/26) há aproximadamente 30 anos [33] - os resultados obtidos desde então nem sempre foram os melhores. Recentemente o relaxamento do cérvix com cloprostenol ou misoprostol em ovelhas Santa Inês mostrou ser muito útil, principalmente em ovelhas nas quais sem este procedimento se tornava quase impossível a introdução do cateter e que desta forma se consegue alcançar um sucesso de aproximadamente 61% [34]. Em ovelhas



Figura 2

Material para utilização em programas de MOET, utilizando laparoscopia. Fonte: própria.

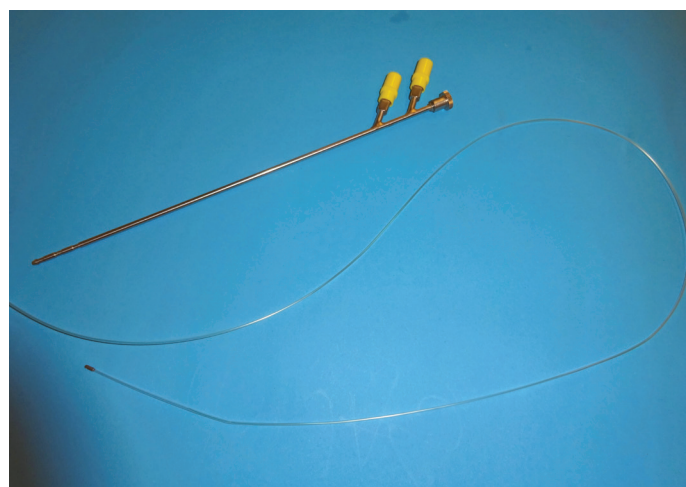


Figura 3

Sonda de três vias e cateter para recolha de embriões por laparoscopia. Fonte: própria.

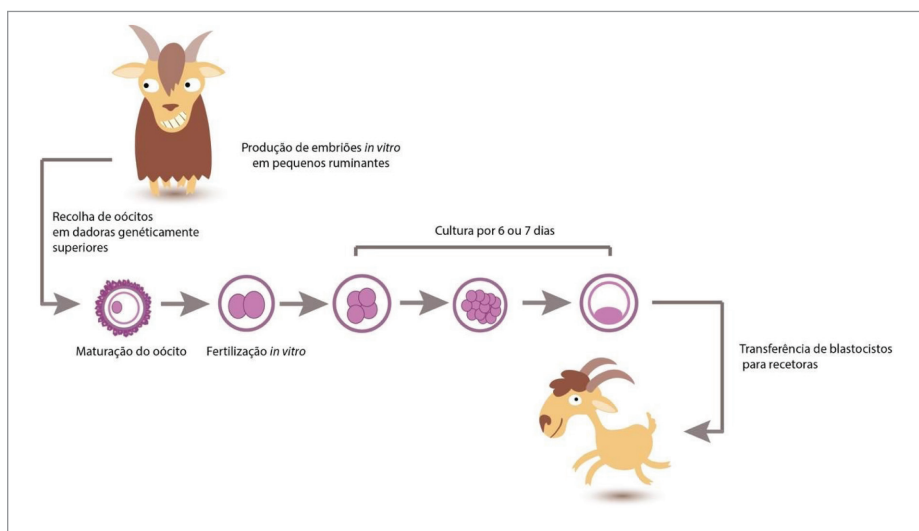


Figura 4

Esquema representativo da introdução da fertilização *in vitro* num esquema tradicional de MOET. Fonte: Montenegro, 2017.

Dorper, o tratamento com misoprostenol, 5 horas antes da recolha de embriões, permitiu um sucesso de 95%, comparado com o grupo controlo que foi de 0%. Já a transferência de embriões utilizando uma prostaglandina E2 com o nome comercial de “Cervidil R”, embora provocasse uma boa dilatação, facilitando a transferência de embriões para a recetora, confirmando-se a gestação aos 25 dias, aos 55 dias de gestação não se conseguiu o registo ecográfico de nenhum feto [3].

SELEÇÃO DE EMBRIÕES E IMPLANTAÇÃO NA RECETORA

A escolha de embriões deve ser baseada em aspetos morfológicos observados com lupa binocular com uma ampliação de 80x, sob diferentes ângulos. A zona pelúcida deve estar íntegra e existir esfericidade. O desenvolvimento embrionário deve ser o esperado teoricamente, podendo ser admitido um atraso entre 24h a 48h, desde que se assuma uma menor percentagem de sucesso. No entanto, é normal que os embriões de uma mesma dadora não tenham exatamente o mesmo grau de desenvolvimento [35]. O mesmo acontece quando comparamos o grau de desenvolvimento, com o mesmo tempo (6-7 dias de gestação) em ovinos frente aos caprinos, já que existe um ligeiro atraso do desenvolvimento dos caprinos em relação aos ovinos, que pode chegar às 12 ou 24h. As células devem ser claras com tamanhos e bordos regulares; a existir opacidade, esta será sinónimo de degeneração

e, por isso, motivo de rejeição. A presença de algumas células no espaço perivitelino não constitui motivo de rejeição se os outros parâmetros estiverem dentro da normalidade [19]. O tempo que medeia a colheita de embriões e a sua implantação na dadora não deve tardar mais que duas horas no meio adequado de preservação “Phosphate-buffered saline” (PBS). No caso de os embriões estarem congelados, o tempo entre descongelar e transferir o embrião para a dadora não deve ser superior a 20-30 minutos. A dadora e a recetora devem estar sincronizadas, podendo ser admitida uma dessincronia de aproximadamente 1 dia [36]. Os métodos de transferência podem ser cirúrgicos ou não cirúrgicos por laparoscopia. A observação prévia à transferência embrionária dos ovários por laparoscopia é aconselhável.

Fatores que podem afetar a sobrevivência de embriões, após um programa de (MOET).

Tanto nos ovinos como nos caprinos existem vários fatores que podem influenciar a sobrevivência dos embriões após um programa de MOET. Entre estes destacam-se o método de transferência, a fase de desenvolvimento embrionário, a qualidade do embrião, o número de corpos lúteos e a idade da recetora ([37], [38]). Quanto ao método de transferência, a laparoscopia apresenta melhores resultados que o método cirúrgico ([38], [39], [40]). Quanto à fase embrionária, alguns autores referem uma maior sobrevivência na fase de blastocisto ([37], [41]) e outros não encontram diferenças

significativas entre mórula e blastocisto. Estas discrepâncias podem estar relacionadas com a qualidade da estrutura embrionária ([42], [38]). A qualidade do embrião é determinante, independentemente da fase embrionária, assim como as concentrações de progesterona durante a fase lútea, estando nos ovinos, também diretamente relacionada com o número de corpos lúteos e a idade da recetora ([43], [44] e [42]).

PRODUÇÃO “IN VITRO” DE EMBRIÕES (IVEP)

Apesar do primeiro relato do nascimento de um cabrito e um cordeiro provenientes de fertilização *in vitro* remontar aos anos 80 do século passado ([45], [46]), e a partir desta data se terem feito inúmeros estudos, continuamos hoje em dia com dados muito inconsistentes. Assim, a produção *in vitro* não substitui atualmente a produção “*in vivo*” de embriões; funciona como um complemento às técnicas tradicionais de MOET em situações muito concretas, como a obtenção de um maior número de embriões em raças geneticamente superiores ou em perigo de extinção, para além de ser a base para outras tecnologias como a produção de animais transgênicos, a clonagem e produção de células estaminais [47]. A introdução da fertilização *in vitro* em programas tradicionais de MOET pode ser observado na **Figura 4**.

Com a produção *in vitro* de embriões, os problemas associados à superovulação podem ser ultrapassados, uma vez que esta técnica não necessita de a promover, já que os oócitos são recolhidos diretamente dos folículos em fêmeas tratadas ou não, com hormonas. Para além disso, permite a produção de descendência de fêmeas não férteis, pré-púberes, gestantes, em lactação ou mesmo mortas ou abatidas em matadouros [1]. A recolha dos oócitos *in vivo* é realizada por punção folicular com recurso a laparoscopia - “laparoscopic ovum pick-up” (LOPU). Esta técnica apresenta a grande vantagem de poder ser repetida diversas vezes com intervalos de 7 a 14 dias [47].

A produção de embriões a partir de oócitos de fêmeas pré-púberes é uma tecnologia chamada “Juvenil *in vitro* Embryo transfer” (JIVET) que permite encurtar o intervalo geracional e aumentar o ganho genético [48].

A fertilização *in vitro* compreende uma série de passos como:

- maturação *in vitro* dos oócitos obtidos diretamente dos folículos;
- fertilização *in vitro* ou incubação conjunta de espermatozoides capacitados com oócitos maturados *in vitro*;

- cultura *in vitro* dos zigotos até à fase de blastocisto.

Durante todas estas etapas os diferentes investigadores tentam simular as condições que ocorrem no sistema reprodutivo da fêmea durante a maturação dos oócitos nos ovários, a fecundação no oviduto e as primeiras fases do desenvolvimento embrionário até à fase de blastocisto expandido [47].

Cada um dos passos referidos terá um meio de cultura de oócitos ou embriões específico, assim como um meio diferenciado para fertilização.

Não sendo o objetivo deste artigo descrever com pormenor cada meio e suas diferentes variantes, gostaríamos apenas de referir que de uma maneira geral os meios devem ser isotónicos com o meio interno celular e manter a pressão osmótica, ter capacidade de manter o pH (7,2-7,4), fornecer nutrientes e outras substâncias como hormonas, agentes capacitantes adequadas a cada fase e, por fim, evitarem o crescimento de microrganismos prejudiciais, mediante a junção de antibióticos e antifúngicos [47].

CONCLUSÕES

A aplicação de MOET revela ser uma ferramenta muito promissora em programas de melhoramento animal e recuperação de raças em perigo de extinção.

Apesar dos vários estudos realizados no âmbito da MOET, prevalecem as dificuldades na implementação de um protocolo tipo, já que continuam a existir fatores intrínsecos e extrínsecos ao animal que interagem de uma forma integrada durante a estimulação hormonal da superovulação. As alterações provocadas no normal desenvolvimento folicular e função secretora, afetam o transporte de espermatozoides, a fertilização e as primeiras etapas desenvolvimento embrionário. Constata-se também uma grande variabilidade individual, o que levou alguns autores a estabelecer testes para pré-selecionar as fêmeas que apresentam uma resposta superior a um determinado protocolo de superovulação, diminuindo desta forma os custos de MOET.

Quanto à comercialização de embriões em pequenos ruminantes, esta irá desenvolver-se à medida que se obtenham resultados mais consistentes com a técnica de MOET.

Outro aspeto que começa a ganhar importância é a cada vez maior preocupação com o “bem-estar animal” e, por isso, a implementação das técnicas não cirúrgicas, uma vez que se revelam menos traumáticas para o animal. ■

Constata-se uma grande variabilidade individual, o que levou alguns autores a estabelecer testes para pré-selecionar as fêmeas que apresentam uma resposta superior a um determinado protocolo de superovulação, diminuindo desta forma os custos de MOET.



Figura 5

Imagem obtida por laparoscopia após um tratamento de superovulação em ovelhas da raça Oikuska. Fonte: Bartlewski, et al; 2016.

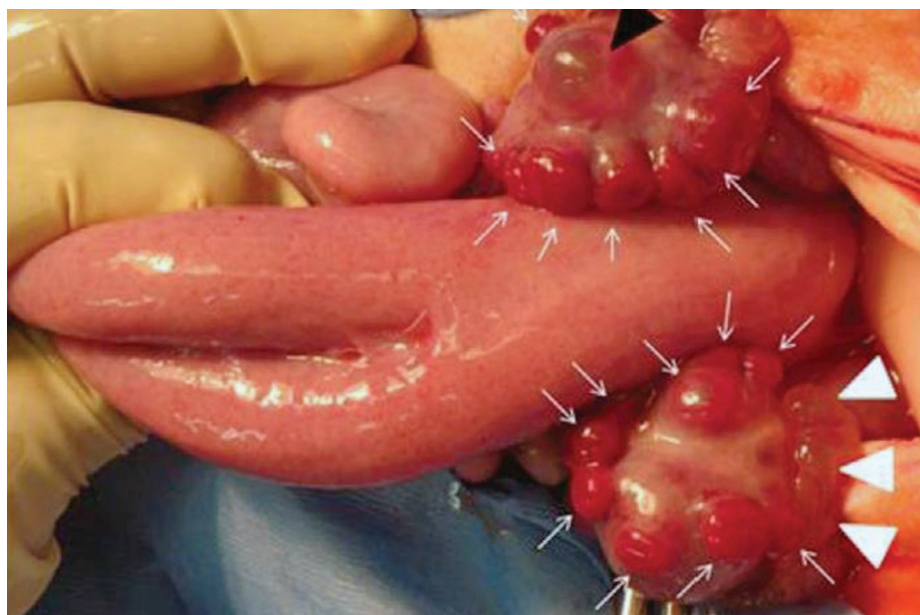


Figura 6

Laparotomia de uma ovelha da raça Rideau Arcott após tratamento de superovulação. Fonte Bartlewski, et al; 2016.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



1. Paramio, M.T. and Izequierdo, D. Current Status of In Embryo Production in Sheep and goat, 2014. *Reproduction in Domestic animals*, 49 (4), p.37-48.
2. Bettencourt, E.M.; Chagas, J.; Silva, J., Ferreira, P.; Manito, C.L.; Matos, C.M., Romão, R.J. and Rocha, A. Effect of season and gonadotrophin preparation on superovulatory response and embryo quality in Portuguese Black Merinos, 2008. *Small Ruminant Research* 74, p.134-139.
3. Candappa, I.B.; Bartlewi, P.M. Introduction of cervical dilation for transervical embryo transfer in ewes, 2014. *Reproductive Biology and Endocrinology* 12 p.1-9.
4. Mayorga, I.; Mara, L.; Sanna, D.; Stelletta, C.; Morganti, M.; Casu, S. and Dattana, M. Good Quality Sheep embryos produced by superovulation treatment without the use of progesterone devices, 2011. *Theriogenology*, 75, p.1661-1668.
5. Bruno-Galaraga M.M.; Cueto M.; Gibbons A.E.; Pereyra-Bonnet E.; Catalano R.; Gonzales-Bulnes A. Repeatability of superovulatory response to successive FSH treatment in Merino sheep, 2014. *Small Rumin Res.* 120, p. 84-9.
6. Paramio, M.T. and Izequierdo, D. Recent advances in vitro embryo production in small, 2016. *Theriogenology*, 89, p.152-159.
7. Gibbons, A. and Cueto, M. Embryo transfer in sheep and goats - A training manual, 2011. National Institute for Agriculture Technology, INTA, Argentina.
8. Bartlewi, M.P.; Seaton, P.; Oliveira, F.M.E.; Kridil, T.R.; Murawski, M. and Schwarz, T. Intrinsic determinants and predictors of superovulatory yields in sheep: Circulating concentrations of reproductive hormones, ovarian status, and antral follicular blood flow, 2016. *Theriogenology*, 86, p. 130-143.
9. Mossa, E.; Duffy, P.; Naitana, S.; Lonergan, P. and Evans, A.C.O. Associations between numbers of ovarian follicles in the first follicle wave and superovulatory response in ewes, 2007. *Anim Reprod. Sci.* 100, p. 391-396.
10. Rubianes, E.; Ibarra, D.; Unger, R.; Carbajal, B. and Castro, T. Superovulatory response in anestrus ewes is affected by presence of large follicle, 1995. *Theriogenology* p. 465-472.
11. Walker, S.K.; Smith, D.H. and Seamark, R.F. Timing of multiple ovulations in the ewe after treatment with FSH or PMSG with and without GnRH, 1986. *Journal of Reproduction and Fertility*, 77, p.135-142.
12. Armstrong, D.T. and Evans, G. 1983. Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats, 1983. *Theriogenology* 19 p. 31-42.
13. Torrès, S.; Cognié, Y. and Colas, G. Transfer of superovulated sheep embryos obtained with different FSH-P, 1987. *Theriogenology*, 27, p. 407-418.
14. Cortez, J.M.; Leboeuf, B. and Barill, G. Artificial breeding of adult goats and kids induced with hormones to ovulate outside the breeding season, 1988. *Small Ruminant Research*, 1, p.19-35.
15. Correia, T.; Azevedo, J.; Simões, J.; Galvão, L.; Fontes, P.; Mendonça, E.; Almeida, J.; Velasco, H.; Mauricio, R.; Cardoso, M., e R. Valentim, 2009. Aplicação de tratamentos com diferentes durações em o controle de la actividade ovarica de cabras de raza Serrana, 2009. *In: 34 congresso Nacional de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia*, p.383-386. Barbastró, Espanha.
16. Menchaca, A.; Vilarinho, M.; Pinzack, A.; Knaid, S. and Daldáña, J.M. Progesterone treatment, FSH plus eCG, GnRH administration and day 0 Protocol for MOET programs in sheep, 2009. *Theriogenology*, 72(4) p. 477-483.
17. Walker, S.K.; Smith, D.H.; Frensham, A.; Ashman, R.J. and Seamark, R.F. The use of synthetic gonadotropin releasing hormone treatment in the collection of sheep embryos, 1989. *Theriogenology*, 31, p. 741-752.
18. Jabbour, H.N.; Ryan, J.P.; Evans, G. Effects of season, GnRH administration and lupin supplementation on the ovarian and endocrine response of merino ewes treated with PMSG and FSH-P to induce superovulation, 1996. *Reprod Fertil Dev.* p. 699-707.
19. Baril, G. P.; Casamitjana, J.; Perrin and J.C. and Vallet. 1989. Embryo production, freezing and transfer in Angora, Alpine and Saanen goats, 1989. *Zuchthygiene*, 24, p. 101-115.
20. Rubianes, E.; Ibarra, D.; Unger, R.; Carbajal, B. and Castro, T. Superovulatory response in anestrus ewes is affected by presence of large follicle, 1995. *Theriogenology*, p. 465-472.
21. Veiga-López, A.; Gonzalez-Bulnes, R.M.; Garcia-Garcia, A.; Dominguez, V. and Cocero, M.J. The effects of previous ovarian status on ovulation rate early embryo development in response to superovulatory FSH treatments in sheep, 2005. *Theriogenology*, 63, p. 1973-1983.
22. Veiga-López, A.; Gonzalez-Bulnes, R.M.; Garcia-Garcia, A.; Dominguez, V.; Cocero, M.J. The effects of previous ovarian status on ovulation rate early embryo development in response to superovulatory FSH treatments in sheep, 2005. *Theriogenology*, 63, p. 1973-1983.
23. Correia, T.M. and Valentim, R. Contributo para a melhoria da eficiência reprodutiva de ovinos da raça Churra Galega Bragançana e de caprinos da raça Serrana in Fórum CIMO - Ciência e Desenvolvimento 2012. Bragança.
24. Brebion, P.; Baril, G.; Cognié, Y. and Vallet, J.M. Transfert d'embryons chez les ovins et les caprins, 1992. *Annales de Zootechnie*, 41 p. 331-339.
25. Wolff, M., Gibbons, A., Cueto, M.; Willems, P. and J. Arrigo, J. Results of artificial insemination with frozen semen in Australian Merino ewes multiovaluated with FSHp, 1994, p. 269 (abstr) in IV World Merino Conference, Montevideo, Uruguay.
26. Evans, G.; Jabbour, H.N. and Moore, N.W. Time of intrauterine insemination of superovulated ewes using fresh and frozen semen, 1992 in 8th Scientific meeting of European Embryo Transfer Association, Lyon France
27. Vallet, J.C. and Baril, G. Effect of time of laparoscopic intrauterine insemination in superovulated dairy goats, 1990, 188 (abstr) in 6th Scientific Meeting of the European Embryo Transfer Association, Fondation Marcel Mérieux, Lyon, France
28. Fieni, F.; Buggin, M., Tainturier, D.; Beckers, J.F.; Bach-Ljour, B.; Bruvas, J.F. et M. Daubie. L'insémination artificielle intra-utérine, transpéritonéale chez la chèvre. *Recueil de Médecine, Vétérinaire* 166: 479-484
29. Fonseca, J.F.; Souza-Fabjan, J.M.; Oliveira, M.E.F.; Leite, C.R.; Nascimento-Penido, P.M.P.; Brandão, E.Z. and Lehlony, K.C. Nonsurgical embryo recovery and transfer in sheep and goat, 2016. *Theriogenology*, 86, p. 144-151.
30. Lima-Verde J.B.; Lopes Jr E.S., Teixeira D.L.A.; Paula N.R.O.; Medeiros A.A.; Rondina D. et al. Transcervical embryo recovery in Saanen goats, 2003. *S Afr J Anim Sci*, 33 p.127-31
31. Nagashima H.; Matsui K.; Sawasaki T.; Kano Y. Nonsurgical collection of embryos in Shiba goats, 1987. *Jikken Dobutsu* 36, p. 51-6.
32. Fonseca, J.F.; Esteves, L.V.; Zambrini, F.N.; Brandão, E.Z.; Peixoto, M.G.C.D.; Verneque, R.S. et al. Viable offspring after successful non-surgical embryo transfer in goats, 2014. *Arq Bras Med Vet Zootec* 66 p.613-6.
33. Coomrod S.A.; Coren B.R.; McBride B.L.; Bowen M.J.; Kraemer, D.C. Successful non-surgical collection of ovine embryos, 1986. *Theriogenology*, 2, p. 149.
34. Gusmão A.L.; Silva J.C.; Quintela, A.; Moura J.C.A.; Resende, J.; Gordiano, H. et al. Colheita transcervical de embriões ovinos da raça Santa Inês no semi-árido nordestino, 2007. *Rev Bras Saúde Prod Anim* 8 p. 1-10.
35. Meinecke, B. and Meinecke-Tillman, S. Assessment of the embryo quality in cattle and small ruminants, 1990. 6th Scientific Meeting of European Embryo Transf. Association, Lyon, France, 1 p. 53-66.
36. Rowson, L.E.A. and Moor, R.M. Embryo transfer in the sheep: the significance of synchronizing oestrus in the donor and recipient animal, 1966. *Journal of Reproduction and Fertility* 11, p. 207-212.
37. Armstrong, D.T. and G. Evans, G. Factors influencing success of embryo transfer in sheep and goats, 1983. *Theriogenology* 19, 31-42.
38. Lee, C.S.; Fanga, N.Z.; Kooa, D.B.; Leea, Y.S.; Zhenga, G.D.; Oha, K.B.; Youna, W.S. et al. Embryo recovery and transfer for the production of transgenic goat from Korean native strain, 2000. *Small Rumi. Res.* 37, p. 57-63.
39. Thompson, J.G.; Bell, A.C.S.; McMillan, W.H.; Peterson, A.J.; Tervit, H.R. Donor and recipient ewe factors affecting in vitro development and post-transfer survival of cultured sheep embryos, 1995. *Anim. Reprod. Sci.* 40, p. 269-279.
40. Zohara, B.F., Azizunnesa, Faruk, Islam, Md.; Golam Shahi Alam, Md. and Bari, F.Y. Survival of embryos after transfer within multiple ovulation and embryo transfer (MOET) programme, 2017. *Small Ruminant Research*, 149, p.11-15.
41. Wright, Jr., Bondioli, R.W.; Grammer, K.; Kuzan, J.; Menino, F. FSH or FSH plus Lh superovulation in ewes folling estrus synchronization with medoxyprogesterone acetate pessaries, 1981. *J. Anim.Sc.*, 52, p.115-118.
42. Shea, B.F. Evaluating the bovine embryo, 1981. *Theriogenology*, 23 p. 15-31.
43. Donaldson, L.E. Recipients as a source of variation in cattle embryo transfer, 1985. *Theriogenology*, 23, p.188.
44. Bruel, K.F.; Baker, R.D.; Butcher, R.L.; Townsend, E.C.; Inskeep, E.K.; Dailey, R.A. and Lerner, S.P. Effect of breed, age of donor range dosage of follicle stimulating hormone on superovulatory response of beef cows, 1991. *Theriogenology*, 36, p. 225-241.
45. Hanada, A. *In vitro* Fertilization in goat, 1985. *Japanese Journal of Animal Reproduction*, 31, p. 21-27.
46. Cheng, W.T.K.; Moor, R.M. and Polgs, C. *In vitro* Fertilization of pig and sheep oocytes matured *in vivo* and *in vitro*, 1986. *Theriogenology*, 25, p.146.
47. Casao, A.G., Tecnología de la reproducción- Producción *in vitro* de embriones, in *Manejo Reproductivo en ganado ovino*, Servet Editor, 2010. Abecia, A.M. y Forcada, F.M. España.
48. Morton K.M. Developmental capabilities of embryos produced *in vitro* from from prepubertal lamb oocytes, 2008. *Reprod Dom Anim*, 43, p.137-143.