

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**RECURSO VIDEOCIRÚRGICO PARA ESTUDOS DE
INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL TRANSCERVICAL EM
OVINOS**

Augusto Ryonosuke Taira
Médico Veterinário

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**RECURSO VIDEOCIRÚRGICO PARA ESTUDOS DE
INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL TRANSCERVICAL EM
OVINOS**

Augusto Ryonosuke Taira

Orientador: Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente

Coorientador: Prof. Dr. Pedro Paulo Maia Teixeira

Prof. Dr. Felipe Farias da Câmara Barros

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Reprodução Animal).

Taira, Augusto Ryonosuke
T134r Recurso videocirúrgico para estudos de inseminação artificial
transcervical em ovinos / Augusto Ryonosuke Taira. – – Jaboticabal,
2018
vi, 26 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018
Orientador: Wilter Ricardo Russiano Vicente
Coorientador: Pedro Paulo Maia Teixeira, Felipe Farias da Câmara
Barros
Banca examinadora: Felipe Zandonadi Brandão, Luciana Cristina
Padilha Nakaghi
Bibliografia

1. Cérvico. 2. Ovelha. 3. Sincronização de cio. 4. Tração cervical. 5.
Vaginoscopia. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias
e Veterinárias.

CDU 619:636.082:636.3

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: RECURSO VIDEOCIRÚRGICO PARA ESTUDOS DE INSEMINAÇÃO
ARTIFICIAL TRANSCERVICAL EM OVINOS

AUTOR: AUGUSTO RYONOSUKE TAIRA

ORIENTADOR: WILTER RICARDO RUSSIANO VICENTE

COORDENADOR: PEDRO PAULO MAIA TEIXEIRA

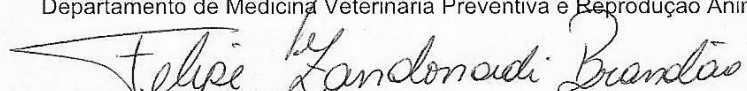
COORDENADOR: FELIPE FARIAS PEREIRA DA CÂMARA BARROS

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em MEDICINA
VETERINÁRIA, área: REPRODUÇÃO ANIMAL pela Comissão Examinadora:



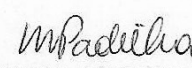
Prof Dr WILTER RICARDO RUSSIANO VICENTE

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. FELIPE ZANDONADI BRANDÃO

Departamento de Reprodução Animal / Universidade Federal Fluminense



Pós-doutoranda LUCIANA CRISTINA PADILHA NAKAGHI

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 26 de fevereiro de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Augusto Ryonosuke Taira, nascido na cidade de São Paulo – SP, em 17 de julho de 1993. Concluiu o curso técnico em Agropecuária pelo Colégio Técnico Agrícola Augusto Ribas, (2008 – 2010). Graduiu-se em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual do Centro-Oeste, Guarapuava – PR (2011-2015). Durante a graduação participou de diversos projetos de extensão, e um projeto de iniciação científica. Realizou estágio extracurricular na Universidade Estadual Paulista – Campus Jaboticabal, na área de biotecnologia da reprodução sob orientação do professor Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente, além dos estágios curriculares na Universidade de Franca sob orientação do professor Dr. Pedro Paulo Maia Teixeira e na Universidade Estadual Paulista – campus Jaboticabal sob orientação da professora Dra. Lindsay Gimenes Uno, ambos na área de reprodução animal. Realizou seu trabalho de conclusão de curso sob a orientação da professora Dra. Kate Aparecida Buzi, com tema “Inseminação transcervical assistida por endoscopia em ovinos”.

“Ninguém sabe tudo, assim como ninguém ignora tudo. O saber começa com a consciência do saber pouco. É sabendo que sabe pouco que uma pessoa se prepara para saber mais”.

Paulo Freire

Dedico esta dissertação aos meus queridos pais Maria Cristina H. C. Taira e Alberto Y. Taira, aos meus avós Waldemar C. Cabrera e Valery H. Cabrera, aos meus irmãos Kendra Y. Taira e Alvaro Y. Taira e a minha afilhada Letícia A. Taira. Dedico também a todos que fizeram e fazem parte da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer primeiramente a Ele que possibilitou a vida, permitiu o desenvolvimento deste trabalho e a conclusão de mais uma etapa em minha vida.

Ao meu orientador Prof. Wilter Ricardo Russiano Vicente, por ter me abraçado e me acolhido em sua equipe nos primeiros dias nesta Universidade, pessoa serena que acalma todos ao seu redor meu sincero obrigado.

Agradecer aqueles que foram e sempre serão meu alicerce é indispensável. Meus pais, Maria Cristina e Alberto Yoshihiro, sempre ficaram ao meu lado, me dando apoio nas horas que pensei que não seria capaz, apesar da distância reconheço o enorme sacrifício que fizeram e fazem por seus filhos, me espelho em vocês por toda a garra e determinação, deixo meu muito obrigado à vocês.

Claro, meus amados avós Waldemar e Valery, são eles que têm o poder de acalmar o meu coração aflito com palavras confortantes, que sempre me diz “confio no seu taco” e me dão todo o apoio que precisei, não tenho palavras para agradecer, com lágrimas nos olhos quero deixar o meu muito obrigado e disser que os senhores são e sempre serão o meu espelho.

O que seria de mim sem essa grande mulher ao meu lado, exemplo de perseverança, de amor, de amizade, de companheirismo, de lealdade sempre estendendo a mão para caminharmos junto, desde a nossa graduação eu só tenho a agradecer Danúbia Nogueira Figueira obrigado.

Ao meu coorientador que sempre me orientou em assuntos acadêmicos, desde a graduação até os dias atuais, quero deixar um agradecimento especial, sei que, sem essa imagem a quem me espelhei não teria chego ao fim desta etapa de minha vida, um exemplo de profissional a ser seguido, sempre agregando seus orientados, tem uma grande e admirável equipe, Pedro Paulo Maia Teixeira, muito obrigado.

O que seria de mim sem a família que me acolheu em Jaboticabal? Os meus irmãos de república, sempre com motivo para comemorar, alegam nossos dias pesados de pós-graduando. Vocês me fizeram crescer ainda mais pessoalmente, cada um com um jeito e uma história diferente somaram para minha vida. Vinicius (Frito), Kayo (Ky), Gilmar (Bartira), Murillo, Otávio (Tatá), Diego (Tofu), Felipe (Nordestino), Cléber (Dido), Alejandro (Prego), Thiago (Aladim), Felipe (Safadão), Igor, obrigado por ser a família ANTRO DO HV.

À equipe de trabalho, onde juntos fizemos do impossível ao possível, me ensinaram que, as diferenças individuais quando sabidas e respeitadas formam não só profissionais mais competentes e maleáveis, mas também cidadãos mais conscientes, por ensinar que as diferenças de opiniões são fundamentais para construir um mundo melhor. Renata S. G. Mariano, Victor J. C. Santos, Priscila Del Aguila, Naiara N. Rodrigues, Dayane P. Vrisman, Luisa P. Bueno, Beatriz Gasser, Maria Eduarda obrigado por ajudar na execução deste experimento.

Aos técnicos do laboratório de reprodução animal muito obrigado. À Roberta com seu jeito especial e sempre disposta em ajudar, me auxiliou não só no mestrado, mas também quando eu era um mero estagiário, me ensinando técnicas que se eu quisesse aprender gastaria muito dinheiro, só tenho à agradecer. Seu Ivo, que hoje aposentado, me fez rir muito no primeiro ano do mestrado, com experiência de vida, me alertava das coisas que iria encontrar. Renata, técnica do laboratório de análises clínicas, muito obrigado, por ensinar e proporcionar a realização das análises clínicas.

Ao seu Edson, sem palavras para agradecer, o senhor foi à engrenagem principal do meu experimento, alimentando os animais de domingo a domingo de baixo de sol ou chuva, sempre esteve presente. Quero deixar registrado também os ensinamentos de vida que senhor me deu, não apenas de como pescar, mas também de como estar sempre disposto em ajudar.

À Unesp por ter aberto suas portas e proporcionado o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa concedida e financiamento do projeto (Processo 441492/2014-2).

Às empresas Top In Life Biotecnologia e Genética Animal Ltda. e a OuroFino Saúde Animal, por terem participado e contribuído com materiais para o trabalho.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RECURSO VIDEOCIRÚRGICO PARA ESTUDOS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL TRANSCERVICAL EM OVINOS	v
ENDOSURGERY RESOURCE FOR STUDIES OF TRANSCERVICAL ARTIFICIAL INSEMINATION IN SHEEP	vi
2. INTRODUÇÃO.....	1
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3.1. Biotecnologia da reprodução em ovinos	3
3.2. Morfologia da cérvix ovina.....	3
3.3. Sincronização hormonal.....	4
3.4. Inseminação artificial em ovinos	5
3.4.1. Inseminação artificial vaginal	5
3.4.2. Inseminação artificial cervical	6
3.4.3. Inseminação laparoscópica	7
3.5. Alternativas para inseminação transcervical	8
3.6. Proteínas de fase aguda	8
4. OBJETIVOS.....	10
4.1. Geral	10
4.2. Específicos.....	10
5. MATERIAL E MÉTODOS	11
6. RESULTADOS	15
7. DISCUSSÃO.....	17
8. CONCLUSÃO	20
9. REFERÊNCIAS	21



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado **"Inseminação artificial videoassistida transcervical em ovinos"**, protocolo nº 9.214/16, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 06 de julho de 2016.

Vigência do Projeto	07/07/2016 a 28/02/2018
Espécie / Linhagem	Ovis Aries (Ovino)
Nº de animais	Quarenta
Peso / Idade	50 kg com idade aproximada de dois anos
Sexo	Fêmeas
Origem	Fazenda comercial

Jaboticabal, 06 de julho de 2016.


Profª Drª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

RECURSO VIDEOCIRÚRGICO PARA ESTUDOS DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL TRANSCERVICAL EM OVINOS

RESUMO - O objetivo deste trabalho foi desenvolver um recurso videocirúrgico para inseminação artificial (IA) transcervical em ovinos. Foram utilizadas 30 ovelhas da raça Santa Inês com idades entre 2 a 5 anos todas pluríparas, divididas em três grupos experimentais: 1) IA por técnica convencional com tração cervical (GC); 2) IA por vídeo-vaginoscopia com insuflação (GVS) e; 3) IA videoassistida com fixação cervical (GVF). Durante o procedimento foi registrado o tipo do óstio cervical, número de anéis transpassados, local de deposição do sêmen no trato reprodutivo, tempo de manipulação cervical, taxa de passagem e fibrinogênio plasmáticos como marcador de reação inflamatória entre as técnicas. O diagnóstico gestacional foi realizado 21 dias após a inseminação artificial. Todos os dados foram submetidos a teste de normalidade seguido de um pós-teste, utilizando o programa estatístico R versão 3.2.5. Para o GVF a técnica não permitiu a entrada ao interior do útero com o aparelho, devido a ausência de expansão cervical associado à presença de muco no canal cervical, dificultaram a visualização. A insuflação da cavidade vaginal do GVS possibilitou a visualização da entrada do óstio cervical com facilidade, com a deposição do sêmen no interior do útero sem a fixação cervical em 10% dos animais (1/10). O número de anéis transpassados diferiu de acordo com o grupo experimental. Para o tempo de procedimento o GVF apresentou maior tempo de manipulação, quando comparado com os demais grupos. O fibrinogênio sérico aumentou nas três primeiras coletas que sucederam a IA do GVS, reduzindo após esse período. A taxa de prenhez não diferiu entre os grupos, sendo de 20% para o GC e 10% para os demais. Conclui que a vaginoscopia pode auxiliar na passagem cervical, favorecendo a deposição do sêmen no interior do útero de animais sincronizados, servindo de base para novos estudos de IATF em pequenos ruminantes.

Palavras-chave: Cérvix, ovelha, sincronização de cio, tração cervical, vaginoscopia

ENDOSURGERY RESOURCE FOR STUDIES OF TRANSCERVICAL ARTIFICIAL INSEMINATION IN SHEEP

ABSTRACT - The aim of this work was to develop a videocurgical resource for transcervical artificial insemination (AI) in sheep. Thirty Santa Ines ewes from 2 to 5 years old were all pluriparous, divided into three experimental groups: 1) AI by conventional cervical traction (CG) technique; 2) AI by video-vaginoscopy with insufflation (GVS) and; 3) Video-assisted AI with cervical fixation (GVF). During the procedure, the type of cervical ostium, number of cervical rings transversed, place of deposition of the semen in the reproductive tract, time of cervical manipulation, passage rate and plasma fibrinogen were registered as a marker of inflammatory reaction between the techniques. The gestational diagnosis was performed 21 days after the artificial insemination. All data were submitted to a normality test followed by a post-test, using the statistical program R version 3.2.5. For GVF the technique did not allow the entrance to the interior of the uterus with the device, due to the absence of cervical expansion associated with the presence of mucus in the cervical canal, diffculted the visualization. The insufflation of the vaginal cavity of the GVS facilitated the visualization of the entrance of the cervical ostium easily, with the deposition of the semen inside the uterus without cervical fixation in 10% of the animals (1/10). The number of rings transversed differed according to the experimental group. For the procedure time the GVF presented a longer handling time when compared to the other groups. Serum fibrinogen increased in the first three samples that succeeded the GVS AI, reducing after this period. The pregnancy rate did not differ between the groups, being 20% for the CG and 10% for the others. It concludes that the vaginoscopy can aid in the cervical passage, favoring the deposition of the semen inside the uterus of synchronized animals, serving as the basis for new studies of IATF in small ruminants.

Keywords: Cervix, sheep, estrus synchronization, cervical traction, vaginoscopy

1. INTRODUÇÃO

Dentre as biotecnologias reprodutivas utilizadas na ovinocultura, a inseminação artificial (IA) destaca-se por contribuir efetivamente com o melhoramento genético animal. Esta apresenta, na espécie ovina, resultados ainda variáveis e inconsistentes, o que dificulta sua aplicabilidade em rebanhos comerciais. Os baixos índices reprodutivos desse método podem ser elucidados principalmente pela anatomia da cérvix na espécie, tempo de manipulação cervical, local de deposição do sêmen, tipo de sêmen utilizado e habilidade do inseminador (KERSHAW et al., 2005; ANEL et al., 2006; ROBINSON et al., 2011; ARAUJO et al., 2016; CASALI et al., 2017).

O acesso ao útero das ovelhas por via transcervical é um dos fatores limitantes da técnica de IA transcervical, visto que nas ovelhas, ao contrário dos bovinos, não são possíveis a manipulação pelo reto, além de apresentarem óstio cervical estreito, com estruturas rígidas e tortuosas, tornando-se difícil a passagem da pipeta de inseminação, dificultando assim o emprego desta biotecnologia (KERSHAW et al., 2005; CASALI et al., 2017). Desta forma, técnicas como a fixação cervical com diversas pinças, tração cervical até o vestíbulo vaginal, sistema Guelph e o uso de fármacos para dilatação cervical vêm sendo estudados a fim de aprimorar a técnica, mesmo diante da conformação anatômica (FUKUI; ROBERTS, 1977; BUCKRELL et al., 1994; RADCLIFFE; WANG; LEWIS, 2004; ÁLVAREZ et al., 2012; BARTLEWSKI; CANDAPPA, 2015).

A vaginoscopia é um procedimento já descrito em bovinos, equinos, caninos, ovinos, caprinos e em humanos, com finalidade de diagnósticos e procedimentos terapêuticos, mostrando-se altamente efetiva (LULICH, 2006; LÉVY, 2006; MADDOZ, et al., 2010; FERRER, et al., 2012; SARDO et al., 2016). Com esse método é possível a observação direta das estruturas relacionadas e avaliação da cavidade vaginal, para fins diagnósticos e/ou tratamentos de forma minimamente invasiva, principalmente quando associada ao recurso videodiagnóstico (EASLEY et al., 2017; TISON et al., 2017, SILVA et al., 2015).

Em animais de companhia, a vaginoscopia é utilizada como método auxiliar para a caracterização do estágio do ciclo estral, bem como a realização de inseminação artificial transcervical, mostrando-se eficiente quando comparado com a inseminação por laparotomia (MASON; ROUS, 2014). Na

reprodução de pequenos ruminantes, o recurso videocirúrgico é empregado com eficiência em repetidas aspirações foliculares por laparoscopia, podendo ser utilizado como método de diagnóstico de anormalidades ou doenças reprodutivas por meio da vaginoscopia (PADILHA et al., 2014; EASLEY et al., 2017).

Desta forma, sugere-se que a visualização do canal cervical por meio do endoscópio possa facilitar a transposição dos anéis cervicais, eliminando assim, a manipulação exagerada da cérvix ovina, diminuindo a liberação de mediadores inflamatórios e consequentemente aumentando a taxa de prenhez utilizando sêmen criopreservado.

O objetivo do presente estudo foi desenvolver recursos videocirúrgicos para a tentativa de transposição da cérvix com e sem fixação cervical, para inseminação artificial transcervical em ovinos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Biotecnologia da reprodução em ovinos

A ovinocultura vem apresentando um crescimento mundial considerável, principalmente nos países em desenvolvimento como o Brasil. O rebanho nacional de ovinos ultrapassa atualmente os 18 milhões de cabeças, onde 60,6% deste rebanho encontram-se na região nordeste e 26,5 % na região sul do País (IBGE, 2015).

O uso das biotécnicas vem sendo cada vez mais empregado comercialmente e destaca-se por representar uma maior amplitude de resultados no desenvolvimento zootécnico, genético e sanitário. Entretanto, apenas algumas dessas técnicas são realmente aplicáveis aos rebanhos brasileiros. Apesar de seu potencial no incremento à produtividade, as restrições se dão ao elevado custo de equipamentos, mão-de-obra qualificada e resultados ainda não satisfatórios (VARAGO et al., 2009; OLIVEIRA, et al., 2011; CASALI, et al., 2017).

2.2. Morfologia da cérvix ovina

A morfologia da cérvix ovina é um dos entraves na reprodução da espécie quando se trata de biotecnologia da reprodução, como por exemplo a IA, existindo uma grande variabilidade entre raças, idade e estado fisiológico, tornando-se um trabalho pouco eficaz e ineficiente. Essa complexidade anatômica diminui a taxa de penetração em 50%, em função da variabilidade individual e habilidade do inseminador (VERBERCKMOES et al., 2001).

O óstio cervical externo é a primeira barreira a ser vencida pelo aplicador de sêmen, podendo ser classificado em cinco tipos: (1) bico de pato, onde duas pregas cervicais opostas salientam-se em direção a vagina; (2) liso, com nenhuma protrusão em direção a vagina; (3) roseta, que apresenta um conjunto de pregas cervicais em direção a vagina, ocluindo a entrada do óstio cervical; (4) papila, em que uma prega cervical protrui em direção a vagina; e (5) flap, onde uma prega cervical protrui em direção vaginal, recobrando parcialmente ou completamente o óstio cervical (KERSHAW et al. 2005). Na raça Santa Inês, o óstio tipo bico de pato apresenta maior prevalência, perfazendo 46% e 51% segundo Franco et al. (2014) e Cruz Júnior (2006) respectivamente. As demais classificações não apresentam padrão, variando entre si.

O canal cervical é composto de 4 a 7 anéis cervicais, formando um lúmen convoluto e tortuoso. Estes possuem suas extremidades voltadas caudalmente, dificultando a transposição do aplicador de sêmen (KAABI et al., 2006). A raça Santa Inês, apresenta número menor de anéis cervicais, variando de 2 a 7 anéis ($4,70 \pm 1,05$ anéis) distribuídos em uma cérvix que varia de 2,49 cm a 5,77 cm de comprimento ($4,13 \pm 1,63$ cm), com diâmetro médio de $2,18 \pm 0,84$ mm para o primeiro anel a $2,23 \pm 1,36$ mm para o último anel. Em animais onde a raça é indefinida, o diâmetro do óstio cervical foi descrito apresentando 6,8 mm (KAABI et al., 2006; MOURA et al., 2011; FRANCO et al., 2014).

2.3. Sincronização hormonal

Em ovinos fora da estação de acasalamento se faz necessário a indução do estro com ovulação por meio de protocolos hormonais, apresentando grande impacto sobre a exploração de animais com estacionalidade reprodutiva. A indução do estro pode ser eficientemente obtida por meio da utilização de progestágenos, em associação às gonadotrofinas e prostaglandinas (TEXEIRA et al., 2016). A gonadotrofina coriônica equina (eCG) é a mais utilizada em protocolos de sincronização de estro, visto que a gonadotrofina coriônica humana (hCG) é utilizada em animais submetidos a repetidas induções e apresenta altos níveis de anticorpos anti-eCG (BARIL et al., 1996; FONSECA et al., 2007). Protocolos de seis dias utilizando progestágeno têm demonstrado elevada eficiência com relação ao percentual de animais em estro (SOUZA et al., 2007; TEXEIRA et al., 2016).

Diversas são as fontes de progestágenos que podem ser utilizadas em protocolos de sincronização. As mais comumente utilizadas na ovinocultura são os dispositivos intravaginais de liberação lenta de progesterona (P4) e a esponja impregnada com medroxiprogesterona. Outras fontes são descritas na literatura, como as esponjas impregnadas com acetato de fluorogesterona (FGA), implantes auriculares de norgestomet, ou ainda, administrações orais diárias de melengestrol (SAFRANSKI et al., 1992; GÓMEZ et al., 2006; SOUZA et al., 2007; FONSECA et al., 2009).

Os estudos sobre protocolos hormonais ganhou grande avanço com a introdução da ultrassonografia, possibilitando aumentar os conhecimentos

sobre a dinâmica folicular ovariana e avançar os conhecimentos sobre protocolos mais eficientes. Comparando protocolos de 6, 9 e 12 dias de progestágenos, com aplicação de prostaglandina e eCG um dia antes da retirada do progestágeno, pode-se observar que nos três protocolos em torno de 70 a 90 % do rebanho manifestou cio, com uma melhor sincronia de ovulação no protocolo de 9 dias(MENCHACA, et al., 2009; MENCHACA, et al., 2010; TEXEIRA, et al., 2016).

2.4. Inseminação artificial em ovinos

A inseminação artificial (IA) é o procedimento de deposição do sêmen dentro do aparelho reprodutivo da fêmea, contudo, abrange inúmeras atividades, desde a seleção do reprodutor com a colheita de sêmen, método de conservação, até a seleção e preparação das fêmeas, além da técnica para a deposição do sêmen propriamente dita (OLIVEIRA, FONSECA 2013). A IA nos ovinos pode ser classificado de acordo com o local de deposição do sêmen no aparelho reprodutor da fêmea em: vaginal, cervical superficial, cervical profunda e intrauterina (DONAVAN et al., 2004).

A técnica de IA pode ser realizada utilizando três modalidades de sêmen: fresco, resfriado ou criopreservado, com resultados variáveis de acordo com a dose inseminante, local de deposição, habilidade do técnico, momento da inseminação em relação a ovulação, manejo nutricional e sanitário, técnica utilizada e o nível tecnológico e infraestruturas da propriedade (Bicudo et al., 2005).

Tal tecnologia, quando executada corretamente, permite maior controle dos animais, podendo identificar os improdutivos, concentrar os partos, constância e lotes mais homogêneos para atender o mercado consumidor (AX, et al., 2000).

2.4.1. Inseminação artificial vaginal

A IA vaginal é a técnica mais simples da modalidade, uma vez que não necessita localizar nem transpassar o óstio cervical, depositando o sêmen na região mais profunda da vagina. Entretanto, apresenta resultados variáveis de acordo com o tipo de sêmen utilizado, sendo comumente realizada com o sêmen fresco ou resfriado, com alta concentração espermática (OLIVEIRA, FONSECA 2013).

A importância da utilização de sêmen fresco para essa técnica é comprovada quando se compara a taxa de prenhez. Segundo Masoudi e colaboradores (2017), a taxa de prenhez pode variar de 4 a 62% utilizando sêmen criopreservado ou fresco respectivamente, ambos com deposição na região vaginal.

2.4.2. Inseminação artificial cervical

A IA cervical consiste na deposição do sêmen no interior da cérvix. Pode ser classificada de acordo com a profundidade em cervical superficial e cervical profunda (TAQUEDA, et al., 2011).

A técnica apresenta graus variados de fertilização, com eficiência de acordo com o local de deposição do sêmen, notando-se aumento na taxa de prenhez na medida em que o sêmen é depositado mais cranialmente em direção ao útero. Entretanto, em poucas fêmeas consegue-se essa penetração completa da cérvix, diferindo diretamente na taxa de prenhez, perfazendo de 15 a 25% quando não se consegue a transposição total da cérvix e 45% de prenhez quando depositado no interior do útero, com utilização de sêmen criopreservado (GUNDUZ et al., 2010; MONREAL et al., 2011; TAQUEDA et al., 2011).

Os anéis inter digitalizados dificultam a penetração cervical nessa espécie animal, sendo o fator limitante da técnica. O alinhamento cervical é influenciável pela raça, idade, ordem de parto, estágio do ciclo estral e dilatação luminal, sendo constantemente desenvolvidos metodologias para facilitar a transposição cervical (OLIVEIRA, FONSECA, 2013).

Devido a problemática anatômica para a IA transcervical na espécie ovina, diversas técnicas são estudadas para aperfeiçoar a executabilidade desta biotecnologia. Métodos de posicionamento do animal como o decúbito dorsal (método de Guelph), e o auxílio de um espéculo tubular (30 mm de diâmetro), a cérvix é localizada, fixada com uma pinça modelo Bozemann para então entrar com um aplicador de sêmen (OLIVEIRA, FONSECA, 2013).

O posicionamento do animal e a associação do uso de pinças para o tracionamento cervical até o vestíbulo vaginal são estratégias utilizadas para diminuir a sinuosidade da cérvix e facilitar a penetração da mesma. O desenvolvimento de aplicadores com diversas angulações visa melhor penetrabilidade, entretanto com resultados ainda insatisfatórios (FUKUI;

ROBERTS, 1977; BUCKRELL et al., 1994; RADCLIFFE; WANG; LEWIS, 2004; ÁLVAREZ et al., 2012).

O uso de fármacos para a dilatação cervical é uma ferramenta que vem sendo estudado para facilitar a transposição do aplicador de sêmen, podendo ser uma alternativa para ser utilizada em conjunto com as técnicas de IA (STELLFLUG, et al. 2001; BARTLEWSKI; CANDAPPA, 2015). Barbas et al. (2003) estudaram o efeito desses agentes para a realização da IA transcervical, utilizando substâncias como o antagonista da progesterona (aglépristone), o análogo sintético da prostaglandina E1 (misoprostol) e um agonista β -adrenérgico (terbutalina). Os autores notaram que a associação de misoprostol e terbutalina é mais efetiva para a dilatação cervical do que seu uso isolado. Em raças Dorper, o uso do misoprostol aumentou significativamente a transposição cervical quando comparado com um grupo sem dilatador (GUSMÃO et al. 2009).

2.4.3. Inseminação laparoscópica

A IA intrauterina por laparoscopia é uma técnica cirúrgica que permite a deposição do sêmen no útero por meio de uma pequena incisão na cavidade abdominal, evitando a anatomia da cérvix. A principal vantagem desta técnica é a deposição do sêmen próximo ao local de fecundação do oócito, minimizando assim, a problemática da viabilidade pós-descongelamento, todavia, necessita de profissionais qualificados e equipamentos específicos, além da necessidade de submeter o animal a um protocolo anestésico, bem como a um posicionamento prejudicial às funções cardiorrespiratórias durante o procedimento (GHALSASI e NIMBKAR, 1996; LUCIDI et al., 2001; FERANTI, et al., 2013).

Para minimizar os riscos do posicionamento de Trendelenburg, está sendo testada a inseminação por laparoscopia em posição quadrupedal, mostrando-se efetiva e menos estressante ao animal. Contudo os autores relatam que a grau de dificuldade é maior quando comparada com a laparoscopia convencional em decúbito dorsal (FERANTI, et al., 2013).

Com o objetivo de avaliar dois métodos de IA (transcervical e laparoscópica), 70 ovelhas multíparas da raça Corriedale foram submetidas ao mesmo protocolo se sincronização de cio e não apresentaram diferença entre os dois métodos, perfazendo 40% de concepção (RABASSA et al., 2007). Se

tratando de sêmen criopreservado, a técnica mais economicamente viável é a laparoscópica, contudo os custos com a mão de obra especializada a torna inviável para alguns rebanhos comerciais (CARDOSO, et al., 2009).

2.5. Alternativas para inseminação transcervical

A técnica de inseminação transcervical assistida por endoscopia foi desenvolvida na Nova Zelândia por Marion Wilson, tendo como vantagem a visualização direta do óstio cervical (WILSON, 1993), sendo mais empregada para a inseminação em animais de companhia. Macedo (2009), estudando esse artifício, inseminou 10 cadelas da raça Golden Retriever obtendo 90% de gestação confirmada, mostrando que a técnica é viável para ser utilizada na reprodução de cadelas.

Colagross-Schouten et al. (2014), utilizando a técnica de endoscopia transcervical em cabras, obtiveram bons resultados para a introdução de compostos contraceptivos no interior do útero de 15 animais, sendo um procedimento atraumático quando comparado com a tentativa de penetração com uma simples cânula.

Easley et al. (2017) descreveram uma técnica de vídeo vaginoscopia para a realização de biopsia vaginal, sendo considerada altamente efetiva com mínimo desconforto aos animais. Tal metodologia para IA transcervical em ovinos é ausente na literatura, podendo ser estudada, com o objetivo de evitar o tracionamento cervical até o vestíbulo vaginal e minimizar os procedimentos cirúrgicos para a realização desta biotecnologia, tornando-se uma técnica que proporcione melhor bem-estar animal.

2.6. Proteínas de fase aguda

A mensuração das proteínas de fase aguda permite avaliar de forma rápida a detecção de uma reação inflamatória, quando comparado com outros marcadores, como as células da linhagem hematopoiética da série branca, os leucócitos e neutrófilos (MURATA et al., 2004; PETERSEN et al., 2004).

Em ovinos, as proteínas de fase aguda como o fibrinogênio plasmático, pode ser utilizado para monitorar processos inflamatórios, traumas cirúrgicos e até mesmo o bem-estar animal, cuja resposta é mais sensível e rápida quando comparada com a leucocitária (JAIN, 1993; MURATA et al. 2004; MURATA, 2007; TAYLOR, 2010). O fibrinogênio plasmático é determinado de forma

rápida e barata, sendo um parâmetro utilizado para comparar processos inflamatórios entre técnicas de IA (OLIVEIRA, et al. 2018).

Trabalhos anteriores descrevem que a penetração do aplicador de sêmen em conjunto com a manipulação cervical pode levar a lesões no epitélio, desencadeando uma reação inflamatória com capacidade de alterar as taxas de concepção, devido ao aumento da síntese de prostaglandinas e citocinas (CAMPBELL et al., 1996; RADCLIFFE; WANG; LEWIS, 2004; SCENNA et al., 2005; TAQUEDA et al., 2011; MOURA et al., 2011). Entretanto, Alvares et al. 2016, constataram que os níveis séricos de interleucina-10 e interferon gama não são capazes de influenciar na taxa de prenhez, quando se realiza a tração cervical em ovinos da raça Santa Inês.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Este trabalho objetivou estabelecer uma técnica de inseminação artificial com e sem fixação cervical utilizando recursos videocirúrgicos para transposição da cérvix em ovinos Santa Inês.

3.2. Específicos

Utilizar a vaginoscopia como método alternativo para inseminação intrauterina sem a tração cervical.

Com a óptica, assistir a entrada bem como a sinuosidade cervical, a fim de diminuir a manipulação da cérvix.

Mensurar os níveis de fibrinogênio para determinar possível reação inflamatória decorrente do procedimento de IA.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (protocolo 9.214/16), executada na cidade de Jaboticabal, São Paulo (21° 15'17"S, 48° 19'20"W) nos meses de janeiro a fevereiro de 2017, seguindo os preceitos da Sociedade Brasileira de Experimentação Animal.

Foram utilizadas trinta ovelhas pluríparas da raça Santa Inês, de 3 a 5 anos de idade, oriundas de rebanho comercial, distribuídas em três grupos experimentais de acordo com a técnica de IA: convencional com tração cervical, como grupo controle (GC, n=10), videoassistida com fixação cervical (GVF, n=10) e por vaginoscopia com insuflação vaginal e sem fixação cervical (GVS, n=10).

Os animais apresentavam escore de condição corporal médio de $2,9 \pm 0,3$; $2,6 \pm 0,3$ e $2,8 \pm 0,4$ para os GV, GVF e GVS respectivamente na escala 1-5 (FERNANDES; OLIVEIRA; QUEIROZ, 2016), com peso médio corporal de $45 \pm 4,6$ Kg para os três grupos, consideradas híginas após realização de exame clínico e ultrassonográfico dos órgãos do sistema reprodutivo. Os animais foram mantidos confinados em aprisco, com acesso *ad libitum* à água e sal mineral, e com ração balanceada (silagem de milho/concentrado comercial – 14 % PB e 65% NDT).

Todos os animais foram submetidos a um protocolo curto de seis dias de progesterona (0,33 g de progesterona - CIDR[®], Pfizer, Brasil) associado à prostaglandina (37,5 µg de cloprostenol sódico - Sincrocio[®] Ourofino, Brasil) e gonadotrofina coriônica equina (300 UI de eCG - Novormon[®] Zoetis, Brasil), como demonstrado na Figura 1 (TEXEIRA et al., 2016). As inseminações foram realizadas de 48 a 55 horas após a retirada do dispositivo de progesterona, utilizando-se sêmen descongelado de um carneiro oriundo de uma central de biotecnologia.

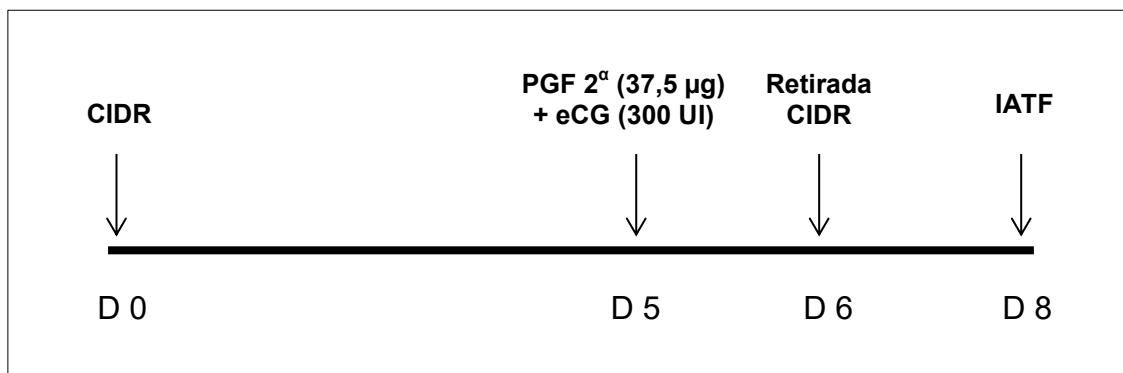


Figura 1: Ilustração de esquema do protocolo curto de sincronização de cio e inseminação artificial em ovinos (TEXEIRA et al., 2016).

Para o GC, os membros posteriores do animal foram elevados sobre um cavalete de 80 cm de altura, sendo realizada previamente a limpeza da região perineal com álcool 70% e papel toalha descartável. Na sequência, um espécule vaginal de 15 cm foi utilizado para a abertura e melhor visualização da cérvix, onde, neste momento, instilou-se 2 mL de cloridrato de lidocaína (2%) no fundo vaginal, aguardando um minuto para o início do procedimento. Com auxílio de uma fonte de luz externa, a cérvix foi visualizada, classificada, apreendida com uma pinça tipo Allis (25 cm) e então tracionada até o vestibulo vaginal. Um mini aplicador para ovinos (13 cm de comprimento e 2 mm de diâmetro) foi utilizado para a passagem cervical. Quando o interior do útero fosse alcançado ou transcorrido três minutos de manipulação cervical, o sêmen descongelado era depositado por meio do aplicador de sêmen, ou no local de maior progressão (Figura 2 – A).

Para o GVF, os animais tiveram o mesmo procedimento de higienização e protocolo de bloqueio local do grupo controle, posicionando-os sobre a perna de um auxiliar. Com auxílio de endoscópio rígido de 2,7 mm de diâmetro e 17,5 cm de comprimento com ângulo de visão 10° (Storz®) inserida a uma bainha de proteção, totalizando 3,5 mm de diâmetro, acoplado a uma fonte de luz de LED, foi utilizada para visualizar e classificar o óstio cervical. Utilizando-se uma pinça de Allis (25 cm), o óstio cervical foi apreendido para dar sustentação à entrada do endoscópio na cérvix. As imagens foram transmitidas a um monitor em tempo real, objetivando-se visualizar o canal cervical e a deposição do sêmen. Assim que transpassado todos os anéis cervicais ou transcorrido cinco minutos de tentativa, o endoscópio foi retirado e o sêmen descongelado foi depositado por meio da bainha de proteção, no local de maior progressão (Figura 2 – C).

A vaginoscopia do GVS foi realizada com os membros posteriores do animal elevado a 80 cm de altura, sobre um cavelete, seguido o mesmo procedimento de antissepsia dos outros grupos, sem a realização do bloqueio local. Um único portal laparoscópico de múltiplos acessos - multiport (Sitracc Less, Edlo) foi inserido no vestíbulo vaginal com auxílio de um lubrificante não espermicida. Após o posicionamento do multiport, uma mangueira foi conectada ao insuflador videocirúrgico, promovendo a insuflação da cavidade vaginal com gás carbônico (CO₂) na velocidade de 6 L/minuto a uma pressão de 10 mmHg, como estabelecido em trabalho piloto. Um endoscópio rígido de 5 mm de diâmetro, 17,5 cm de comprimento e ângulo de visão 0°, acoplado a uma câmera e a um cabo de fibra óptica, foi utilizado para avaliar a cavidade vaginal e o óstio cervical. Sequencialmente um aplicador de sêmen comercial (31 cm) de caprinos foi inserido em um dos canais de trabalho do trocater multiport, para passagem cervical, sendo todo o procedimento visualizado em um monitor. A deposição do sêmen foi realizada assim que todos os anéis cervicais foram transpassados transcorridos três minutos de manipulação cervical (Figura 2 – B).

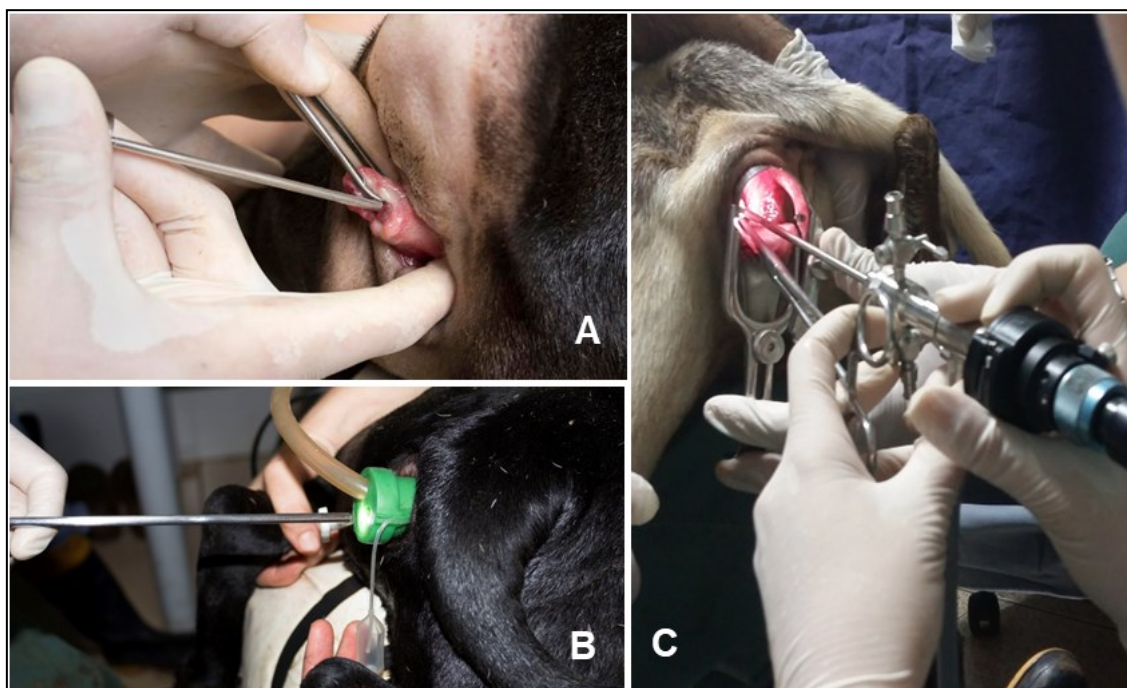


Figura 2: Técnicas de inseminação artificial transcervical em ovinos da raça Santa Inês. Imagens: (A) Grupo controle - GC; (B) Grupo vaginoscopia sem fixação cervical com insuflação vaginal - GVS; (C) Grupo videoassistido com fixação cervical – GVF.

O início do tempo de procedimento da IA foi determinado desde o pinçamento da cérvix nos grupos GC e GVF e, do momento que se obteve a pressão de CO₂ preconizada para o GVS, até o momento da retirada do aplicador de sêmen.

Os óstio cervicais foram classificados de acordo com Kershaw et al. (2005) em: bico de pato, flap, lisa, papila ou roseta. A contagem de anéis transpassados foi mensurada de acordo com a progressão do aplicador ou da bainha e endoscópio, e a classificação do local de deposição do sêmen de acordo com o número de anéis transpassados, sendo categorizada de acordo com Taqueda et al. (2011) em: cervical superficial (até o 3º anel), cervical profunda (após o 3º anel) e intrauterina, obtendo-se assim, a taxa de passagem cervical.

Para avaliação do processo inflamatório, foram coletadas sete amostras sanguíneas em sete momentos: 5 minutos antes da IA, 20 minutos, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a IA. As amostras foram coletadas por meio da venopunção jugular, utilizando tubos de vácuo contendo EDTA (Vacutainer, BD, Juiz de Fora, Brasil), imediatamente centrifugadas a 1500g por 10 minutos. O plasma foi coletado e armazenado em micro tubos mantidos a -80°C até a realização das dosagens. O fibrinogênio plasmático foi analisado pelo método descrito por Millar et al. (1971), por meio de precipitação pelo calor a 56°C e leitura em refratômetro manual com valores expressos em mg/dL.

A confirmação da gestação foi realizada 21 dias após a IA, por meio da ultrassonografia transretal utilizando um aparelho MyLabTM 30VET (Esaote S.p.A., Genova, Ligúria, Itália), com transdutor linear de 7,5 MHz.

Os dados coletados foram submetidos ao teste de normalidade (Shapiro teste). O número de anéis transpassados, o local de deposição do sêmen e o fibrinogênio plasmático foram comparados entre as técnicas de IA pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunns. O tempo de manipulação cervical foi comparado pela análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. A taxa de prenhez foi comparada pelo teste Qui-quadrado. Os valores de fibrinogênio foram calculados como a variação deste parâmetro dos demais momentos em porcentagem (basal sendo considerado como 0). Estas análises foram realizadas pelo programa estatístico R (versão 3.2.5) e considerados significativos os valores de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

Os animais utilizados neste estudo apresentaram maior proporção de óstio cervical do tipo papila (33% = 10/30), seguido pelos tipos lisa (23% = 7/30), roseta (20% = 6/10), flap (17% = 7/30) e bico de pato (7% = 2/30).

O número de anéis transpassados durante as inseminações artificiais diferiram ($p=0,0065$) entre os grupos. No GC, foram transpassados $3,5 \pm 3,3$ anéis, sendo maior em relação ao GVF e GVS com médias de $1,0 \pm 0,3$ e $1,6 \pm 1,2$ anéis respectivamente, perfazendo uma taxa de passagem de 20% (2/10) para o GC e 10% (1/10) para o GVS, sem sucesso no grupo GVF ($p=0,7494$).

Nos grupos GVS e GVF a deposição do sêmen foi realizada na região superficial da cérvix, diferindo ($p=0,0035$) do GC, no qual a deposição ocorreu principalmente entre a porção média e intrauterina.

A taxa de prenhez foi de 20% (2/10) para o GC e 10% (1/10) para os grupos GVS e GVF, não sendo estatisticamente significativas ($p=0,7494$).

O tempo de inseminação (em segundos) foi maior ($p=0,0016$) no GVF (249 ± 101) do que nos grupos GC (158 ± 50) e GVS (129 ± 29).

O fibrinogênio plasmático apresentou valores dentro do intervalo aceito para espécie (100 a 500 mg/dL), entretanto foi observado um aumento entre 20 minutos até 24 horas após a inseminação ($p=0,0017$) no GVS, reduzindo após esse período em todos os grupos ($p=0,003$), sendo menor no GC após 72 horas e até o final do período experimental ($p=0,006$) (Figura 3).

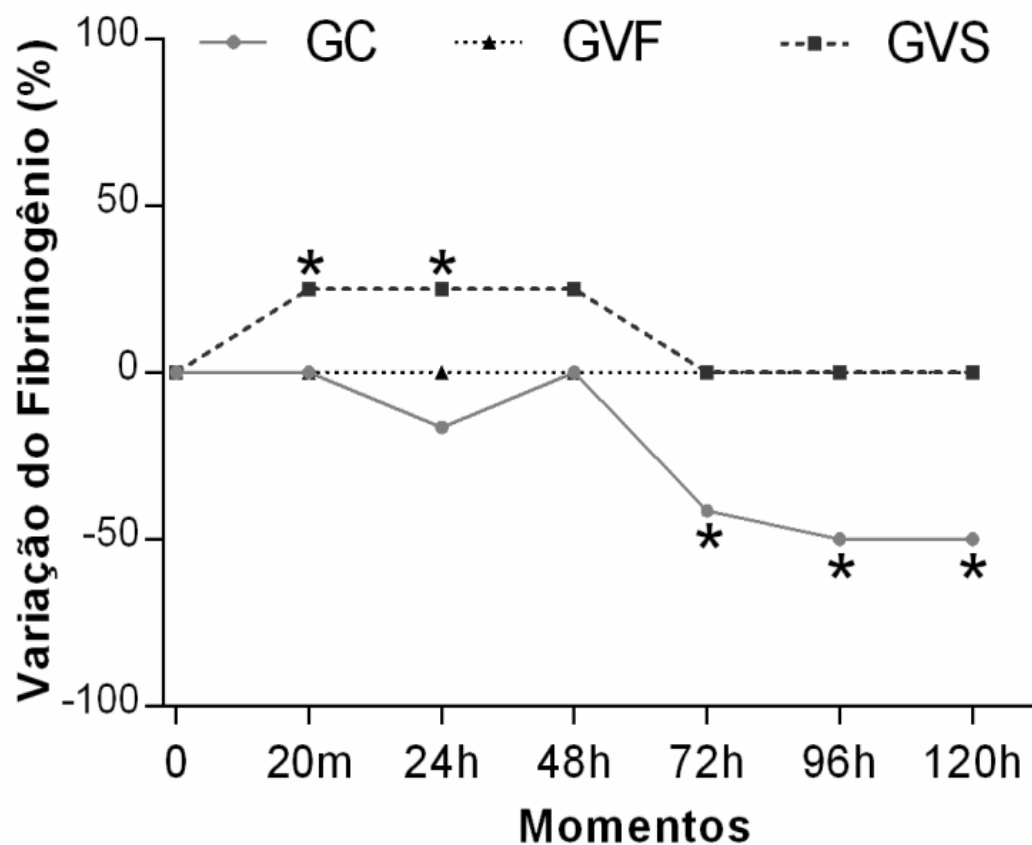


Figura - 3. Concentrações plasmáticas de fibrinogênio de ovelhas da raça Santa Inês submetidas à inseminação artificial transcervical. GC: Grupo controle (n=10); GVS: Grupo vaginoscopia sem fixação cervical com insuflação vaginal (n=10); GVF: Grupo vídeoassistido com fixação cervical (n=10). Sendo o momento 0 antes da inseminação artificial, seguido por 20 minutos, 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a IA. (*) Difere entre momentos ($p=0,001$). A variação deste parâmetro foi calculada e convertida em porcentagem, não apresentando valores fora do preconizado pela espécie 100 a 500 mg/dL⁻¹ (JAIN, 1993).

6. DISCUSSÃO

A classificação do óstio cervical nos animais é considerada de relativa facilidade. Com as técnicas empregadas nesse estudo, a vaginoscopia permitiu uma visualização completa e mais detalhada da cavidade vaginal quando comparada com as demais. De acordo com Easley et al. (2017), a vaginoscopia possibilita uma perfeita visualização das estruturas, causando mínimo desconforto aos animais, possibilitando visualizar e localizar a abertura do óstio cervical sem o pinçamento e tracionamento da cérvix até o vestíbulo vaginal, proporcionando melhor bem-estar animal.

A frequência do tipo de óstio cervical nesse experimento diferenciou de outros estudos relatados na literatura, apresentando maior frequência a do tipo papila e menor para o tipo bico-de-pato. Franco et al. (2014), utilizando a mesma raça do presente estudo, notaram que o óstio com a maior prevalência (46%) é o tipo bico-de-pato, mostrando quão variável são os tipos cervicais. Isso pode ser devido à ausência de seleção animal por tipo cervical, a qual apresenta grande variabilidade. Devido a falta de repetibilidade, assim como demonstrado por Moura et al. (2011), torna-se a transposição do óstio cervical o primeiro entrave, tornando o procedimento com alto grau de dificuldade.

O acesso ao útero de cabras com um endoscópio rígido permitiu a visualização e a transposição cervical, podendo ser considerado um procedimento atraumático, como relatado por Schouten et al. (2014). Em ovinos, a técnica com o endoscópio rígido apresentou dificuldade para a visualização do canal cervical, isso devido ao estágio do ciclo estral, pois todos os animais apresentavam grande quantidade de muco cervical, o que acabou inviabilizando a progressão do endoscópio por meio da cérvix. Sugere-se realizar a aspiração do muco cervical durante o procedimento para facilitar a visualização e o acesso ao útero.

As técnicas utilizando os recursos videoendoscópicos apresentaram menor transposição dos anéis, ($p=0,0065$) quando comparado com o GC. Tal resultado pode ser explicado pelo diâmetro do equipamento utilizado, podendo ser o fator limitante da técnica, pois o diâmetro da óptica utilizado foi maior que o aplicador comercial e maior que o diâmetro cervical relatado por Franco et al. (2014).

O local de deposição do sêmen de acordo com as técnicas empregadas não apresentou diferença na taxa de gestação, perfazendo uma média global

de 13%, resultado semelhante ao obtido por Rekha et al. (2016). Esses resultados podem ser atribuídos a alguns fatores: habilidade do inseminador, momento da IA e tipo de sêmen. A prática e a familiaridade do técnico com a metodologia empregada para a inseminação estão diretamente relacionadas com a taxa de prenhez (NOGUEIRA et al., 2011; ARAUJO et al., 2017).

Texeira e colaboradores (2016) comprovaram com estudos da dinâmica folicular com o mesmo protocolo hormonal utilizado que, as ovulações ocorrem entre 56 e 83 horas após a retirada do dispositivo de progesterona. Dessa forma, as IA no presente trabalho ocorreram precocemente às ovulações e, associado à baixa sobrevivência dos espermatozoides criopreservado contribuíram para o baixo índice de prenhez (DONAVAN et al., 2004; REKHA et al., 2016).

Sêmen criopreservado ovino deve ser utilizado em técnicas para deposição no interior do útero, caso contrário, os resultados são altamente variáveis. Masoudi et al. (2017), compararam a taxa de fertilização do sêmen criopreservado com o local de deposição no trato reprodutivo, e concluíram que quando depositado na região vaginal, a taxa de fertilização é de 4%, e quando a deposição ocorre no interior do útero essa taxa aumenta em onze vezes. Dessa forma nota-se a necessidade em realizar a deposição no interior do útero para obtenção de melhores resultados.

O menor tempo de manipulação cervical entre os grupos deu-se devido à facilidade em observar a entrada do óstio cervical, seja pelo tracionamento cervical, seja pela videovaginoscopia após a insuflação. Esta é uma técnica relatada por Easley et al. (2017) com êxito na realização de biópsia intravaginal, entretanto, utilizaram protocolo anestésico com velocidade e pressão de CO₂ menores que a do presente estudo.

O menor tempo de manipulação cervical entre os grupos, se deu devido à facilidade em observar a entrada do óstio cervical, seja pelo tracionamento cervical, seja pela videovaginoscopia após a insuflação. Esta é uma técnica relatada por Easley et al. (2017) com êxito na realização de biópsia intravaginal, entretanto, utilizaram protocolo anestésico com velocidade e pressão de CO₂ menores que a do presente estudo. Silva et al. (2014) em procedimento de ressecção de uma neoplasia vaginal em cadela, utilizou a mesma pressão de 10 mmHg para a vaginoscopia, mostrando-se viável a realização do procedimento desta forma. Durante o procedimento os animais

não manifestaram desconforto, inferindo que o procedimento de anestesia para IA, não se faz necessário, reduzindo o valor da técnica aumentando a aplicabilidade.

Em todos os grupos, o tempo de manipulação cervical não influenciou na taxa de prenhez assim como relatado por Taqueda et al. (2011). Para esses autores não foi observada influência do tempo, mas sim da dificuldade em transpassar os anéis cervicais.

Os valores de fibrinogênio plasmático apresentaram-se dentro dos limites normais estabelecidos para ovinos (JAIN, 1993). Entretanto, o GVS apresentou nos dois primeiros momentos após a IA, valores superiores aos outros dois grupos, sugere-se que o aumento de fibrinogênio tenha ocorrido pela insuflação vaginal com o CO₂. Segundo Sabes e colaboradores (2017), fibrinogênio, mostra-se como um indicador sensível para reação inflamatória em ruminantes. A diminuição dos valores na coleta de 72 horas após o procedimento do GVS foi semelhante ao observado em colheita de embrião pelo método transcervical, mostrando que tais procedimentos não causam elevação do fibrinogênio acima dos valores estabelecidos para a espécie (OLIVEIRA et al., 2018).

7. CONCLUSÃO

A vaginoscopia como recurso videocirúrgico utilizado para transposição cervical mostrou-se promissora, pois o acesso ao útero foi alcançado sem o tracionamento cervical em um pequeno número de animais, necessitando de alterações para a melhoria da técnica, como realizar a aspiração do muco cervical durante o procedimento para facilitar a visualização e o acesso ao útero, entretanto deve se estudar as consequências de tal procedimento sobre a fertilidade dos animais.

A associação da técnica de vaginoscopia com a dilatação cervical devem ser avaliados em novas pesquisas, buscando-se assim otimizar novas ferramentas para o procedimento de IA transcervical.

8. REFERÊNCIAS

- ALVARES, C. T. G.; CRUZ, J. F.; ROMANO, C. C.; & BRANDÃO, F. Z. Serum profile of cytokines interferon gamma and interleukin-10 in ewes subjected to artificial insemination by cervical retraction. **Theriogenology**, v. 85, n. 7, p. 1262-1266, 2016.
- ÁLVAREZ, M.; CHAMORRO, C. A.; KAABI, M.; ANLE-LOPES, L.; BOIXO, J. C.; ANEL, E.; ANEL, L.; DE PAZ, P. Design and “in vivo” evaluation of two adapted catheters for intrauterine transcervical insemination in sheep. **Animal reproduction science**, v. 131, n. 3, p. 153-159, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.03.001>>.
- ANEL, L.; ALVAREZ, M.; MARTINEZ-PASTOR, F.; GARCIA-MACIAS, V.; ANEL, E.; DE PAZ, P. Improvement strategies in ovine artificial insemination. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 41, n. s2, p. 30-42, 2006. Disponível em: <[10.1111/j.1439-0531.2006.00767.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00767.x)>.
- ARAUJO, C. F. M.; SANTOS, G. L.; CAMPLESI, A.C.; ARAÚJO, C. M. F.; ARAUJO, G.H.M. the importance of inseminator in conception rate of FTAI programs in beef cattle. IN. VI International Symposium on Animal Biology of Reproduction, v. 14, n. 1, 2017, Campos do Jordão. **Resumos...** Campos do Jordão: Animal Reproduction Science, 2017. P. 291.
- AX, R. L.; DALLY, M. R.; DIDION, B. A.; LENZ, R. W.; LOVE, C. C.; VARNER, D. D.; BELLIN, M. E. Artificial insemination. **Reproduction in Farm Animals**, 7th Edition, p. 376-389, 2000.
- BARBAS, J.P.; GONÇALVES, S.C.; BAPTISTA, M.C.; MARQUES, C.C.; VASQUES, M.I.; HORTA, A.E.M. Effects of intravaginal application of cervical dilatation agents during oestrous follicular phase in ewes. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. Lisboa, v.98, n.548, p.185-188, 2003.
- BARIL, G.; REMY, B.; LEBOEUF, B.; BECKERS, J.F.; SAUMANDE, J. Synchronzation of estrus in goats: the relationship between eCG binding in plasma, time of occurrence of estrus and fertility following artificial insemination. **Theriogenology**. Montgomery, v.45, n.8, p.1553-1559, 1996.
- BARTLEWSKI, P M.; CANDAPPA, I. B. R. Assessing the usefulness of prostaglandin E 2 (Cervidil) for transcervical artificial insemination in ewes. **Theriogenology**, v. 84, n. 9, p. 1594-1602, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.08.007>>.
- BUCKRELL, B. C.; BUSCHBECK, C.; GARTLEY, C. J.; KROETSCH, T.; MCCUTCHEON, W.; MARTIN, J.; PENNER, W. K.; WALTON, J. S. Further development of a transcervical technique for artificial insemination in sheep using previously frozen semen. **Theriogenology**, v. 42, n. 4, p. 601-611, 1994. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90377-U](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90377-U)>.
- CAMPBELL, J.W.; HARVEY, T.G.; MCDONALD, M.F.; SPARKSMAN, R.I. Transcervical insemination in sheep: an anatomical and histological evaluatuion. **Theriogenology**, v. 45, p. 1535-1544, 1996. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0093-691X\(96\)00121-5](https://doi.org/10.1016/0093-691X(96)00121-5)>.
- CARDOSO, E.; DA CRUZ, J.F.; FERRAZ, R.C.N.; NETO, M.R.T.; DOS SANTOS, R.S. Avaliação econômica de diferentes técnicas de inseminação artificial em ovinos da raça Santa Inês. **Revista Brasileira de Ciência Agrárias**. Recife, v.4, n.2, p.217-222, 2009.
- CASALI, R.; PINCZAK, A.; CUADRO, F.; GUILLEN-MUNOZ, J. M.; MAZZALIRA, A.; MENCHACA, A. Semen deposition by cervical, transcervical and intrauterine route for fixed-time artificial insemination (FTAI) in the

ewe. **Theriogenology**, v. 103, p. 30-35, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.07.021>>.

COLAGROSS-SCHOUTEN, A.; ALLISON, D.; BRENT, L.; LISSNER, E. Successful Use of Endoscopy for Transcervical Cannulation Procedures in the Goat. **Reproduction in Domestic Animals**. Berlim, n.49, p.909–912, 2014.

CRUZ JÚNIOR, C.A. **Caracterização anatômica e histológica da cérvix de ovelhas da raça Santa Inês**. 2006, 46 p. Dissertação de mestrado em Ciências Agrárias – Universidade de Brasília. Brasília, 2006.

DONAVAN, A.; HANRAHAN, J. P.; KUMMEN, E.; DUFFY, P.; BOLAND, M. P. Fertility in the ewe following cervical insemination with fresh or frozen–thawed semen at a natural or synchronised oestrus. **Animal reproduction science**, v. 84, n. 3, p. 359-368, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2003.12.014>>.

EASLEY, J.; SHASA, D.; HACKETT, E. Vaginoscopy in Ewes Utilizing a Laparoscopic Surgical Port Device. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 30, n. 2, p. 290, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1155/2017/7404371>>.

FERANTI, J. P. S.; BRUN, M. V.; ZANELLA, E.; MESSINA, S. A.; SCHUH, R.; SANTOS, F. R.; BRAMBATTI, G. Viabilidade de duas novas técnicas para inseminação intrauterina laparoscópica em ovinos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 3, p. 687-693, 2013.

FERNANDES, A. F. A.; OLIVEIRA, J. A.; QUEIROZ, S. A. Body condition score in ruminants. **ARS Veterinaria**, v.32, n.1, p. 055-066, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.15361/2175-0106.2016v32n1p55-66>>.

FERRER, M. S.; LYLE, S. K.; PACCAMONTI, D. L.; ELITS, B. E.; HOSGOOD, G.; GODKE, R. A. Persistent Breeding-Induced Endometritis after Hysteroscopic Insemination in the Mare. **Reproduction in domestic animals**, v. 47, n. 5, p. 732-739, 2012. Disponível em: <10.1111/j.1439-0531.2011.01951.x>.

FONSECA, J.F.; SOUZA, J.M.G.; BRUSCHI, J.H. Sincronização de estro e superovulação em ovinos e caprinos. In: II Simpósio de Caprinos e Ovinos da EV-UFGM, 2007, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte. UFGM, 2007.

FONSECA, J.F.; SOUZA, J.M.G.; RIBEIRO, A.C.; RIBEIRO, D.A.S.; VIANA, J.H.M.; FACÓ, O. Estrus and fertility of anestrus Anglo-Nubian goats submitted to different synchronous protocols and given hCG five days after artificial insemination. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte, **Anais...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro Reprodução Animal (CD-ROM). 2009.

FRANCO, M. C.; DOS SANTOS, J. F.; MACIEL, T. A.; DUARTE NETO, P. J.; OLIVEIRA, D. Morphology of the cervix of Santa Ines adult sheep in luteal and follicular phases. **Ciência Animal Brasileira**, v. 15, n. 4, p. 495-501, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1089-6891v15i425173>>

FUKUI, Y.; ROBERTS, E. M. Repeatability of non-surgical intrauterine technique for artificial insemination in the ewe. **Theriogenology**, v. 8, n. 2-3, p. 77-81, 1977. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/0093-691X\(77\)90224-2](https://doi.org/10.1016/0093-691X(77)90224-2)>.

GHALSASI, P. M.; NIMBKAR, C. Evaluation of laparoscopic intrauterine insemination in ewes. **Small Ruminant Research**, v. 23, n. 1, p. 69-73, 1996.

GÓMEZ, J.D.; BALASCH, S.; GÓMEZ, L.D.; MARTINO, A.; FERNÁNDEZ, N. A comparison between intravaginal progestagen and melatonina implant treatments on the reproductive efficiency of ewes. **Small Ruminant Research**. Fort Valley, v.66, n.1-3, p.156– 163, 2006.

GUNDUZ, M.C.; TURNA, O.; CIRIT, U.; UÇMAK, M.; TEK, Ç.; SABUNCUB, A.; BACINOGLU, S. Lambing rates and litter size following

carazolol administration prior to insemination in Kivircik ewes. **Animal Reproduction Science**, v. 118, p. 32–36, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.06.001>>.

GUSMÃO, A.L.; SILVA, J.C.; BITTENCOURT, T.C.C.; MARTINS, L.E.P.; GORDIANO, H.D.; BARCOSA, L.P. Coleta transcervical de embriões em ovinos da raça Dorper no semiárido do Nordeste brasileiro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. Belo Horizonte, v.61, n.2, p.313-318, 2009.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Produção da Pecuária Municipal. v. 43, p.1-49, 2015 Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2015_v43_br.pdf> Acesso em: 22 jan. 2018.

JAIN, N.C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. 417p.

KAABI, M.; ALVAREZ, A.; ANEL, E.; CHAMORRO, C. A.; BOIXO, J. C.; PAZ, P.; ANEL, L. Influence of breed and age on morphometry and depth of inseminating cateter penetration in the ewe cervix: a postortem study. **Theriogenology**. Montgomery, v.66, p. 1876-1883, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.04.039>>.

KERSHAW, M. C.; KHALID, M.; MCGOWAN, M. R.; INGRAM, K.; LEETHONGDEE, S.; WAX, G.; SCARAMUZZI, R. J. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. **Theriogenology**, v. 64, n. 5, p. 1225-1235, 2005. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.02.017>>.

LÉVY, X. Videovaginoscopy of the canine vagina. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, supplement 1, p.31–36, 2016. Disponível em: <[doi:10.1111/rda.12785](https://doi.org/10.1111/rda.12785)>.

LUCIDI, P.; BARBONI, B.; MATTIOLO, M. Ram-induced ovulation to improve artificial insemination efficiency with frozen semen in sheep. **Theriogenology**, v. 55, p. 1797-1805, 2001.

LULICH, J. P. Endoscopic vaginoscopy in the dog. **Theriogenology**, v. 66, n. 3, p. 588-591, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.04.022>>.

MACEDO, S.P. **Inseminação artificial intra-uterina transcervical assistida por endoscopia em cadelas da raça Retriever do Labrador**. 2009. 70p. Dissertação de mestrado em ciência animal, na área de medicina e cirurgia veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, 2009.

MADOZ, L.V.; DE LA SOTA, R.L.; SUZUKI, K.; HEUWIESER, W.; DRILLICH, M. Use of hysteroscopy for the diagnosis of postpartum clinical endometritis in dairy cows. **Veterinary Record**, v. 167, p. 142–143, 2010.

MASON, S. J.; ROUS, N. R. Comparison of endoscopic-assisted transcervical and laparotomy insemination with frozen-thawed dog semen: A retrospective clinical study. **Theriogenology**, v. 82, n. 6, p. 844-850, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.06.014>>.

MASOUDI, R.; SHAHNEH, A. Z.; TOWHIDI, A.; KOHRAM, H.; AKBARISHARIF, A.; SHARAFI, M. Fertility response of artificial insemination methods in sheep with fresh and frozen-thawed semen. **Cryobiology**, v. 74, p. 77-80, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2016.11.012>>.

MASOUDI, R.; SHAHNEH, A. Z.; TOWHIDI, A.; KOHRAM, H.; AKBARISHARIF, A.; SHARAFI, M.; SHAHAB-EL-DEEN, M. A. M. M. Cervical dilation and improvement of reproductive performance in fat-tailed ewes via

cervical dilator treatments. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 6, n. 2, p. 93, 2017.

MENCHACA, A.; AVILARIÑO, M.; PINCZAK, A.; KMAID, S.; SALDAÑA, J. M. Progesterone treatment, FSH plus eCG, GnRH administration, and Day 0 Protocol for MOET programs in sheep. **Theriogenology**, v.72, p.477–483, 2009.

MENCHACA, A.; VILARIÑO, M.; CRISPO, M.; DE CASTRO, T.; RUBIANES, E. New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. **Reproduction, fertility, and development**, v.22, n.1, p.113–118, 2010.

MILLAR, H. R.; SIMPSON, J. G.; STALKER, A. L. An evaluation of the heat precipitation method for plasma fibrinogen estimation. **Journal of Clinical Pathology**, v. 24, n. 9, p. 827-830, 1971. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1136/jcp.24.9.827>>.

MONREAL, A. C. D.; MARTINS, C. F.; DE SOUZA, A. S.; DOS ANJOS, D. N. Deposição de sêmen congelado em ovelhas nativas pela técnica transcervical. **Agrarian**, v. 3, n. 10, p. 286-292, 2011.

MOURA, D. S.; LOURENÇO, T. T.; MOSCARDINI, M. M.; SCOTT, C. FONSECA, P. O.; SOUZA, F. F. Aspectos morfológicos da cérvix de ovelhas. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 33-38, 2011.

MURATA, H. Stress and acute phase protein response: an inconspicuous but essential linkage. *The Veterinary Journal*, London, v. 173, p. 473-474, 2007.

MURATA, H.; SHIMADA, N.; YOSHIOKA, M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *The Veterinary Journal*, London, v. 168, p. 28-40, 2004.

NOGUEIRA, E.; SILVA, A.; DIAS, A.; ITAVO, L.; BATISTOTE, E. Taxa de prenhez de vacas nelores submetidas a protocolos de IATF no Pantanal de MS. **Embrapa Pantanal-Circular Técnica (INFOTECA-E)**.

OLIVEIRA, F. C.; HAAS, C. S.; FERREIRA, C. E. R.; GOULARTE, K. L.; PEGORARO, L. M. C.; GASPERIN, B. G.; VIEIRA, A. D. Inflammatory markers in ewes submitted to surgical or transcervical embryo collection. **Small Ruminant Research**, v. 158, p. 15-18, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.11.012>>.

OLIVEIRA, M. E. F. State-of-the-art in the superovulation of ewes. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. Suppl. 1, p.29–35, 2011.

OLIVEIRA, M. E. F. **Técnicas de inseminação artificial em ovinos e caprinos**. São Paulo, 2009. Disponível em: <<http://www.farmpoint.com.br/radares-tecnicos/reproducao/tecnicas-de-inseminacao-artificial-em-ovinos-e-caprinos52391n.x>>.

PADILHA, L. C.; TEIXEIRA, P. P. M.; PIRES-BUTTLE, E. A.; APPARICIO, M.; MOTHEO, T. F.; SAVI, P. A. P.; VICENTE, W. R. R. In vitro maturation of oocytes from Santa Ines ewes subjected to consecutive sessions of follicular aspiration by laparoscopy. **Reproduction in domestic animals**, v. 49, n. 2, p. 243-248, 2014. Disponível em: <[10.1111/rda.12261](https://doi.org/10.1111/rda.12261)>.

PETERSEN, H. H.; NIELSEN, J. P.; HEEGAARD, P. M. H. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. **Veterinary Research**, v. 35, p. 163-187, 2004.

RABASSA, V. R.; TABELÃO, V. C.; PFEIFER, L. F. M.; SCHNEIDER, A.; ZIGUER, E. A.; SCHOSSLER, E.; SEVERO, N. C.; DEL PINO, F. A. B.; CORRÊA, M. N. Efeitos das técnicas transcervical e palaroscópica sobre a taxa

de prenhez de ovelhas inseminadas em tempo-fixado. **Ciência Animal Brasileira**, v. 8, n. 1, p. 127-134, 2007.

RADCLIFFE, M. C. W.; WANG, S.; LEWIS, G. S. Transcervical artificial insemination in sheep: effects of a new transcervical artificial insemination instrument and traversing the cervix on pregnancy and lambing rates. **Theriogenology**, v. 62, n. 6, p. 990-1002, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.12.031>>.

REKHA, A.; ZOHARA, B. F.; BARI, F.; ALAM, M. G. S. Comparison of commercial Triladyl extender with a tris-fructose-egg-yolk extender on the quality of frozen semen and pregnancy rate after transcervical AI in Bangladeshi indigenous sheep (*Ovis aries*). **Small Ruminant Research**, v. 134, p. 39-43, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2015.12.007>>.

ROBINSON, J. J.; MCKELVEY, W. A. C.; KING, M. E.; MITCHELL, S. E.; MYLNE, M. J. A.; MCEVOY, T. G.; WILLIAMS, L. M. Traversing the ovine cervix—a challenge for cryopreserved semen and creative science. **Animal**, v. 5, n. 11, p. 1791-1804, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1017/S1751731111000978>>.

SABES, A. F.; GIRARDI, A. M.; FAGLIARI, J. J.; DE OLIVEIRA, J. A.; MARQUES, L. C. Serum proteinogram in sheep with acute ruminal lactic acidosis. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2017.04.003>>.

SAFRANSKI, U.T.J.; LAMBERSON, W.R.; KEISLER, D.H. Use of melengestrol acetate and gonadotropins to induce fertile estrus in seasonally anestrous ewes. **Journal of animal science**. Penicuik Midlothian, n.70, v.10, p.2935-2941, 1992.

SARDO, A. D. S.; ZOZOLFI, B.; CALAGNA, G.; FLORIO, P.; NAPPI, C.; CARLO, C. D. Vaginoscopy for the diagnosis and treatment of vaginal lesions. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 133, n. 2, p. 146-151, 2016. Disponível em: <[10.1016/j.ijgo.2015.09.018](https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2015.09.018)>.

SCENNA, F.N.; HOCKETT, M.E.; TOWNS, T.M.; SAXTON, A.M.; ROHRBACH, N.R.; WEHRMAN, M.E.; SCHRICK, F.N. Influence of a prostaglandin synthesis inhibitor administered at embryo transfer on pregnancy rates of recipient cows. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**. Edinburgh, v.78, p. 38–45, 2005.

SCHOUTEN, A. C.; ALLISON, D.; BRENT, L.; LISSNER, E. Successful use of endoscopy for transcervical cannulation procedures in the goat. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, n. 6, p. 909–912, 2014. Disponível em: <[10.1111/rda.12399](https://doi.org/10.1111/rda.12399)>.

SILVA, M. A. M.; TEIXEIRA, P. P. M.; COUTINHO, L. N.; GUTIERREZ, R. R.; MACENTE, B. I.; VICENTE, W. R. R.; BRUN, M. V. Resection of vaginal neoplasms by video-vaginoscopy in bitches. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 42, p. 01-05, 2014.

SOUZA, J.M.G.; COUTO, J.F.; BRUSCHI, J.H.; VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A.; FONSECA, J.F. Estrus and ovulation in anestrous Saanen Goats submitted to short-term estrous induction protocols. In: XXI Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society, 21, 2007, Costa do Sauípe. **Anais... Acta Scientiae Veterinariae**, 2007. v.35, p.1289.

STELLFLUG, J. N.; WULSTER-RADCLIFFE, M. C.; HENSLEY, E. L.; COWARDIN, E. A.; SEALS, R. C.; LEWIS, G. S. Oxytocin-induced cervical dilation and cervical manipulation in sheep: effects on laparoscopic artificial insemination. **Journal of animal science**, v. 79, n. 3, p. 568-573, 2001.

TAQUEDA, G. S.; AZEVEDO, H. C.; SANTOS, E. M.; MATOS, J. E.; BITTENCOURT, R. F.; BICUDO, S.D. Influence of anatomical and technical aspects on fertility rate based on sheep transcervical artificial insemination performance. **Ars Veterinaria**, v. 27, n. 2, p. 127-133, 2011.

TAYLOR, J. A. Leucocyte responses in ruminants. In. FELDMAN, B. F.; ZINKL, J. G.; JAIN, N. C. Schalm's veterinary hematology. 5. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2010. p. 391-404.

TEXEIRA, T. A.; DA FONSECA, J. F.; DE SOUZA-FABJAN, J. M. G.; DE REZENDE CARVALHEIRA, L.; DE MOURA FERNANDES, D. A.; BRANDÃO, F. Z. Efficiency of different hormonal treatments for estrus synchronization in tropical Santa Inês sheep. **Tropical animal health and production**, v. 48, n. 3, p. 545-551, 2016. Disponível em: <10.1007/s11250-015-0989-y>.

TISON, N.; BOUCHARD, E.; DESCÔTEAUX, L.; LEFEBVRE, R. C. Effectiveness of intrauterine treatment with cephalixin in dairy cows with purulent vaginal discharge. **Theriogenology**, v. 89, p. 305-317, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.007>>.

VARAGO, F. C.; MOUSTACAS, V. S.; CRUZ, B. C.; Lagares, M. A.; Henry, M. R. J. M. Biotécnicas da reprodução aplicada a pequenos ruminantes. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 8, Supl. 1, p. 1-17, 2009.

VERBERCKMOES, S.; PAUW, I. D.; SOOM, A. V.; VANROOSE, G.; LAEVENS, H. KRUIF, A. Cervical insemination in sheep. **Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift**, v. 70, n. 6, p. 475-480, 2001.

WILSON, M.S. Non-surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen. **Journal of reproduction and fertility**. Birmingham, v.47, p.307-311, 1993.

WULSTER-RADCLIFFE, M.C.; COSTINE, B.A.; LEWIS, G.S. Estradiol-17 beta-oxytocin-induced cervical dilation in sheep: Application to transcervical embryo transfer. **Journal of Animal Science**. Champaign, v.77, p.2587-2593, 1999.