

UTILIZAÇÃO DO ULTRASSOM PARA DIAGNOSTICAR A PREENHEZ E O SEXO DE FETOS DE PEQUENOS RUMINANTES GERADOS A PARTIR DE MONTA NATURAL E DA TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES FRESCOS, CONGELADOS E VITRIFICADOS

Leopoldo Mayer de Freitas Neto

**TESE DE DOUTORADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**Recife-PE, Brasil
2010**

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

Leopoldo Mayer de Freitas Neto

UTILIZAÇÃO DO ULTRASSOM PARA DIAGNOSTICAR A PRENHEZ E O SEXO DE FETOS DE PEQUENOS RUMINANTES GERADOS A PARTIR DE MONTA NATURAL E DA TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES FRESCOS, CONGELADOS E VITRIFICADOS

Tese de Doutorado

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do grau de **DOUTOR** em Ciência Veterinária.

UFRPE
Recife-PE, Brasil
2010

Ficha catalográfica

F866u Freitas Neto, Leopoldo Mayer de
Utilização do ultrassom para diagnosticar prenhez e o sexo de fetos de pequenos ruminantes gerados a partir de monta natural e da transferência de embriões frescos, congelados e vitrificados / Leopoldo Mayer de Freitas Neto – 2010.
81 f. : il.

Orientador: Marcos Antônio Lemos de Oliveira
Tese (Doutorado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Medicina Veterinária, Recife, 2010.

Referências

1. Transdutor linear 2. Transdutor microconvexo 3. Vulva
4. Tubérculo genital I. Oliveira, Marcos Antônio Lemos de, orientador II. Título

CDD 636.08926

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**UTILIZAÇÃO DO ULTRASSOM PARA DIAGNOSTICAR A PREENHEZ E O
SEXO DE FETOS DE PEQUENOS RUMINANTES GERADOS A PARTIR
DE MONTA NATURAL E DA TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES
FRESCOS, CONGELADOS E VITRIFICADOS**

Tese de Doutorado elaborada por

LEOPOLDO MAYER DE FREITAS NETO

Aprovada pela

COMISSÃO EXAMINADORA:

Marcos Antonio Lemos de Oliveira
- Professor Orientador -

Paulo Fernandes de Lima
- Examinador -

Cláudio Coutinho Bartolomeu
- Examinador -

Maico Henrique Barbosa dos Santos
- Examinador -

Adriana Wanderley Taveiros
- Examinador -

**Recife-PE, Brasil
2010**

*Aos meus pais Hélio Rafael Mayer (**in memoriam**) e Maria Consuelo Ribeiro Mayer que deram o dom da vida e estiveram sempre presentes, transmitindo amor, paz, segurança, serenidade e apoio em todos os momentos da minha vida.*

Aos meus irmãos Maria das Graças e Edson Junior, Alexandre e Consolação, Rosângela e Leonardo, Benício e aos sobrinhos Rafael, Rodolfo, Ester, Lucas, Letícia e Maria Luiza pelo amor fraterno colaborando na minha evolução como ser humano.

À minha namorada e grande companheira Luciana Leda da Silva Costa, pelo amor imprescindível, respeito, admiração e compreensão, apoiando e motivando-me a alcançar sempre o melhor.

D e d i c o

Aos queridos do coração, Almir José e Josefa Leda, Polyana, Eudo e Pedro José, Juliana e Lara Maria, Almir Filho e Lorena, pelo acolhimento e exemplo de uma família feliz.

Aos amigos Túlio, José Farias e Lula, agradeço a amizade, o apoio, incentivo e o companheirismo nas dificuldades e alegrias e fazendo de cada encontro sempre uma festa.

*Aos companheiros, Dra. Socorro Marques, Nilsão, Fernando, Davi, Creuza e Alisson (**in meroriam**) pela presença constante em minha vida quando morei no Paraná.*

Especial Recordação

“Que Deus nos dê a sabedoria dos simples e a humildade dos mestres para que possamos continuar nossos estudos em busca do conhecimento fraterno e divisível entre todos.”

Geanete Lavorato

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por tudo que tem proporcionado em minha vida, seja material e espiritual, estando ao meu lado em todas as situações, iluminando o meu caminho.

Ao professor Marcos Antônio Lemos de Oliveira, pela orientação paterna e pedagógica, pelo respeito, paciência, cumplicidade e confiança e uma segunda chance depositada em mim.

Ao professor Paulo Fernandes de Lima, pelos conselhos, orientações, exemplo de pessoa e profissional, bem como pela oportunidade de proferir palestras para seus alunos da Ginecologia Veterinária do Curso de Graduação em Medicina Veterinária desta UFRPE.

À Professora Jacinta Eufrásia Brito Leite pela serena e sincera amizade, pelos ensinamentos de radiologia, bem como pelos convites para ministrar palestras sobre radiologia e ultrassonografia aos alunos de Radiologia Veterinária do Curso de Graduação em Medicina Veterinária desta UFRPE.

Ao Professor Eduardo Luiz Caldas pelos constantes convites para proferir palestras sobre ultrassonografia aos alunos de Diagnóstico por Imagem do Curso de Graduação em Medicina Veterinária da Faculdade Pio Décimo.

Ao grupo da Pós-Graduação, Monteiro, Cristiano, Joubert, Eduardo, Juliana, Maira, Ricardo, Filipe, Marcelo, Espedito, Edivaldo, Arthur, Edílson, Pedro Paulo e JWP Júnior pela amizade, união e incondicional companheirismo, além do amigo Helder Molecular pela sugestão e incentivo para a realização da Pós-Graduação na UFRPE.

Em especial, ao amigo Maico Henrique pelo aprendizado ultrassonográfico, incentivo e experiências compartilhadas que resultou nesse trabalho.

Aos funcionários da UFRPE, Sônia, Alcir, Joana, Guiomar, Marquinho e Edna pela ajuda, paciência e ao apoio dispensado durante a realização do Curso de Doutorado.

Aos funcionários da EMEPA, mais precisamente das Estações Experimentais de Tacima e Pendência e a todos que contribuíram na execução dos experimentos.

À UFRPE pela oportunidade em obter o Título de Doutor em Ciência Veterinária e em especial à Coordenação do Programa de Pós-Graduação.

À FACEPE e ao CNPq pela fomentação e incentivo na execução destes experimentos.

Aos animais, que ajudaram de forma inconsciente e significativa para a realização desse experimento.

Em fim, a todos aqueles que não citei, mas sabem que são merecedores de meu agradecimento.

Muito Obrigado!!!

SUMÁRIO

| | | Páginas |
|-----------------------|--|---------|
| AGRADECIMENTOS..... | | vi |
| SUMÁRIO..... | | viii |
| LISTA DE TABELAS..... | | ix |
| LISTA DE FIGURAS..... | | x |
| RESUMO..... | | xi |
| ABSTRACT..... | | xiii |
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA..... | 6 |
| 2.1 | Técnicas Ultrassonográficas..... | 6 |
| 2.2 | Diagnóstico de Gestação..... | 7 |
| 2.3 | Vias de exame ultrassonográfico..... | 11 |
| 2.3.1 | Transretal..... | 11 |
| 2.3.2 | Transabdominal..... | 12 |
| 2.3.3 | Transvaginal..... | 13 |
| 2.4 | Sexagem Fetal..... | 13 |
| 2.5 | Criopreservação de Embriões..... | 17 |
| 3 | OBJETIVOS..... | 20 |
| 4 | REFERÊNCIAS..... | 21 |
| 5 | CAPÍTULO 1..... | 30 |
| | Viabilidade do exame ultrassonográfico pelas vias transretal, transabdominal e transvaginal para diagnosticar prenhez em cabras e ovelhas..... | 31 |
| 6 | CAPÍTULO 2..... | 44 |
| | Reliability of ultrasound for early sexing of goat fetuses derived from natural mating and from fresh, frozen and vitrified embryo transfer..... | 45 |
| 7 | CAPÍTULO 3..... | 57 |
| | Ultrasonographic fetal sex identification in pregnant sheep derived from natural mating and embryo transfer..... | 58 |

LISTA DE TABELAS

| CAPÍTULO 1 | | Páginas |
|-------------------|--|---------|
| Tabela 1 | Valores médios ($\bar{x} \pm s$) da duração em segundos do exame ultrassonográfico pelas vias transretal, transabdominal e transvaginal no 30 ^o , 45 ^o , 60 ^o e 75 ^o dia da gestação de cabras..... | 35 |
| Tabela 2 | Valores médios ($\bar{x} \pm s$) da duração em segundos do exame ultrassonográfico pelas vias transretal, transabdominal e transvaginal no 30 ^o , 45 ^o , 60 ^o e 75 ^o dia da gestação de ovelhas..... | 36 |
| CAPÍTULO 2 | | |
| Table 1 | Mean \pm s.e.m. of the day of genital tubercle migration and identification of the external genital structures of Boer fetuses derived from natural mating (NM), fresh (FrE), frozen (FE) and vitrified (VE) embryo transfer..... | 50 |
| CAPÍTULO 3 | | |
| Table 1 | Mean and standard deviation, of the day of genital tubercle migration and identification of the external genital structures of Dorper fetuses derived from natural mating (NM), fresh (FrE), frozen (FE) and vitrified (VE) embryo transfer..... | 62 |

LISTA DE FIGURAS

| CAPÍTULO 1 | | Páginas |
|-------------------|---|---------|
| Figura 1 | Duração média ($\bar{x} \pm s$) do exame ultrassonográfico para diagnosticar a gestação de cabras em diferentes períodos (ab; cd; ef = P < 0,05)..... | 36 |
| Figura 2 | Duração média ($\bar{x} \pm s$) do exame ultrassonográfico para diagnosticar a gestação de ovelhas em diferentes períodos (ab; cd; ef = P < 0,05)..... | 37 |
| Figura 3 | Duração média ($\bar{x} \pm s$) dos exames ultrassonográficos em cabras e ovelhas pelas vias transretal, transabdominal e transvaginal (ab; cd; ef = P < 0,05)..... | 38 |
| CAPÍTULO 2 | | |
| Figure 1 | Images of (a, b) male fetuses showing genital tubercle (gt), umbilical cord (uc), prepuce (p) and scrotum (s). (c, d) Female fetuses showing genital tubercle (gt), umbilical cord (uc), nipples (n) and vulva (v)..... | 49 |
| Figure 2 | Sexing of goat fetuses derived from natural mating (NM), fresh embryo transfer (FrE), frozen embryo transfer (FE) and vitrified embryo transfer (VE) taking into consideration the final position of the genital tubercle and/or by visualization of the external genitalia..... | 50 |
| CAPÍTULO 3 | | |
| Figure 1 | Fetal sex identification in Dorper fetuses at 45 days of pregnancy from vitrified embryo transfer. The figure shows images of a male fetus (a) showing the location of the genital tubercle (gt) located immediately caudal to the umbilical cord (uc) and a female fetus (b) showing the position of the genital tubercle (gt) in close proximity to the tail (t)..... | 61 |
| Figure 2 | Variation in the number of days in which fetal sexing became possible. The sexes of fetuses derived from natural mating (NM) and fresh (FrE), frozen (FE) and vitrified (VE) embryo transfer were determined by transrectal ultrasound taking into consideration the final position of the genital tubercle and/or visualization of the external genitalia..... | 63 |

Título: Utilização do ultrassom para diagnosticar a prenhez e o sexo de fetos de pequenos ruminantes gerados a partir de monta natural e da transferência de embriões frescos, congelados e vitrificados.

Autor: Leopoldo Mayer de Freitas Neto

Orientador: Marcos Antonio Lemos de Oliveira

Resumo

Com este trabalho, dividido em três experimentos, objetivou-se verificar a possibilidade de realizar o diagnóstico de prenhez em cabras e ovelhas por diferentes vias de acesso e sexar fetos originados de monta natural e da transferência de embriões frescos e criopreservados. Os exames foram realizados com um aparelho de ultrassom equipado com um transdutor linear (6,0 e 8,0 MHz) utilizado pelas vias transretal e transabdominal e outro microconvexo (5,0 e 7,5 MHz) endocavitário utilizado por via transvaginal. No primeiro experimento verificou-se a viabilidade do exame ultrassonográfico pelas vias transretal, transabdominal e transvaginal para diagnosticar a gestação de cabras (n = 240) e ovelhas (n = 320) no 30^o, 45^o, 60^o e 75^o dia. Nas cabras e ovelhas, o exame ultrassonográfico pela via transretal foi mais rápido (P < 0,05) no 30^o e no 45^o dia da gestação, mas, pela via transabdominal foi mais rápido no 60^o e no 75^o dia. Em ambas as espécies, a duração do diagnóstico de gestação foi maior (P < 0,05) no 30^o dia do que nos demais, enquanto que a duração do diagnóstico no 75^o dia foi menor (P < 0,05) do que no 45^o e 60^o. Independentemente da via de exame e do dia da gestação, o tempo médio para diagnosticar a gestação foi menor (P < 0,05) nas cabras do que nas ovelhas. Independentemente da espécie e do dia da gestação, o tempo médio para diagnosticar a gestação pela via transretal foi menor (P < 0,05) do que as demais e o da transvaginal foi menor (P < 0,05) do que o da via transabdominal. No segundo experimento, com a finalidade de aperfeiçoar a sexagem de fetos (n = 123) caprinos da raça Boer por via transretal, procurou-se identificar o período de migração do tubérculo genital e sua diferenciação nas estruturas da genitália de fetos derivados de monta natural (TI) e da transferência de embriões frescos (TII), congelados (TIII) e vitrificados (TIV) colhidos 7 dias após a cobertura. A migração do tubérculo genital ocorreu mais cedo (P < 0,05) no TI (42,21±2,86 dias) do que no TII (43,98±3,00 dias), TIII (44,97±1,83 dias) e no TIV (44,58±1,97 dias). A visibilização da bolsa escrotal, prepúcio e vulva ocorreu precocemente (P < 0,05) no TI (45,22±1,25; 45,95±1,53; 45,01±1,03 dias) do que no TII (53,25 ± 2,02; 53,37 ± 1,92; 51,76 ± 2,10 dias), TIII (53,25 ± 2,02; 53,37 ± 1,92; 51,76 ± 2,10 dias) e TIV (54,06±1,75; 52,46 ± 1,95; 51,91 ± 2,06 dias). No terceiro experimento, com o propósito de aperfeiçoar a sexagem de fetos (n = 130) ovinos da raça Dorper por via transretal, procurou-se identificar o período de migração do tubérculo genital e sua diferenciação nas estruturas da genitália de fetos derivados de monta natural (TI) e da transferência de embriões frescos (TII), congelados (TIII) e vitrificados (TIV) colhidos 7 dias após a cobertura. A migração do tubérculo genital ocorreu mais cedo (P < 0,05) no TI (45,21 ± 3,31 dias) do que no TII (48,50 ± 3,70 dias), TIII (48,50 ± 3,70 dias) e no TIV (48,85 ± 3,23 dias). A visibilização da bolsa escrotal, prepúcio e vulva ocorreu precocemente (P < 0,05) no TI (51,20 ± 2,56; 50,35 ± 1,59; 49,75 ± 1,73 dias) do que no TII (53,25 ± 2,02; 53,37 ± 1,92; 51,76 ± 2,10 dias), TIII (53,25 ± 2,02; 53,37 ± 1,92; 51,76 ± 2,10 dias) e TIV (54,06±1,75; 52,46 ± 1,95; 51,91 ± 2,06 dias). Os resultados permitem concluir que o diagnóstico de gestação pode ser realizado pelas vias transretal, transabdominal e

transvaginal, bem como que é mais rápido pela via transretal, na gestação avançada e na espécie caprina. É também permissível concluir que, com base no posicionamento final do tubérculo genital, é recomendável sexar fetos caprinos provenientes de monta natural somente a partir do 55º dia de prenhez e a partir do 60º dia naqueles derivados da transferência de embriões frescos e criopreservados. Nos ovinos a sexagem fetal já pode ser efetuada a partir do 50º dia de prenhez nos fetos oriundos de monta natural e a partir do 55º dia naqueles originados da transferência de embriões frescos e criopreservados. Ainda é possível concluir que a ultrassonografia em tempo real é uma ferramenta importante para diagnosticar precocemente a prenhez nos pequenos ruminantes, assim como identificar o sexo fetal nos primeiros 60 dias de gestação.

Palavras-chave: transdutor linear, transdutor microconvexo, tubérculo genital, vulva.

Title: Use of ultrasound to diagnose pregnancy and fetal sex of small ruminant originating from natural mating and from fresh, frozen and vitrified embryo transfer.

Author: Leopoldo Mayer de Freitas Neto

Advisor: Marcos Antonio Lemos de Oliveira

Abstract

In this work, divided into three experiments, the aim was to verify the possibility to diagnose the pregnancy of does and ewes by different pathway access and diagnose the fetuses sex originated by natural mating and transfer of fresh and cryopreserved embryos. The examinations were carried out using an ultrasound scanner equipped with a linear transducer (6.0 and 8.0 MHz) used by transrectal and transabdominal via and a microconvex endocavitary (5.0 and 7.5 MHz) transducer used by transvaginal via. In the first experiment was verified the viability of the ultrasound examination by transretal, transabdominal and transvaginal via to diagnose pregnancy in goats ($n = 240$) and ewes ($n = 320$) at days 30th, 45th, 60th and 75th. In does and ewes the ultrasound examination was faster ($P < 0.05$) on days 30th and 45th of pregnancy, however by transabdominal via was faster on day 60th and 75th. In both species the time of pregnancy diagnose was greater ($P < 0.05$) on day 30th than the others days while this time was smallest ($P < 0.05$) at day 75th than day 45th and 60th. Independent of the examination via and the day of pregnancy the average time to diagnose the pregnancy was shorter ($P < 0.05$) in does than in ewes. Independending of the specie and the day of pregnancy the average time to diagnose the pregnancy by transrectal via was shorter ($P < 0.05$) than the other vias and the transvaginal via was shorter ($P < 0.05$) than the transabdominal one. In the second experiment, in order to improve the sexing of Boer fetuses ($n = 123$) by transrectal ultrasonography, the aim was to identify the migration period of the genital tubercle and its later differentiation into genital structures in fetuses derived from natural mating (TI) and fetus from fresh (TII), frozen (TIII) and vitrified (TIV) embryo transfer collected 7 days after breeding. Migration of the genital tubercle occurred earlier ($P < 0.05$) in TI (45.21 ± 3.31 days) than in TII (48.50 ± 3.70 days), TIII (48.93 ± 3.61 days) and TIV (48.85 ± 3.23 days). The visualization of the scrotum, prepuce and vulva occurred earlier ($P < 0.05$) in TI (51.20 ± 2.56 ; 50.35 ± 1.59 ; 49.75 ± 1.73 days) than in TII (53.25 ± 2.02 ; 53.37 ± 1.92 ; 51.76 ± 2.10 days), TIII (53.37 ± 1.92 ; 52.31 ± 2.00 ; $51 \pm 78 \pm 2.22$ days) and TIV (54.06 ± 1.75 ; 52.46 ± 1.95 ; 51.91 ± 2.06 days). In the third experiment, in order to improve fetal sexing by ultrasonography in Dorper ewe breed ($n = 130$), the objective was to identify the migration period of the genital tubercle and the period of the visualization of external genital structures in fetuses derived from natural mating (TI) and from fresh (TII), frozen (TIII) and vitrified (TIV) embryos transfer collected 7 days after breeding. Migration of the genital tubercle occurred earlier ($P < 0.05$) in TI (42.21 ± 2.86 days) than in TII (43.98 ± 3.00 days), TIII (44.97 ± 1.83 days) and TIV (44.58 ± 1.97 days). The visualization of scrotal bag, prepuce and vulva occurred, respectively, earlier ($P < 0.05$) in TI (45.22 ± 1.25 ; 45.95 ± 1.53 ; 45.01 ± 1.03 days) than in TII (48.91 ± 1.92 ; 48.52 ± 1.41 ; 47.41 ± 1.41 days), TIII (49.97 ± 1.08 ; 49.18 ± 2.00 ; 47.64 ± 1.82 days) and TIV (50.12 ± 1.66 ; $49.27 \pm 1.1.61$; 47.93 ± 1.92 days). The results allow to conclude that the pregnancy diagnose may be performed by transrectal, transabdominal and transvaginal via, as well as, that is faster by transrectal via and hat the time for diagnosing is shorter

in advanced pregnancy and in goat specie. Is also possible to conclude, taking into consideration the final position of the genital tubercle, that goat fetal sexing can be done from the 55th day onward in fetuses produced by natural mating and from the 60th day onward in fetuses derived from cryopreserved embryos. It can also be concluded that, real-time ultrasonography is a reliable tool for fetal sex determination in sheep after Day 50 of pregnancy taking into account both the location of the genital tubercle and the identification of external genital structures. In ovine species the fetal sexing can be done from the 50th day onward in fetuses produced by natural mating and from the 55th day onward in fetuses derived from cryopreserved embryos. Finally is possible to conclude that real-time ultrasonography is a reliable tool for early pregnancy diagnose in small ruminant as well as that to identify the sex on the first 60 days of pregnancy.

Key-words: linear transducer, microconvex transducer, genital tubercle, vulva.

1 - INTRODUÇÃO

Ao se analisar o sistema agroindustrial da caprino-ovinocultura brasileira, assim como seus principais pontos tecnológicos de estrangulamento nos diversos segmentos, detecta-se certo distanciamento entre algumas instituições de pesquisa e os órgãos representativos dos produtores (SILVA, 1996). É evidente que a pesquisa institucional, nos últimos 20 anos, ainda não contribuiu significativamente com essa atividade pecuária no País, sendo importante identificar, na prática, as demandas imediatas do produtor para direcionar os projetos, de tal modo que, de fato, os impactos tecnológicos constituam-se em insumos de grande importância e não fiquem restritos apenas aos pesquisadores (BANDEIRA et al., 2004).

A caprino-ovinocultura brasileira é uma alternativa sustentável para a geração de renda e fixação da população rural nas atividades de produção primária, consolidando-se como um segmento de grande importância para o desenvolvimento sócio-econômico do país (BANDEIRA et al., 2004). Essas espécies ruminantes, por constituírem-se em grande fonte de proteína animal representam um importante setor da economia de países produtores e, por isso, necessitam de suporte técnico para viabilizar o aumento de sua produtividade.

A adequada reprodução dos caprinos e ovinos é um dos pontos iniciais da cadeia de eventos do processo produtivo e sua ineficiência compromete a lucratividade da exploração em consequência de afetar o potencial produtivo do rebanho (BICUDO, 2002). Considerando que a caprino-ovinocultura deve ser racionalmente explorada em função do monitoramento reprodutivo assumir um importante papel na escala produtiva, faz-se necessário implementar a utilização de biotécnicas que maximizem a produtividade do rebanho (SANTOS, 2003).

Sendo assim, nos últimos anos, foram desenvolvidas uma série de biotécnicas, como a inseminação artificial (IA) e a transferência de embriões (TE) na expectativa de maximizar a eficiência reprodutiva dos rebanhos e de tecnificar a produção das criações mais estruturadas. No caso específico da TE, a escassez de fêmeas receptoras para atender a demanda de

embriões produzidos através da superestimulação hormonal motivou o desenvolvimento de métodos de criopreservação para evitar o desperdício dos embriões excedentes e possibilitar a formação de bancos com estruturas geneticamente superiores (PALASZ e MAPLETOFT, 1996; TRALDI et al., 1999).

Tanto a congelação quanto a vitrificação de embriões, apesar dos diversos métodos desenvolvidos até o momento, ainda apresentam problemas por não estarem completamente dominadas nos pequenos ruminantes (RALL, 1987; PAPADOPOULOS et al., 2002)

Nos caprinos e ovinos ainda predomina o método lento de congelação, também conhecido como método clássico de criopreservação (BARIL et al., 1989; FIÉNI et al., 1995; SOMGSASEN et al., 1995). Todavia, a formação de cristais de gelo, as variações osmóticas, o efeito tóxico dos crioprotetores e os concentrados intracelulares de eletrólitos, promovendo danos na zona pelúcida, alterando o posicionamento das organelas intracelulares e do citoesqueleto da célula embrionária são os fatores limitantes mais evidentes que limitam os resultados desse método (MASSIP et al., 1995; DOBRINSKY, 1996; KASAI, 1996; KASAI et al., 1996; MARTINO et al., 1996; SAHA et al., 1996).

Estabelecer um protocolo de congelação/descongelação de embriões que seja prático, rápido e eficaz é o principal desafio da criopreservação e nesse contexto, o método de vitrificação, que consiste na exposição do embrião ao crioprotetor em alta concentração e a direta imersão em nitrogênio líquido, surge como uma alternativa interessante por favorecer a rotina da TE com embriões criopreservados (ISACHENCO et al., 2003). Além do exposto e de requerer menor tempo operacional, a vitrificação de embriões utiliza menor volume de soluções e evita os efeitos deletérios da formação de cristais de gelo intra e extracelulares que danificam as organelas e as membranas celulares (VATJA, 2000; PAPADOPOULOS et al., 2002)

Na realidade, essas biotécnicas têm contribuído para aumentar a fertilidade, a prolificidade e acelerar o melhoramento genético dos rebanhos, bem como têm favorecido os

proprietários na tomada de decisões sobre a exploração, já que permitem submeter seus rebanhos a graus maiores ou menores de intensificação. Entretanto, é preciso considerar que a utilização de biotécnicas aplicadas à reprodução requer alto investimento financeiro e, por isso mesmo, necessita de um comércio atraente e que assegure, rotatividade e retorno do capital investido, pelo menos a médio prazo.

A sexagem fetal nos pequenos ruminantes pode atender as necessidades de pesquisas em diferentes áreas. Na pesquisa fundamental, ela pode ser direcionada para diagnosticar precocemente o sexo de fetos gerados através da IA com sêmen sexado (CRAN et al., 1997; JOHNSON, 2000; GARNER, 2001), através da TE com sexo pré-determinado (GUTIERREZ-ADAN et al., 1997) ou ainda através de embriões produzidos *in vitro* pela técnica da injeção intracitoplasmática de espermatozóide (CATT et al., 1996). Quanto a sua aplicabilidade prática, pode-se destacar sua importância para a produção animal por permitir um melhor planejamento para adquirir e comercializar animais do próprio rebanho (HAIBEL, 1990) e facilitar a coordenação de ações que visem racionalizar a produção e a lucratividade. Este melhor planejamento implica numa maior concentração de fêmeas nos rebanhos leiteiros e de machos nos de carne (REICHENBACH et al., 2004).

Até pouco tempo, acreditava-se que a identificação do sexo fetal através da ultrassonografia já era possível de ser realizada em torno do 40º dia de gestação nos pequenos ruminantes, sugestão que contribuía para que fossem cometidos muitos diagnósticos equivocados. Existia também a recomendação de sexar fetos nos pequenos ruminantes em dois períodos, sendo o primeiro entre o 50º e o 58º dia de gestação, podendo ser efetuado até o 64º dia, mas com precisão diagnóstica inferior (BÜRSTELL, 2002). Essa ampla variação contribuía para aumentar a eficiência do diagnóstico e limitava a difusão desse método, principalmente em condições de campo para atender as necessidades dos profissionais que lidam com a reprodução assistida de pequenos ruminantes.

Na atualidade é possível afirmar que a migração do tubérculo genital já ocorre antes dos 40 dias nos fetos da espécie ovina, estendendo-se até próximo do 50º dia de gestação (SANTOS et al., 2006) e que nos da espécie caprina, essa migração é um pouco mais tardia, ocorrendo após o 40º dia, mas podendo estender-se até próximo do 55º dia de gestação (SANTOS et al., 2005). Esses resultados permitiram recomendar a sexagem fetal nos ovinos a partir do 50º dia de gestação e a de caprinos após o 55º dia com boa margem de segurança para evitar que fetos do sexo masculino sejam indevidamente sexados como do sexo feminino. Além disso, existe também a sugestão de não sexar fetos a partir do 100º dia de gestação porque seu tamanho dificulta o exame e induz o operador cometer equívocos no diagnóstico (SANTOS et al., 2004a).

Dados preliminares relatados por Santos et al. (2007) demonstraram que a migração do tubérculo genital de fetos ovinos provenientes da TE com embriões congelados ocorre mais tardiamente do que os originados de monta natural, razão pela qual existe a propensão de ser sugerido que a sexagem fetal seja realizada cinco dias mais tarde (55º dia de gestação) do que a realizada com fetos provenientes de monta natural. Prévios estudos conduzidos por PTAK et al. (1999), TRALDI et al. (1999) e PAPADOPOULOS et al. (2002) demonstraram que a criopreservação de embriões prolonga o período de gestação, pelo menos, em quatro dias devido a um possível retardo no restabelecimento da atividade celular após a descongelação.

A proposta desta pesquisa é inicialmente justificada porque está fundamentada na expectativa de definir o período ideal de sexar fetos caprinos e ovinos originados de embriões frescos, congelados, vitrificados e provenientes de monta natural, quando o exame for realizado somente com base na localização do tubérculo genital. Ainda é justificada porque aferindo o tempo de diferenciação do tubérculo genital nas estruturas da genitália externa será possível definir o período mais precoce de sexar fetos provenientes de embriões frescos, criopreservados e de monta natural quando a presença dessas estruturas for levada em

consideração. Ainda é justificada porque os resultados irão contribuir, em curto prazo, para difundir esse método no seio do setor produtivo com conseqüente aquecimento do comércio de gestantes com fetos sexados, estimulando a implantação de novos programas de IA e TE. Finalmente é justificada por não existir estudo semelhante ao aqui elaborado, bem como porque deverá contribuir para transformar o modelo atual da produção pecuária tecnificada.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Técnicas ultrassonográficas

Por muitos anos, as técnicas ultrassonográficas empregadas no diagnóstico de gestação em pequenos ruminantes domésticos, utilizaram-se do efeito doppler e do scan modo A, em que as ondas ultrassônicas refletidas são captadas pelo equipamento e traduzidas em sinais luminosos ou sonoros.

A partir da década de 80, passou-se a utilizar técnicas que traduzem as ondas refletidas por imagens (modo B) e que, por analogia, permitem a interpretação das estruturas (BICUDO, 2003). Na atualidade, existem vários modelos, marcas e configurações de equipamentos que podem ser utilizados na detecção da prenhez por imagem (CHALHOUB et al., 2004).

Um importante componente do aparelho de ultrassom de tempo real é o transdutor em função de ser responsável pela emissão das ondas que refletirão nos tecidos e se converterão nas imagens. Estes transdutores podem ser lineares que formam imagens retangulares, convexos e setoriais mecânicos que originam imagens cônicas (BUCKRELL, 1988; BICUDO, 2003). Estes transdutores apresentam configurações de frequência que varia de 2,25 a 8,0 MHz, ressalta-se que as frequências mais elevadas proporcionam melhor resolução de imagem, enquanto que as mais baixas permitem um alcance de maior profundidade das ondas ultrassônicas com qualidade de imagem inferior por não ser tão detalhada (BUCKRELL, 1988).

O desenvolvimento de equipamentos de ultrassom do tipo Scan-B com maior resolução de imagem e o aperfeiçoamento dos transdutores nos últimos anos determinaram maior acurácia e rapidez no diagnóstico de gestação e na determinação do número de fetos em caprinos e ovinos, além de possibilitar a determinação do sexo nas referidas espécies (COUGHBROUGH e CASTELL, 1998; NAN et al., 2001; BÜRSTEL, 2002; BÜRSTEL et al., 2002). Para o diagnóstico de gestação, geralmente são utilizados equipamentos simples e

economicamente mais acessíveis (KAULFUSS et al., 1999). Todavia, para a identificação do sexo fetal é necessário que sejam produzidas imagens com maior detalhamento das estruturas fetais, aspectos que são melhores obtidos através de equipamentos mais sofisticados que permitam não somente a utilização de transdutores com frequências mais elevadas, mas também o uso concomitante de diferentes transdutores, fato que determina maiores investimentos (COUGHBROUGH e CASTELL, 1998; BÜRSTEL, 2002; BÜRSTEL et al., 2002).

A data da primeira visualização das diferentes características gestacionais é bastante variável (BUCKRELL et al., 1986; ISHWAR, 1995; MALIK et al., 1998). Segundo Khän (1994), a frequência do transdutor e a via de acesso a ser utilizada são os fatores que mais influenciam na variação desta data. Diagnósticos falsos positivos são raros (BUCKRELL et al., 1986; ISHWAR, 1995), podendo ocorrer devido à morte e reabsorção embrionária precoce, não observação de aborto ou ainda devido à observação da bexiga como se fosse útero (BUCKRELL, 1988). No tocante a diagnósticos falsos negativos, imagens pouco detalhadas em início de prenhez, não qualificação e inexperiência operacional são os principais fatores (FREITAS e SIMPLÍCIO, 2002).

2.2 Diagnóstico de gestação

A ultrassonografia em tempo real, apesar de não estar totalmente livre da ocorrência de erros no diagnóstico (KÄHN, 1994; KAULFUSS et al., 1996; SALLES et al., 1997; CHALHOUB e RIBEIRO FILHO, 2002) é o método mais eficiente por reunir praticidade e acurácia na determinação precoce da gestação, na quantificação fetal, sexagem e, até mesmo, na identificação de alguma patologia de caráter reprodutivo (FOWLER e WILKINS, 1982/1984; BUCKRELL, 1988; ISHWAR, 1995).

O diagnóstico precoce de gestação pela ultrassonografia é importante para aprimorar o manejo reprodutivo e racionalizar a produtividade de rebanhos (HAIBEL, 1990). Fêmeas

preghes podem ser submetidas a um programa nutricional adequado visando o máximo aproveitamento do potencial produtivo e, ao mesmo tempo, suprir as exigências dos fetos em desenvolvimento (DAVEY, 1986), sobretudo no final de gestação, fase na qual a nutrição tem maior influência no peso da cria ao nascer (WHITE et al., 1984).

O momento da primeira visualização das diferentes características do concepto varia, principalmente, de acordo com a frequência do transdutor e a via de acesso utilizada (BUCKRELL, 1988; KÄHN, 1994).

Os primeiros relatos sobre observações de fetos pela ultrassonografia de Modo B foram realizadas por Tainturier et al. (1983) em ovinos e por Tainturier et al. (1983) e Yamaga e Too (1984) em caprinos. A partir de então, a ultrassonografia tem sido amplamente utilizada nos pequenos ruminantes (TAVERNE et al., 1985; MARTINEZ et al., 1998; CHALHOUB, 2000) para diagnóstico precoce de prenhez com uma acurácia perto dos 100% (BUCKRELL, 1988; HAIBEL, 1990; MIALOT et al., 1991; BRETZLAFF et al., 1993; GARCIA et al., 1993). Em países onde se tem uma criação intensiva de ovinos, a prática de exames de ultrassom, para detecção de prenhez e determinação do número de fetos, é realizada rotineiramente (FOWLER e WILKINS, 1980; DAVEY, 1986; SPRECHER et al., 1989).

A visualização do líquido intra-uterino, vesícula embrionária, embrião, batimentos cardíacos, membrana amniótica, placentomas, diferenciação da cabeça e tronco, identificação do botão germinativo dos membros, movimento embrionário/fetal, delimitação do cordão umbilical e visualização do globo ocular (ISHWAR, 1995; CHALHOUB e RIBEIRO FILHO, 2002) são as principais imagens do ultrassom de tempo real que caracterizam a fase inicial da gestação.

A presença de líquido intra-uterino é o primeiro indício de gestação, mas pode ser confundido com líquido proveniente da fase estrogênica (KÄHN, 1994; AZEVEDO et al., 2001) ou com líquido oriundo de casos de hidrometra (LÊGA e TONIOLO, 1999). Utilizando

transdutor linear de 7,5 MHz por via transretal em ovelhas (SCHRICK e INSKEEP, 1993) e cabras (SALLES et al., 1997) é possível detectar a presença de líquido intra-uterino a partir do 15^o dia da cobertura. Ultrassonograficamente, o fluido extra-embrionário apresenta-se anecogênico, semelhante à urina (BUCKRELL, 1988; KÄHN, 1994; KAULFUSS et al., 1996; DOIZÉ et al., 1997), com forma de imagens alongadas ou circulares, cranial à bexiga (GEARHART et al., 1988; DOIZÉ et al., 1997).

A visualização do embrião é possível entre o 20^o e 23^o dia de prenhez (SCHRICK e INSKEEP, 1993; DOMINGUES e TREIN, 1995; MARTINEZ et al., 1998; SALLES et al., 1997; CHALHOUB, 2000; AZEVEDO et al., 2001), todavia, a mensuração precisa de todos os embriões somente é possível a partir do 25^o dia (SANTOS et al., 2004a).

Com relação à membrana amniótica ela é formada entre o 13^o e o 16^o dia após a concepção (PERRY, 1981; ROBERTS, 1986), porém, somente é identificada através de exame ultrassonográfico transretal entre o 24^o e o 32^o dia da prenhez (KÄHN, 1994; AZEVEDO et al., 2001).

Os primeiros batimentos cardíacos do embrião caprino podem ser observados após o 25^o dia de prenhez (BUCKRELL, 1988), sendo que se intensificam entre o 25^o e o 29^o dia de gestação (SALLES et al., 1997; MARTINEZ et al., 1998). Em ovelhas foram detectados a partir do 18^o ou 19^o dia de prenhez com a utilização de transdutor com frequência de 7,5 MHz por via transretal (SCHRICK e INSKEEP, 1993). Pela mesma via e com um transdutor linear de 5 MHz, os primeiros batimentos cardíacos podem ser observados no 21^o dia de gestação em ovelhas (CALAMARI et al., 2002), achados semelhantes aos anteriormente com fêmeas da espécie caprina foram descritos por SALLES et al. (1997) e MARTINEZ et al. (1998).

No final da década de 30, utilizando-se peças anatômicas da espécie ovina, foi observado que os placentomas podiam ser identificados, como pequenos nódulos, no 21^o dia da gestação e em torno do 90^o dia atingiam tamanho e diâmetro máximos (CLOETE, 1939). Em relação à primeira visualização ultrassonográfica, os placentomas foram detectados desde

o 16^o dia utilizando a via transretal na frequência de 7,5 MHz (SANTIAGO MORENO et al., 1995) até 32 - 45 dias pela via transabdominal na frequência de 3,5 MHz (LEVY et al., 1990).

A diferenciação do embrião ovino em cabeça e tronco pode ser visualizada aos 26 dias de gestação quando é utilizado, por via transretal, transdutor linear de 5,0 MHz (KAULFUSS et al., 1996).

Alguns autores discordam entre si em relação ao dia de visibilização do botão germinativo dos membros. Sua identificação é possível aos 36 dias de gestação (AZEVEDO et al., 2001), contudo, existem relatos desta identificação aos 30 (KAULFUSS et al., 1996) e 41 dias de prenhez (PICAZO et al., 1991).

No que concerne ao movimento fetal, o dia de sua identificação é também bastante controverso, há visualizações desde 33^o dia (CHALHOUB, 2000) pela via transretal nas frequências de 5,0 e 7,5 MHz até 45-50^o dia (BUCKRELL et al., 1986) pela mesma via.

A identificação do globo ocular é possível a partir do 41^o dia (PICAZO et al., 1991) ou no 42^o dia de prenhez (AZEVEDO et al., 2001), existindo relato de identificação aos 30 dias de gestação utilizando transdutor com frequência de 5,0 MHz (KAULFUSS et al., 1996).

A determinação precisa do número de conceptos está relacionada com a idade gestacional, com a qualidade do equipamento utilizado e com a experiência do operador (HAIBEL, 1990). Os gêmeos são identificados com maior precisão em relação aos trigêmeos (ISHWAR, 1995) e a diferenciação entre gestação simples e múltipla é facilitada, em algumas oportunidades, pela observação de diferentes partes dos fetos e/ou pela movimentação individual durante a varredura (GEARHART et al., 1988). Por outro lado, os resultados falso-positivos, em muitas ocasiões, são decorrentes das perdas embrionárias ou abortamentos não observados após a realização do exame (TAVERNE et al., 1985).

A prenhez múltipla é possível de ser diagnosticada no 31^o dia (GEARHART et al., 1988), apesar de a determinação ser mais segura entre o 40^o e o 100^o dia de gestação (WHITE

et al., 1984; TAVERNE et al., 1985; GEARHART et al., 1988). A diferenciação entre prenhez dupla, tripla ou quádrupla é difícil em virtude de que, normalmente, o número de fetos é subestimado (BUCKRELL, 1988).

O tempo requerido para a realização do diagnóstico de gestação simples é de 10 segundos, na prenhez gemelar aumenta em até 30 segundos e nos casos de fêmeas vazias é necessário o tempo mínimo que varia de 20 a 30 segundos (DAVEY, 1986).

Outra consideração que precisa ser enfatizada é a condição corporal dos animais que tanto pode afetar a rapidez e a precisão do exame quanto impedir sua realização, como ocorre com animais obesos, segundo relato de Santos et al. (2004b).

2.3 Vias de exame ultrassonográfico

2.3.1 Transretal

O diagnóstico de gestação pela via transretal pode ser realizado com precocidade anterior aos 20 dias, caso seja utilizado uma frequência de 7,5 MHz (BUCKRELL et al., 1986). Além disso, o exame ultrassonográfico por essa via tem sido uma ferramenta importante na avaliação da dinâmica do crescimento folicular em pequenos ruminantes (EVANS et al., 2000; MENCHACA e RUBIANES, 2002; DUGGAVATHI et al., 2003; RUBIANES e MENCHACA, 2003; TENÓRIO FILHO, 2003) e nos protocolos de sincronização do estro nos pequenos ruminantes (BARRETT et al., 2002). Também é importante na transferência de embriões, pois permite um melhor aproveitamento do rebanho de receptoras mediante a detecção precoce, monitoramento e viabilidade do concepto, assim como do rebanho das doadoras mediante a avaliação do útero e dos ovários (KASTELIC et al., 1988; MENCHACA et al., 2002) e da resposta superovulatória (RIESENBERG et al., 2001).

Apesar da manipulação do transdutor linear por via transretal ser limitada e possibilitar o risco de lesões em caprinos e ovinos, (NEVES, 1991; REICHLE e HAIBEL, 1991;

HESELINK e TAVERNE, 1994), o seu uso é bem tolerado pelos pequenos ruminantes (DOIZÉ et al., 1997), e também bastante usado nos grandes animais, devido à sua versatilidade (SANTOS, 2003), principalmente aqueles que dispõem de dupla frequência (6.0 e 8.0 MHz).

2.3.2 Transabdominal

O método transabdominal é o mais utilizado em pequenos ruminantes (CHALHOUB e RIBEIRO FILHO, 2002), entretanto, o período ideal para iniciar este exame é a partir do 30^o dia da cobertura por observação da imagem do fluido uterino (TAINTURIER et al., 1983; REICHLER e HAIBEL, 1991), que se torna mais evidente após 40^o dia de gestação, momento em que o útero se encontra no lado direito da cavidade abdominal (ISHWAR, 1995). No exame de gestação avançada, tanto em cabras quanto em ovelhas, os fetos encontram-se geralmente na região abdominal, ventro-lateral direita, devido à presença do rúmen no lado esquerdo (SCHEERBOOM e TAVERNE, 1985; HESSELINK e TAVERNE, 1994). Além disto, o método transabdominal permite uma boa fetometria, possibilitando avaliar o desenvolvimento embrionário e estimar, com boa margem de segurança, a idade do feto e, por conseguinte, uma boa previsão das possíveis datas de parição (KÄHN et al., 1992; GREENWOOD et al., 2002).

Para a realização do exame transabdominal, o transdutor é colocado em contato com a região inguinal, cranialmente ao úbere (BICUDO, 2003). O período ideal para confirmar a gestação situa-se entre 40^o e o 50^o dia porque, além da visualização do fluido uterino, vesícula embrionária, placentomas, embrião e batimento cardíaco, os movimentos fetais passam a ser observados e as gestações múltiplas podem ser diferenciadas das simples (CHALHOUB e RIBEIRO FILHO, 2002).

A partir dos três meses de gestação, a visualização completa do feto por via transabdominal somente é possível com transdutores de baixa frequência (3,0 ou 3,5 MHz).

Em frequências elevadas são observadas apenas partes do feto em forma de sombras, que preenchem a tela, dificultando a interpretação pelo operador (BUCKRELL, 1988; ISHWAR, 1995; CHALHOUB e RIBEIRO FILHO, 2002).

2.3.3 Transvaginal

A ultrassonografia transvaginal é uma via de exame ainda pouco difundida, apesar de não provocar aborto e infecção do sistema genital e de não propiciar desconforto ao animal (AYRES et al., 2000; SANTOS et al., 2004b; TENÓRIO FILHO, 2003).

É uma via de exame limitada quando existe a necessidade de realizar um diagnóstico tardio de gestação em virtude do feto se encontrar localizado na cavidade abdominal (SANTOS et al., 2004b). Por esta via é possível diagnosticar prenhez antes dos 21 dias de gestação, mas um diagnóstico de gestação definitivo somente deve ser feito a partir do 35^o dia de prenhez. Apresenta resultados semelhantes aos obtidos pela via transretal (AYRES et al., 2000; SANTOS et al., 2004b), podendo ser classificado como um método efetivo para ser utilizado na reprodução de caprinos (AYRES et al., 2000).

2.4 Sexagem Fetal

A determinação do sexo fetal através da ultrassonografia baseia-se na localização e diferenciação da genitália externa (MÜLLER e WITTKOWSKY, 1986; CURRAN et al., 1989). A estrutura anatômica do feto que possibilita este diagnóstico pelo ultrassom é denominada de tubérculo genital (CURRAN et al., 1991; COUGHBROUGH e CASTELL, 1998). O tubérculo genital (TG) é identificado como uma estrutura constituída de dois lóbulos alongados, com aparência semelhante a duas barras paralelas ovais que refletem as ondas ultrassônicas que lhes são dirigidas de forma intensiva (CURRAN et al., 1989).

Em torno do 25^o dia de gestação, embriões ovinos já podem apresentar uma discreta elevação entre os brotos dos membros posteriores indicando a formação do TG. Entre o 28^o e

o 30º dia, o TG está mais proeminente e no 34º dia já é possível à identificação do sexo do embrião em algumas ocasiões. Com o desenvolvimento do corpo do embrião e a migração do TG em direção ao umbigo nos machos e à cauda nas fêmeas, têm-se, respectivamente, a diferenciação deste órgão em pênis e clitóris (SCHNORR, 1989). Portanto, a partir deste período, a distância compreendida entre o ânus e o TG, será maior no macho do que na fêmea.

Tanto a ultrassonografia transcutânea abdominal (SERGEEV et al., 1990; CHALHOUB e RIBEIRO FILHO, 2002) quanto à transretal (DOMINGUES e TREIN, 1995; MARTINEZ et al., 1998) vêm sendo utilizadas com sucesso há alguns anos em pequenos ruminantes para o diagnóstico da gestação e, mais recentemente, a transvaginal (SANTOS et al., 2004b; OLIVEIRA et al., 2004). Além de diversas outras aplicações no diagnóstico clínico em ovinos e caprinos, a ultrassonografia nestas espécies pode ser também empregada para a determinação do sexo fetal (COUGHBROUGH E CASTELL, 1998; BÜRSTEL, 2002; BÜRSTEL et al., 2002). Investigações para a determinação pré-natal do sexo com auxílio da ultrassonografia em bovinos tinham inicialmente como principal ponto de referência, a identificação da bolsa escrotal e do prepúcio no macho, ou da glândula mamária das fêmeas em gestações mais avançadas, entre o 70º e o 120º dia após a cobertura ou inseminação artificial (MÜLLER E WITTKOWSKY, 1986; GINTHER, 1998). Posteriormente foi demonstrada a possibilidade de um diagnóstico mais precoce em bovinos pela identificação do TG, a partir do 50º dia de gestação, com transdutores de 5,0 MHz pela via transretal (CURRAN et al., 1989; STROUD, 1996).

A técnica da sexagem fetal em ovinos foi descrita pela primeira vez na década de 90 por Coughbrough e Castell (1998). Neste estudo inicial, o diagnóstico foi realizado por via transretal utilizando transdutor linear de 5,0 MHz em ovelhas com gestações simples entre o 60º e o 69º dia da prenhez (COUGHBROUGH E CASTELL, 1998). Todos os animais foram inicialmente examinados em posição de estação, sendo, em alguns casos, necessário examinar a fêmea em decúbito dorsal devido à inadequada apresentação do feto, quando a ovelha estava

em estação (COUGHBROUGH E CASTELL, 1998). Estudos posteriores mostraram ser também possível utilizar a via transcutânea abdominal para diagnosticar o sexo fetal tanto nas gestações simples (NAN et al., 2001) quanto nas múltiplas (BÜRSTEL et al., 2001; BÜRSTEL, 2002), utilizando transdutor e frequência idênticos aos anteriormente referidos, com os animais posicionados em estação.

Na ultrassonografia transretal existe a possibilidade remota da vesícula amniótica ser traumatizada, o mesmo não ocorre em relação a via transcutânea abdominal. O diagnóstico transcutâneo abdominal pode ser executado entre o 50º e o 70º dia de gestação (BÜRSTEL et al., 2001) ou entre o 65º e o 100º dia (NAN et al., 2001) em condições de campo. No caso de gestações múltiplas, é recomendada a realização de exames em dois períodos consecutivos, sendo o primeiro realizado entre o 50º e o 56º dia e o segundo entre o 66º e o 70º dia (BÜRSTEL et al., 2001).

A visualização do TG pelo ultrassom é descrita como sendo simples pelo fato de se tratar de uma estrutura anatômica hiperecótica (COUGHBROUGH e CASTELL, 1998). Os fetos são considerados machos quando o TG encontra-se imediatamente caudal ao umbigo e são diagnosticados como fêmeas, quando se localiza abaixo da cauda (COUGHBROUGH e CASTELL, 1998; NAN et al., 1998). Para o diagnóstico de machos pode-se também tomar como base, a presença do prepúcio imediatamente caudal ao umbigo e/ou a presença da bolsa escrotal, geralmente de aparência triangular, entre os membros posteriores (BÜRSTEL et al., 2001).

Movimento fetal, membros cruzados, posicionamento desfavorável, posicionamento do cordão umbilical entre os membros, posicionamento da cauda, além de dificuldades no exame de animais obesos, são os principais fatores que podem dificultar a visualização do TG do concepto (BARROS e VISINTIN, 2001; BÜRSTEL et al., 2001; NAN et al., 2001).

A acurácia da técnica de sexagem fetal por via transretal na ovelha com gestação simples é de 89%, sendo que em 7% dos animais examinados, a identificação do sexo não é

possível (COUGHBROUGH e CASTELL, 1998). Entretanto, outro trabalho envolvendo ovinos e caprinos, mostra que a sexagem ultrassonográfica por via transretal não é possível de ser efetuada quando os animais apresentam gestação múltipla (BÜRSTELL, 2002). Neste mesmo trabalho, a acurácia na quantificação fetal foi próxima de 100% nas gestações com menos de quatro fetos (BÜRSTELL, 2002).

Em pequenos ruminantes, a determinação do número de fetos pela ultrassonografia nos casos de gestação múltipla com mais de três fetos é extremamente incerta (GEARHART et al., 1988; HAIBEL, 1990; BÜRSTELL, 2002), sendo recomendando proceder a determinação do sexo fetal apenas em gestações simples ou nas múltiplas com menos de quatro fetos (BÜRSTEL, 2002). Nas gestações múltiplas, o mapeamento dos fetos é mais demorado e complicado devido à necessidade de se visualizar vários planos para que o posicionamento do TG, em todos os fetos, possa ser determinado com precisão (BÜRSTEL, 2002).

A técnica da ultrassonografia transcutânea abdominal resulta em 78% (NAN et al., 2001) e 86% (BÜRSTEL et al., 2001) de diagnósticos corretos em ovinos. Em caprinos, a acurácia é de 92% (BÜRSTEL et al., 2001/2002). Em 8% das ovelhas gestantes examinadas por via transcutânea abdominal, o diagnóstico do sexo fetal não é possível (BÜRSTEL, 2002). A acurácia nas gestações múltiplas após exame único em condições de campo é de apenas 64%, sendo, portanto, recomendado dois exames consecutivos nos períodos anteriormente propostos, para a obtenção de melhores taxas de acerto (BÜRSTEL et al., 2001).

O grau de dificuldade para diagnosticar o sexo do feto é controverso. Se por um lado tem sido descrito que é mais fácil diagnosticar machos do que fêmeas (COUGHBROUGH e CASTELL, 1998; BÜRSTEL et al., 2001), por outro existe relato de que o sexo fetal não influencia na acurácia do diagnóstico, sendo de 88,5% nos casos de fetos masculinos e de 88,9% no de fetos femininos (NAN et al., 2001). Além do sexo do feto, a acurácia do diagnóstico varia conforme o equipamento de ultrassonografia, a experiência, a habilidade e a

motivação do operador (BARROS e VISINTIN, 2001). Outros fatores envolvidos são o comportamento do animal durante o exame, as condições anatômicas do útero conforme a idade e a raça dos animais, além da necessidade de informações precisas sobre as datas de cobertura ou de inseminação artificial (BÜRSTEL, 2002).

No diagnóstico transcutâneo abdominal, o número de fetos também influencia os resultados, sendo de 88% de acerto nas gestações simples e de 83% nas múltiplas (BÜRSTEL, 2002). Contudo, em condições de campo, o resultado de 64% de diagnósticos corretos, tanto para ovinos quanto para caprinos, é inferior aos 86% obtidos experimentalmente (BÜRSTEL, 2002).

Em função do exposto recomenda-se, quando o trabalho é desenvolvido a campo, a realização de dois exames consecutivos, sendo o primeiro entre o 50º e o 58º dia e o segundo entre o 65º e o 70º dia de gestação para permitir que a porcentagem de diagnósticos corretos alcance o patamar de, pelo menos, 78% (BÜRSTEL, 2002).

2.5 Criopreservação de embriões

Na Tecnologia da Reprodução, a possibilidade do armazenamento de embriões é essencial para qualquer programa envolvendo melhoramento genético e, ainda mais, para a conservação de espécies ou raças em perigo de extinção. A criopreservação de embriões mamíferos tem algumas vantagens: menor custo com transporte a longas distâncias, pois dispensa o transporte de animais e período de quarentena; aumento na avaliação genética em programas de seleção: elimina a necessidade de receptoras síncronas após um tratamento de superovulatório; permite a transferência de embriões para fêmeas em estro natural; a preservação de embriões colhidos excedentes ao número de receptoras; a formação de germoplasma e diminuição dos riscos de transmissão de doenças (GONZALEZ-BULNES et al., 2004; DOBRINSKY, 2002).

Por outro lado, todos os embriões sofrem consideráveis danos morfológicos e funcionais durante a criopreservação. A extensão das injúrias dependem de alguns fatores incluindo a forma e o tamanho das células, a permeabilidade das membranas e a qualidade e sensibilidade dos embriões. Todos esses fatores podem ser altamente variáveis, dependendo da espécie, do estágio de desenvolvimento e origem (por exemplo, se produzidos *in vivo* ou *in vitro*). Contudo, embriões também possuem uma notável, e algumas vezes surpreendente habilidade para reparar estes danos, total ou parcialmente, e, nos melhores casos, continuar o desenvolvimento normal. O Propósito dos procedimentos de criopreservação é minimizar os danos e ajudar as células a regenerar (MASSIP, 2001; VAJTA e KUWAYAMA, 1997).

Desde o desenvolvimento e aplicação comercial das metodologias programáveis padrão de congelamento de embriões, novas tecnologias de criopreservação tem sido desenvolvidas nos últimos anos. A alternativa mais notável ao congelamento clássico tem sido a aplicação e desenvolvimento da tecnologia de vitrificação para criopreservar embriões (DOBRINSKY, 2002). Embriões de pequenos ruminantes podem ser criopreservados pelo congelamento convencional ou por vitrificação.

Alguns problemas que ocorrem quando do congelamento lento de embriões põem ser superados com o uso do procedimento de vitrificação. A vitrificação desenvolvida por Rall e Fahy (1985), tem se tornado alvo de vários estudos objetivando estabelecer uma alternativa aos problemas econômicos e de gestão inerentes ao congelamento clássico com desidratação gradual, resfriamento e aquecimento lentos (MASSIP et al., 1989; RALL, 1987/1992). A técnica de vitrificação open pulled-straw (OPS) (VAJTA et al., 1997), adaptada para ovinos e caprinos (DATTENA et al., 2000; EL-GAYAR E HOLTZ, 2001), pode tornar-se uma técnica efetiva para ser aplicada sob condições de campo (ISACHENKO et al., 2003).

Quando comparados com embriões frescos, embriões ovinos e caprinos congelados ou submetidos a vitrificação resultaram em menores taxas de prenhez (PAPADOPOULOS et al., 2002) ou de nascimentos (PTAK et al., 1999). Embriões ovinos produzidos *in vivo* foram

mais sensíveis à criopreservação que os embriões caprinos (TRALDI, 1999), o que tem levado a um grande interesse nos estudos de vários fatores que possam aumentar a criotolerância dos embriões ovinos e caprinos (BERLINGUER et al., 2004; LEONI et al., 2002).

Esta sensibilidade observada na criopreservação dos embriões caprinos e ovinos produzidos *in vivo*, sendo expressa por menores taxas de re-expansão, prenhez ou de nascimentos, também tem se expressado pelo prolongamento da gestação por até quatro dias (DATTENA et al., 2000; MARTINEZ et al., 1997), fatores estes que separadamente ou somados podem alterar a migração do TG determinada por Santos (2006), refletindo direto ou indiretamente nos aspectos referentes às biotécnicas avançadas como a sexagem fetal.

3 – OBJETIVOS

- a. Verificar a viabilidade do exame ultrassonográfico pelas vias transretal, transabdominal e transvaginal para diagnosticar a prenhez de cabras e ovelhas;
- b. Identificar o período gestacional que ocorre a migração do tubérculo genital nos fetos provenientes de monta natural, de transferência de embriões frescos, congelados e vitrificados;
- c. Identificar o tempo em que o tubérculo genital se diferencia em estruturas anatômicas da genitália externa de fetos provenientes de monta natural e de transferência de embriões frescos, congelados e vitrificados;

4 – REFERÊNCIAS

AYRES SL, NIMS S, PORTER C, CAMMUSO C, GAVIN W. Evaluation of follicular development and early pregnancy in goats using transvaginal ultrasound. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS, 7th, 2000, Tours. **Proceedings. Tours: CCSI**, 2000. p.481.

AZEVEDO, A.; CHALHOUB, M.; FURST, R.; MOURA NETO, A. V.; RIBEIRO FILHO, A. I. Momento de detecção ultra-sonográfica de algumas características do concepto ovino Santa Inês do 20° ao 46° dia de prenhez. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, n.2, p.147-1148, 2001.

BANDEIRA, D.A.; SANTOS, M.H.B.; CORREIA NETO, J.; NUNES, J.F. Aspectos gerais da caprino-ovinocultura no Brasil e seu reflexos produtivo e reprodutivo. In: SANTOS, M.H.B.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F. **Diagnóstico de gestação na cabra e na ovelha**. São Paulo: Varela, 2004. p.1-8.

BARIL, G.; CASAMITZANA, P.; PERRIN, J. et al. Embryo production freezing and transfer in Angora, Alpine and Saanen goats. **Zuchthygiene**, v.24, p.101-115, 1989.

BARRETT, D. M. W, BARTLEWSKI, P. M., COOK S. J., RAWLINGS, N. C. Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to PGF2 α given at different stages of the luteal phase in ewes. **Theriogenology**, v.58, n.7, p.1409-1424, 2002.

BARROS, B.J.P.; VISINTIN, J.A. Ultrasonic control of early pregnancies, embryonic and fetal mortalities and fetal sex in zebu cattle. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** v.38, n.2, p. 74-79, 2001.

BERLINGUER F., LEONI G., BOGLIOLO L., PINTUS P.P., ROSATI I., LEDDA S., NAITANA S. FSH different regimes affect the developmental capacity and cryotolerance of embryos derived from oocytes collected by ovum pick-up in donor sheep. **Theriogenology**, v. 61, p. 1477-1486, 2004.

BICUDO, S.D. O diagnóstico ultra-sonográfico de gestação em ovinos. <http://www.fmvz.unesp.br/ovinos/repman3.htm>, 2003.

BICUDO, S.D. Sumários de pesquisas. In: SIMPÓSIO PAULISTA DE OVINO-CULTURA, 6, 2002, Botucatu. **Anais...** Botucatu: Associação Paulista dos Criadores de Ovinos, 2002. p.88-100.

BRETZLAFF K.N, Edwards J, Forrest D, Nuti L. Ultrasonographic determination of pregnancy in small ruminants. **Veterinary Medicine.**, v.88, p.12-24, 1993.

BUCKRELL, B.C. Application of ultrasonography in reproduction in sheep and goats. **Theriogenology**, v.29, p.71-84, 1988.

BUCKRELL, B. C.; BONNETT, B. N.; JOHNSON, W. H. The use of real-time ultrasound rectally for early pregnancy diagnosis in sheep. **Theriogenology**, v. 25, p.665-73, 1986.

BÜRSTEL, D. **Untersuchungen zur intrauterinen Geschlechtsfeststellung bei Feten kleiner Wiederkäuer mittels Ultrasonographie.** Hannover, 2002. 142p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Institut für Reproduktionsmedizin, Tierärztliche Hochschule Hannover.

BÜRSTEL, D.; MEINECKE-TILLMANN, S.; MEINECKE, B. Ultrasonographic determination of fetal sex in small ruminants. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE EUROPEAN SOCIETY FOR DOMESTIC ANIMALS REPRODUCTION, 5th Vienna. 2001. Vienna. **Proceedings...** Vienna: **ESDAR Newsletter**, 2001. v.6, p.53-54.

BÜRSTEL, D.; MEINECKE-TILLMANN, S.; MEINECKE, B. Ultrasonographic diagnosis of fetal sex in small ruminants bearing multiple fetuses. **Veterinary Records**, v.151, n.21, p.635-636, 2002.

CALAMARI CV, FERRARI S, LEINZ FF, CARVALHO CF Acurácia da ultrassonografia transretal para diagnóstico precoce de gestação em ovelhas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, n.3, 258-259, 2002.

CATT, S.L.; CATT, J.W.; GOMEZ, M.C.; MAXELL W.M.C.; EVANS G. Birth of a male lamb derived from an in vitro matured oocyte fertilised by intracytoplasmic injection of a single presumptive male sperm. **Veterinary Records** v.139, p.494-495, 1996.

CHALHOUB, M. Aspectos ultra-sonográficos e aspecto hormonal da gestação ovina (*Ovis Aries*) nas raças Bergamácia e ideal. Botucatu, 2000. 120p. Tese (**Doutorado em Medicina Veterinária**) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

CHALHOUB, M.; OLIVEIRA, M.A.L.; SANTOS, M.H.B.; BARTOLOMEU, C.C. Características do ultra-som scan B. In: SANTOS, M.H.B.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F. **Diagnóstico de gestação na cabra e na ovelha.** São Paulo: Varela, 2004. p.73 -83.

CHALHOUB, M.; RIBEIRO FILHO, A. L. Diagnóstico de gestação em pequenos ruminantes por ultra-sonografia de tempo real. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, supl.5, p.27-30, 2002.

CLOETE, J.H.L. Prenatal growth in the Merino sheep. **Onderstepoort Journal Veterinary Science Animal Indian**, v.13, p.417-557, 1939.

COUGHBROUGH, C.A.; CASTELL, M.C. Fetal sex determination by ultrasonically locating the genital tubercle in ewes. **Theriogenology**, v.50, p.263-267, 1998.

CRAN, D.G.; McKELVEY, W.A.C.; KING, M.E.; DOLMAN, D.F.; McEVOY, T.G.; BROADBENT, P.J.; ROBINSON J.J. Production of lambs by low dose intrauterine insemination with flow cytometrically sorted and unsorted semen. **Theriogenology**, v.42, p.267, 1997.

CURRAN, S.; KASTELIC, J.P.; GINTHER, O.J. Determining sex of the bovine fetus by ultrasonic assessment of the relative location of the genital tubercle. **Animal Reproduction Science**, v.19, p.217-227, 1989.

CURRAN, S.; GINTHER O.J. Ultrasonic determination of fetal gender in horses and cattle under farm conditions. **Theriogenology**, v.36, p.809-814, 1991.

DATTENA, M. Survival and viability of vitrified in vitro and in vivo produced ovine blastocysts. **Theriogenology**, v.53, p.1511-1519, 2000.

DAVEY, C.G. An evaluation of pregnancy testing in sheep using a real-time ultrasound scanner. **Australian Veterinary Journal**, v. 63, n. 10, p. 347-8, 1986.

DOBRINSKY, J.R. Cellular approach to cryopreservation of embryos. **Theriogenology**, v. 45, p. 17-26, 1996.

DOBRINSKY, J.R. Advancements in criopreservation of domestic animal embryos. **Theriogenology**, v.57, p.285-302, 2002.

DOIZE F, VAILLANCOURT D, CARABIN H, BÉLANGER D Determination of gestational age in sheep and goats using transrectal ultrasonographic measurements of placentomes. **Theriogenology**, v.48, p.449-60, 1997.

DOMINGUES, E.; TREIN, E. Diagnóstico de gestação em ovinos através de ultrasonografia. **A Hora Veterinária**, v. 15, n.87, p.58-61, 1995.

DUGGAVATHI, R., BARTLEWSKIB, P.M., BARRETT, D.W., RAWLINGS, N. C. Use of high-resolution transrectal ultrasonography to assess changes in numbers of small ovarian antral follicles and their relationships to the emergence of follicular waves in cyclic ewes. **Theriogenology**, v.60, n.3, p.495-510, 2003.

EVANS, A.C.O.; DUFFY, P.; HYNES, N. Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. **Theriogenology**, v.53, n.3, p.699-715, 2000.

FIÉNI, F.; BECKERS, J.P.; BUGGING, M. et al. Evaluation of criopreservation techniques for goats embryos. **Reproduction, Nutrition and Development**, v.35, p.367-173, 1995.

FOWLER, D.G.; WILKINS, J.F. Diagnosis of pregnant and number of foetuses in sheep by real-time ultrasonic imaging. I. Effects of number of foetuses, stage of gestation, operator and breed of ewe on accuracy of diagnosis. **Livestock Production Science**, v.11, p.437-50, 1984.

FOWLER, D.G.; WILKINS, J.F. The identification of single and multiple bearing ewes by ultrasonic imaging. In: AUSTRALIAN SOCIETY ANIMAL PRODUCTION, 13, 1980, Melbourne. **Proceedings...** Melbourne: ASAP, 1980.

FREITAS, V.J.F.; SIMPLÍCIO, A.A. Diagnóstico de gestação em caprinos. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2002. p.15-24.

GARCIA A, NEARY MK, KELLY GR, PIERSON RA Accuracy of ultrasonography in early pregnancy diagnosis in the ewe. **Theriogenology**, v.39, p.847-61, 1993.

GEARHART, M.A.; WINGFIELD, W.E.; KNIGHT, A.P.; SMITH, J.A.; DARGATZ, D.A.; BOON, J.A.; STOKES, C.A. Real-time ultrasonography for determining pregnancy status and viable fetal numbers in ewes. **Theriogenology**, v.30, p.323-337, 1988.

GINTHER, O.J. Ultrasonic imaging and animal reproduction. In: _____. **Cattle**. Wisconsin: Equiservices Publishing, 1998. p.196-205.

GREENWOOD PL, SLEPETIS RM, MCPHEE MJ, BELL AW. Prediction of stage of pregnancy in prolific sheep using ultrasound measurement of fetal bones. **Reproduction, Fertility and Development**, v.14, n.1-2, p.7-13, 2002.

GONZALEZ-BULNES, A.; BAIRD, D.T.; CAMPBELL, B.K. Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. **Reproduction, Fertility and Development**, v.16, p.421-435, 2004.

GUTIERREZ-ADAN, A.; CUSHWA, W.T.; ANDERSON, G.B.; MEDRANO, J.F. Ovine-specific Y-chromosome RAPD-SCAR marker for embryo sexing. **Animal Genetics**, v.28, p.135-138, 1997.

HAIIBEL, G.K. Use of ultrasonography in reproductive management of sheep and goat herds. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice - Elsevier** v.3, p.597-613, 1990.

HESSELINK, J.W.; TAVERNE, M. A. Ultrasonography of the uterus of the goat. **Veterinary Quarterly**, v. 16, n.1, p.41-45, 1994.

ISACHENKO, V.; ALABART, J.L.; DATTENA, M. et al. New technology for vitrification and field (microscope free) warming and transfer of small ruminant embryos. **Theriogenology**, v.59, p.1209-1218, 2003.

ISHWAR, A.K. Pregnancy diagnosis in sheep and goats: a review. **Small Ruminant Research**, v.17, n.4, p.37-44, 1995.

JOHNSON, L.A. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. **Animal Reproduction Science**, v.60 - 61, p.93 - 107, 2000.

KÄHN, W. **Veterinary reproductive ultrasonography**. London: Mosbywlf, 1994. 256p.

KÄHN W, KÄHN B, RICHTER A, SCHULZ J, WOLF M. Sonography during the pregnancy of sheep. I. Fetometry for the determination of the stage of gestation and prediction of the time of parturition. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v. 99, n.11, p.449-452, 1992.

KASAI, M. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 67-75, 1996.

KASAI, M., ZHU, S.E., PEDRO, P.B., NAKAMURA, K., SAKURAI, T., EDASHIGE, K. Fracture damage of embryos and its prevention during vitrification and warming. **Cryobiology**, v. 33, p. 459-464, 1996.

KASTELIC, J. P.; CURRAN, S.; PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Ultrasonic evaluation of the bovine conceptus. **Theriogenology**, v.29, n.1, p.39-54, 1988.

KAULFUSS, K.H.; Süß, R.; SCHENK, P. Die ultrasonographische Trächtigkeitsdiagnostik (B-Mode) beim Schaf. Teil 4: Ergebnisse einer Feldstudie. **Tierärztliche Praxis** v.27, p.74-82, 1999.

KAULFUSS, K.H., UHLICH, K., BRABANT, S. Die ultrasonographische Trächtigkeitsdiagnostik (B Mode) beim Schaf. Teil 1: Verlaufsuntersuchungen im ersten Trächtigkeitsmonat. **Tierärztliche Praxis** v.24, n.5, p.443-452, 1996.

LEONI, G., BOGLIOLO, L., BERLINGUER, F., ROSATI, I. Defined media for vitrification, warming, and rehydration: effects on post-thaw protein synthesis and viability of in vitro derived ovine embryos. **Cryobiology**, v. 45, p. 204-212, 2002.

LÊGA, E.; TONIOLO, G. Hidrometra na espécie caprina. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.23, n.3, p.446-447, 1999.

LEVY, I.; EMERY, P.; MIALOT, J. P. Echographie et gestion des troupeaux ovins. **Recueil de Medecine Veterinaire**. v. 166, p. 751-764, 1990.

MALIK, R.S., RAZZAQUE, M.A., AL-KHOZAN, N.M. Accuracy of ultrasonic scanning for pregnancy diagnosis in ewe of five different breeds. **Indian Journal Animal Science** v.68, p.328-329, 1998.

MARTINEZ, M.F.; BOSCH P.; BOSCH, R.A. Determination of early pregnancy and embryonic growth in goats by transrectal ultrasound scanning. **Theriogenology**, v.49, p.1555-1565, 1998.

MARTINEZ A.G., FURNUS C.C., MATKOVIC M., DE MATOS D.G. Lambing from transfer of *in vivo* and *in vitro* produced fresh or vitrified ovine embryos. **Theriogenology**, v.47, p. 351, 1997.

MARTINO, A., POLLARD, J.A., LEIBO, S.P. Effect of chilling bovine oocytes on their developmental competence. **Molecular Reproduction Development**. v. 45, p. 503-512, 1996.

MASSIP, A., MERMILLOD, P., DINNYE'S, A. Morphology and biochemistry of in-vitro produced bovine embryos: implications for their cryopreservation. **Human Reproduction**, v. 10, p. 3004–3011, 1995.

MASSIP, A., VAN DER ZWALMEN, P., SCHEFFEN, B., ECTORS, F. Some significant steps in the cryopreservation of mammalian embryos with a note on a vitrification procedure. **Animal Reproduction Science** v. 19, p. 117–129, 1989.

MASSIP, A. Cryopreservation of embryo of farm animals. **Domestic Animal**, v.36, p.49-55, 2001.

MENCHACA, A.; RUBIANES, E. Relation between progesterone concentrations during the early luteal phase and follicular dynamics in goats. **Theriogenology**, v.57, n.5, p.1411-1419, 2002.

MENCHACA A, PINCZAK A, RUBIANES E. Follicular recruitment and ovulatory response to FSH treatment initiated on day 0 or day 3 postovulation in goats. **Theriogenology**, v.58, n.9, p1713-1721, 2002.

MIALOT JP, LEVY I, EMERY P. Echographie et gestion des troupeaux caprins. **Recueil de Medecine Veterinaire**, v.168, p.399-406, 1991.

MÜLLER, E.; WITTKOWSKY, G. Visualization of male and female characteristics of bovine fetuses by real-time ultrasonics. **Theriogenology**, v.25, p.571-574, 1986.

NAN, D.; VAN OORD, H.A.; TAVERNE, M.A.M. Determination of foetal gender in sheep by transabdominal ultrasonographic scanning. In: ANNUAL CONFERENCE OF THE EUROPEAN SOCIETY FOR DOMESTIC ANIMALS REPRODUCTION, 5th. 2001. Vienna. **Proceedings...** Vienna: **ESDAR Newsletter**, 2001. v.6, p.70.

NEVES, J.P. Diagnóstico de gestação por ultra-sonografia. **Ciência Rural**, v.21, n.3, p.457-465, 1991.

OLIVEIRA, M.A.L., REICHENBACH, H-D., SANTOS, M.H.B., AND TENÓRIO FILHO, F. (2004). Aplicabilidade do scan B na reprodução de pequenos ruminantes. In: Santos, M.H.B., Oliveira, M.A.L., and Lima, P.F. (eds), **Diagnóstico de gestação na cabra e na ovelha**. Varela, São Paulo, pp. 85-96.

PALASZ, A.T., MAPLETOFT, R.J. Cryopreservation of mammalian embryos and oocytes: recent advances. **Biotechnology Advance** v.14, p. 127-149, 1996.

PAPADOPOULOS, S., RIZOS, D., DUFFY, P., WADE, M., QUINN, K., BOLAND, M.P., LONERGAN, P. Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, in vivo or in vitro produced ovine blastocysts. **Animal Reproduction Science** v.74, p. 35-44, 2002.

PTAK G., DATTENA M., LOI P., TISCHNER M., CAPPALAI P. Ovum pick-up in sheep: efficiency of *in vitro* embryo production, vitrification and birth of offspring. **Theriogenology**, v.52, p. 1105-1114, 1999.

PERRY, J. S. The mammalian fetal membranes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 62, p. 321-335, 1981.

PICAZO, R. A.; BARRAGÁN, M. L.; VALENCIANO, M.; SEABASTIÁN, A. L. Evolución de la imagen ecográfica durante la gestación de la oveja. **Medicine Veterinarie**, v. 8, p. 300-317, 1991.

RALL, W.F. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. **Cryobiology**, v. 24, p. 387-402, 1987.

RALL, W.F. Advances in the cryopreservation of embryos and prospects for the application to the conservation of salmonid fishes. In: CLOUD, J.G.; THORGAARD, G.M. **Genetic conservation of salmonid fishes**. New York: Plenum Press, 1992, p.45-60.

RALL, W. AND FAHY, G. (1985) Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*, 313, 573.

REICHENBACH, H-D.; SANTOS, M.H.B.; OLIVEIRA, M.A.L.; MEINECKE-TILLMANN, S.; BÜRSTEL, D-M. Sexagem fetal na cabra e na ovelha por ultrasonografia. In: SANTOS, M.H.B.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F. **Diagnóstico de gestação na cabra e na ovelha**. São Paulo: Varela, 2004. p.117-136.

REICHLE, J.K.; HAIBEL, G.K. Ultrasonic biparietal diameter of second trimester pygmy goat fetuses. **Theriogenology**, v.35, n.4, p. 680-694, 1991.

RIESENBERG S, MEINECKE-TILLMANN S, MEINECKE B. Ultrasonic survey of follicular development following superovulation with a single application of pFSH, eCG or hMG in goats. **Small Ruminant Research**, v.40, n.1, p.83-93, 2001.

ROBERTS, S.J. Gestational period – Embryology, fetal membranes and placenta – teratology. In: ROBERTS, S.J. **Veterinary Obstetrics and Genital Diseases (Theriogenology)**. 3rd. Michigan: Edwards Brothers, 1986. p.38-91.

RUBIANES, E.; MENCHACA, A. The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. **Animal Reproduction Science**, v.78, n.3-4, p.271-287, 2003.

SAHA, S., RAJAMAHENDRAN, R., BOEDIONO, A., SUMANTRI, C., SUZUKI, T. Viability of bovine blastocysts obtained after 7, 8 or 9 days of culture in vitro following vitrification and one-step dehydration. **Theriogenology**, v. 46, p. 331–343, 1996.

SALLES, H.O.; SOARES, A.T.; AZEVEDO, H.C.; MOURA SOBRINHO, P.A.; VIANA, A.K.D.S. Diagnóstico precoce de prenhez em caprinos através da ultrasonografia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.21, n.2, p.19-20, 1997.

SANTIAGO MORENO, J. et al. Valoración de estadios precoces de gestación en oveja y cabra mediante ecografía transrectal. **Investigacion Agrária, Produccion y Sanidade Animal**, v.10, p.53-61, 1995.

SANTOS, M.H.B. **Principais métodos de diagnóstico de gestação em pequenos ruminantes domésticos**. Lavras, 2003. 61p. Monografia (Curso de Medicina Veterinária) – Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Lavras.

SANTOS, M.H.B.; CHIAMENTI, A.; AGUIAR FILHO, C.R.; MORAES, E.P.B.X.; CAVALCANTI NETO, C.C.; LIMA, P.F.; OLIVEIRA, M.A.L. Utilização da ultrasonografia na sexagem de fetos da raça Anglo-nubiana pela identificação do tubérculo genital e da genitália externa. **Veterinária e Zootecnia**, v.12, n.1/2, p.52-60, 2005.

SANTOS, M.H.B., GONZALEZ, C.I.M. BEZERRA, F.Q.G., NEVES, J.P., REICHENBACH, H.D., LIMA PF, OLIVEIRA MAL. Sexing of Dorper sheep derived from mating and embryo transfer by ultrasonography. **Reproduction, Fertility and Development**, v.19, p.366-369, 2007.

SANTOS, M.H.B.; LIMA, P.F.; MESSIAS, J.B.; OLIVEIRA, M.A.L. Medidas do concepto utilizadas na prática ultra-sonográfica de pequenos ruminantes. In: _____. **Diagnóstico de gestação na cabra e na ovelha**. São Paulo: Varela, 2004a. p.137-148.

SANTOS, M.H.B.; MORAES, E.P.B.; GUIDO, S.I.; BEZERRA, F.Q., MELO, A.N.; LIMA, P.F.; OLIVEIRA, M.A.L. Sexagem fetal em ovelhas Santa Inês por ultrasonografia. **Ciência Rural**, v.36, n.2, p.573-578, 2006.

SANTOS, M.H.B.; OLIVEIRA, M.A.L.; CHALHOUB, M.; BICUDO, S.D. Diagnóstico de gestação por ultra-sonografia de tempo real. In: _____. **Diagnóstico de gestação na cabra e na ovelha**. São Paulo: Varela, 2004b. p.97-116.

SCHEERBOOM, J.E.M., TAVERNE, M.A.M. A study of the pregnant uterus of the ewe and the goat using real-time ultrasound scanning and electromyography. **Veterinary Research Community**. 9: 45-56, 1985.

SCHNORR, B. Entwicklung der Organe: Entwicklung der Geschlechtsorgane. In: _____. **Embryologie der Haustiere: Ein Kurzlehrbuch**. Stuttgart: Verlag Enke, 1989. p.165-180.

SCHRICK, F. N.; INSKEEP, E. K. Determination of early pregnancy in ewes utilizing transrectal ultrasonography, **Theriogenology**, v. 40, p. 295-306, 1993.

SERGEEV, L.; KLEEMANN, D.O.; WALKER, S.K.; SMITH, D.H.; GROSSER, T.I.; MANN, T.; SEAMARK, R.F. Real-time ultrasound imaging for predicting ovine fetal age. **Theriogenology**, v.34, p.593-601, 1990.

SILVA, R.R. **Sistema agroindustrial da caprinocultura leiteira no Brasil**. Campina Grande, 1996. 38p. Monografia (Especialização em Agribusiness) – Centro de Ciência e Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba.

SPRECHER, D.J., LEY W.B., WHITTIER W. D., BOWEN, J.M., THATCHER, C.D., PELZER, K.D., MOORE J. M. Use of the partial farm budget technique to predict the economic impact to the flock management decision to use B-mode ultrasonographic pregnancy diagnosis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.195, p.199-204, 1989.

STROUD, B.K. Using ultrasonography to determine bovine fetal sex. **Veterinary Medicine**, v.91, p.663-672, 1996.

SOMGASEN, N.; BUCKRELL, B.C.; PLANT, C. et al. In vitro and in vivo survival of cryopreserved sheep embryos. **Cryobiology**, v.32, p.78-91, 1995.

TAINTURIER, D. L. LUOR, M. CHAARI, K.W., SARDIANA, B.. Diagnostic de la gestation chez la brebis por échotomographie. **Revue de Medecine Veterinaire**, v.134, p.523-526, 1983.

TAVERNE, M.A.M., LAVOIR, M.C., VAN OORD, R., VAN DER WEYDEN, G. C. Accuracy of pregnancy diagnosis and prediction of foetal numbers in sheep with linear-array real time ultrasound scanning. **Veterinary Quartely**, v.7, p. 256-63, 1985.

TENÓRIO FILHO, F. **Dinâmica folicular ovariana da cabra avaliada com ultra-som por vias transretal e transvaginal**. Recife, 2003. 62p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

TRALDI A.S., LEBOEUF B., COGNIÉ Y., POULIN N., MERMILLOD P. Comparative results of *in vitro* and *in vivo* survival of vitrified *in vitro* produced goat and sheep embryos. **Theriogenology**, v. 51, p. 175, 1999.

VATJA, G. Vitrification of the oocytes and embryos of domestic animals. **Animal Reproduction Science**, v.60, p.357-364, 2000.

VATJA, G., KUWAYAMA, M., HOLMES, P., BOOTH, P., JACOBSEN, H., GREVE, T. AND CALLESEN, H. (1997) A new way to avoid cryoinjuries of mammalian ova and embryos: the OPS vitrification. **Molecular Reproduction Development**, v.51, 53-58.

WHITE, I.R.; RUSSEL, A.J.F.; FOWLER, D.J. Real-time ultrasonic scanning in the diagnosis of pregnancy and the determination of fetal numbers in sheep. **Veterinary Record**, v.115, p.140-143, 1984.

YAMAGA, Y.; TOO, K. Diagnostic ultrasound imaging in domestic animals: fundamental studies on abdominal organs and fetuses. **The Japanese Journal of Veterinary Research**, v.46, p.203-212, 1984.

CAPÍTULO 1

Artigo publicado:

Medicina Veterinária (ISSN 1809-4678), v.3, n.1, p.23-30, 2009

Viabilidade do exame ultrassonográfico pelas vias transretal, transabdominal e transvaginal para diagnosticar prenhez em cabras e ovelhas⁽¹⁾

(Viability of the ultrasound examination by transretal, transabdominal and transvaginal via to diagnose pregnancy in goats and ewes)

**LM Freitas Neto^A, CR Aguiar Filho^A, JM Almeida Irmão^A, ELC Caldas^A,
MHB Santos^B, JP Neves^C, PF Lima^A, MAL Oliveira^{A(*)}**

^ALaboratório de Biotecnologia da Área de Reprodução do Departamento de Medicina Veterinária/UFRPE. Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, CEP 52171-900, Recife-PE/Brasil.

^BBolsista Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco/FACEPE. Rua Benfica, 150, Madalena, CEP 50720-001 Recife-PE/Brasil.

^CFaculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, UNB, Campus Universitário Darcy Ribeiro, 70910-900 Brasília-DF, Brasil

Resumo

Neste trabalho objetivou-se verificar a viabilidade do exame ultrassonográfico pelas vias transretal, transabdominal e transvaginal para diagnosticar a gestação de cabras (n = 240) e ovelhas (n = 320) no 30^o, 45^o, 60^o e 75^o dia. Foi utilizando um aparelho de ultrassom equipado com um transdutor linear utilizado pelas vias transretal e transabdominal e outro microconvexo endocavitário utilizado por via transvaginal. Nas cabras e ovelhas, o exame ultrassonográfico pela via transretal foi mais rápido ($P < 0,05$) no 30^o e no 45^o dia da gestação, mas, pela via transabdominal foi mais rápido no 60^o e no 75^o dia. Em ambas as espécies, a duração do diagnóstico de gestação foi maior ($P < 0,05$) no 30^o dia do que nos demais, enquanto que a duração do diagnóstico no 75^o dia foi menor ($P < 0,05$) do que no 45^o e 60^o. Independentemente da via de exame e do dia da gestação, o tempo médio para diagnosticar a gestação foi menor ($P < 0,05$) nas cabras do que nas ovelhas. Independentemente da espécie e do dia da gestação, o tempo médio para diagnosticar a gestação pela via transretal foi menor ($P < 0,05$) do que as demais e o da transvaginal foi menor ($P < 0,05$) do que o da via transabdominal. Os resultados permitem concluir que o diagnóstico de gestação é mais rápido pela via transretal, que o tempo de diagnóstico é menor na gestação avançada e na espécie caprina.

Palavras-chave: feto, transdutor linear, transdutor microconvexo.

⁽¹⁾Trabalho extraído da Tese de Doutorado do primeiro autor apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife/PE, Brasil.

^(*)Autor para correspondência/Corresponding author (maloufrpe@uol.com.br).

Abstract

The aim of this work was to verify the viability of the ultrasound examination by transrectal, transabdominal and transvaginal via to diagnose single pregnancy in goats ($n = 240$) and ewes ($n = 320$) at days 30th, 45th, 60th and 75th. The examination was carried out with an ultrasound scanner equipped with a linear-array transducer used by transrectal and transabdominal via and a microconvex endocavitary transducer used by transvaginal via. In does and ewes the ultrasound examination was faster ($P < 0.05$) on days 30th and 45th of pregnancy, however by transabdominal via was faster on day 60th and 75th. In both species the time of pregnancy diagnose was greater ($P < 0.05$) on day 30th than the others days while this time was smallest ($P < 0.05$) at day 75th than day 45th and 60th. Independent of the examination via and the day of pregnancy the average time to diagnose the pregnancy was shorter ($P < 0.05$) in does than in ewes. Depending of the specie and the day of pregnancy the average time to diagnose the pregnancy by transrectal via was shorter ($P < 0.05$) than the other vias and the transvaginal via was shorter ($P < 0.05$) than the transabdominal one. The results allow to conclude that the pregnancy diagnose is faster by transrectal via and the time for diagnosing is shorter in advanced pregnancy and in goat specie.

Key words: fetus, linear transducer, microconvex transducer.

Introdução

O diagnóstico precoce de gestação pela ultrassonografia é um método não invasivo, de elevada precisão e fundamental para aprimorar o manejo reprodutivo e racionalizar a produtividade de rebanhos (HAIBEL, 1990). Fêmeas com prenhez múltipla podem ser submetidas a um programa nutricional adequado visando o máximo aproveitamento do potencial de produção de leite e, ao mesmo tempo, suprir as exigências dos fetos em desenvolvimento (DAVEY, 1986), sobretudo no terço final de gestação, fase na qual a nutrição tem maior influência no peso da cria ao nascer (WHITE et al., 1984).

Nos pequenos ruminantes, o diagnóstico de gestação tem sido normalmente realizado pelas vias transabdominal (CHALHOUB et al., 2004; PADILHA-RIVAS et al., 2005) e transrectal (CHALHOUB, 2000; PADILHA-RIVAS et al., 2005; SANTOS et al., 2004a). A

possibilidade de utilização da via transvaginal foi relatada por Ayres et al. (2000) para diagnosticar a prenhez nos caprinos e de Santos et al. (2004a) e Moraes (2006) em ovinos sem conter informação do tempo de duração do exame em diferentes fases da prenhez.

A ultrassonografia transabdominal representa o melhor método disponível para diagnosticar prenhez em ovinos (CELA et al., 1988; GARCIA et al., 1993; DOIZÈ et al., 1997), sendo normalmente utilizada a partir do 35^o dia de gestação, quando o diagnóstico é baseado no reconhecimento do feto com batimento cardíaco (LAVOIR e TAVERNE, 1989). No método transabdominal, o transdutor é posicionado cranialmente no flanco direito e próximo ao úbere com a cabra em posição de estação, mas, a presença de pêlos e excessiva gordura subcutânea são obstáculos para obtenção da imagem transabdominal (ISHWAR, 1995).

O método ultrassonográfico transretal é limitado devido às dimensões reduzidas do reto nos pequenos ruminantes e em função de um operador inábil provocar lesões (NEVES, 1991). Todavia, apresenta a vantagem de poder ser usado um transdutor linear, amplamente utilizado nos animais de grande porte (OLIVEIRA et al., 2004), além de proporcionar um diagnóstico seguro e precoce, já que é possível diagnosticar a gestação a partir do 23^o dia (MARTÍNEZ et al., 1998).

A ultrassonografia transvaginal é uma via de exame alternativa para quem dispõe somente de um transdutor microconvexo endocavitário (OLIVEIRA et al., 2004). Ainda é pouco difundida, apesar de já ser conhecido que não provoca aborto, infecção do sistema genital e não propicia desconforto ao animal quando da manipulação vaginal (TENÓRIO FILHO et al., 2007). Nos últimos anos, a via transvaginal foi pouco investigada, existindo somente os relatos de Tenório Filho et al. (2007) no monitoramento da dinâmica folicular em caprinos e para diagnosticar prenhez em caprinos (AYRES et al., 2000) e ovinos (SANTOS et al., 2004a; MORAES, 2006).

Com este trabalho objetivou-se verificar a viabilidade do exame ultrassonográfico pelas vias transretal, transabdominal e transvaginal para diagnosticar a prenhez de cabras e ovelhas.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido em propriedade que adotava o sistema semi-intensivo de criação com monta natural controlada. Após o início do estro natural detectado por rufiões e observação de pessoal habilitado, as fêmeas foram levadas ao reprodutor para serem cobertas apenas uma vez, considerando-se esse momento como o dia zero da prenhez.

Foram realizados 240 exames na espécie caprina e 320 na ovina utilizando um aparelho de ultrassom Águila-Pró (*Esaote Pie Medical*[®] - Maastricht/Holanda) equipado com transdutores de dupla frequência, sendo um linear (6,0 e 8,0 MHz) usado pelas vias transretal e transabdominal e outro micro-convexo endocavitário (5,0 e 7,5 MHz) utilizado por via transvaginal, ressaltando-se que as maiores frequências eram utilizadas para ampliar e visibilizar as imagens com maiores detalhes. O transdutor linear foi adaptado a um suporte de PVC revestido com fita adesiva para facilitar a manipulação no reto do animal e o revestimento plástico da parte anterior do transdutor micro-convexo era substituído a cada exame, conforme recomendação de Oliveira et al. (2004). Também se utilizou gel de contato para facilitar a introdução do transdutor e evitar interferências de ar entre o reto e o transdutor. Uma impressora Seikosha VP/1200[®] (*Sony/Seikosha*[®] - Tóquio/Japão) foi utilizada para registro de imagens em papel termográfico.

Os exames ultrassonográficos foram realizados, com a fêmea contida e posicionada em estação, sempre pelo mesmo operador, no 30º, 45º, 60º e no 75º dia da gestação sem quantificar os fetos. A seqüência de utilização dos transdutores foi aleatoriamente alternada para evitar que o exame anterior interferisse no subsequente e que o transdutor utilizado não

fosse caracterizado como desconfortável e de menor eficiência, conforme recomendação de Tenório Filho et al. (2007).

O tempo de exame, aferido com um cronômetro (em segundos), foi determinado desde o momento da introdução do transdutor até a visibilização da imagem de um dos parâmetros característicos de gestação, conforme discriminado por Santos et al. (2004b). Após posicionar o transdutor, procurava-se inicialmente a bexiga para servir como ponto de referência na localização dos cornos uterinos.

Na última semana da gestação, as fêmeas foram transferidas para baias individuais com a finalidade de auxiliar o parto, quando necessário, e anotar os dados para registro das crias, além dos demais cuidados dispensados com a higiene do neonato.

Os resultados foram analisados pela ANOVA, teste de Tukey e Scheffê, sendo considerado o nível de 5% de significância.

Resultados

O tempo médio para diagnosticar a gestação nas cabras e ovelhas variou entre as diferentes vias de exame, bem como entre os dias de gestação (Tabelas 1 e 2). O exame ultrassonográfico pela via transretal foi mais rápido ($P < 0,05$) no 30^o e no 45^o dia da gestação, enquanto que, pela via transabdominal foi mais rápido no 60^o e no 75^o dia.

Tabela 1 - Valores médios ($\bar{x} \pm s$) da duração em segundos do exame ultrassonográfico pelas vias transretal, transabdominal e transvaginal no 30^o, 45^o, 60^o e 75^o dia da gestação de cabras.

| Via do exame | Dia e duração média do diagnóstico da gestação | | | |
|----------------|--|--|--|--|
| | 30 ^o dia $\bar{x} \pm s$ | 45 ^o dia $\bar{x} \pm s$ | 60 ^o dia $\bar{x} \pm s$ | 75 ^o dia $\bar{x} \pm s$ |
| Transretal | 16,25±9,42 ^a | 7,50±4,71 ^a | 6,95±4,49 ^a | 3,93±2,59 ^a |
| Transabdominal | 58,80±15,94 ^{bc} | 10,73±7,21 ^{bc} | 4,20±5,48 ^{bc} | 1,95±1,41 ^{bc} |
| Transvaginal | 31,13±18,70 ^{bd} | 7,95±5,79 ^{bd} | 4,70±2,62 ^{bd} | 4,98±3,29 ^{bd} |

^{ab: cd} Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística ($P < 0,05$).

Tabela 2 - Valores médios ($\bar{x} \pm s$) da duração em segundos do exame ultrassonográfico pelas vias transretal, transabdominal e transvaginal no 30^o, 45^o, 60^o e 75^o dia da gestação de ovelhas.

| Via do exame | Duração média do diagnóstico da gestação | | | |
|----------------|--|--|--|--|
| | 30 ^o dia $\bar{x} \pm s$ | 45 ^o dia $\bar{x} \pm s$ | 60 ^o dia $\bar{x} \pm s$ | 75 ^o dia $\bar{x} \pm s$ |
| Transretal | 25,45±14,42 ^a | 5,75±2,64 ^a | 7,68±6,12 ^a | 6,10±3,59 ^a |
| Transabdominal | 57,23±14,10 ^b | 14,50±10,84 ^b | 4,05±2,16 ^b | 4,25±2,88 ^b |
| Transvaginal | 34,70±20,46 ^c | 9,03±8,71 ^c | 18,28±17,99 ^c | 8,08±5,68 ^c |

Letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatística ($P < 0,05$).

A comparação dos achados entre os dias gestação em ambas as espécies (Figuras 1 e 2) evidenciou que o tempo dispensado para efetuar o diagnóstico no 30^o dia é maior ($P < 0,05$) do que nos demais e que no 75^o dia, a duração do diagnóstico de gestação é menor ($P < 0,05$) do que no 45^o e 60^o dias.

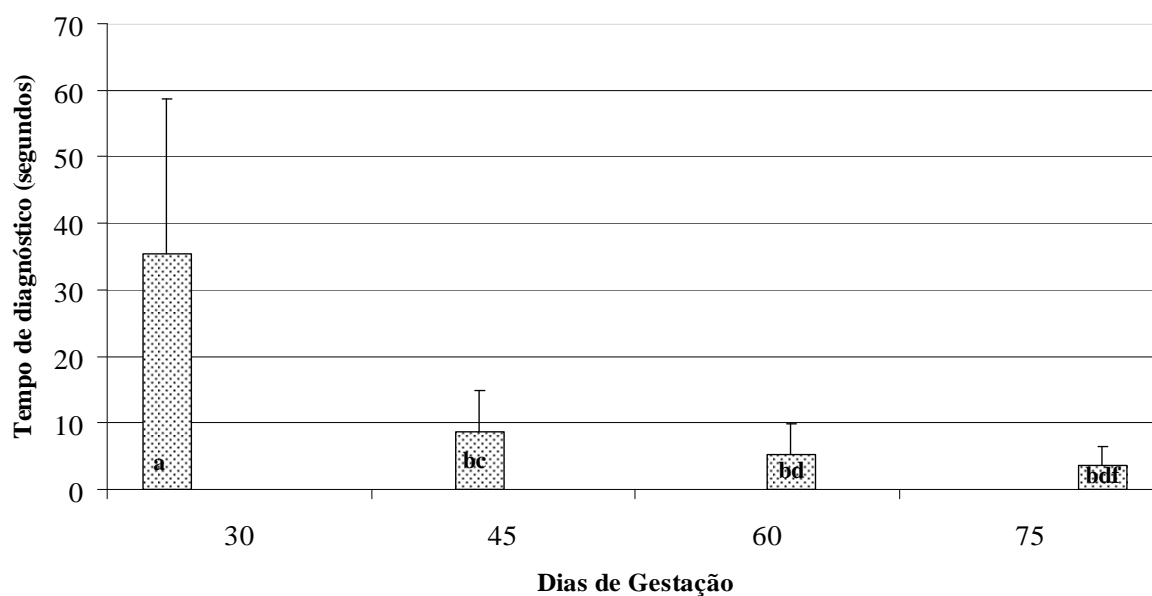


Figura 1 – Duração média ($\bar{x} \pm s$) do exame ultrassonográfico para diagnosticar a gestação de cabras em diferentes períodos (ab; cd; ef = $P < 0,05$).

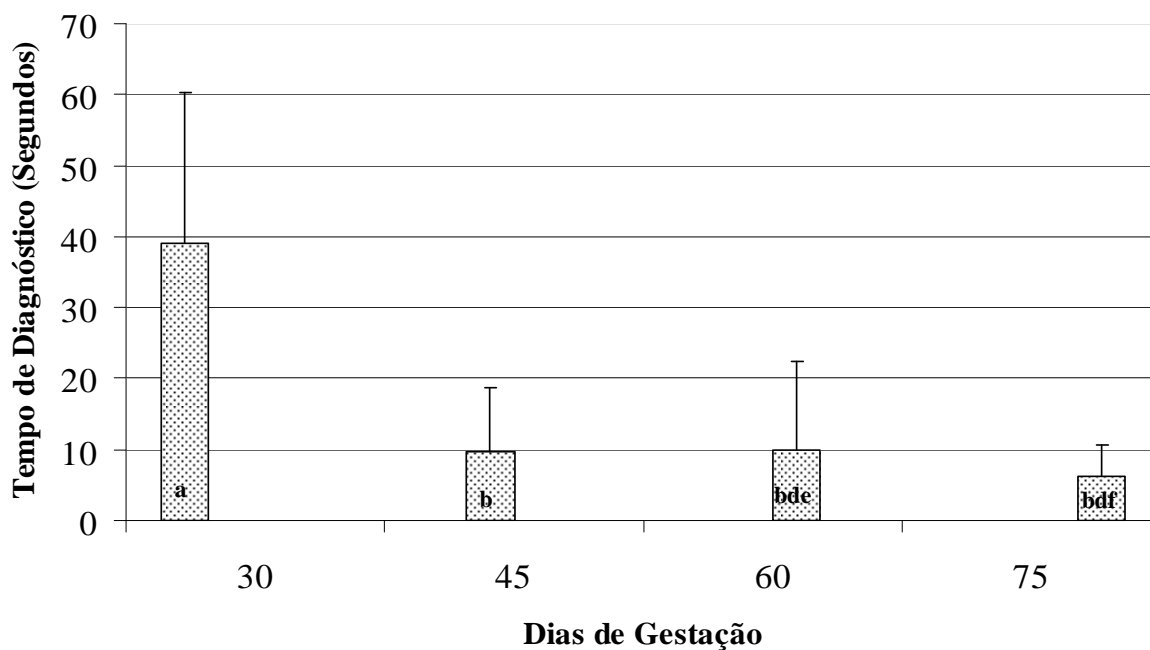


Figura 2 - Duração média ($\bar{x} \pm s$) do exame ultrassonográfico para diagnosticar a gestação de ovelhas em diferentes períodos (ab; cd; ef = $P < 0,05$).

O tempo médio para a realização do diagnóstico de gestação, independentemente da via de exame e do dia da gestação, foi de $13,25 \pm 0,56$ segundos nas cabras e de $16,26 \pm 0,56$ segundos nas ovelhas, evidenciando-se diferença ($P < 0,05$) entre ambos.

Com relação à via de exame, independentemente da espécie e do dia da gestação, a transretal apresentou menor tempo médio ($P < 0,05$) do que as demais, havendo também diferença ($P < 0,05$) entre as vias transabdominal e transretal (Figura 3).

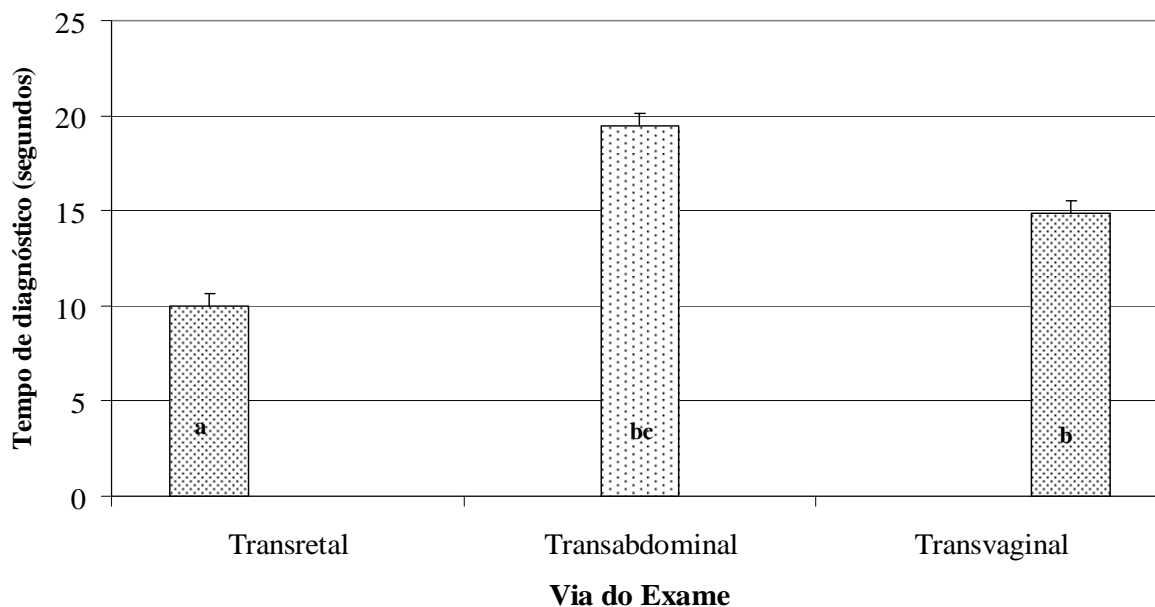


Figura 3 - Duração média ($\bar{x} \pm s$) dos exames ultrassonográficos em cabras e ovelhas pelas vias transretal, transabdominal e transvaginal (ab; cd; ef = $P < 0,05$).

Discussão

A expectativa inicial de que os exames realizados no 60^o e 75^o dia após a cobertura seriam aqueles que demandariam mais tempo para a emissão do diagnóstico de prenhez, em decorrência do útero, especialmente em fêmeas pluríparas, encontrar-se na cavidade abdominal em posição ventral, como sugerido por Santos et al. (2004b), não foi confirmada neste trabalho. Por outro lado, os resultados obtidos no 30^o e 45^o dia da cobertura não confirmaram a hipótese inicial de que seriam os exames mais rápidos. É importante ressaltar que tal expectativa foi fundamentada no tamanho do útero favorecer a realização do exame. No caso da prenhez mais adiantada, entre o 60^o e o 75^o dia, o tamanho do útero, do feto e dos placentomas proporcionariam uma visualização mais rápida do conceito e na prenhez entre o 30^o e o 45^o dia, o útero ainda estaria localizado na cavidade pélvica e não provocaria nenhuma dificuldade ao operador, principalmente quando da utilização do transdutor linear por via transretal, onde o transdutor seria posicionado muito próximo do útero. A explicação mais plausível para o tempo de exame não ter sido menor do que o esperado no 30^o e o 45^o dia é de que as fêmeas poderiam apresentar um maior número de partições e útero com ligamentos

mais relaxados que contribuíram para a insinuação desse órgão na cavidade abdominal e desse modo ter retardado o tempo de diagnóstico.

Neste trabalho, o tempo dispensado para a realização do diagnóstico de prenhez foi inferior aos obtidos por Santos et al. (2004b) utilizando as vias transretal e transvaginal para exame e o mesmo equipamento de ultrassom, bem como menor do que os verificados por Padilha-Rivas et al. (2005) utilizando as vias de acesso transabdominal e transretal. A diferença nos resultados pode ser explicada considerando-se o tipo de gestação que, segundo Davey (1986), é de 10 segundos na gestação simples, podendo aumentar em até 30 segundos na gestação dupla e nas fêmeas não prenhes, o tempo de exame pode variar de 20 a 30 segundos. Outra consideração que precisa ser enfatizada é a condição corporal dos animais que tanto pode afetar a rapidez e a precisão do exame quanto impedir sua realização, como ocorre com animais obesos, segundo relato de Santos et al. (2004b).

Diante do que foi evidenciado é possível argumentar que os resultados deste trabalho corroboram os achados de Ayres et al. (2000), Santos et al. (2004ab) e Moraes (2006) quanto à possibilidade de utilização das vias transretal e transvaginal para diagnosticar a prenhez. É também preciso ressaltar que além da acurácia e da qualidade de resolução de imagem, a precocidade de diagnóstico, de acordo com Martínez et al. (1998) e a rapidez do exame é um parâmetro que o operador precisa levar em consideração para não provocar desconforto ao animal, como destacado por Tenório Filho et al. (2007). Assim sendo é interessante sugerir que a via transretal deva ser priorizada porque, na média geral, os exames foram mais rápidos. Entretanto, considerando que o fundamento maior do diagnóstico de prenhez é sua precocidade e que a diferença de tempo entre às vias de exame nos primeiros 60 dias após a cobertura não ultrapassa a casa dos 10 segundos, questiona-se até que ponto essa diferença possa interferir no bem estar do animal e provocar desconforto que prejudique a qualidade e a confiabilidade do exame. Neste trabalho não foi observado qualquer sinal de irritação da mucosa retal e tampouco perda de fetos das fêmeas examinadas, razão pela qual pode ser

recomendado diagnosticar a gestação por via transretal utilizando o transdutor linear, apesar da opinião de Neves (1991), Reichle e Haibel (1991) e de Hesselink e Taverne (1994) afirmarem que às dimensões reduzidas do reto nos ovinos dificulta a manipulação do transdutor e associada à inabilidade do operador pode provocar lesões e até mesmo aborto. Ainda é oportuno comentar que a sugestão de uso do transdutor linear neste trabalho é em razão de sua versatilidade, podendo ser também utilizado tanto por via transabdominal para diagnosticar gestação nos pequenos ruminantes, segundo Oliveira et al. (2004), quanto para colheita *in vivo* de oócitos bovinos por via transvaginal, de acordo com relato de Santos et al. (2003).

Considerando a rapidez do exame pela via transvaginal, o fato de não ter provocado aborto ou infecção do sistema genital, bem como de não ter propiciado desconforto aos animais, resultado que corrobora as observações de Tenório Filho et al. (2007), é possível afirmar que é uma via de exame viável para diagnosticar prenhez em caprinos e ovinos como previamente relatado por Ayres et al. (2000) e Santos et al. (2004a).

O diagnóstico de prenhez na espécie caprina é mais rápido do que na ovina, pelo menos em três segundos. Esta maior rapidez pode ser devido à presença de gordura subcutânea excessiva, como referiram-se Ishwar (1995), bem como ao temperamento mais estressado da espécie ovina quando da realização do exame.

Os resultados permitem concluir que o diagnóstico de prenhez é mais rápido na prenhez mais avançada, que a via transretal é mais rápida para diagnosticar a prenhez e que ela é mais rápido na espécie caprina.

Referências

AYRES, S.L. et al. Evaluation of follicular development and early pregnancy in goats using transvaginal ultrasound. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON GOATS, 7th, 2000,

Tours. **Proceedings...** Tours: CCSI, 2000. p.481.

CELA, M. et al. F. Monitoraggio ecografico trans-addominale dell'accrescimento del feto ovino. **Annali Della Facoltà di Medicina Veterinaria di Pisa**, XLI, p.283-300, 1988.

CHALHOUB, M. 2000. **Aspectos ultra-sonográficos e aspecto hormonal da gestação ovina (Ovis Rires) nas raças Bergamácia e ideal**. Botucatu, 120p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.

CHALHOUB, M., OLIVEIRA, M.A.L., SANTOS, M.H.B., BARTOLOMEU, C.C. 2004. Características do ultra-son Scan B. In: SANTOS, M.H.B; OLIVEIRA, M.A.L; LIMA, P.F. **Diagnóstico de gestação na cabra e na ovelha**. São Paulo: Varela, p.73-84.

DAVEY, C.G. An evaluation of pregnancy testing in sheep using a real-time ultrasound scanner. **Australian Veterinary Journal**, v.63, n.10, p.347-8, 1986.

DOIZÉ, F. et al. Determination of gestational age in sheep and goats using transrectal ultrasonographic measurements of placentomes. **Theriogenology**, v.48, p.449-60, 1997.

GARCIA, A. et al. Accuracy of ultrasonography in early pregnancy diagnosis in the ewe. **Theriogenology**, v.39, p.847-861, 1993.

HAIBEL, G. K. Use of ultrasonography in the reproductive management of sheep and goats herds. In: SMITH, M. C. **Advances in sheep and goat medicine. The Veterinary Clinics of North America**, Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1990. p.597-613.

HESSELINK, J.W.; TAVERNE, M.A. Ultrasonography of the uterus of the goat. **The Veterinary Quarterly**, v.16, n.1, p.41, 1994.

ISHWAR, A. K. Pregnancy diagnosis in sheep and goats: a review. **Small Ruminant Research**, v.17, p. 37-44, 1995.

LAVOIR, M.C.; TAVERNE, M.A.M. The diagnosis of pregnancy and pseudopregnancy, and the determination of foetal numbers of goats, by means of real-time ultrasound scanning. In: TAVERNE, M.A.M.; WILLEMSE, A.H. **Diagnostic ultrasound and animal reproduction**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1989. p.89–96.

MARTÍNEZ, M.F.; BOSCH, P.; BOSCH, R.A. Determination of early pregnancy and embryonic growth in goats by transrectal ultrasound scanning. **Theriogenology**, v.49, p.1555-1565, 1998.

MORAES, E.P.B.X. **Utilização da ultra-sonografia para diagnosticar alterações uterinas em cabras, gestação, perdas embrionárias fetal e sexo fetal em ovelhas**. Recife, 2006. 112f. Dissertação. (Mestrado em Ciência Veterinária) – Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco.

NEVES, J.P. Diagnóstico de gestação por ultra-sonografia. **Ciência Rural**, v.21, n.3, p.457-465, 1991.

OLIVEIRA, M.A.L. et al. Aplicabilidade do Scan B na reprodução de pequenos ruminantes. In: SANTOS, M.H.B.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F. **Diagnóstico de gestação na cabra e na ovelha**. São Paulo: Varela, 2004. p. 85-96.

PADILLA-RIVAS, G.R.; SOHNREY, B.; HOLTZ, W. Early pregnancy detection by real-time ultrasonography in Boer goats. **Small Ruminants Research**, v.58, p.87-92, 2005.

REICHLER, J.K.; HAIBEL, G.K. Ultrasonic biparietal diameter of second trimester pygmy goat fetuses. **Theriogenology**, v.35, n.4, p. 680-694, 1991.

SANTOS, M.H.B. et al. Punção folicular em bovinos guiada por ultra-som utilizando transdutores linear e micro-convexo endocavitário. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.3, p.465-466, 2003.

SANTOS, M.H.B. et al. Diagnóstico ultra-sonográfico de gestação em ovelhas utilizando as

vias transretal e transvaginal. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p.243, 2004a.

SANTOS, M.H.B. et al. Diagnóstico de gestação por ultra-sonografia de tempo real. In: _____. **Diagnóstico de gestação na cabra e na ovelha**. São Paulo: Varela, p.97-116, 2004b.

TENÓRIO FILHO, F. et al. Follicular dynamics in Anglo-Nubian goats using transrectal and transvaginal ultrasound. **Small Ruminant Research**, v.72, n.1, p.237, 2007.

WHITE, I.R.; RUSSEL, A.J.F.; FOWLER, D.J. Real-time ultrasonic scanning in the diagnosis of pregnancy and the determination of fetal numbers in sheep. **Veterinary Record**, v.115, p.140-3, 1984.

CAPÍTULO 2

Artigo publicado:

Reproduction, Fertility and Development (ISSN 1031-3613), v.22, n. 2, p.489–493, 2010.

Reliability of ultrasound for early sexing of goat fetuses derived from natural mating and from fresh, frozen and vitrified embryo transfer

L.M. Freitas Neto¹, M.H.B. Santos², C.R. Aguiar Filho¹, J.M. Almeida-Irmão¹, E.R. Santos Junior², E.L.C. Caldas³, P.F. Lima¹, M.A.L. Oliveira¹

¹Laboratório de Biotécnicas Aplicadas à Reprodução do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife-PE, Brasil.

²Bolsita (BFP) da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Rua Benfica, 150, Madalena, 50720 001 Recife-PE, Brasil.

³Diagnóstico por Imagem do Hospital Veterinário da Faculdade Pio Décimo. Av. Tancredo Neves, 5655, Jaboatã, 49080 470 Aracaju-SE, Brasil.

Abstract

The aim of this study was to identify the migration period of the genital tubercle and its later differentiation into external genital structures in fetuses derived from natural mating and fetuses from fresh, frozen and vitrified embryo transfer. A transrectal ultrasound with a double-frequency linear transducer (6.0 and 8.0 MHz) was used to monitor 123 goat fetuses which were allocated in four groups. Fetuses originated from controlled natural mating (G1, n = 32) and fetuses derived from fresh (G2, n = 34), frozen (G3, n = 30) and vitrified (G4, n = 27) embryo transfer, the transferable embryos were collected 7 days after mating by laparoscopy. Migration of the genital tubercle occurred significantly earlier ($P < 0.05$) in G1 (45.21 ± 3.31 days) than in G2 (48.50 ± 3.70 days), G3 (48.93 ± 3.61 days) and G4 (48.85 ± 3.23 days). The visualization of the scrotum, prepuce and vulva occurred significantly earlier ($P < 0.05$) in G1 (51.20 ± 2.56 ; 50.35 ± 1.59 ; 49.75 ± 1.73 days) than in G2 (53.25 ± 2.02 ; 53.37 ± 1.92 ; 51.76 ± 2.10 days), G3 (53.37 ± 1.92 ; 52.31 ± 2.00 ; 51.78 ± 2.22 days) and G4 (54.06 ± 1.75 ; 52.46 ± 1.95 ; 51.91 ± 2.06 days), respectively. Our results show that fetal sexing is feasible after 55 days for fetuses from natural mating and after 60 days in fetuses from fresh and cryopreserved embryos. Thus, real-time ultrasonography is a reliable tool for fetal sex determination in goats after day 50 of pregnancy, taking into account both the location of the genital tubercle and the identification of external genital structures.

Keywords: genital tubercle, prepuce, scrotum, vulva.

Introduction

Embryo transfer drives high investments for goat production systems in the Northeast of Brazil. Investments range from selection of skilled personnel to improvement of property facilities designed for animals of higher genetic value, which are acquired through artificial insemination and embryo transfer (Bandeira et al., 2004).

The establishment of an embryo freezing/thawing protocol that is feasible, quick and efficient still poses a major challenge for researchers. With this in mind, vitrification - which consists of exposing the embryo to high concentrations of a cryoprotective agent followed by

direct immersion in liquid nitrogen - is an interesting alternative that favors routine transfer of cryopreserved embryos (Kasai et al., 1990; Papadopoulos et al., 2002). Embryo vitrification is faster than freezing (Kasai, 1996), requires smaller volumes of preservation agents and avoids the negative effects associated with the formation of ice crystals within and outside the cell, thus, preventing damage to organelles and cell membranes (Kasai et al., 1990; Papadopoulos et al., 2002).

Previous studies demonstrate that cryopreservation delays gestation in at least four days (Ptak et al., 1999; Traldi et al., 1999; Papadopoulos et al., 2002). This might be due to a delay in the re-establishment of cell activity after thawing. Data reported by Santos et al. (2007cf) demonstrate that the migration of the genital tubercle of sheep embryos derived from frozen embryo transfer is delayed in comparison to fetus produced from natural mating. This study suggests that fetal sexing of sheep embryos derived from frozen embryo transfer should be performed 5 days later (at 55 days of gestation) than in fetuses produced by natural mating.

Determination of fetal sex in utero is useful for management decisions of dairy or meat goats as well as for commercialization of fetuses of a certain sex (Santos et al., 2005). The development of integrated reproductive management systems that combine ultrasonography with other reproductive technologies will further increase the practical applications of ultrasonography (Santos et al., 2007e).

The period of genital tubercle migration of goat fetuses produced by natural mating is longer than that observed in sheep (Azevedo et al., 2009). In goats the period of genital tubercle migration can vary between 45 and 55 days in Savana (Santos et al., 2007a) and Saanen (Santos et al., 2007e); between 41 and 51 in Toggenburg (Santos et al., 2007b) and American Alpine (Santos et al., 2007d), between 40 and 50 in Moxotó (Santos et al., 2008); between 44 and 49 in Anglo-Nubian (Santos et al., 2006a); between 43 and 54 in Boer (Santos et al., 2006c); and between 45 and 53 days in crossbred goats (Santos et al., 2007g). However, there are no reports regarding the period of genital tubercle migration in embryo

transfer derived goat fetus, whether they are transferred to receptor females immediately after collection, or after undergoing some cryopreservation process.

Since sexing of goat fetuses can be incorporated into routine ultrasound examination for early pregnancy diagnosis, the aim of this study was to determine the day of the final position of the genital tubercle and the period for identification of external genital structures of Boer fetuses derived from natural mating and fresh, frozen or vitrified embryo transfer.

Material and Methods

In this study, 123 Boer fetuses from 123 single pregnant goats were examined by single transrectal ultrasound with 30 days of pregnancy and allocated into four groups (G1, G2, G3 and G4). The ewes aged from two to five years and body condition score ranged between 3 and 4 on a scale from 1 to 5 (Gonzalez-Stagnaro, 1991), were kept semi-intensive. The animals were submitted to semi-intensive management by grazing in corrals and feeding on legumes. When stabled they received triturated napier grass and a protein concentrated and had free access to a mineral mixture and water.

In G1, the fetuses (n = 32) were originated from controlled natural mating, whereas in G2 (n = 34), G3 (n = 30) and G4 (n = 27) the fetuses were derived from embryo transfer, and had been collected 7 days after mating, as described by Lima et al. (1996). G2 Group was composed of fresh embryos, transferred to recipients immediately after collection. G3 Group was composed of embryos that had been frozen as described by Freitas et al. (2008), and G4 Group consisted of vitrified embryos, produced according to Papadopoulos et al. (2002). The cryopreserved embryos were transferred to recipient goats using the technique described by Freitas et al. (2008).

The day of mating during estrus was designated as day 0 of pregnancy. After pregnancy diagnosis by transretal ultrasonography, the fetuses were monitored from the 40th to the 60th day of pregnancy at 24-h intervals. Fetuses were diagnosed as males when the

genital tubercle was positioned immediately caudal to the umbilical cord and as females when the genital tubercle was positioned below the tail (Figure 1) as suggested by Santos et al. (2007g). Even after genital tubercle migration, fetal monitoring continued until identification of external genital structures: vulva in females and, prepuce and scrotum in males (Figure 1).

The same experienced operator performed all ultrasound examinations with the animals restrained in a chute in standing position. Ultrasound was carried out with an Aquila-Pro (Pie Medical, Maastrich - Netherlands) apparatus equipped with a dual frequency, linear transducer (6.0 and 8.0 MHz) coupled to a PVC support to facilitate manipulation within the rectum of each doe, as described by Oliveira et al. (2004). A printer (Seikosha VP/1200, Tokyo, Japan) was also attached to the ultrasound equipment.

Since was not done fasting the content of the rectum was manually removed and an ultrasonic coupling gel was applied to the transducer prior to introduction into the rectum as suggested by Santos et al. (2007e). After location of the fetus, a scanning technique for fetal sexing was established, using ultrasonographic longitudinal ventral plane described by Azevedo (2007).

In the last week of pregnancy, females were transferred to individual boxes so that the sex of the offspring could be confirmed immediately after birth.

The average values for the migration day of genital tubercle as well as for visualization day of scrotum, prepuce and vulva nipples of fetuses from controlled natural mating and fresh, frozen and vitrified embryo were evaluated using the analysis of variance and Tukey's test. The accuracy of fetal sexing was analyzed by the chisquared test with a 5% level of significance.

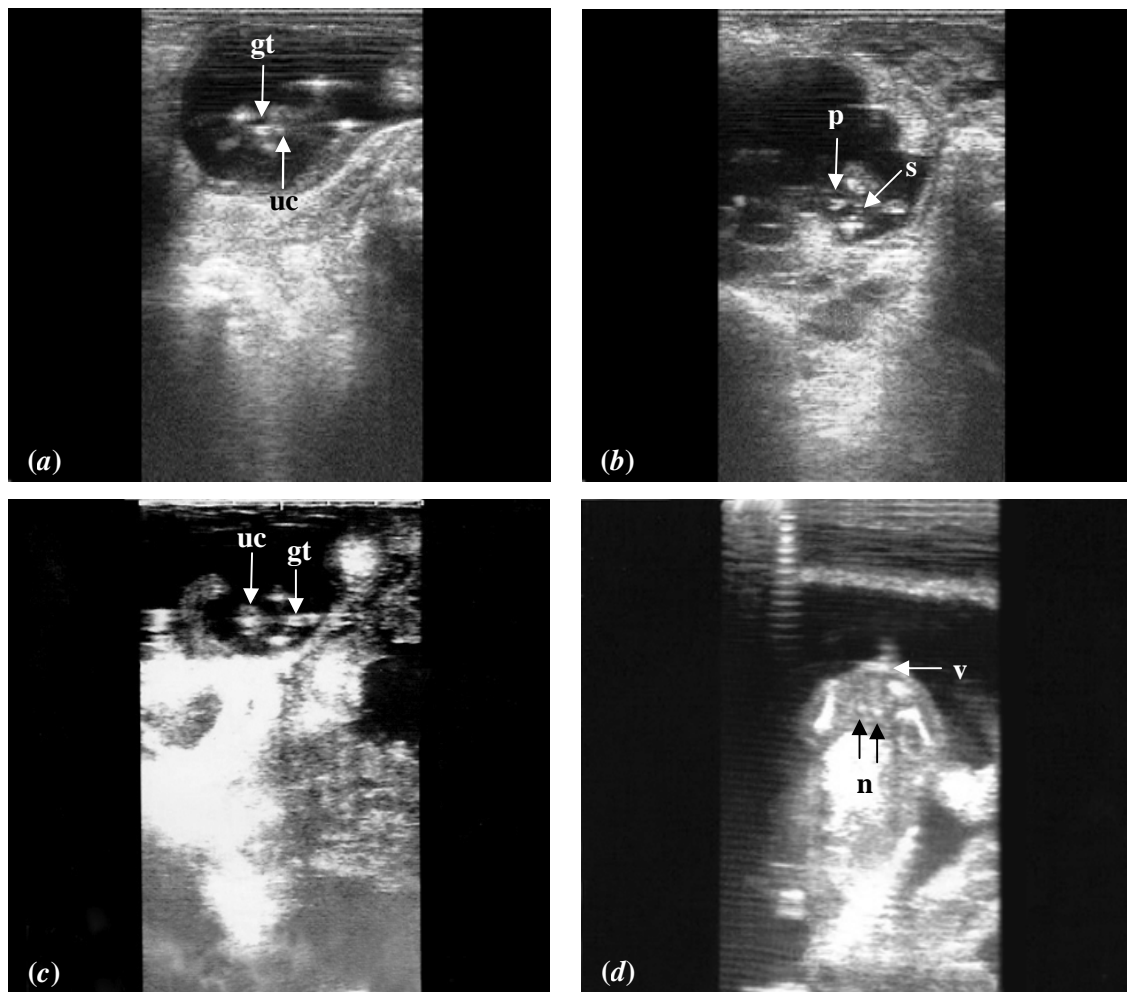


Figure 1. Images of (a, b) male fetuses showing genital tubercle (gt), umbilical cord (uc), prepuce (p) and scrotum (s). (c, d) Female fetuses showing genital tubercle (gt), umbilical cord (uc), nipples (n) and vulva (v).

Results

The migration period of the genital tubercle occurred earlier in G1 ($P < 0.05$) than in G2, G3 and G4, however, no significant difference ($P > 0.05$) was observed among G2, G3 and G4 (Table 1).

Visualization of external genitalia occurred significantly earlier in G1 ($P < 0.05$) than in G2, G3 and G4, however, no difference ($P > 0.05$) was registered between G2, G3 and G4 (Table 1).

Difference ($P < 0.05$) between visualization of scrotal bag and prepuce was observed only in G4. The vulva was visualized earlier ($P < 0.05$) than the scrotum in all groups (Table 1).

Table 1. Mean \pm s.e.m. of the day of genital tubercle migration and identification of the external genital structures of Boer fetuses derived from natural mating (NM), fresh (FrE), frozen (FE) and vitrified (VE) embryo transfer

| Group | Genital tubercle | Scrotum | Prepuce | Vulva |
|----------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| G1 (NM) | 45.21 ^{aA} \pm 3.31 | 51.20 ^{aBC} \pm 2.56 | 50.35 ^{aB} \pm 1.59 | 49.75 ^{aBD} \pm 1.73 |
| G2 (FrE) | 48.50 ^{bA} \pm 3.70 | 53.25 ^{bBC} \pm 2.02 | 52.17 ^{bB} \pm 1.97 | 51.76 ^{bBD} \pm 2.10 |
| G3 (FE) | 48.93 ^{bA} \pm 3.61 | 53.37 ^{bBC} \pm 1.92 | 52.31 ^{bB} \pm 2.00 | 51.78 ^{bBD} \pm 2.22 |
| G4 (VE) | 48.85 ^{bB} \pm 3.23 | 54.06 ^{bBC} \pm 1.75 | 52.46 ^{bBD} \pm 1.95 | 51.91 ^{bBD} \pm 2.06 |

Values with different superscript letters in same column and row differ significantly ($P < 0.05$)

Figure 2 shows high variation of the period of sexing of goat fetuses based on the final position of genital tubercle and/or on the presence of external genitalia in the different groups. Considering all fetuses that were born, accuracy of diagnosis was 100% for all groups in the experiment.

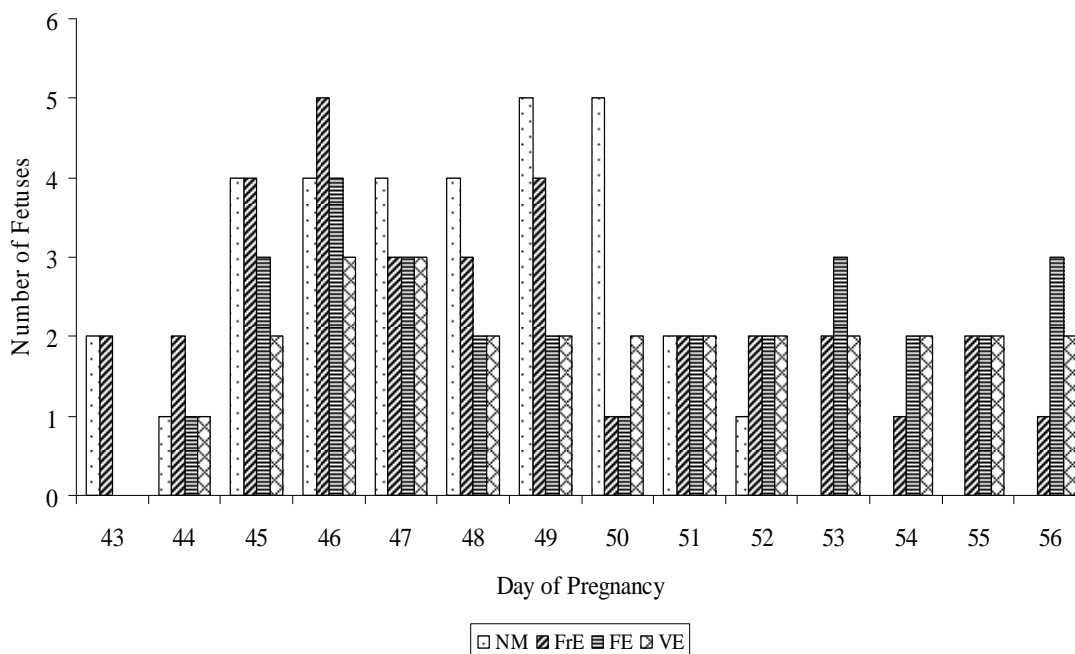


Figure 2. Sexing of goat fetuses derived from natural mating (NM), fresh embryo transfer (FrE), frozen embryo transfer (FE) and vitrified embryo transfer (VE) taking into consideration the final position of the genital tubercle and/or by visualization of the external genitalia.

Discussion

The determination of the ideal time to identify the final position of the genital tubercle by ultrasonography in small ruminants is vital for higher accuracy in fetal sexing (Santos et al., 2006b). Numerous studies define the period of genital tubercle migration in goat fetuses derived from natural mating (Santos et al., 2006ac; Santos et al., 2007abdefg; Santos et al., 2008; Azevedo et al., 2009). However, no information is available for fetuses derived from, fresh or cryopreserved embryo transfer.

In the present study, genital tubercle migration and the visualization of external genitalia occurred later in fetuses derived from fresh, frozen and vitrified embryo transfer than in fetuses produced by natural mating. This comes in agreement with Santos et al. (2007cf) who observed that genital tubercle migration, of Dorper and Morada Nova sheep fetuses derived from frozen embryo transfer was delayed compared to those from natural mating. Similar information was registered by Ptak et al. (1999), Traldi et al. (1999) and Papadopoulos et al. (2002). The authors also reported that the duration of pregnancy of cryopreserved sheep embryo was four days longer.

Frozen-thawed embryos presented low cellular activity as suggested by Ptak et al. (1999), Traldi et al. (1999) and Papadopoulos et al. (2002) and the delay in genital tubercle migration to handling of frozen embryos as attributed by Santos et al. (2007cf). Results of this study indicate that the outcome was influenced by embryo manipulation, because no difference was noticed between fresh and cryopreserved embryos.

Regardless of whether the fetus is derived from natural mating, fresh or cryopreserved embryo transfer, fetal sexing based exclusively on the final position of the genital tubercle requires good ultrasound scanning equipment and a skilled and experienced operator who knows the exact migration period for each species and breed. This recommendation is particularly important in the case of female fetuses, because genital tubercle migration from its initial position to its final position is shorter than in male fetuses.

The vulva had an earlier detection than scrotum since had a shorter distance covered by the genital tubercle of the female prior to reaching its final position under the tail. Later than this component transforms into of the external genital structure.

Although sexing of fetuses produced by natural mating is possible between 38 and 48 days of pregnancy, it has been suggested that the ultrasound scanning in sheep should be performed after 50 days of gestation (Santos et al., 2006b). However, this assumption is not always correct for fetuses derived from frozen embryo transfer, because in some fetuses this migration can be delayed up to 56 days of pregnancy. Therefore, we recommend the diagnosis of fetal sex on day 60 of pregnancy. However, it is important to point out that the genital tubercle of some fetuses may migrate after 60 days of pregnancy due to species-specific and individual variations (Oliveira et al., 2005; Santos et al., 2006b).

The results obtained in the present study suggest that transrectal ultrasound scanning is a reliable technique for fetal sexing in goats when ultrasound imaging is properly timed within a specific period of pregnancy and accurately performed with proper equipment and by experienced operators.

Based on the results of this study, it is safe to conclude that genital tubercle migration and the later differentiation into external genital structures differs between fetuses derived from natural mating and embryo transfer, and that fetal sexing can be performed after 60 days of pregnancy, especially in the case of fetuses derived from embryo transfer. In the case of fetuses derived from natural mating, under the right circumstances, fetal sexing is possible after 55 days of pregnancy.

References

Azevedo, E.M.P. (2007). Utilização da ultra-sonografia em ovinos e caprinos para sexar fetos e estimar a idade e o peso fetal ao nascimento. Thesis (Doutorado em Ciência Veterinária) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, Universidade Federal

Rural de Pernambuco, Recife.

Azevedo, E.M.P., Santos, M.H.B., Aguiar Filho, C.R., Freitas Neto, L.M., Bezerra, F.Q.G., Neves, J.P., Lima, P.F., and Oliviera, M.A.L. (2009). Migration time of the genital tubercle caprine and ovine fetuses: comparison between breeds, sexes and species. *Acta Vet Hung.* **57**, 147-154.

Bandeira, D.A., Santos, M.H.B., Correia Neto, J. and Nunes, J.F. (2004). Aspectos gerais da caprino-ovinocultura no Brasil e seu reflexos produtivo e reprodutivo. In: Santos, M.H.B., Oliveira, M.A.L., and Lima, P.F. (eds) Diagnóstico de gestação na cabra e na ovelha. Varela, São Paulo, pp.1-8.

Freitas, V.J.F., Oliveira, M.A.L., Simplício, A.A., Baril, G., Poulin, N., and Cognie, Y. (2008). Produção, criopreservação e transferência de embriões em pequenos ruminantes. In: Gonçalves, P.B.D., Figueiredo, J.R., and Freitas, J.V.F. (eds), Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. Roca, Porto Alegre, pp.241-260.

Gonzalez-Stagnaro, C. (1991). Control y manejo de los factores que afectan al comportamiento reproductivo de los pequeños rumiantes en el mediotropical. In 'Proceedings of the International Symposium on Nuclear and Related Techniques in Animal Production and Health, Vienna, 1991'. (International Atomic Energy Agency.) pp. 405–421. (International Atomic Energy Agency: Vienna.)

Kasai, M., Komi, J.H., Takakamo, A., Tsudera, H., Sakurai, T., and Machida, T. (1990). A simple method for mouse embryo cryopreservation in a low toxicity vitrification solution, without appreciable loss of viability. *J Reprod Fertil* **89**, 90-97.

Kasai, M. (1996). Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. *Anim Reprod Sci* **42**, 67-75.

Lima, P.F., Oliveira, M.A.L., and Guerra, M.M.P. (1996). Eficiência de diferentes métodos de colheita embrionária em caprinos. *Rev. Brasil. Reprod. Anim.*, **20**, 63-68.

Oliveira, M.A.L., Reichenbach, H-D., Santos, M.H.B., and Tenório Filho, F. (2004). Aplicabilidade do scan B na reprodução de pequenos ruminantes. In: Santos, M.H.B., Oliveira, M.A.L., and Lima, P.F. (eds), Diagnóstico de gestação na cabra e na ovelha. Varela, São Paulo, pp. 85-96.

Oliveira, M.A.L., Santos, M.H.B., Moraes, E.P.B.X., Moura, R.T.D., Chiamenti, A., Rabelo, M.C., Bezerra, F.Q.G., Lima, P.F. (2005). Early identification of fetal sex and determination of the genital tubercle migration's day in dairy goats using ultrasound. *Acta Sci Ve.* **32**, 459.

Papadopoulos, S., Rizos, D., Duffy, P., Wade, M., Quinn, K., Boland, M.P., and Lonergan, P. (2002). Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, *in vivo* or *in vitro* produced ovine blastocysts. *Anim. Reprod. Sci.* **74**, 35-44.

Ptak, G., Dattena, M., Loi, P., Tischner, M., and Cappai, P. (1999). Ovum pick-up in sheep: efficiency of *in vitro* embryo production, vitrification and birth of offspring. *Theriogenology.* **52**, 1105-1114.

Santos, M.H.B., Moraes, E.P.B.X., Moura, R.T.D., Lima, P.F., Reichenbach, H.-D. and Oliveira, M.A.L. (2005) Early identification of the fetal sex in small ruminants by ultrasonography. *Acta Sci. Vet.* **33**, 131-134.

Santos, M.H.B., Chiamenti, A., Aguiar Filho, C.R., Moraes, E.P.B.X., Cavalcanti Neto, C.C., Lima, P.F., and Oliveira, M.A.L. (2006a). Use of ultrasound for sexing fetus of Anglo-nubiana breed by identification of the genital tubercle and external genitalia. *Vet Zootec.* **12**, 52-60.

Santos, M.H.B., Moraes, E.P.B.X., Guido, S.I., Bezerra, F.Q.G., Melo, A.N., Lima, P.F., and Oliveira, M.A.L. (2006b). Fetal sexing in Santa Inês ewes by ultrasonography. *Ciência Rural*. **36**, 573-578.

Santos, M.H.B., Moura, R.T.D., Chaves, R.M., Soares, A.T., Neves, J.P., Reichenbach, H.-D., Lima, P.F., and Oliveira, M.A.L. (2006c). Sexing of Boer Goat fetuses using transrectal ultrasonography. *Anim Reprod*. **3**, 359-363.

Santos, M.H.B., Aguiar Filho, C.R., Freitas Neto, L.M., Santos Junior, E.R., Freitas, V.J.F., Neves, J.P., Lima, P.F. and Oliveira, M.A.L. (2007a). Sexing of Savana goat fetuses using transrectal ultrasonography. *Medicina Veterinária*. **1**, 50-55.

Santos, M.H.B., Aguiar Filho, C.R., Freitas Neto, L.M., Silva, S.R., Freitas, V.J.F., Neves, J.P., Lima, P.F., and Oliveira, M.A.L. (2007b). Early caprine fetal sexing of Toggenburg breed by transretal ultrasonography. *Medicina Veterinária*, **1**, 48-54,

Santos, M.H.B., Gonzalez, C.I., Bezerra, F.Q.G., Neves, J.P., Reichenbach, H.-D., Lima, P.F., and Oliveira, M.A.L. (2007c). Sexing of Dorper sheep fetuses derived from natural mating and embryo transfer by ultrasonography. *Reprod Fertil Dev*. **19**, 366-369.

Santos, M.H.B., Moraes, E.P.B.X., Aguiar Filho, C.R., Chaves, R.M., Neves, J.P., Lima, P.F., and Oliveira, M.A.L. (2007d). Fetal sexing by ultrasonography identifying the genital tubercle or external genitália of América Alpine goats. *Ciência Anim Bras*. **8**, 325-331.

Santos, M.H.B., Moraes, E.P.B.X., Bezerra, F.Q.G., Moura, R.T.D., Paula-Lopes, F.F., Neves, J.P., Lima, P.F., and Oliveira, M.A.L. (2007e). Early fetal sexing of Saanen goats by use of transrectal ultrasonography to identify the genital tubercle and external genital. *Am J Vet Res*. **68**, 561-564.

Santos, M.H.B., Rabelo, M.C., Guido, S.I., Torreão, J.N.C., Lopes Júnior, E.S., Freitas, V.J., Lima, P.F., and Oliveira, M.A.L. (2007f). Determination of the genital tubercle

migration period in Morada Nova sheep fetuses by ultrasonography. *Reprod Domest Anim.* **42**, 214-217.

Santos, M.H.B., Rabelo, M.C., Aguiar Filho, C.R., Dezzoti, C.H., Reichenbach, H.-D., Neves, J.P., Lima, P.F., and Oliveira, M.A.L. (2007g). Accuracy of early fetal sex determination by ultrasonic assessment in goats. *Res Vet Sci.* **83**, 251-255.

Santos, M.H.B., Aguiar Filho, C.R., Freitas Neto, L.M., Silva, S.R., Neves, J.P., Lima, P.F., and Oliveira, M.A.L. (2008). Use of ultrasound to sexing Moxotó breed fetuses identifying the final position of the genital tubercle. *Arch. Zooot.* **57**, 505-511.

Traldi, A.S., Leboeuf, B., Cognié, Y., Poulin, N. and Mermillod, P. (1999). Comparative results of *in vitro* and *in vivo* survival of vitrified *in vitro* produced goat and sheep embryos. *Theriogenology.* **51**, 175.

CAPÍTULO 3

Artigo aceito para publicação:

Journal of Reproduction and Development (ISSN 0916-8818), v.56, n. 3, p.290–294, 2010.

Ultrasonographic fetal sex identification in pregnant sheep derived from natural mating and embryo transfer

Leopoldo Mayer de Freitas Neto¹⁾, Maico Henrique Barbosa dos Santos²⁾,
Cristiano Rocha de Aguiar Filho¹⁾, José Monteiro de Almeida-Irmão¹⁾,
Eduardo Luiz Cavalcanti Caldas³⁾, Jairo Pereira Neves³⁾, Paulo Fernandes Lima¹⁾
and Marcos Antonio Lemos de Oliveira¹⁾

¹⁾*Laboratório de Biotécnicas Aplicadas à Reprodução do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco. Av. Dom Manoel de Medeiros s/n, Dois Irmãos, 52171-900 Recife-PE, Brazil. E-mail: maloufrpe@uol.com.br.*

²⁾*Bolsita (BFP) da Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Rua Benfica, 150, Madalena, 50720 001 Recife-PE, Brazil.*

³⁾*Diagnóstico por Imagem do Hospital Veterinário da Faculdade Pio Décimo. Av. Tancredo Neves, 5655, Jaboatana, 49080 470 Aracaju-SE, Brazil.*

⁴⁾*Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, UNB, Campus Universitário Darcy Ribeiro, 70910-900 Brasília-DF, Brazil.*

Running head: Fetal sex identification in sheep

Abstract

The objective of this study was to identify the migration period of the genital tubercle and the period of visualization of external genital structures in fetuses of the Dorper breed of sheep derived from natural mating and from fresh, frozen and vitrified embryo transfer. Transrectal ultrasound was performed using a double-frequency linear transducer (6.0 and 8.0 MHz) to monitor 130 ewe fetuses distributed in the four treatments regarding embryo origin. The accuracy of the ultrasound was 100% in this experiment. The fetuses originated from controlled natural mating (NM) and from fresh (FrE), frozen (FE) and vitrified (VE) embryo transfer, with embryos collected 7 days after breeding. Migration of the genital tubercle occurred earlier ($P < 0.05$) in NM (42.21 ± 2.86 days) than in FrE (43.98 ± 3.00 days), FE (44.97 ± 1.83 days) and VE (44.58 ± 1.97 days). Visualization of the scrotal bag, prepuce and vulva occurred, respectively, earlier ($P < 0.05$) in NM (45.22 ± 1.25 , 45.95 ± 1.53 and 45.01 ± 1.03 days) than in FrE (48.91 ± 1.92 , 48.52 ± 1.41 and 47.41 ± 1.41 days), FE (49.97 ± 1.08 , 49.18 ± 2.00 and 47.64 ± 1.82 days) and VE (50.12 ± 1.66 , 49.27 ± 1.61 and 47.93 ± 1.92 days). The results show that fetal sexing can be accomplished from the 50th day

onward in fetuses produced by natural mating and from the 55th day onward in fetuses derived from fresh, frozen and vitrified embryos. It can also be concluded that real-time ultrasonography is a reliable tool for fetal sex determination in sheep taking into account both the location of the genital tubercle and the identification of external genital structures.

Keywords: genital tubercle, prepuce, scrotal bag, vulva, ultrasound.

Introduction

Brazilian sheep raising is a sustainable alternative for generation of profits and is one of the primary production activities of rural populations, consolidating itself as an important sector for socio-economic development of the country. The sheep is also a major source of animal protein, and technical support is needed to guide the use of biotechnology to increase the productivity of flocks [1].

Embryo transfer is the most useful technique to accelerate genetic improvement of sheep livestock in Brazil because it provides the opportunity to disseminate the genetics of highly proven elite females and males. However, the scarcity of female recipients for the high number of embryos produced by hormonal stimulation have motivated development of several types of vitrified embryos [2] to avoid wasting excess embryos and retain these high genetic quality embryos under appropriate conditions to be used in future embryo transfer programs [3].

Determination of fetal sex in utero is useful in make management decisions for dairy or meat goats as well as for commercialization of fetuses of a certain sex [4]. The development of integrated reproductive management systems that combine ultrasonography with other reproductive technologies, such as artificial insemination and embryo transfer, will further increase the practical applications of ultrasonography [5].

Previous studies have show that embryo cryopreservation extends the gestation period by at least four days, probably due to a slow down of cryopreserved embryo cellular activity [2, 3, 6]. Preliminary data also showed that the migration period of genital tubercle in Dorper [7] and Morada Nova fetuses [8] derived from natural mating occurs earlier compared with fetuses originating from frozen embryo transfer; for this reason, the authors suggested that these fetuses should be sexed five days later.

Determination of the ideal time to visualize the genital tubercle definitively positioned by ultrasonography in small ruminants is vital in order to obtain higher accuracy rates in fetal sexing [9]. There are several studies defining the period of genital tubercle migration in ewe fetuses derived from natural mating [9, 10] and from frozen embryo transfer [7, 8]; however, this information is still unknown in fetuses derived from fresh and vitrified embryo transfer.

The objective of this study was to identify the migration period of the genital tubercle and the period of visualization of external genital structures in fetuses of the Dorper breed derived from natural mating and from fresh, frozen and vitrified embryo transfer.

Material and Methods

In this study, 130 Dorper fetuses, 75 males and 55 females, from 130 single pregnant ewes were examined and allocated into four treatments (NM, FrE, FE and VE).

In NM, the fetuses (n = 33) originated from controlled natural mating (monitoring the female mating day and hour), whereas FrE (n = 36), FE (n = 33) and VE (n = 28) derived from embryo transfer, with the embryos collected 7 days after breeding [11]. Treatment FrE was composed of fresh embryos transferred to recipients immediately after collection. Treatment FE was composed of frozen embryos [12], and Treatment VE was composed of vitrified embryos [3]. The cryopreserved embryos were transferred to recipient ewes [12].

All females were mated only once, and the day of mating during estrus was designated as day 0 of pregnancy. The gestation period begins with natural mating in all females (embryo

donors and females from natural mating). After pregnancy diagnosis by transrectal ultrasonography, the fetuses were monitored from the 40th to 60th day of pregnancy at 24 H intervals. Fetuses were diagnosed as males when the genital tubercle was positioned immediately caudal to the umbilical cord and were diagnosed as females when the genital tubercle was positioned below the tail (Figure 1). Even after genital tubercle migration, fetal monitoring continued until identification of external genital structures, including the vulva in females and the prepuce and scrotum in males.

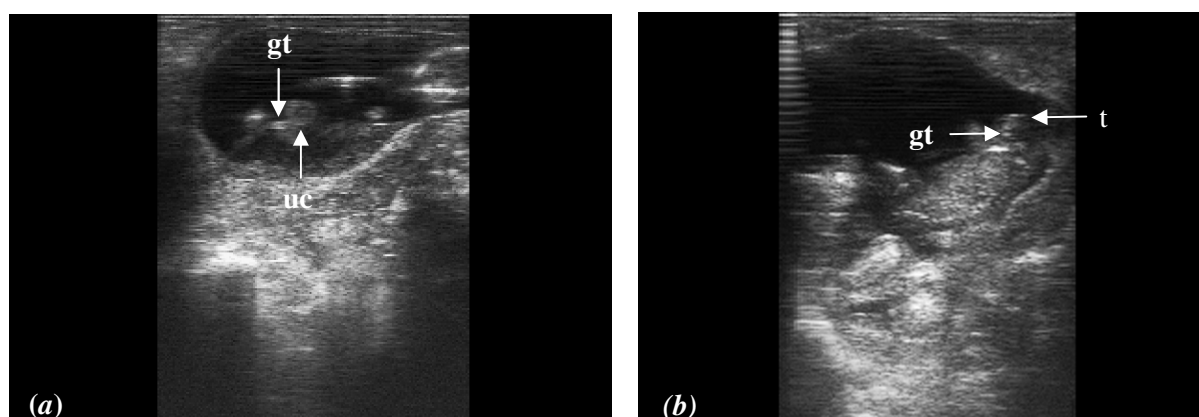


Figure 1 – Fetal sex identification in Dorper fetuses at 45 days of pregnancy from vitrified embryo transfer. The figure shows images of a male fetus (*a*) showing the location of the genital tubercle (gt) located immediately caudal to the umbilical cord (uc) and a female fetus (*b*) showing the position of the genital tubercle (gt) in close proximity to the tail (t).

The same experienced operator performed all ultrasound examinations with the animals restrained in a chute in a standing position. Ultrasound was carried out with an Aquila Pro (Pie Medical, Maastrich, the Netherlands) apparatus equipped with a dual frequency, linear transducer (6.0 and 8.0 MHz) coupled to a PVC support to facilitate manipulation within the rectum of each doe [13]. A Sony printer (Seikosha VP/1200, Tokyo, Japan) was also attached to the ultrasound equipment.

Prior to the exam, the content of the rectum was manually removed, and an ultrasonic coupling gel was applied to the transducer prior to introduction into the rectum. After location

of the fetus, a scanning technique for fetal sexing was established using an ultrasonographic longitudinal ventral plane [14].

In the last week of pregnancy, the females were transferred to individual boxes to confirm the sex of fetuses immediately after birth.

The average values for the migration day of the genital tubercle as well as for the visualization day of the scrotum, prepuce and vulva nipples of fetuses from controlled natural mating and fresh, frozen and vitrified embryo transfer were evaluated using analysis of variance and Tukey's test. The accuracy of fetal sexing was analyzed by the chi-squared test with a 5% level of significance.

Results

The migration period of the genital tubercle in NM was earlier ($P < 0.05$) than in FrE, FE and VE; however, no difference ($P > 0.05$) was observed among FrE, FE and VE (Table 1).

The periods of visualization of the scrotal bag, prepuce and vulva in NM were earlier ($P < 0.05$) than in FrE, FE and VE; however, no difference ($P > 0.05$) was observed among FrE, FE and VE (Table 1).

No difference ($P < 0.05$) was observed between the periods of visualization of the scrotal bag and prepuce; however, the vulva was visualized earlier ($P < 0.05$) than the scrotal bag and prepuce in FrE, FE and VE (Table 1).

Table 1- Mean and standard deviation of the day of genital tubercle migration and identification of the external genital structures of Dorper fetuses derived from natural mating (NM) and fresh (FrE), frozen (FE) and vitrified (VE) embryo transfer

| Treatment | Genital Tubercle $\bar{x} \pm s$ (day) | Scrotal Bag $\bar{x} \pm s$ (day) | Prepuce $\bar{x} \pm s$ (day) | Vulva $\bar{x} \pm s$ (day) |
|-----------|---|--------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| NM | 42.10 ^a \pm 2.86 | 45.22 ^a \pm 1.25 | 45.95 ^a \pm 1.53 | 45.01 ^a \pm 3.10 |
| FrE | 43.98 ^b \pm 3.00 | 48.91 ^{bA} \pm 1.92 | 48.52 ^{bA} \pm 1.41 | 47.41 ^{bB} \pm 1.41 |
| FE | 44.97 ^b \pm 1.83 | 49.97 ^{bA} \pm 1.08 | 49.18 ^{bA} \pm 2.00 | 47.64 ^{bB} \pm 1.82 |
| VE | 44.58 ^b \pm 1.97 | 50.12 ^{bA} \pm 1.66 | 49.27 ^{bA} \pm 1.61 | 47.93 ^{bB} \pm 1.92 |

Different superscripts indicate significant differences ($P < 0.05$) in the same column (ab) or line (AB).

Figure 2 shows the high variation in the fetal sexing period based on the final position of the genital tubercle and/or on the presence of external genitalia according to the different treatments.

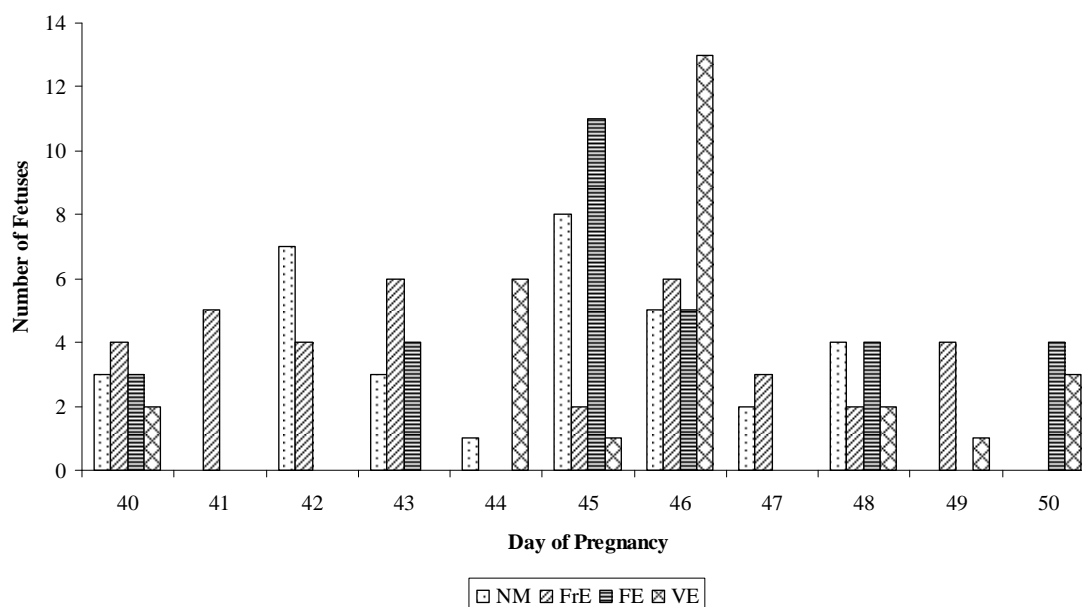


Figure 2 – Variation in the number of days in which fetal sexing became possible. The sexes of fetuses derived from natural mating (NM) and fresh (FrE), frozen (FE) and vitrified (VE) embryo transfer were determined by transrectal ultrasound taking into consideration the final position of the genital tubercle and/or visualization of the external genitalia.

Considering all fetuses that were born, the accuracy of diagnosis was 100% for all treatments in the experiment.

Discussion

In the present study, genital tubercle migration and visualization of external genitalia occurred later in fetuses derived from the transfer of fresh, frozen and vitrified embryos than in fetuses produced by natural mating. It has previously been observed that the genital tubercle migration [7, 8] of Dorper and Morada Nova fetuses derived from frozen embryo transfer is delayed compared with fetuses originating from natural mating [2, 3, 6]. The authors [2, 3, 6] also reported that the pregnancy period was four days longer in ewes

transferred cryopreserved embryos. In regard to equine species, the development of fetuses derived from unfrozen embryo transfer in mares during the first 30 days of pregnancy was slower than of that of fetuses derived from natural mating [15].

Considering the information conveyed above, low cellular activity is induced by frozen-thawed embryos [2, 3, 6] and results in a delay in genital tubercle migration due to handling of the frozen embryos [7, 8]. The results of the present study indicate that the outcome was influenced by embryo manipulation because no difference was noticed between the fresh and cryopreserved embryos. Also, it has been suggested that embryo handling outside the uterine environment influences the latency period of the embryos [15].

Regardless of whether the fetus is derived from natural mating, fresh or cryopreserved embryo transfer, fetal sexing performed only based on the final position of the genital tubercle requires good ultrasound scanning equipment and a skilled and experienced operator who knows the exact migration period for each species and breed. This recommendation is particularly important in the case of female fetuses because the genital tubercle migration from its initial position to its final position is shorter than in male fetuses.

In the present study, the early visualization of the vulva compared with the scrotum might be associated with the smaller distance covered by the genital tubercle of the female prior to reaching its final position under the tail when it transforms into this component of the external genital structure.

Although sexing of fetuses produced by natural mating is possible between the 38th and 48th days of pregnancy, it has been suggested that the ultrasonographic exam in ewes be performed from the 50th day onwards [9]. However, this assumption is not always correct for fetuses derived from transfer of cryopreserved embryos since in some fetuses this migration can be delayed up to the 50th day of pregnancy due to species-specific and individual variations. However, the best period to carry out fetal sexing would be from day 60 onwards as migration of the genital tubercle has surely occurred by that time, even in embryos with

delayed movement of positioning. Another factor that must be considered is that by 60 days, differentiation of the genital tubercle into external genital structures has already occurred, reducing the probability of mistakes in identification of fetal sex.

The results obtained in the present study suggest that transrectal ultrasonography is a reliable technique for fetal sexing in ewes when ultrasound imaging is properly timed within a specific period of pregnancy and accurately performed with proper equipment and by experienced operators. The results allow one to conclude that genital tubercle migration and posterior differentiation into external genital structures differs between fetuses derived from natural mating and embryo transfer, as well as that fetal sexing can be carefully done from the 55th day of pregnancy onward, especially in fetuses derived from embryo transfer; however, in fetuses produced by natural mating, fetal sexing can be performed from the 50th day onward.

References

1. **Bandeira DA, Santos MHB, Correia Neto J, Nunes JF.** Aspectos gerais da caprino-ovinocultura no Brasil e seu reflexos produtivo e reprodutivo. *In: Santos MHB, Oliveira MAL, Lima PF (eds), Diagnóstico de gestação na cabra e na ovelha.* São Paulo: Varela; 2004: 1-8.
2. **Traldi AS, Leboeuf B, Cognié Y, Poulin N, Mermillod P.** Comparative results of *in vitro* and *in vivo* survival of vitrified *in vitro* produced goat and sheep embryos. *Theriogenology* 1999; 51: 175.
3. **Papadopoulos S, Rizos D, Duffy P, Wade M, Quinn K, Boland MP, Lonergan P.** Embryo survival and recipient pregnancy rates after transfer of fresh or vitrified, *in vivo* or *in vitro* produced ovine blastocysts. *Anim Reprod Sci* 2002; 74: 35-44.

4. **Santos MHB, Moraes EPBX, Moura RTD, Lima PF, Reichenbach H-D, Oliveira MAL.** Early identification of the fetal sex in small ruminants by ultrasonography. *Acta Sci Vet* 2005; 33: 131-134.
5. **Santos MHB, Moraes EPBX, Bezerra FQG, Moura RTD, Paula-Lopes FF, Neves JP, Lima PF, Oliveira MAL.** Early fetal sexing of Saanen goats by use of transrectal ultrasonography to identify the genital tubercle and external genital. *Am J Vet Res* 2007b; 68: 561-564.
6. **Ptak G, Dattena M, Loi P, Tischner M, Cappai P.** Ovum pick-up in sheep: efficiency of *in vitro* embryo production, vitrification and birth of offspring. *Theriogenology* 1999; 52: 1105-1114.
7. **Santos MHB, Gonzalez CI, Bezerra FQG, Neves JP, Reichenbach H-D, Lima PF, Oliveira MAL.** Sexing of Dorper sheep fetuses derived from natural mating and embryo transfer by ultrasonography. *Reprod Fertil Dev* 2007a; 19: 366-369.
8. **Santos MHB, Rabelo MC, Guido SI, Torreão JNC, Lopes Júnior ES, Freitas VJ, Lima PF, Oliveira MAL.** Determination of the genital tubercle migration period in Morada Nova sheep foetuses by ultrasonography. *Reprod Domest Anim* 2007d; 42: 214-217.
9. **Santos MHB, Moraes EPBX, Guido SI, Bezerra FQG, Melo AN, Lima PF, Oliveira MAL.** Fetal sexing in Santa Inês ewes by ultrasonography. *Ciência Rural* 2006; 36: 573-578.
10. **Santos MHB, Moraes EPBX, Chiamenti A, Rocha JM, Paula NRO, Silva GA, Lima PF, Oliveira MAL.** Determinação do período de migração do tubérculo genital na sexagem precoce de fetos ovinos das raças Damara, Santa Inês e 3/4 Damara-Santa Inês. *Ciênc Anim Bras* 2007c; 8: 111-117.

11. **Lima PF, Oliveira MAL, Guerra MMP.** Eficiência de diferentes métodos de colheita embrionária em caprinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 1996; 20: 63-68.
12. **Freitas VJF, Oliveira MAL, Simplício AA, Baril G, Poulin N, Cognie Y.** Produção, criopreservação e transferência de embriões em pequenos ruminantes. *In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas JVF (eds), Biotécnicas aplicadas à reprodução animal.* Porto Alegre: Roca; 2008: 241-260.
13. **Oliveira MAL, Reichenbach H-D, Santos MHB, Tenório Filho F.** Aplicabilidade do scan B na reprodução de pequenos ruminantes. *In: Santos MHB, Oliveira MAL, Lima PF (eds), Diagnóstico de gestação na cabra e na ovelha.* São Paulo: Varela, 2004: 85-96.
14. **Azevedo EMP.** Utilização da ultra-sonografia em ovinos e caprinos para sexar fetos e estimar a idade e o peso fetal ao nascimento. 2007. Thesis (Doutorado em Ciência Veterinária) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
15. **Taveiros AW, Oliveira MAL, Tenório Filho F, Lima PF, Santos MHB.** Ultrasonographic monitoring of 103 recipient mares of different reproductive status during the first 30 days after embryo transfer. *Vet Record* 2003; 153: 558-560.