



Situação atual da superovulação em ovinos

Current status of superovulation in ewes

O.O. Brasil¹, N.H. Moreira¹, A.F. Ramos^{2,3*}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Animais, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, UnB, Brasília, DF, Brasil.

²Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil.

³Correspondência: alexandre.floriani@embrapa.br

Resumo

Esta revisão apresenta uma visão geral e crítica da base técnica dos procedimentos de superovulação, expondo as limitações e os últimos avanços dessa tecnologia na produção de embriões ovinos. Entre os responsáveis pelas limitações dos protocolos comumente empregados, destacam-se a variabilidade no grau de purificação das gonadotrofinas derivadas da hipófise, a falta de controle da dinâmica folicular, as falhas no processo de fertilização e o elevado índice de regressão prematura do corpo lúteo. Algumas abordagens foram empregadas visando ao controle desses limitantes e obteve-se aceitável resposta superovulatória, como: a utilização de gonadotrofinas recombinantes; a superestimulação no dia, ou em até 24 h, da emergência de uma onda folicular; a administração de GnRH e seus agonistas, como indutores de ovulação, principalmente quando for realizada inseminação artificial com sêmen congelado; e a aplicação de hCG, GnRH ou inibidores da prostaglandina F2 α após a ocorrência das ovulações múltiplas. Essas abordagens resultaram em melhorias relevantes nos programas de MOTE em ovinos.

Palavras-chave: biotecnologia, embrião, gonadotrofina, melhoramento genético, reprodução.

Abstract

The present paper reviews an overview and critique of the technical basis of the procedures for superovulation, exposing the limitations and recent advances in this technology in production of sheep embryos. Among those responsible for the limitations of commonly used protocols, those that stand out are the variability in the degree of purification of pituitary gonadotropins, the lack of control of follicular dynamics, failures in the fertilization process and the high rate of premature regression of the corpus luteum. Some approaches have been employed for the control of these impediments, enhancing superovulatory response, such as the use of recombinant gonadotropins; superstimulation on the day or within 24 h of emergence of a follicular wave; and the administration of GnRH agonists to induce ovulation, especially when artificial insemination is carried out with frozen semen; and the administration of hCG, GnRH or prostaglandin F2 α inhibitors after the occurrence of multiple ovulations. These approaches have resulted in significant improvements to MOET programs in sheep.

Keywords: biotechnology, embryo, genetic improvement, gonadotrophin, reproduction.

Introdução

A multiplicação de animais geneticamente superiores é realizada, sobretudo, com o auxílio de tecnologias de reprodução assistida (TRA). A inseminação artificial é a biotécnica mais empregada, contudo apenas o germoplasma masculino é multiplicado. A produção de embriões *in vivo* é uma importante ferramenta para aumentar a contribuição de fêmeas superiores para o conjunto de genes da população, principalmente se ela for realizada por meio da múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE). Essa, além de aumentar o número de descendentes de fêmeas geneticamente superiores, pode acelerar testes de progênie, permitir o intercâmbio de germoplasma para outras regiões ou países com o mínimo risco de transmissão de doenças, reduzir os custos e eliminar o estresse causado pelo transporte de animais.

Durante as três últimas décadas, houve um grande progresso no uso de germoplasma feminino por meio da MOTE, revisados por Cognie (1999) e Cognie et al. (2003), Gonzalez-Bulnes et al. (2004) e Menchaca et al. (2010). No entanto, a aceitação dessa tecnologia em ovinos tem sido lenta, principalmente devido à variabilidade da resposta ovariana ao tratamento superovulatório (Cognie et al., 1999; Gonzalez-Bulnes et al., 2004). Nesta revisão, serão abordadas as recentes melhorias e algumas oportunidades de pesquisa para tornar a superovulação mais econômica e eficaz, levando a sua ampla utilização em programas de seleção de pequenos ruminantes.

Superovulação

Em ovinos, um programa de múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE) tradicionalmente inclui a inserção de uma esponja vaginal contendo análogos da progesterona, como o acetato de fluorogestona (FGA) ou o



acetato de medroxiprogesterona (MAP), ou mesmo a progesterona em si, por uso do dispositivo interno de liberação de progesterona (DILP), que permanecem por 12 ou 14 dias, a fim de induzir e sincronizar o ciclo estral.

As gonadotrofinas mais utilizadas para a superovulação são a gonadotrofina coriônica equina (eCG) e o hormônio folículo estimulante (FSH) de origem suína (pFSH) ou ovina (oFSH). Desses, a eCG foi a primeira droga utilizada para superovulação, em dose única de 1000 a 2000 UI, um ou dois dias antes da remoção do progestágeno (Cognie, 1999).

A eCG apresenta uma longa meia-vida *in vivo*, por isso pode resultar em uma alta incidência de folículos anovulatórios, que são responsáveis por alta produção de estradiol. É provável que a condição estrogênica, provocada por esses folículos, altere o transporte de gametas através do trato genital e, portanto, diminua as taxas de recuperação embrionária (Evans e Armstrong, 1984). Tais efeitos adversos são reduzidos quando se neutraliza a eCG com anticorpo monoclonal, após a estimulação folicular (Martemucci et al., 1995). Uma alternativa para evitar o uso do anti-eCG seria a administração do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) no início da manifestação do estro (Jabbour e Evans, 1991).

A menor eficácia da eCG para a produção de embriões *in vivo*, nas últimas três décadas, contribuiu para uma substituição desse hormônio por preparados comerciais de pFSH (Jabbour e Evans, 1991; Menchaca et al., 2009) e, em menor escala, de oFSH (Veiga-Lopez et al., 2008). Bettencourt et al. (2008) mostraram que o FSH parece ser mais vantajoso do que o pFSH, devido a um aumento significativo no número de embriões produzidos. Contudo, nesse trabalho os autores não verificaram diferença no número de ovulações entre os tipos de FSH, sendo a diferença no número de embriões explicada pela alta taxa de recuperação embrionária no protocolo utilizando o FSH (80%) em comparação ao contendo pFSH (30%). Acredita-se que outros fatores, mencionados nesta revisão, possuem maior influência na taxa de recuperação embrionária do que o tipo de FSH utilizado na superestimulação. Portanto, mais pesquisas, com os FSH de origem ovina e suína, seriam necessárias para confirmar se há diferença na superestimulação e na produção de embriões.

Estudos recentes comparando múltiplas aplicações de pFSH e uma única aplicação de eCG, para superovular ovelhas da raça Awassi, apresentaram resultados superiores para o pFSH em ambas as estações (Azawi e Al-Mola, 2010; Cueto et al., 2011). Na estação reprodutiva, apenas a resposta superovulatória foi significativamente maior, enquanto na estação não reprodutiva tanto a resposta superovulatória como a produção de embriões foram melhores na superestimulação com FSH (Azawi e Al-Mola, 2010). Esses dados sugerem que a diferença entre os protocolos com pFSH e eCG seja mais evidente na estação não reprodutiva.

Devido à sua meia-vida curta, as preparações de FSH têm que ser administradas repetidamente, ocasionando em um maior manejo. Dessa forma, são necessárias seis a oito aplicações, em intervalos de 12 h, a partir de dois ou três dias antes da remoção do progestágeno. O regime de administração (número de aplicações e protocolo de dosagem: constante ou doses decrescentes) são comumente questionados.

Torrès et al. (1987) foram os primeiros a usar um regime de doses decrescentes de pFSH na superovulação de ovelhas, obtendo maiores taxas de ovelhas superovuladas. Esse tratamento pode reduzir a incidência de folículos anovulatórios ao final da estimulação gonadotrófica, devido à menor quantidade de FSH administrada ao final da superestimulação, levando a uma menor atresia de folículos grandes (Gonzalez-Bulnes et al., 2004).

Na tentativa de correlacionar a resposta superovulatória com o fluxo sanguíneo folicular, ovelhas Santa Inês foram submetidas a protocolos curtos e longos, com oito aplicações decrescentes de 200 mg de pFSH. Nesse estudo, não foram encontradas correlações entre o aumento do fluxo sanguíneo e a resposta superovulatória das ovelhas. No entanto, surpreendentemente, foram observadas correlações positivas significativas entre as estimativas quantitativas do fluxo sanguíneo folicular nas duas últimas aplicações de pFSH e o número e percentual de óocitos não fertilizados (Oliveira et al., 2014). Devido à existência dessa correlação, os autores sugerem que os protocolos com seis aplicações de pFSH são mais eficientes do que os com oito aplicações.

Comumente são usados protocolos com doses totais \geq a 200 mg de FSH por ovelha superestimulada (Menchaca et al., 2009; Cueto et al., 2011). Estudos recentes estão sendo desenvolvidos utilizando-se protocolos com dose total de 133 mg e obtendo-se desempenho (taxa de ovulação e produção de embriões viáveis) similar aos relatados na literatura e em resultados de campo (Brasil, 2013).

Os preparados de FSH disponíveis comercialmente a partir de extratos de pituitária, inevitavelmente, não possuem uma composição uniforme. O teor em LH é variável de lote para lote, podendo afetar seriamente o resultado superovulatório em termos de resposta ovariana, taxa de fertilização e qualidade embrionária (Wu et al., 2011). O baixo teor de LH pode ser melhor para o desenvolvimento folicular e a obtenção de mais embriões transferíveis. Entretanto, tomando por base o conceito de que a relação FSH:LH em condições fisiológicas diminui da regressão luteal para o pico pré-ovulatório, protocolos que seguem esse princípio foram usados com sucesso em ovinos (D'Alessandro et al., 1997).

Os protocolos convencionais requerem manejo intensivo devido às múltiplas aplicações de FSH, portanto estão sujeitos a erros na dosagem e no horário de aplicação do hormônio, assim como são fatores estressantes que podem prejudicar o desempenho reprodutivo dos animais (Simonetti et al., 2008). Assim, a simplificação dos protocolos seria benéfica e contornaria tais problemas.

A associação da eCG (500 UI) com uma única aplicação de FSH (Simonetti et al., 2008) ou com três aplicações (Wu et al., 2011) resultou em produção de embriões viáveis semelhantes aos resultados obtidos com

protocolos clássicos de múltiplas aplicações de FSH. A simplificação do protocolo, também, foi obtida com uma única aplicação de FSH dissolvido em polivinilpirrolidona (PVP), um polímero orgânico sintético, solúvel em água e em muitos solventes orgânicos. O PVP é responsável por estabilizar e aumentar a meia-vida do FSH, elevando a resposta superovulatória (D'Alessandro et al., 2001).

Em um estudo pioneiro, uma única aplicação intravenosa de 1,25 UI Fca/kg, uma gonadotrofina humana recombinante de cadeia única e com atividade de FSH com maior meia-vida (hFSH β -CTP- α ; Fca), promoveu a ovulação múltipla de cordeiras na estação reprodutiva (\approx 7 ovulações) e sincronizou o pico pré-ovulatório de LH (Rutigliano et al., 2014). A utilização dessa gonadotrofina recombinante poderá ser uma alternativa eficaz para a simplificação dos protocolos e a redução da variabilidade da resposta superestimulatória em programas de MOTE. As gonadotrofinas convencionais derivadas da pituitária apresentam uma alta variabilidade entre lotes, quanto à pureza e potência, podendo também ser fonte de transmissão de doenças infecciosas (Wrathall et al., 2008). A utilização da hFSH β -CTP- α é promissora, entretanto mais estudos são necessários para avaliar a produção e a qualidade dos embriões em protocolos de superovulação utilizando essa gonadotrofina recombinante.

Controle da população ovariana

Independentemente do tipo de gonadotrofina utilizada e do esquema de aplicação, a condição folicular ovariana, no início do tratamento superestimulatório, é de suma importância para a resposta superestimulatória final (Gonzalez-Bulnes et al., 2004; Veiga-Lopez et al., 2008). Em particular, no dia de início do tratamento com a gonadotrofina, a presença de folículo(s) dominante(s) atenua a resposta superovulatória (Veiga-Lopez et al., 2008), enquanto a taxa de ovulação é aumentada quando estão presentes apenas folículos antrais de tamanho pequeno e/ou médio (Gonzalez-Bulnes et al., 2002).

Fêmeas com um folículo dominante apresentam alterações no desenvolvimento folicular, que incluem maior atresia, atraso no recrutamento e no crescimento folicular, além de apresentarem folículos com menor tamanho e oócitos com redução da qualidade e capacidade de retomada da meiose durante a maturação. Portanto, é desejável que o tratamento superovulatório inicie durante a emergência da onda folicular ou na ausência de uma dominância estabelecida (Menchaca et al., 2010), como pode ser observado na Fig. 1.

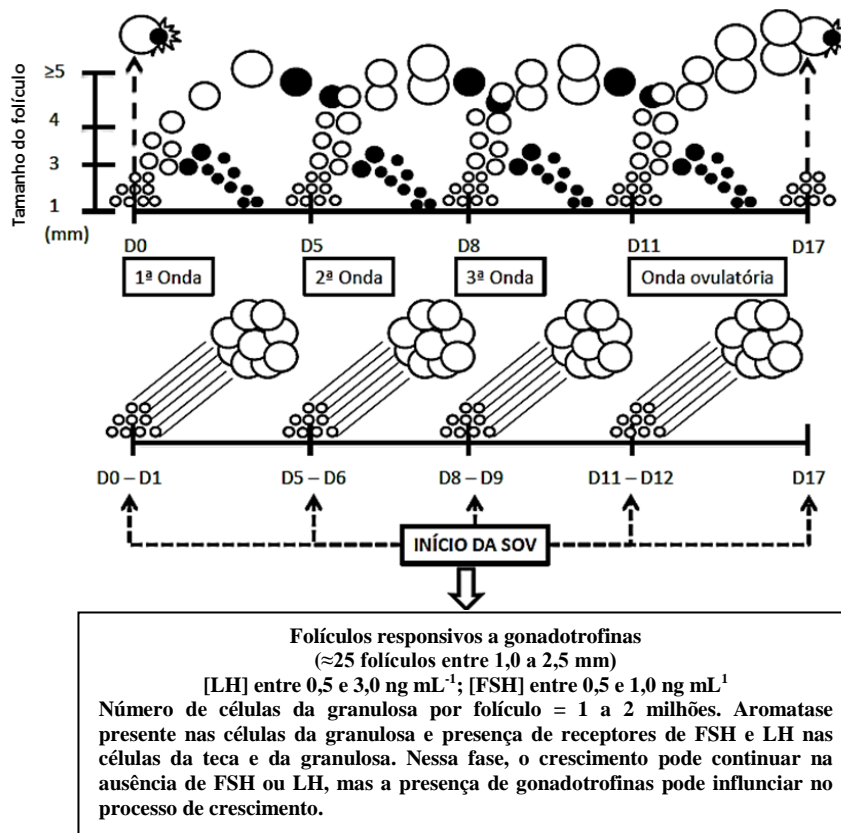


Figura 1. Representação esquemática do recrutamento e das ondas foliculares no ciclo estral da ovelha, mostrando a fase ideal (até um dia após o recrutamento da onda) para o início da superestimulação com gonadotrofinas exógenas; compilada de dados publicados (Scaramuzzi et al., 1993; Toosi et al., 2010). Eixo vertical: tamanho dos folículos durante o ciclo estral da ovelha. Eixo horizontal: dias do ciclo estral da ovelha e padrão de onda folicular (painel superior) e especificação dos dias adequados para aplicação de gonadotrofinas exógenas (painel inferior).



Em pequenos ruminantes, o controle da população folicular pode ser conseguido com o uso de fármacos que inibam o desenvolvimento folicular no início da superovulação (Cognie, 1999; Cognie et al., 2003). A dominância é adquirida em um ambiente com altas concentrações de LH e, deste modo, intervenções farmacêuticas com administração de agonista ou antagonistas do GnRH podem ser realizadas com o intuito de suprimir a secreção de LH (Cognie et al., 2003).

Os antagonistas de GnRH produzem um efeito imediato por bloquear de forma competitiva os receptores de GnRH, provocando um rápido declínio das concentrações séricas de FSH e LH (Diedrich et al., 1994). Suas propriedades não necessitam de um período de dessensibilização, e, além disso, a pituitária mantém a sua capacidade de resposta à estimulação com GnRH ou seus agonistas (Reissmann et al., 1995). Uma única aplicação, subcutânea, de 1,5 mg de antagonista do GnRH, diminui a secreção de gonadotrofinas, e, assim, inibe a secreção pulsátil de LH por pelo menos 48 h, após a administração, causando a atresia dos folículos grandes dependentes dessa gonadotrofina, enquanto aumenta significativamente o número de pequenos e médios folículos (Lopez-Alonso et al., 2005). Essa é uma metodologia promissora para ser adotada em protocolos de superovulação.

Outra abordagem que pode ser empregada, visando ao maior controle do crescimento da população folicular é o “método do dia zero”, que consiste em iniciar a superestimulação com FSH no dia da ovulação, a qual coincide com o surgimento da primeira onda folicular (Menchaca et al., 2009). Uma desvantagem do uso desse método é que os folículos da primeira onda crescem em um meio com menores concentrações de progesterona (Viñoles et al., 1999). Portanto, o uso de um dispositivo de progesterona durante o momento da superestimulação com FSH poderia ser benéfico sobre a qualidade folicular e a oocitária, assim como verificado em bovinos também utilizando o “método do dia zero” (Nasser et al., 2011).

Anormalidades na ovulação e recuperação embrionária

Alguns estudos evidenciaram que uma elevada dose de eCG resultaria no desenvolvimento de folículos grandes anovulatórios, que podem se tornar persistentes, provavelmente devido à elevada meia-vida dessa gonadotrofina (Jabbour e Evans, 1991; Chagas e Silva et al., 2003). Simonetti et al. (2008) também reforçaram que alguns protocolos de superovulação apresentam maior taxa de folículos anovulatórios. Tais folículos produzem concentrações anormais de estradiol (Jabbour e Evans, 1991), as quais poderiam estar afetando o ambiente uterino e, portanto, interferindo na captação dos oócitos pelas fímbrias ou no transporte deles (Murray et al., 1994) e também dos espermatozoides ao longo do trato genital feminino (Evans e Armstrong, 1984).

A elevada resposta superestimulatória também é amplamente reconhecida como fator prejudicial à captação do oócito (D'Alessandro et al., 2005; Simonetti et al., 2008), reduzindo, assim, a produção de embriões. Também é visto que a manipulação física da ovelha e do útero, bem como o grau de inflação da cavidade abdominal no momento da IA, poderia influenciar na baixa captação oocitária pelas fímbrias (Bari et al., 1999).

A superovulação de ovelhas está associada a um elevado grau de regressão prematura de corpo lúteo (RPCL), podendo acontecer em quase 40% das doadoras de embriões (Schiewe et al., 1991). A razão para a ocorrência desse fenômeno não é clara, sendo este acompanhado por uma baixa taxa de recuperação de embriões ou recuperação de embriões de má qualidade (Cognie et al., 2003) ou mesmo nenhuma recuperação (Schiewe et al., 1990).

Lopes Júnior et al. (2006) verificaram regressão em 33% das ovelhas da raça Morada Nova superovuladas, ocorrendo de forma total ou parcial. Devido à existência de casos de coexistência de CL com morfologia e coloração normal e CL em regressão, é provável que isto aconteça em função do tempo de observação em relação ao início da luteólise. Portanto, se a laparoscopia é realizada apenas quando o processo luteolítico se inicia, é possível que alguns CL já mostrem alterações na morfologia enquanto outros ainda se apresentem morfológicamente normais, embora todos eles já tenham começado a regredir (Saharrea et al., 1998).

A inibição da síntese de agentes luteolíticos pela flunixinameglumina entre o dia da ovulação e a recuperação de embriões permite uma redução da RPCL (Battye et al., 1988). A liberação prematura de agentes luteolíticos pode ser induzida pela persistência de grandes folículos estrogênicos entre três e quatro dias após a superovulação. A indução da ovulação dos folículos anovulatórios, três dias após o estro, com gonadotrofina coriônica humana (hCG) evita a RPCL em cabras superovuladas (Saharrea et al., 1998) apoiando essa hipótese.

Em ovelhas superestimuladas com uma aplicação de 1000 UI de eCG, a administração de duas doses de 250 UI de hCG, uma no momento da remoção do pessário vaginal e a outra 24 h mais tarde, evitou a RPCL, aumentou o peso e o tamanho do CL e as concentrações de progesterona, embora tenha sido incapaz de reduzir o número de folículos grandes persistentes (Shabankareh et al., 2012). Provavelmente, em alta concentração de progesterona, a liberação endometrial de PGF2 α é muito pequena e insensível ao estímulo do estrógeno e da oxicina. Estudos detalhados são necessários para esclarecer o efeito da múltipla administração de hCG não somente na produção de progesterona e nas características morfológicas do CL, mas também no número e na qualidade dos embriões produzidos *in vivo*.



Indução da ovulação

Existe uma variabilidade no início do estro após o tratamento superovulatório e, conseqüentemente, no momento da ovulação, bem como no pico de LH (Veiga-Lopez et al., 2008). Isso poderia levar à ocorrência de ovulações prematuras e a um alto tempo entre a primeira e a última ovulação, ocasionando uma assincronia das ovulações (Walker et al., 1986). Esses fatores estão relacionados a uma diminuição na taxa de fertilização, principalmente após a inseminação em tempo fixo, gerando menor número de embriões transferíveis (Veiga-Lopez et al., 2008).

O GnRH e análogos têm sido usados por alguns pesquisadores após a estimulação ovariana com FSH, o que tem reduzido o tempo de início das ovulações e melhorado a sincronia das ovulações (Walker et al., 1986), bem como reduzido o número de folículos anovulatórios e cistos foliculares (Naqvi e Gulyani, 1999) e elevado a taxa de ovulação (Azawi e Al-Mola, 2011) e a produção de embriões viáveis (Menchaca et al., 2009). Apesar do consenso do efeito benéfico do GnRH, ao final do tratamento superovulatório, segundo Jabbour et al. (1996), a administração durante a estação não reprodutiva não melhorou a taxa de ovulação e a produção embrionária. A maioria dos resultados desses trabalhos indica que o GnRH pode ser usado nos programas de MOTE para aumentar a taxa de fertilização e, assim, a produção de embriões.

Considerações finais

Apesar dos avanços alcançados nos últimos anos, a variação da resposta superestimulatória continua sendo o grande gargalo da tecnologia de MOTE em ovinos. Resultados promissores foram obtidos usando-se gonadotrofinas recombinantes, protocolos que permitem iniciar a superestimulação ovariana no começo do crescimento da onda folicular, utilizando indutores de ovulação e com a administração de hCG, GnRH ou inibidores da prostaglandina F_{2α} após as ovulações múltiplas para evitar a RPCL.

Acredita-se que o uso conjunto dessas abordagens proporcionará uma melhoria considerável na produção de embriões em ovinos. Portanto, tais protocolos devem ser testados em ensaios de campo, em grande escala, para validar essas melhorias nos programas de MOTE em ovinos.

Agradecimentos

À Capes, pela concessão da bolsa de estudos.

Referências

- Azawi OI, Al-Mola MK.** A study on superovulation using FSH and eCG in Awassi ewes. *Trop Anim Health Prod*, v.42, p.799-801, 2010.
- Azawi OI, Al-Mola MK.** A study on the effect of GnRH administration on the ovarian response and laparoscopic intrauterine insemination of Awassi ewes treated with eCG to induce superovulation in ewes. *Trop Anim Health Prod*, v.43, p.1351-1355, 2011.
- Bari F, Khalid M, Haresign W, Merrell B, Murray A, Richards RIW.** An evaluation of the success of MOET in two breeds of hill sheep maintained under normal systems of hill flock management. *J Anim Sci*, v.69, p.367-376, 1999.
- Battye KM, Fairclough RJ, Cameron AW, Trounson AO.** Evidence for prostaglandin involvement in early luteal regression of the superovulated nanny goat (*Capra hircus*). *J Reprod Fertil*, v.84, p.425-430, 1988.
- Bettencourt EM, Bettencourt CM, Silva JC, Ferreira P, Manito CI, Matos CM, Romão RJ, Rocha A.** Effect of season and gonadotrophin preparation on superovulatory response and embryo quality in Portuguese Black Merinos. *Small Rumin Res*, v.74, p.134-139, 2008.
- Brasil OO.** Maior tempo de exposição à progesterona associado ao uso de agonista de GnRH na superovulação e produção de embriões ovinos. 2013. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2013.
- Chagas e Silva J, Lopes da Costa L, Cidadão R, Robalo Silva J.** Plasma progesterone profiles, ovulation rate, donor embryo yield and recipient embryo survival in native Saloia sheep in the fall and spring breeding seasons. *Theriogenology*, v.60, p.521-532, 2003.
- Cognie Y.** State of art in sheep and goat embryo transfer. *Theriogenology*, v.51, p.105-116, 1999.
- Cognié Y, Baril G, Poulin N, Mermillod P.** Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*, v.59, p.171-188, 2003.
- Cueto MI, Gibbons AE, Pereyra-Bonnet F, Silvestre P, González-Bulnes A.** Effects of season and superovulatory treatment on embryo yields in fine-wool Merinos maintained under field conditions. *Reprod Domest Anim*, v.46, p.770-775, 2011.
- D'Alessandro AG, Martemucci G, Colonna MA, Borghese A, Terzano MG, Bellitti A.** Superovulation in ewes by a single injection of pFSH dissolved in polyvinylpyrrolidone (PVP): effects of PVP molecular weight,



- concentration and schedule of treatment. *Anim Reprod Sci*, v.65, p.255-264, 2001.
- D'Alessandro AG, Martemucci G, Colonna MA, Cafueri C, Toteda F.** Some effects of adding p-LH in defined amounts to purified p-FSH to modify FSH/LH ratios during the superovulatory treatment of anestrus ewes. *Anim Reprod Sci*.v.47, p.91-98, 1997.
- D'Alessandro AG, Martemucci G, Taibi L.** How the FSH/LH ratio and dose numbers in the p-FSH administration treatment regimen, and insemination schedule affect superovulatory response in ewes. *Theriogenology*, v.63, p.1764-1774, 2005.
- Diedrich K, Diedrich C, Santos E, Zoll C, al-Hasani S, Reissmann T, Krebs D, Klingmüller D.** Suppression of the endogenous luteinizing hormone surge by the gonadotrophin-releasing hormone antagonist Cetrorelix during ovarian stimulation. *Hum Reprod*, v.9, p.788-791,1994.
- Evans G, Armstrong DT.** Reduction of sperm transport in ewes by superovulation treatments. *J Reprod Fertil*, v.70, p.47-53, 1984.
- González-Bulnes A, Baird DT, Campbell BK, Cocero MJ, García-García RM, Inskoop EK, López-Sebastián A, McNeilly AS, Santiago-Moreno J, Souza CJ, Veiga-López A.** Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. *Reprod Fertil Dev*, v.16, p.421-435, 2004.
- Gonzalez-Bulnes A, Garcia-Garcia RM, Souza CJ, Santiago-Moreno J, Lopez-Sebastian A, Cocero MJ, Baird DT.** Patterns of follicular growth in superovulated sheep and influence on endocrine and ovarian response. *Reprod Domest Anim*, v.37, p.357-361, 2002.
- Jabbour HN, Evans G.** Ovarian and endocrine responses of Merino ewes following treatment with PMSG and GnRH or PMSG antiserum. *Anim Reprod Sci*, v.24, p.259-270, 1991.
- Jabbour HN, Ryan JP, Evans G, Maxwell WM.** Effects of season, GnRH administration and lupin supplementation on the ovarian and endocrine responses of merino ewes treated with PMSG and FSH-P to induce superovulation. *Reprod Fertil Dev*, v.3, p.699-707, 1996.
- Lopes Júnior ES, Maia EL, Paula NR, Teixeira DI, Villarreal AB, Rondina D, Freitas VJ.** Effect of age of donor on embryo production in Morada Nova (white variety) ewes participating in a conservation programme in Brazil. *Trop Anim Health Prod*, v.38, p.555-561, 2006.
- Lopez-Alonso C, Encinas T, Garcia-Garcia RM, Veiga-Lopez A, Ros JM, McNeilly AS, Gonzalez-Bulnes A.** Administration of single short-acting doses of GnRH antagonist modifies pituitary and follicular function in sheep. *Domest Anim Endocrinol*, v.29, p.476-487, 2005.
- Martemucci G, D'Alessandro A, Toteda F, Facciolongo AM, Gambacorta M.** Embryo production and endocrine response in the ewe superovulated with PMSG with or without monoclonal anti-PMSG administered at different times. *Theriogenology*, v.44, p.691-703, 1995.
- Menchaca A, Vilariño M, Crispo M, de Castro T, Rubianes E.** New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. *Reprod Fertil Dev*, v.22, p.113-118, 2010.
- Menchaca A, Vilariño M, Pinczak A, Kmaid S, Saldaña JM.** Progesterone treatment, FSH plus eCG, GnRH administration, and Day 0 protocol for MOET programs in sheep. *Theriogenology*, v.72, p.477-483, 2009.
- Murray JF, Downing JA, Svaramuzzi RJ, Evans G.** Heterogeneity in ovarian steroid secretion response to treatment with PMSG in ewes during the breeding season and anestrus. *Theriogenology*, v.42, p.1337-1347, 1994.
- Naqvi SMK, Gulyani R.** Ovarian response and embryo recovery to different superovulatory regimens in Rambouillet ewes under semi-arid conditions. *Small Rumin Res*, v.34, p.127-131, 1999.
- Nasser LF, Sá Filho MF, Reis EL, Rezende CR, Mapletoft RJ, Bó GA, Baruselli PS.** Exogenous progesterone enhances ova and embryo quality following superstimulation of the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology*, v.76, p.320-327, 2011.
- Oliveira ME, Feliciano MA, D'Amato CC, Oliveira LG, Bicudo SD, Fonseca JF, Vicente WR, Visco E, Bartlewski PM.** Correlations between ovarian follicular blood flow and superovulatory responses in ewes. *Anim Reprod Sci*, v.144, p.30-37, 2014.
- Reissmann T, Felberbaum R, Diedrich K, Engel J, Comaru-Schally AM, Schally AV.** Development and applications of luteinizing hormone-releasing hormone antagonists in the treatment of infertility: an overview. *Hum Reprod*, v.10, p.1974-1981, 1995.
- Rutigliano HM, Adams BM, Jablonka-Shariff A, Boime I, Adams TE.** Effect of time and dose of recombinant follicle stimulating hormone agonist on the superovulatory response of sheep. *Theriogenology*, v.82, p.455-460, 2014.
- Saharrea A, Valencia J, Balcázar A, Mejía O, Cerbón JL, Caballero V, Zarco L.** Premature luteal regression in goats superovulated with PMSG: effect of hCG or GnRH administration during the early luteal phase. *Theriogenology*, v.50, p.1039-1052, 1998.
- Scaramuzzi RJ, Adams NR, Baird DT, Campbell BK, Downing JA, Findlay JK, Henderson KM, Martin GB, McNatty KP, McNeilly AS, Tsonis CG.** A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reprod Fertil Dev*, v.5, p.459-478, 1993.
- Schiewe MC, Fitz TA, Brown JL, Stuart LD, Wildt DE.** Relationship of estrus synchronization method,



circulating hormones, luteinizing-hormone and prostaglandin-F2-alpha receptors and luteal progesterone concentration to premature luteal regression in superovulated sheep. *J Reprod Fertil*, v.93, p.19-30, 1991.

Schiewe MC, Howard JG, Goodrowe KL, Stuart LD, Wildt DE. Human menopausal gonadotropin induces ovulation in sheep, but embryo recovery after prostaglandin F2alpha synchronization is compromised by premature luteal regression. *Theriogenology*, v.34, p.469-486, 1990.

Shabankareh HK, Seyedhashemi SB, Torki M, Kelidari H, Abdolmohammadi A. Effects of repeated administration of hCG on follicular and luteal characteristics and serum progesterone concentrations in eCG-superovulated Sanjabi ewes. *Trop Anim Health Prod*, v.44, p.1865-1871, 2012.

Simonetti L, Forcada F, Rivera OE, Carou N, Alberio RH, Abecia JA, Palacin I. Simplified superovulatory treatments in Corriedale ewes. *Anim Reprod Sci*, v.104, p.227-237, 2008.

Toosi BM, Seekallu SV, Barrett DM, Davies KL, Duggavathi R, Bagu ET, Rawlings NC. Characteristics of peaks in serum concentrations of follicle-stimulating hormone and estradiol, and follicular wave dynamics during the interovulatory interval in cyclic ewes. *Theriogenology*, v.73, p.1192-1201, 2010.

Torrès S, Cognié Y, Colas G. Transfer of superovulated sheep embryos obtained with different FSH-P. *Theriogenology*, v.27, p.407-419, 1987.

Veiga-Lopez A, Dominguez V, Souza CJ, Garcia-Garcia RM, Ariznavarreta C, Tresguerres JA, McNeilly AS, Gonzalez-Bulnes A. Features of follicle-stimulating hormone stimulated follicles in a sheep model: keys to elucidate embryo failure in assisted reproductive technique cycles. *Fertil Steril*, v.89, p.1328-1337, 2008.

Viñoles C, Meikle A, Forsberg M, Rubianes E. The effect of subluteal levels of exogenous progesterone on follicular dynamics and endocrine patterns during early luteal phase of the ewe. *Theriogenology*, v.51, p.1351-1361, 1999.

Walker SK, Smith DH, Seamark RF. Timing of multiple ovulations in the ewe after treatment with FSH or PMSG with and without GnRH. *J Reprod Fertil*, v.77, p.135-142, 1986.

Wrathall AE, Holyoak GR, Parsonson IM, Simmons HA. Risks of transmitting ruminant spongiform encephalopathies (prion diseases) by semen and embryo transfer techniques. *Theriogenology*, v.70, p.725-745, 2008.

Wu W, Yang M, Gong P, Wang F, Tian Y, Xu X, Fu X, Tian K, Guo Z. Effect of two follicle stimulating hormone (FSH) preparations and simplified superovulatory treatments on superovulatory response in Xinji fine-wool sheep. *Afr J Biotechnol*, v.10, p.15834-15837, 2011.