

State-of-the-art in the superovulation of ewes

Maria Emilia Franco Oliveira

RESUMO

Background: Os programas de múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE) em ovinos têm sido implantados com sucesso em todo mundo. O impacto é evidente nos programas de melhoramento genético, zootécnicos e sanitários, bem como, no resgate e conservação de raças ameaçadas de extinção e no apoio a outras biotécnicas relacionadas. A simplificação da técnica, incremento da eficiência dos resultados, assim como, o aumento no número de técnicos capacitados, pode acelerar ainda mais este desenvolvimento. De suas etapas, os protocolos superovulatórios são os responsáveis por induzir ampla variabilidade das respostas ovulatórias e produção de embriões. Tal efeito é, indubitavelmente, o principal limitante da MOTE nesta espécie.

Revisão: Tradicionalmente os protocolos utilizados consideram fundamentalmente a duração do ciclo estral, e não o fenômeno biológico da dinâmica folicular, desconhecendo-se as condições prejudiciais ao desenvolvimento folicular adequado e produção de oócitos/embriões de qualidade. Alguns pontos críticos têm sido apontados como potenciais responsáveis pelos efeitos negativos, destacando-se: (i) o perfil de progesterona induzido pelos dispositivos utilizados no tratamento; (ii) a condição folicular presente ao início do protocolo superestimulatório e; (iii) a deficiência ou inexistência do pico pré-ovulatório de LH após tratamento com gonadotrofinas. As respostas são acompanhadas pela ampla variação nas taxas de ovulação e fecundação dos oócitos, bem como, no número e qualidade dos embriões recuperados. Neste contexto, diversos estudos têm buscado desenvolver novas estratégias para o controle da dinâmica folicular. Acredita-se que há um efeito prejudicial da dominância folicular na resposta superovulatória em pequenos ruminantes. Nos tratamentos tradicionais, 70-85% das doadoras apresentam grandes folículos dominantes ao início dos tratamentos com FSH. Considerando a imprevisibilidade do dia da emergência de cada onda folicular em ovinos, a verdadeira questão é como sincronizá-la. O emprego da pré-sincronização do estro e superestimulação da primeira onda emergente têm promovido maior eficiência. Outra estratégia, comumente empregada em bovinos, é a indução de uma nova onda folicular pelo emprego de estrógenos associado ao progestágeno, entretanto, sua eficiência em ovinos ainda é incipiente. Paralelamente, a indução do pico de LH ao final do tratamento superestimulatório tem sido investigada quanto aos benefícios em promover incremento da taxa ovulatória e número de embriões viáveis, bem como, melhoria da sincronia entre as ovulações visando aumentar a taxa de fecundação dos oócitos. A regressão luteal precoce é outra problemática que afeta os resultados dos programas de MOTE em pequenos ruminantes. Este fenômeno parece estar associado a elevadas concentrações plasmáticas de estrógenos durante a fase luteal inicial, resultando em decréscimo na resposta superovulatória e diminuição do número e qualidade dos embriões. A administração de progesterona exógena, agentes anti-luteolíticos ou luteotróficos pode prevenir ou reduzir os efeitos deletérios da regressão luteal precoce.

Conclusão: A indústria da múltipla ovulação e transferência de embrião tem se tornado um negócio de escala internacional. As inúmeras vantagens relacionadas à biotécnica, a crescente exigência mundial por produção de alimentos seguros e sustentáveis têm demandado o incremento da eficiência reprodutiva e produtiva dos animais. Neste contexto, esta revisão abordará o estado da arte da superovulação em ovinos, bem como, as perspectivas voltadas a melhoria de seus resultados e dos programas de MOTE.

Descritores: múltipla ovulação, produção de embrião, ovino.

I. INTRODUÇÃO**II. PROTOCOLOS SUPEROVULATÓRIOS****2.1 Superestimulação gonadotrófica****2.2 Protocolos base para superovulação****2.3 Indução da ovulação****2.4 Controle da regressão luteal precoce****III. CONCLUSÕES****I. INTRODUÇÃO**

O processo superovulatório tem como princípio o fornecimento de preparações hormonais que estimulam o crescimento e, subsequente, ovulação de uma série de folículos. Tal procedimento dá início ao programa de múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE); biotecnologia que alavanca grandes avanços na multiplicação dos rebanhos, programas de melhoramento genético, trâmites comerciais (nacional ou internacionalmente) e conservação de germoplasmas animais em todo mundo.

Os registros da movimentação mundial na área de transferência de embriões em pequenos ruminantes [14], embora instável e, de certo modo, imprecisa, podem demonstrar o sucesso desta prática. Entretanto, há grande demanda por melhorar a eficiência em resposta aos tratamentos superovulatórios e obter uma consistente produção de embriões viáveis.

Dentre uma série de fatores intrínsecos e extrínsecos aos animais, a alta variabilidade das respostas à estimulação ovariana é destacadamente o maior desafio frente ao aumento da eficiência dos programas de MOTE em ovinos. O mesmo comportamento é registrado em outras espécies, a exemplo dos bovinos. Acredita-se que esta heterogeneidade nos resultados estimulatórios, em ovinos, decorra do uso de protocolos que consideram fundamentalmente a duração do ciclo estral, e não o fenômeno biológico da dinâmica folicular. Alguns pontos críticos têm sido apontados como potenciais responsáveis pelos efeitos negativos, destacando-se: (i) o perfil de progesterona induzido pelos dispositivos utilizados no tratamento [6]; (ii) a condição folicular presente ao início do protocolo superestimulatório [19,39,40] e; (iii) a deficiência ou inexistência do pico pré-ovulatório de LH após tratamento com gonadotrofinas [18]. As respostas são acompanhadas pela ampla variação nas taxas de ovulação e fecundação dos oócitos, bem como, no número e qualidade dos embriões recuperados. Neste contexto, esta revisão abor-

dará o estado da arte da superovulação em ovinos e as perspectivas voltadas a melhoria de seus resultados.

II. PROTOCOLOS SUPEROVULATÓRIOS**2.1 Superestimulação gonadotrófica**

Durante o intervalo interovulatório (i.e. ciclo estral) nas ovelhas, há tipicamente três ou quatro ondas de crescimento folicular. A emergência de cada onda é primariamente controlada pelo incremento das concentrações do hormônio folículo estimulante (FSH). Com o desenvolvimento desse *pool* de folículos, as concentrações do FSH diminuem pelo estabelecimento da dominância [3]. Em outras palavras, um a quatro folículos podem alcançar a diâmetro ovulatório em um ciclo normal [12], dentre outros aspectos, privando os demais folículos (i.e. subordinados) do FSH [17]. Com base neste princípio, o tratamento superovulatório é realizado mediante aporte de altas doses de gonadotrofinas exógenas, como FSH, gonadotrofina coriônica equina (eCG) e gonadotrofina menopausal humana (hMG). Em resposta a este procedimento há incremento da taxa ovulatória e, conseqüentemente, do número de embriões obtidos por fêmea tratada.

Diversas preparações hormonais estão disponíveis comercialmente. O número e a frequência de administrações, bem como, a dose empregada pode variar de acordo com o protocolo. Como relato histórico, os tratamentos estimulatórios iniciaram-se com o uso da eCG em dose única, normalmente, de 1000-1500 UI administrada 48 h antes da retirada do progestágeno [36]. Atualmente, a eCG não é utilizada isoladamente em protocolos de superovulação por promover alta taxa de folículos anovulatórios, que se luteinizam; efeito dependente da dose, momento de aplicação e vida média do preparado comercial [26]. A produção de anticorpo anti-eCG, observada em fêmeas que recebem o tratamento repetidas vezes, tem ação biológica de inibir a atividade estimulatória da gonadotrofina administrada, levando a um atraso ou ausência da ovulação, podendo afetar a fertilidade dos animais [37].

Grande melhoria na eficiência dos programas de superovulação para produção *in vivo* de embriões tem sido observada nas últimas três décadas pela substituição da eCG por preparados de FSH de origem porcina, ovina ou caprina. Com este hormônio

se obtêm taxas de ovulações superiores e menor incidência de folículos anovulatórios, além de resposta individual mais uniforme quando comparado aos tratamentos com eCG [1]. No entanto, para estimular adequadamente os folículos é necessário administrá-lo a intervalo de 12 h, devido suas concentrações na circulação periférica decrescerem a concentrações basais em 10 h [11]. Tal fato gera a necessidade de repetir as administrações em um curto intervalo de tempo, o que intensifica o manejo, tornando-o menos prático.

Usualmente, o tratamento superestimulatório é iniciado 48 h antes da retirada do progestágeno, administrado em doses decrescentes, durante 2 - 4 dias [8]. Recomenda-se o emprego de FSH em 6 a 8 aplicações. Em geral, o FSH exógeno começa a atuar sobre a população de folículos presente nos ovários das ovelhas entre 12 e 24 h após o início do tratamento. Decorridas 48 h, se observa crescimento de folículos de 2 a 5 mm. Os folículos em crescimento alcançam o tamanho pré-ovulatório entre 36 e 60 h, concentrando-se entre 48 e 60 h o processo ovulatório [21]. A dose total utilizada é relativamente elevada [13]. No Brasil, emprega-se, comumente, protocolos com doses totais de 256 mg (Folltropin®) [23,32] ou 200 UI (Pluset®) [9] por ovelha superestimulada. Novas pesquisas estão sendo desenvolvidas por nosso grupo de pesquisa utilizando-se dose total de 200 mg (Folltropin®), as quais tem obtido desempenho (taxa de ovulação e produção de embriões viáveis) similar aos relatados na literatura e resultados de campo (M.E.F. Oliveira, dados não publicados).

Muitas vezes, uma pequena dose da eCG (200 - 400 UI) é associada ao tratamento, sendo administrada no momento da retirada do dispositivo [29]. Esta prática baseia-se na hipótese de que a suplementação com LH é importante para a maturação final dos folículos, entretanto, sua eficácia é discutível [31]. Devido a longa meia-vida da eCG, há produção de estradiol após a ovulação [4]. Consequentemente têm sido reportados efeitos deletérios no oviduto (resultando em falhas de fecundação dos oócitos) e, sobre a frequência de regressão luteal prematura. Vale ressaltar que o momento da inseminação artificial deve ser antecipado quando se fizer uso desta associação.

Em decorrência dos tratamentos com FSH envolverem várias administrações durante a fase

folicular (i.e. intensa manipulação dos animais), há uma grande demanda por simplificação dos tratamentos superovulatórios. Nesta perspectiva, a redução do número de administrações de FSH pode ser obtida pela associação do fármaco a moléculas que propiciem sua liberação lenta. A associação de FSH com polivinilpirrolidina (PVP) obteve taxas de recuperação embrionárias idênticas aos protocolos de múltiplas administrações [10].

2.2 Protocolos base para superovulação

O procedimento superestimulatório pode ser realizado com base na observação de estro natural ou sincronização de estro. Tradicionalmente, utilizam-se progesterona ou progestágenos impregnados em dispositivos/pessários vaginais ou implantes auriculares, os quais permanecem por um tempo de exposição superior a 10 dias para a indução e sincronização do estro [13]. O mais comum é que em ovelhas o progestágeno permaneça por 14 dias (i. e. período de duração da fase lútea. Nesses protocolos as administrações de gonadotrofinas exógenas iniciam-se dois dias antes do término do tratamento.

Apesar dos benefícios de sincronização, atribuí-se aos progestágenos efeito negativo ao número de ovulações e embriões transferíveis [6]. O perfil de progesterona induzido pelo tratamento não é constante, havendo diminuição a concentrações abaixo do fisiológico, particularmente, ao final dos protocolos longos (10 a 14 dias). Esse evento é associado à alteração do padrão de crescimento folicular e persistência folicular [24], bem como a interferência no processo de fecundação e desenvolvimento de embriões de boa qualidade [22]. Estratégias usadas, até o momento, para superar o efeito negativo dos tratamentos com progestágenos incluem: (i) inserção de um segundo dispositivo de progesterona (do Dia 7 ao Dia 14) para evitar concentrações subluteais do hormônio durante o tratamento [23,19]; (ii) suplementação de gonadotrofinas logo após a remoção do dispositivo até a ovulação para evitar efeito nocivo do folículo dominante [28,30]; (iii) administrar tratamento superovulatório baseando-se na detecção do estro natural (início das administrações de gonadotrofinas quatro dias após o estro), assim, faz-se uso de níveis fisiológicos de progesterona produzidos pelo corpo lúteo cíclico [27] ou; (iv) encurtar o período do tratamento com progestágenos para 5 - 7 dias [31].

Outra problemática que tem intensificado as pesquisas é referente à ampla variabilidade das respostas superovulatórias aos tratamentos gonadotróficos. Essa é, sem dúvida, o principal fator limitante da transferência de embriões em ovinos e caprinos. Na produção *in vivo* de embriões, independentemente dos hormônios utilizados no tratamento superovulatório, protocolo de administração e método de sincronização das ovulações, as maiores limitações responsáveis pela variabilidade das respostas estão, possivelmente, relacionadas à dinâmica folicular, equilíbrio estímulo-inibição que determinam à taxa de ovulação em cada espécie, e aos mecanismos intra-ovarianos que controlam o crescimento folicular [26]. Os tratamentos tradicionais de superestimulação ovariana em pequenos ruminantes foram definidos há vários anos e não consideravam os conhecimentos atuais do desenvolvimento folicular [29].

Neste contexto, diversos estudos apontam que a condição folicular presente no início do protocolo superovulatório interfere na resposta ao tratamento. Acredita-se que há um efeito prejudicial da dominância folicular na resposta superovulatória em pequenos ruminantes. Em outras palavras, tratamentos superovulatórios iniciados na ausência de um folículo dominante têm resultado em melhores taxas de recrutamento folicular, ovulação e produção de embriões [19,39,40]. A presença de folículos dominantes (maiores que 5-6 mm) no início do tratamento com FSH parece afetar a maturação e a ovulação [39,40] dos folículos menores. Esta seria uma das possíveis justificativas para a alta frequência de folículos anovulatórios em tratamentos superovulatórios destes animais. A evidência de que o folículo dominante possa exercer domínio, não só por vias sistêmicas, mas também por fatores locais, reforça a necessidade de garantir a ausência de folículos grandes no início da superestimulação [29]. Nos tratamentos tradicionais, 70-85% das doadoras apresentam grandes folículos dominantes ao início dos tratamentos com FSH [30]. Considerando a imprevisibilidade do dia da emergência de cada onda folicular em ovinos, a verdadeira questão é como sincronizá-la [29].

Já existem algumas estratégias focadas em começar o tratamento superovulatório na ausência de um folículo dominante (i. e. próximo a emergência da onda folicular) em pequenos ruminantes, des-

tacando-se o: (i) protocolo “Dia 0”, no qual se emprega a pré-sincronização do estro e superestimulação da primeira onda emergente [30,38] e; (ii) tratamentos com antagonistas do GnRH antes da superestimulação gonadotrófica, o qual pode ser uma alternativa para eliminar o folículo dominante [20]. Outra estratégia, comumente empregada em bovinos, é a indução de uma nova onda folicular pelo emprego de estrógenos associado ao progestágeno [7]. Entretanto, poucos estudos têm avaliado este tratamento em ovinos e caprinos [29]. Os dois fármacos conjuntamente promovem uma elevação transitória de FSH e emergência da nova onda folicular, aproximadamente, três a cinco dias após [2,5]. Nestes estudos, o 17 α -estradiol foi administrado por volta da metade do tratamento (14 dias) com progestágeno, resultando em uma redução da variabilidade da resposta ovariana, sem, no entanto, afetar a produção embrionária.

Embora alguns avanços estejam sendo conquistados, roga-se por mais estudos na busca por tratamentos que efetivamente sincronizem uma nova onda folicular em ovinos.

A ampliação de conhecimentos nesta perspectiva terá grande importância e relevância quando associados à superovulação. Acredita-se que haverá melhora na resposta superovulatória e produção de embriões viáveis em ovinos.

2.3 Indução da ovulação

Outra possível causa relacionada à alta variabilidade da resposta superovulatória e produção de embriões em pequenos ruminantes é associada à deficiência ou inexistência do pico pré-ovulatório de LH após tratamento com gonadotrofina exógena [18] ou devido à presença de folículos não responsivos, o que é relacionado a uma baixa regulação dos receptores de LH na granulosa e teca [25]. Paralelamente, há registro de falhas de fecundação em ovelhas superestimuladas, o que poderia ser reduzido melhorando a sincronia entre as ovulações e os procedimentos de inseminação artificial [29].

Neste contexto, alguns estudos em MOTE [31,32,35] têm focado no incremento da taxa ovulatória e número de embriões viáveis por modificar a taxa FSH:LH no final do tratamento superestimulatório, administrando-se LH ou GnRH exógeno. É importante ressaltar ainda que, nesses protocolos há modificação no momento ovulatório, informação

que deve ser considerada quando for utilizar a inseminação artificial em tempo fixo [34,33].

2.4 Controle da regressão luteal precoce

A regressão luteal precoce é outra problemática que afeta os resultados dos programas de MOTE em pequenos ruminantes. Este fenômeno é exacerbado em ovelhas superovuladas e parece estar associado a elevadas concentrações plasmáticas de estrógenos durante a fase luteal inicial, notando-se como consequência, um decréscimo na resposta superovulatória e diminuição do número e qualidade dos embriões [13]. A regressão luteal precoce é evidente cerca de quatro dias após o estro, mas as concentrações plasmáticas de progesterona incompatíveis com atividade luteal normal já são detectadas aos três dias após o estro em cabras acometidas [41]. Em ovelhas superovuladas, a frequência de regressão luteal precoce pode variar de 6 a 75% [16], e acometer a formação de todos ou parte dos corpos lúteos de um mesmo animal [32]. A administração de progesterona exógena, agentes anti-luteolíticos (anti-inflamatório; i. e. inibidores da prostaglandina)

ou luteotróficos (hCG, GnRH, LH) pode prevenir ou reduzir os efeitos deletérios da regressão luteal precoce [15]. Inibidores da prostaglandina-sintetase como a Flunixin meglumine administrado de uma a duas vezes ao dia, entre o 2º e 4º dia após a detecção do estro (período crítico), auxiliam no bloqueio do processo de regressão prematura dos corpos lúteos. Neste sentido, tem-se observado incremento na recuperação de embriões viáveis [42].

III. CONCLUSÃO

Por muitos anos os protocolos empregados como base para o processo de superovulação, descon sideraram os eventos relacionados à dinâmica folicular. Com o emprego da ultrassonografia e da avaliação dos perfis hormonais, as investigações mais recentes têm-se voltado para elaboração de protocolos que efetivamente controlem a atividade ovariana, evitando os efeitos negativos dos hormônios exógenos. A meta principal é atingir o equilíbrio estímulo-inibição das respostas aos protocolos hormonais, visando incrementar o sucesso desta etapa dos programas de MOTE.

REFERÊNCIAS

- 1 **Armstrong D.T. & Evans G. 1983.** Factors affecting success of embryo transfer in sheep and goats. *Theriogenology*. 19: 31-42.
- 2 **Bartlewski P.M., Alexander B.D., Rawlings N.C., Barrett D.M.W. & King W.A. 2008.** Ovarian responses, hormonal profiles and embryo yields in anoestrous ewes superovulated with Folltropin®-V after pretreatment with medroxyprogesterone acetate-releasing vaginal sponges and a single dose of oestradiol-17 β . *Reproduction in Domestic Animals*. 43(3): 299-307.
- 3 **Bartlewski P.M., Baby T.E. & Giffin J.L. 2011.** Reproductive cycles in sheep. *Animal Reproduction Science*. 124(3-4): 259-268.
- 4 **Barrett D.M.W., Bartlewski P.M., Batista-Arteaga M., Symington A. & Rawlings N.C. 2004.** Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to a single injection of 500 IU of PMSG following a 12-day treatment with progestogen-releasing intravaginal sponges in and out of the breeding season in ewes. *Theriogenology*. 61(2-3): 311-327.
- 5 **Barrett D.M.W., Bartlewski P.M., Duggavathi R., Davies K.L., Huchkowsky S.L., Epp T. & Rawlings N.C. 2008.** Synchronization of follicular wave emergence in the seasonally anestrous ewe: The effects of estradiol with or without medroxyprogesterone acetate. *Theriogenology*. 69(7): 827-836.
- 6 **Berlinguer F., González-Bulnes A., Succu S., Leoni G., Mossa F., Bebbere D., Ariznavarreta C., Tresguerres J.A.F., Veiga-Lopez A. & Naitana S. 2007.** Effects of progestagens on follicular growth and oocyte developmental competence in FSH-treated ewes. *Domestic Animal Endocrinology*. 32(Suppl 4): 303-314.
- 7 **Bó G.A., Adams G.P.; Caccia M., Martinez M., Pierson R.A. & Mapletoft R.J. 1995.** Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. *Animal Reproduction Science*. 39: 193-204.
- 8 **Cognié Y. 1999.** State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*. 51(1): 105-116.
- 9 **Cordeiro M.F., Lima-Verde J.B., Lopes-Júnior E.S., Teixeira D.I.A., Farias L.N., Sales H.O., Simplício A.A, Rondina D. & Freitas V.J.F. 2003.** Embryo recovery rate in Santa Inês ewes subjected to successive superovulatory treatments with pFSH. *Small Ruminant Research*. 49: 19-23.

- 10 D'Alessandro A.G., Martemucci G., Colonna M.A., Borghese A., Terzano M.G. & Bellitti A. 2001. Superovulation in ewes by a single injection of pFSH dissolved in polyvinylpyrrolidone (PVP): effects of PVP molecular weight, concentration and schedule of treatment. *Animal Reproduction Science*. 65(3-4): 255-264.
- 11 Demoustier M.M., Beckers J.F., Van Der Zwalmen P., Closset J., Gillard J.L. & Ector F.R. 1988. Determination of porcine plasma levels during superovulation treatment in cows. *Theriogenology*. 30(2): 379-386.
- 12 Evans A.C.O. 2003. Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. *Animal Reproduction Science*. 78(3-4): 289-306.
- 13 Fonseca J.F., Souza J.M.G. & Bruschi J.H. 2007. Sincronização de estro e Superovulação em Caprinos e Ovinos. In: *II Simpósio de Caprinos e Ovinos da UFMG* (Belo Horizonte, Brasil). pp.167-195.
- 14 Fonseca J.F., Souza J.M.G. & Camargo L.S.A. 2010. Estado da Arte de ovócitos e embriões de caprinos e ovinos: passado, presente, futuro. *Acta Scientiae Veterinariae*. 38: 353-369.
- 15 Fonseca J.F., Viana J.H.M., Bruschi J.H., Zambrini F.N., Palhão M.P. & Santos A.F.A. 2005. Resposta superovulatória em cabras Saanen lactantes utilizando curtos protocolos de exposição à progesterona e somatotropina bovina recombinante (rbST). *Acta Scientiae Veterinariae*. 32: 243.
- 16 Fukui Y., Okada M. & Ishida M. 1998. Incidence of premature luteal regression in ewes superovulated with a single injection of follicle-stimulating hormone combined with equine chorionic gonadotropin. *Journal of Reproduction and Development*. 44: 407-412.
- 17 Ginther O.J., Wiltbank M.C., Friche P.M., Gibbons J.R. & Kot K. 1996. Selection of the dominant follicle in cattle. *Biology of Reproduction*. 55(6): 1187-1194.
- 18 González-Bulnes A., Carrizosa J.A., Díaz-Delfa C., Garcia-Garcia R.M., Urrutia B., Santiago-Moreno J., Cocero M.J. & López-Sebastián A. 2003. Effects of ovarian follicular status on superovulatory response of dairy goats to FSH treatment. *Small Ruminant Research*. 48: 9-14.
- 19 González-Bulnes A., Santiago-Moreno J., Cocero M.J., Souza C.J.H., Groome N.P., Garcia-Garcia R.M., Lopez-Sebastián A. & Baird D.T. 2002. Measurement of inhibin A predicts the superovulatory response to exogenous FSH in sheep. *Theriogenology*. 57: 1263-1272.
- 20 González-Bulnes A., Santiago-Moreno J., Garcia-Garcia M.R. & Souza C.J.H. 2004. Effect of GnRH antagonist treatment on gonadotropin secretion, follicular development and inhibin A secretion in goat. *Theriogenology*. 61(5): 977-985.
- 21 González-Bulnes A., Santiago-Moreno J. & Lopez-Sebastián A. 1997. Effect of follicular development and superovulatory protocol on ovulation rate in ewes. In: *I Congresso Ibérico de Reprodução Animal* (Estoril, Portugal). pp. 40-41.
- 22 González-Bulnes A., Veiga-Lopez A., Garcia P., Garcia-Garcia R.M., Ariznavarreta C. & Sanchez M.A. 2005. Effects of progestagens and prostaglandin analogues on ovarian function and embryo viability in sheep. *Theriogenology*. 63(9): 2523-2534.
- 23 Gusmão A.L. 2006. Transferência de embriões em pequenos ruminantes. *O Embrião*. 25: 6-9.
- 24 Letelier C.A., Contreras-Solis I., García-Fernández R.A., Ariznavarreta C., Tresguerres J.A.F., Flores J.M. & González-Bulnes A. 2009. Ovarian follicular dynamics and plasma steroid concentrations are not significantly different in ewes given intravaginal sponges containing either 20 or 40 mg of fluorogestone acetate. *Theriogenology*. 71(4): 676-682.
- 25 Lopez-Diaz M.C. & Bosu W.T.K. 1992. A review and an update of cystic ovarian degeneration in ruminants. *Theriogenology*. 37: 1163-1183.
- 26 López-Sebastián A., Gonzáles-Bulnes A. & Moreno J. S. 2006. Control y manejo reproductivo en pequeños rumiantes. In: *XXIX Curso Internacional de Reproducción animal* (Madrid, Espanha). pp.43-52.
- 27 Mayorga I., Mara L., Sanna D., Stelletta C., Morgante M., Casu S. & Dattena M. 2011. Good quality sheep embryos produced by superovulation treatment without the use of progesterone devices. *Theriogenology*. [in press].
- 28 Menchaca A. & Rubianes E. 2002. Relation between progesterone concentrations during the early luteal phase and follicular dynamics in goats. *Theriogenology*. 57(5): 1411-1419.
- 29 Menchaca A., Vilariño M., Crispo M., Castro T. & Rubianes E. 2010. New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*. 22(1): 113-118.
- 30 Menchaca A., Vilariño M., Crispo M., Pinczak A. & Rubianes E. 2007. Day 0 Protocol: Superstimulatory treatment initiated in the absence of a large follicle improves ovarian response and embryo yield in goats. *Theriogenology*. 68(8): 1111-1117.
- 31 Menchaca A., Vilariño M., Pinczak A., Kmaid S. & Saldaña J.M. 2009. Progesterone treatment, FSH plus eCG, GnRH administration, and Day 0 protocol for MOET programs in sheep. *Theriogenology*. 72(4): 477-483.

- 32 Oliveira M.E.F. 2008.** Efeito da administração do LH ao final do tratamento superestimulatório na taxa de ovulação e produção de embriões em ovelhas da raça Santa Inês. 67f. Jaboticabal, SP. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal.
- 33 Oliveira M.E.F., Ferreira R.M., Cordeiro M.F., Pieroni J.S.P., Souza S.F., Santos, I.C.C., Rodrigues, L.F.S., Fonseca J. F. & Vicente W.R.R. 2008.** Efeito da administração do LH ao final do tratamento superovulatório sobre as taxas de ovulação e produção de embriões em ovelhas Santa Inês. *Acta Scientiae Veterinariae*. 36: 598.
- 34 Oliveira M.E.F., Vicente W.R.R., Costa D.A.C.P., Cordeiro M.F., Ferreira R.M., Sousa S.F. & Rodrigues L.F.S. 2008.** Effects of LH administration at end of the FSH superovulatory regimen on ovulatory period in Santa Inês sheep [abstract]. In: *XXV Jubilee World Buiatrics Congress (Budapest, Hungary)*. *Hungarian Veterinary Journal*. 130: 129.
- 35 Picazo R.A., Cocero M.J., Barragan M.L. & López-Sebastián A. 1996.** Effects of LH administration at the end of an FSH superovulatory regimen on ovulation rate and embryo production in three breeds of sheep. *Theriogenology*. 45(5): 1065-1073.
- 36 Ranio V. 1991.** PMSG-dose in Finn-sheep embryo production. In: *Annual Conference of the International Embryo Transfer Society*. *Theriogenology*. 35: 261. [abstract].
- 37 Roy F., Combes B., Vaiman D., Cuiuiu E.P., Pobel T., Deletang F., Combarnous Y., Guillou F. & Maurel M.C. 1999.** Humoral immune response to equine chorionic gonadotropin in ewes: Association with major histocompatibility complex and interference with subsequent fertility. *Biology of Reproduction*. 61(1): 209-218.
- 38 Rubianes E. & Menchaca A. 2006.** Dinâmica folicular, sincronização de estro e superovulação em ovinos. *Acta Scientiae Veterinariae*. 34: 251-261.
- 39 Rubianes E., Ibarra D., Ungerfeld R., Carbajal B. & De Castro T. 1995.** Superovulatory response in anestrus ewes is affected by the presence of a large follicle. *Theriogenology*. 43(2): 465-472.
- 40 Rubianes E., Ungerfeld R., Viñoles C., Rivero A. & Andadams G.P. 1997.** Ovarian response to gonadotropin treatment initiated relative to wave emergence in ultrasonographically monitored ewes. *Theriogenology*. 47(8): 1479-1488.
- 41 Saharrea A., Valencia J., Balcázar A., Medja O., Cerbón J.L., Caballero V. & Zarco L. 1998.** Premature luteal regression in goats superovulated with PMSG: effect of hCG or GnRH administration during the early luteal phase. *Theriogenology*. 50(7): 1039-1052.
- 42 Traldi A.S. 2002.** Biotecnologia da Reprodução de Pequenos Ruminantes. Laboratório de Biotecnologia de Ovinos e Caprinos. VRA – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP, 85p.