



## SUPERESTIMULAÇÃO OVARIANA EM OVELHAS COM DOSE ÚNICA

### *Ovarian overstimulation in ewes with single dose*

**Antônio Carlos Duenhas Monreal<sup>1</sup>, Joice Stein<sup>1</sup>, Simone Marques Caramalac<sup>1</sup>, Silvana Marques Caramalac<sup>1</sup>, Mariana Adalgiza Gilberti Urt<sup>1</sup>, João Bosco Moura Filho<sup>1</sup> Ivone Nagao Abreu<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Cidade Universitária, Laboratório BIOCAPRI, Avenida Senador Filinto Muller, 2430A, Campo Grande/MS, CEP: 79.070-900, e-mail: antonio.monreal@ufms.br; <sup>2</sup> Embriologista autônoma Caixa Postal, 143, CEP, 84165-970, Castro-PR

Recebido em: 01/09/2015

Aceito em:24/10/2016

**Resumo:** O uso de hormônios em doses decrescentes e repetidas durante quatro dias consecutivos para superovulação em ovelhas dificulta o manejo em propriedades rurais. O objetivo desse experimento foi avaliar a resposta de superovulação em vinte ovelhas Santa Inês com hormônio folículo estimulante aplicado em doses fracionadas ou em dose única. Os animais apresentaram escore corporal 3 – 3,5 e foram manejados em condições idênticas. Dez ovelhas receberam duas aplicações diárias de doses decrescentes de hormônio folículo estimulante (48, 36, 24 e 20mg), nos dias D12-15 do início (D0) do protocolo de sincronização do ciclo estral com 0,33 g de progesterona. Outras 10 ovelhas receberam 256 mg de hormônio folículo estimulante no dia D13 pela manhã. No D22 foi realizada a laparotomia para contagem do número de corpos lúteos medindo entre 5 a 10mm. Os testes estatísticos aplicados foram o teste de qui-quadrado para a taxa de fêmeas reagentes e o teste t-Student para o número de corpos lúteos. O nível de significância considerado foi de 5%. A taxa de fêmeas reagentes ao tratamento ( $\geq 5$  CL, 5-10mm de diâmetro) foi 90% nas ovelhas superovuladas com dose fracionada de hormônio folículo estimulante, e não diferiu das ovelhas tratadas com dose única (60%, teste qui-quadrado). Em resumo, o protocolo de dose única de FSH-p mostrou-se eficiente na indução da superovulação em ovelhas Santa Inês, com a formação de mais de quatro corpos lúteos (5-10 mm de diâmetro) em oito das dez fêmeas superovuladas.

**Palavras chave:** hormônio folículo estimulante, ovinos, superovulação

**Abstract:** The use of hormones in decreasing and repeated doses for four consecutive days used for superovulation in ewes complicates the management in farms. The aim of this experiment was to evaluate superovulation response in twenty Santa Inês ewes with follicle stimulating hormone applied in divided doses or in single dose. The animals had a body score of 3 to 3.5 and were handled under identical conditions. Ten ewes received two daily applications of decreasing doses of follicle stimulating hormone (48, 36, 24 and 20 mg) on days D12-15 at the beginning (D0) of the synchronization protocol of the estrous cycle with 0.33 g of progesterone. Other 10 ewes were given 256 mg of follicle stimulating hormone on day D13 at morning. Laparotomy was performed on day D22 to count the number of corpora lutea measuring 5 mm to 10 mm. Statistical tests were chi-square test for the rate of reagents females and the Student t test for the number of corpora lutea. The significance level was 5%. The rate of ewes reacting to treatment ( $\geq 5$  CL, 5-10mm in diameter) was 90% in superovulated ewes with fractionated dose of follicle stimulating hormone, and did not differ in ewes treated with single dose (60%, chi-square test). In short, there was no significant difference in the rate of reagents females and the number of corpora lutea. In summary, the single protocol dose FSH-p proved to be effective on induction of superovulation in Santa Inês ewes, with the more than four corpora lutea production (5-10 mm diameter) in eight of ten superovulated females.

**Key words:** follicle stimulating hormone, sheep, superovulation

### Introdução



A superovulação é uma importante técnica de manipulação reprodutiva que permite a ovulação de um grande número de oócitos por ciclo estral, sendo essencial para o sucesso no programa de transferência de embriões (Mayorga et al., 2011), além de favorecer o aumento populacional para a contribuição genética de fêmeas ovinas (Ishwar & Menon, 1996). Entretanto, o elevado custo e as diferentes respostas aos tratamentos de ovulação múltipla constituem as maiores dificuldades para a realização deste programa (Nagano et al., 2004). Em ovinos, dentre as biotecnologias da reprodução, esta é a que apresenta maior variabilidade de resposta (Fonseca, 2005), sendo que, fatores intrínsecos ao animal e o tipo de hormônio utilizado são importantes componentes que interferem na atividade ovulatória (Ammounet al., 2006). Dessa forma, é necessário o desenvolvimento de protocolos mais simples, eficientes, menos estressantes e onerosos e que apresentem melhores taxas de recuperação das estruturas colhidas (Fonseca et al., 2007).

A técnica de superovulação tem como objetivo o desenvolvimento de um grande número de folículos capazes de sofrer o processo de ovulação e fertilização. Para isso, os hormônios Gonadotrofina coriônica Equina (eCG) e Hormônio Folículo Estimulante (FSH) de origem suína (FSH-p mais encontrado no mercado atual, entretanto confere produção de anticorpos) e ovina, hormônio homólogo mais recomendado (FSH-ov) são utilizados para aumentar o número de folículos ovulatórios, ovulações e embriões (Simonetti et al., 2008). O eCG pode ser utilizado na indução de ovulação múltipla em ovelhas devido a sua acentuada atividade folículo-estimulante. Todavia, resultados pouco satisfatórios estão associados à alta capacidade de produção de anticorpos diminuição da resposta após repetidas aplicações (Fonseca, 2005), levando a produção de anticorpos anti-eCG pela fêmea, com conseqüente baixa fertilidade e variação na resposta ovariana (Maia & Bezerra, 2010).

O FSH é essencial para o recrutamento folicular durante fase específica do ciclo estral, estimulando o crescimento e maturação dos folículos ovarianos (Driancourt, 2001). Fisiologicamente os ruminantes domésticos liberam apenas um ou dois oócitos por ciclo estral. Entretanto em programas de superovulação são realizadas injeções de FSH exógeno para

incrementar o crescimento de folículos adicionais, aumentando o número de ovulações e conseqüentemente o número de embriões por doadora (Hafez & Hafez, 2004). Dessa forma, diferentes protocolos de superovulação são utilizados, podendo estes serem divididos em dois principais grupos: doses fracionadas decrescentes de FSH-p (Gusmão et al., 2007) ou aplicação em dose única (Simonetti et al., 2008).

Avaliando o efeito do número de doses de FSH-p na superovulação em ovelhas, D'Alessandro et al. (2005) verificaram que a terapia com oito aplicações de FSH-p não melhorou a resposta superovulatória se comparada ao protocolo com quatro aplicações. Além disso, sabe-se que aplicações múltiplas podem resultar em manejo estressante aos animais, contribuindo para a obtenção de baixos índices de fertilidade, além de acarretar mais gastos à realização da técnica (Dobson et al., 2012). Em contrapartida, a utilização de protocolos em dose única é caracterizada pela simplicidade de manejo para a colheita de embriões e classificação de atividade ovariana pelos corpos lúteos, associados a resultados semelhantes ( $5,4 \pm 1,5$  embriões/fêmea) aos protocolos de dose fracionada (Simonetti, 2008), uma vez que uma única aplicação de FSH-p promove o estímulo adequado para que a superovulação ocorra (Riesenberg et al., 2001).

Baseado nos diferentes protocolos de superovulação já desenvolvidos, o presente estudo teve como objetivo comparar o protocolo padrão de superovulação (utilização de dose fracionada de FSH-p) com protocolo de única dose de FSH-p em ovelhas Santa Inês, com a avaliação da resposta ovariana sendo realizada a partir do número de corpos lúteos (CL) formados após os tratamentos.

### **Material e métodos**

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMS, Certificado N° 256/2010) e executado entre setembro de 2010 e abril de 2011, no Laboratório de Biotecnologia de Ovinos e Caprinos (BIOCAPRI) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (MS), Campo Grande, Brasil.

Vinte ovelhas adultas da raça Santa Inês, sem idade definida e escore corporal 3 – 3,5 foram mantidas em pasto nativo e alimentadas com silagem de milho, sal mineral e água *ad libitum*. Além disso, receberam *flushing* alimentar (Tec Rúmen Elite Premium Ovinos Reprodução,



Allimenta<sup>®</sup>, Campo Grande, MS/Brasil) na fase de adaptação e pré-sincronização, oferecendo-se em única vez pela manhã 400 g/dia/animal para lotes de cinco animais/baia no momento da suplementação, durante 10 dias e, posteriormente, em uma segunda etapa, 400 gramas/dia/animal, durante 30 e 20 dias, respectivamente, durante todo período experimental, com o objetivo de atingir o escore corporal de 3,5 a 4 ao início da superovulação. O peso médio dos animais foi 58,02 ± 3,96 kg (n=10) obtido do lote utilizado no experimento na estação de chuvas, ao início do flushing alimentar, não diferindo (P>0.05) dos cinco animais do tratamento um (57,80 ± 4,50 kg; dose fracionada de FSH-p) e do tratamento dois (58,30 ± 3,90 kg; dose única de FSH-p).

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos experimentais. Os tratamentos aplicados foram dose fracionada de FSH-p (tratamento um), adaptado de Gusmão et al. (2007), e dose única de FSH-p (tratamento dois), adaptado de Simonetti et al.,(2008). O tratamento um consistiu de sincronização do ciclo estral com a aplicação de dispositivo intravaginal (D0) contendo 0,33 g de progesterona (Eazi-Breed CIDR<sup>®</sup>, Pfizer, Brasil) o qual foi substituído no D7 juntamente com a aplicação intramuscular de 0,0375 mg de d-Cloprostenol (Prolise, ARSA S.R.L, Argentina). A superovulação foi realizada em D12-15, consistindo de duas aplicações diárias e decrescentes de 48, 36, 24 e 20 mg NIH de FSH-p (Folltropin- V<sup>®</sup>, Bioniche, Canadá) respectivamente, aplicadas por via intramuscular em intervalos de 12 h. Na última aplicação de FSH-p foram também aplicadas 500 UI de eCG (Novormon<sup>®</sup>, Coopers, Brasil), por via intramuscular e retirado o dispositivo intravaginal. O tratamento dois consistiu de sincronização do ciclo estral com a aplicação única do dispositivo

intravaginal contendo 0,33 g de progesterona no D0 (Eazi-Breed CIDR<sup>®</sup>, Pfizer, Brasil) e retirado no D15, sendo a superovulação realizada no D13 com a aplicação intramuscular de dose única de 256 mg NIH de FSH (Folltropin V<sup>®</sup>, Bioniche, Canadá) e 500 UI de eCG (Novormon<sup>®</sup>, Coopers, Brasil). O controle de cio foi realizado nos dias D15 e D16 (0, 12 e 24 h da aplicação de FSH-p) e todas as fêmeas cobertas por monta natural.

Para avaliar a resposta ovariana, foi realizada laparotomia para contagem do número de corpos lúteos e folículos não ovulados. No D22 ou D7 do desenvolvimento do embrião, as ovelhas foram pré-anestesiadas com 0,5 mL de sulfato de atropina 1% (Farmagrícola<sup>®</sup>) e a anestesia realizada com a aplicação de cloridrato de quetamina (50 mg/mL, Vetanarcol, König, Brasil) e de cloridrato de xilazina (2g/100mL, Rompun, Bayer Brasil). A anestesia local por infiltração de 10 mL foi realizada com solução de lidocaína 2% na incisão cirúrgica. Durante a laparotomia foram contados o número de corpos lúteos e de folículos e classificados por tamanho (<5 mm; 5 – 10 mm; e>10 mm de diâmetro).

A comparação entre a produção de corpos lúteos dos dois tratamentos de superovulação foi realizada pelo teste de Qui-Quadrado e comparação de médias pelo teste t-Student, como resultados das variáveis apresentadas na forma de estatística descritiva ou na forma de tabela. A análise estatística para a superovulação foi realizada com o programa Excell 2010, sendo considerado um nível de significância de 5%.

**Resultados e discussão**

Os resultados obtidos ao término da execução do experimento dos dois tratamentos de superovulação estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1** – Fêmeas reagentes, corpos lúteos e folículos em ovelhas Santa Inês superovuladas com 256 mg/animal de FSH-p<sup>®</sup> em dose fracionada ou dose única, BIOCAPRI, 2011.

Variáveis	Dose Fracionada	Dose Única
Nº fêmeas superovuladas	10	10
Nº fêmeas reagentes	10 <sup>1</sup>	08 <sup>1</sup>
Nº total CL(mínimo-máximo)	170(8-32)	119(4-26)
Média±dp de CL/fêmea reagente	17,0±7,2	11,9±6,9
Média±dp nº folículos (mínimo-máximo)	2,3±2,9(0-8)	2,42±4,24(0-13)

P>0,05(teste de Qui-Quadrado)

<sup>1</sup>≥ 5CL/fêmea com diâmetro de 5 a 10mm

Os dois tratamentos empregados resultaram em superovulação (≥ 5CL; 5 – 10 mm

de diâmetro) em 18 das 20 ovelhas avaliadas. As duas fêmeas que não responderam ao tratamento de



superovulação pertenciam ao grupo do protocolo de dose única, sendo que uma delas apresentou quatro CL de 5 - 10mm de diâmetro) e dois CL com menos de 3 mm de diâmetro, e outra fêmea com quatro CL ( $\leq 4$ mm). Pelo teste Qui-Quadrado não houve diferença ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos.

Assim, o número total de corpos lúteos verificados no tratamento em dose fracionada foi 170 (mínimo oito, máximo 32, com média de  $17,0 \pm 7,5$  CL/fêmea), enquanto que no tratamento em dose única foi 119 (mínimo quatro, máximo 26, média de  $11,9 \pm 6,9$  CL/fêmea). Schiewe et al. (1991) ao estudarem ovelhas superovuladas com doses decrescentes de FSH, observaram regressão do corpo lúteo três a quatro dias após a ovulação, com redução acentuada das células luteínicas maiores e menores ocorrendo nesse mesmo período.

Nos tratamentos de superovulação, onde elevadas concentrações de FSH-p exógeno são aplicadas nos animais, ocorre o desenvolvimento de folículos persistentes anovulatórios (Battye et al., 1988), que mantém elevada a concentração plasmática de estrógeno. Altos níveis deste hormônio conduzem ao aparecimento precoce de receptores de ocitocina no útero, induzindo o endométrio a produzir prostaglandina  $F_{2\alpha}$ , o que, por sua vez, leva à regressão antecipada do corpo lúteo (Herrera Benavides, 2012). Como consequência da regressão luteínica precoce, a resposta superovulatória fica prejudicada, levando a um decréscimo no número e qualidade dos embriões formados em relação à qualidade e tamanho dos corpos lúteos (Fonseca et al., 2007).

Riesenberget al. (2001), em estudo realizado com ovelhas Merino verificaram que a duração funcional de ação do FSH-p foi de aproximadamente 48 h, com o diâmetro dos cinco folículos ovulatórios nos animais tratados sendo menores do que os obtidos de ovelhas não estimuladas. Demonstraram ainda que uma única aplicação de FSH-p pode induzir resposta superovulatória, apesar do perfil de progesterona pós-estro revelar grande regressão luteínica prematura nos grupos superovulados. Além disso, os autores ressaltam que a regressão dos corpos lúteos prematuros pode ser observada pelo exame ultrassonográfico no início da fase luteínica, indicando que a técnica pode falhar em detectar corpos lúteos em programas de transferência de embrião.

Sirjaniet al. (2012) obtiveram respostas para a superestimulação ovariana com 400 mg de FSH-p para folículos grandes recrutados após 12 h da retirada do dispositivo intravaginal, já neste experimento com 256 mg de FSH-p foi possível estimular os ovários com dose menor, enquanto Moakhar Kermani et al. (2012) obtiveram folículos grandes com 350 UI de eCG em ovelhas. Acreditamos que a dosagem de FSH-p pode ser reduzida para o tratamento de superovulação, a exemplo de Bruno-Galarraga et al. (2014) em que realizaram colheita de embriões em ovelhas com 80 mg de FSH-p e Oliveira et al. (2014) que utilizaram 200 mg de FSH-p com CIDR®.

Com o objetivo de melhorar os programas de ovulação múltipla, estudos que avaliam diferentes protocolos hormonais vem sendo desenvolvidos a fim de se obter um tratamento que facilite o manejo dos animais submetidos à superovulação. D'Alessandro et al. (2001) realizaram estudo com uma única aplicação de FSH-p dissolvido em polivinilpirrolidona (PVP), um veículo de liberação lenta, verificando que o número de fêmeas superovuladas e a taxa de ovulação foi similar ao do grupo de animais que recebeu doses decrescentes de FSH-p dissolvidas em solução salina, não havendo diferença na qualidade dos embriões produzidos. Desse modo, os autores destacam a eficiência da aplicação de dose única de FSH-p dissolvido em PVP em induzir a resposta superovulatória. Entretanto, Wu et al. (2013), ao avaliarem o uso de quatro protocolos de superovulação em ovelhas Xinji, observaram que os animais dos grupos C (dose de 40, 30 e 20mg de Folltropin-v em três dias, respectivamente) e D (aplicação em dose única de Folltropin-v em 30% de PVP) apresentaram taxa de recuperação e transferência de embriões menor quando comparado ao grupo que recebeu várias doses de Folltropin-v (Grupo A: 6 injeções, com total de 150 mg; Grupo B: uma injeção diária, com 60, 40 e 20 mg cada).

Simonetti (2008) verificou que ovelhas Corriedale que receberam quatro aplicações de FSH-ov (grupo B1 – 44 unidades a cada 12 h, dose total 176 unidades) apresentaram maior taxa de ovulação ( $6,2 \pm 1,1$ ) se comparado ao grupo que recebeu uma única aplicação de FSH-ov (grupo C1 - 176 unidades) em veículo PVP ( $4,8 \pm 1,0$ ). Entretanto, as ovelhas que receberam uma única aplicação apresentaram maiores taxas de fertilização e viabilidade do que o outro grupo



avaliado (89,7% e 76,9% em C1 versus 45,9% e 40,5% em B1, respectivamente).

No presente estudo verificou-se que a aplicação de uma única dose de FSH-p sem a utilização de veículo para induzir efeito de longa ação foi capaz de produzir resposta superovulatória em ovelhas Santa Inês, comoito das dez ovelhas apresentando mais de quatro corpos lúteos de 5 a 10mm de diâmetro. Os resultados obtidos, associados aos benefícios decorrentes do manejo simplificado dos animais mostrou que o protocolo de aplicação única de FSH-p pode ser uma alternativa aos protocolos de superovulação com utilização de doses decrescentes. Mais estudos são necessários para avaliar a eficiência deste protocolo nos programas de transferência de embrião, bem como observar a ocorrência de regressão prematura luteínica e aumentar o número de animais experimentais.

### Conclusão

O protocolo de dose única de FSH-p mostrou-se eficiente na indução da superovulação em ovelhas Santa Inês, com a formação de mais de quatro corpos lúteos (5-10 mm de diâmetro) em oito das dez fêmeas superovuladas.

**AGRADECIMENTOS:** Agrademos à Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul - FUNDECT ao auxílio financeiro para realização dessa pesquisa e a Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS.

### Referências bibliográficas

AMMOUN, T.; ENCINAS, T.; VEIGA-LOPEZ, A.; ROS, J.M.; CONTRERAS, I.; GONZALEZ-AÑOVER, P.; COCERO, M.J.; MCNEILLY, A.S.; GONZALEZ-BULNES, A. Effects of breed on kinetics of ovine FSH and ovarian response in superovulated sheep. **Theriogenology**, v.66, n.4, p.896-905, 2006.

BATTYE, K.M.; FAIRCLOUGH, R.J.; CAMERON, A.W.N.; TROUNSON, A.O. Evidence for prostaglandin involvement in early luteal regression of the superovulated nanny goat (*Capra hircus*). **Journal of Reproduction and Fertility**, n.84, p.423-430, 1988.

BRUNO-GALARRAGA, M.M, CUETO, M, GIBBONS, A. E., PEREYRA-BONNET, F., CATALANO, R., GONZALES-BULNES, A.

Repeatability of superovulatory response FSH treatments in Merino sheep. **Small Ruminant Research**, v.120, p.84-89, 2014.

D’ALESSANDRO, A.G.; MARTEMUCCI, G.; COLONNA, M.A.; BORGHESE, A.; D’ALESSANDRO, A., 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.

DOBSON, H.; FERGANI, C.; ROUTLY, J.E.; SMITH, R. F. Effects of stress on reproduction in ewes. **Animal Reproduction Science**, v.130, n.3, p.135-140, 2012.

DRIANCOURT, M.A.Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals.Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v. 55, n.6, p.1211-1239, 2001.

FONSECA, J. F. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. In Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 2005, Goiânia-GO. **Anais... Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, 2005. v.16. p. 1-9.

FONSECA, F. J.; SOUZA, J. M. G.; BRUSCHI, J. H. Sincronização de estro e superovulação em ovinos e caprinos. In: Simpósio de Caprinos e Ovinos da EV-UFMG, Belo Horizonte - MG. **Anais... II Simpósio de Caprinos e Ovinos da EV-UFMG**, 2007. p. 1-9.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. Reprodução Animal. 7ed, São Paulo: Manole, 2004.513p.

GUSMÃO, A.L.; SILVA, J.C.; QUINTELA, A.; MOURA, J.C.A.; RESENDE, J.; GORDIANO, H.; CHALHOUB, M.; RIBEIRO FILHO, A.L.; BITTENCOURT, T.C.B.S.C.; BARBOSA, L. P. Colheita transcervical de embriões ovinos da raça Santa Inês no Semi-Árido Nordeste. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v.8, p.1-10, 2007.

HERRERA BENAVIDES, L.R. **Respuestas superovulatorias en ovinos blackbelly obtenida bajo três tratamientos**. Xalapa-VE: Universidad Veracruzana, 2012. 40p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária e Zootecnia), Universidad Veracruzana, 2012.

ISHWAR, A. K.; MEMON, M. A. Embryo transfer in sheep and goats: a review.



**Small Ruminant Research**, v.19 n.1,p.35-43, 1996.

MAIA, K.M.; BEZERRA, A.C.D.S. Controle do ciclo estral em caprinos: revisão. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 4, p.14-19, 2010.

MAYORGA, I., MARA, L., SANNA, D., STELLETTA, C., MORGANTE, M., CASU, S., DATTENA, M. Good quality sheep embryos produced by superovulation treatment without the use of progesterone devices. **Theriogenology**, v. 75, n. 9, p. 1661-1668, 2011.

MOAKHAR KERMANI, H., KOHRAM, H., SHAHNEH ZAREH, A., SABERIFAR, T., Ovarian response and pregnancy rate following different doses of eCG treatment in Chall ewes. **Small Ruminant Research**, v.102, p.63-67, 2012.

NAGANO, A. Y.; WEISS, R. R.; BÜCHELE, J.; MURADAS, P. R.; GRANEMANN, L. C. A Somatotropina bovina recombinante (rbST) na superovulação de fêmeas bovinas. **Archives of Veterinary Science**, v. 9, n. 2, 2004.

OLIVEIRA, M.E.F., FELICIANO, M.A.R., D'AMATO, C.C., OLIVEIRA, L.G., BICUDO, S.D., FONSECA, J.F., VICENTE, W.R.R., VISCO, E., BARTLEWSKI, P.M. Correlations between ovarian follicular blood flow and superovulatory responses in ewes. **Animal Reproduction Science**, v.144, p.30-37, 2014.

RIESENBERG, S.; MEINECKE-TILLMANN, S.; MEINECKE, B. Ultrasonic study of follicular dynamics following superovulation in German Merino ewes. **Theriogenology**, v. 55, n. 4, p. 847-865, 2001.

SCHIEWE, M. C.; FITZ, T. A.; BROWN, J. L.; STUART, L. D.; WILDT, D. E. Relationship of oestrus synchronization method, circulating hormones, luteinizing hormone and prostaglandin F-2 $\alpha$  receptors and luteal progesterone concentration to premature luteal regression in superovulated sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 93, n. 1, p. 19-30, 1991.

SIMONETTI, L.; FORCADA, F.; RIVERA, O.E.; CAROU, N.; ALBERIO, R.H.; ABECIA, J.A. PALACIN, I. Simplified superovulatory treatments in Corriedale ewes. **Animal Reproduction Science**, n.104, p.227-237, 2008.

SIIMONETTI L. **Simplificación de los métodos de superovulación em ovejas de laraza Corriedale**. 2008. 208p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Politécnica de Valência, Espanha, 2008.

SIRJANI, M.A., KOHRAM, H., SHAHIR, M. H. Effects of eCG injection combined with FSH and GnRH treatment on the lambing rate in synchronized Afshari ewes. **Small Ruminant Research**, v.106, p.59-63, 2012.

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. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n.70, p.15834-15837, 2013.