

FALHA DA OVULAÇÃO APÓS TRATAMENTO SUPEROVULATÓRIO COM ECG EM VACAS NELORE (*Bos taurus indicus*)

Mateus José Sudano¹
Marco Antonio Alvarenga²
Fernanda Da Cruz Landim e Alvarenga³
Rui Machado⁴

RESUMO

Devido as vantagens do tratamento superovulatório com a gonodotrofina coriônica eqüina (eCG), esta vem sendo aplicada em programas de transferência de embriões de vacas nelore (*Bos taurus indicus*), com resultados comparáveis ao da utilização do hormônio folículo estimulante (FSH). Porém, a utilização da eCG está frequentemente, associada com a ocorrência de um elevado número de folículos anovulatórios, secreção anormal de estradiol, progesterona e hormônio luteinizante (LH), além da possibilidade de reduzir a resposta superovulatória e a qualidade dos embriões produzidos. Uma alternativa para reduzir esta incidência é o tratamento com a eCG associada ao anticorpo monoclonal anti-eCG, garantindo respostas efetivas das doadoras, aumentando as taxas de ovulação e de embriões transferíveis, e prevenindo a falha da ovulação. O objetivo desta revisão é discutir os aspectos envolvidos na falha da ovulação em vacas Nelore submetidas ao tratamento superovulatório com a eCG.

Palavras-chave: falha da ovulação, superovulação, eCG, anticorpo anti-eCG, nelore

OVULATION FAILURE AFTER SUPEROVULATORY TREATMENT WITH ECG IN NELORE (*Bos Taurus indicus*) CATTLE

SUMMARY

Because the benefits of superovulatory treatment using equine chorionic gonadotrofina (eCG), this compound has been applied in embryo transfer programs from nellore (*Bos taurus indicus*) cattle, leading to the same results obtained when follicle stimulatory hormone (FSH) was used. However, the use of eCG is often associated with high number of anovulatory follicles, abnormal estradiol, progesterone and luteinizing hormone (LH) secretion, reduction of superovulatory response and low quality of produced embryos. An alternative to reduce this incidence is the association of eCG treatment with anti-eCG monoclonal antibody, ensuring effective responses from donors, increasing the ovulatory rates, the number of transferable embryos, and preventing ovulation failure. The objective of this review is to

¹ Pós-graduando - Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária - FMVZ - UNESP, Distrito de Rubião Junior, s/n°, Botucatu – SP. E-mail: mateusjsudano@yahoo.com.br

² Professor Adjunto do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária - FMVZ-UNESP, Distrito de Rubião Junior, s/n°, Botucatu – SP. E-mail: malvarenga@fmvz.unesp.br

³ Professora Adjunta do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária - FMVZ-UNESP, Distrito de Rubião Junior, s/n°, Botucatu – SP. E-mail: fernanda@fmvz.unesp.br

⁴ Pesquisador da Embrapa Pecuária Sudeste, Rodovia Washington Luis Km 234, Fazenda Canchim, São Carlos - SP. E-mail: rui@cpps.eembrapa.br

Endereço para correspondência: Mateus José Sudano, Rua São Paulo, n° 1779, Centro, São Carlos – SP, CEP: 13560-340 Fone: (16) 81416276 / (16) 33741760; Fax: (14) 38116249 mateusjsudano@yahoo.com.br

discuss the involved issues in ovulation failure in Nellore cattle subjected to superovulatory treatment with eCG.

Key words: ovulation failure, superovulation, eCG, anti-eCG antibody, nellore cattle

FALLA DE LA OVULACIÓN EN TRATAMIENTO SUPEROVULATORIO CON ECG EN VACAS NELORE (*Bos taurus indicus*)

RESUMEN

Debido a las ventajas de el tratamiento superovulatorio con la gonodotrofina coriónica equina (eCG), esta siendo empleada en programas de transferencia embrionaria de vacas Nelore (*Bos taurus indicus*), obteniendo resultados comparables a los de la utilización de la hormona foliculo estimulante (FSH). Todavía la utilización de eCG está frecuentemente asociada con la ocurrencia de un elevado número de folículos anovulatorios y la secreción anormal de estradiol, progesterona y hormona luteinizante (LH), además hay la posibilidad de reducir la respuesta superovulatoria y la calidad de los embriones producidos. Una alternativa para reducir esta incidencia es el tratamiento con la eCG asociada a el anticuerpo monoclonal anti-eCG, garantizando respuestas efectivas de las donantes, aumentando las tasas de ovulación y de embriones transferibles, y previniendo la falla de la ovulación. El objetivo de esta revisión es discutir los aspectos implicados en la falla de la ovulación en vacas Nelore sometidas a el tratamiento superovulatorio con la eCG.

Palabras-claves: falla de la ovulación, superovulación, eCG, anticuerpo anti-eCG, nellore

INTRODUÇÃO

O gado zebuino (*Bos taurus indicus*) é predominante em regiões tropicais e subtropicais pela sua resistência natural ao estresse causado pelo calor e pelos ectoparasitas. No Brasil, o nelore é a principal raça de corte, com aproximadamente 100 milhões de cabeças, exigindo constante atenção no melhoramento genético da raça. A múltipla ovulação e transferência de embriões (MOETE) é uma biotécnica reprodutiva disponível para assegurar o progresso genético do nelore (1).

A transferência de embriões (TE) em bovinos abrange as técnicas de superovulação, colheita e transferência de embriões para receptoras, sendo o método mais utilizado em todo o mundo para multiplicar animais de alto valor genético (2). Segundo o último relatório da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (3) houve aumento de 20% no número de embriões bovinos produzidos por múltipla ovulação.

A primeira transferência de embriões com sucesso foi realizada em 1951 na Universidade de Cornell, nos Estados Unidos (4). Desde a década de 70 a técnica de TE vem aprimorando-se, sendo utilizada comercialmente. Diversos protocolos superovulatórios foram desenvolvidos desde então, aprimorando-a cada vez mais (5).

Recentemente, a utilização da eCG é sugerida, novamente, em protocolos de superovulação, devido às facilidades de sua aplicação e aos resultados, observando-se taxas de recuperação embrionária semelhantes à superovulação com o FSH (6). No entanto, a eCG é frequentemente associada com a ocorrência de um elevado número de folículos anovulatórios no momento da colheita dos embriões (7, 8, 9, 10). Portanto, a presente revisão tem por objetivo discutir os aspectos envolvidos na falha da ovulação em vacas Nelore (*Bos taurus indicus*) submetidas a tratamentos superovulatórios com a eCG.

REVISÃO DA LITERATURA:

A TE é uma biotécnica reprodutiva utilizada para multiplicar animais de alto valor genético (2), possibilitando acelerar o melhoramento genético animal (1).

O uso da TE possibilita que uma fêmea produza um número de descendentes superior ao que seria possível obter fisiologicamente durante sua vida reprodutiva (11). Dos aproximadamente 200.000 oócitos primários presentes nos ovários de uma fêmea no momento de seu nascimento, poucos irão, por via fisiológica e reprodutiva natural, resultar numa cria, principalmente devido a limitações de caráter biológico (intervalo entre partos prolongado, gestação simples), ambiental (enfermidades das articulações, cascos, úbere e etc) e econômico (sistema de produção).

No entanto, o tratamento superovulatório pode provocar desordens no eixo neuro-endócrino que regula a função dos folículos ovarianos (12). Estas alterações podem causar anormalidades como: folículos anovulatórios, síndrome da estimulação excessiva (“*overstimulation syndrome*”) e folículos luteinizados anovulatórios (13).

Os resultados dos protocolos de superovulação são influenciados pelo número de folículos que são estimulados a crescer e o número que são induzidos a ovular. Porém, apenas uma parcela dos folículos que são estimulados a crescer progride até a ovulação. De acordo com D’occhio et al. (14), isto ocorre não por deficiência intrínseca do folículo, mas devido ao diâmetro folicular ser muito reduzido no momento do início do tratamento superovulatório, culminando em tempo insuficiente para completar a maturação oocitária antes do pico pré-ovulatório de LH, ou então, devido a presença insuficiente de receptores para LH em alguns folículos no momento do pico de LH (15).

Outro fator que afeta a resposta superovulatória é a presença de um folículo dominante no momento da administração do hormônio superovulatório, que exerce um efeito inibitório sobre o número de folículos que são induzidos a crescer durante a superovulação (16).

O tratamento superovulatório de bovinos com gonodotrofina sérica da égua prenhe (PMSG), também conhecida como eCG, é freqüentemente associado com a ocorrência de elevado número de folículos anovulatórios no momento da colheita dos embriões (7, 8, 9). De fato, a superovulação com eCG causa a hipertrofia dos ovários e a presença de numerosos folículos anovulatórios (10-30mm de diâmetro) com parcial luteinização no momento da colheita dos embriões (17).

Acredita-se que isto ocorra pela persistência da eCG na circulação devido a sua longa meia vida, fato este atribuído ao elevado conteúdo de ácido siálico na molécula da gonodotrofina (18). Assim, a aplicação de eCG é associada à secreção anormal de estradiol, progesterona e LH (19), podendo reduzir a resposta superovulatória e a produção de embriões com baixa qualidade. No entanto, há relatos de resposta superovulatória com resultados comparáveis aos da utilização do FSH (20, 6).

No estudo realizado por Martins et al. (6), 12 vacas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) foram divididas em três grupos de acordo com o tratamento superestimulatório: eCG-2500UI; eCG-2000UI e FSH-100mg. Os animais receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (P4) (DIB[®]) associado a 2 mg de benzoato de estradiol (BE) no Dia 0. Nos tratamentos com eCG, a superestimulação foi realizada com a administração de 2500 ou 2000 UI de eCG (Novormon[®]) em dose única no Dia 4. No tratamento com FSH, administraram-se 100mg de Folltropin-V[®] em 8 doses decrescentes a cada 12 horas, a partir do Dia 4. No Dia 6, administraram-se 150 µg de prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) (Prolise[®]). Os dispositivos de P4 foram retirados 36 horas após a administração de PGF_{2α}, e o LH (25mg, Lutropin-V[®]) aplicado 48 horas após a PGF_{2α}. Realizou-se uma única inseminação artificial 16 horas após o tratamento com LH utilizando uma única partida de um único touro para cada vaca/ réplica. A colheita dos embriões foi realizada no Dia 15. Os resultados encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1: Taxa de ovulação, estruturas totais, embrião grau 1 e embriões transferíveis de vacas nelore superovuladas com eCG-2500UI, eCG-2000UI e FSH 100mg.

Grupo	eCG-2500UI	eCG-2000UI	FSH 100mg
Taxa de ovulação	33,1% ^b	58,4% ^a	65,9% ^a
Estruturas totais	5.9±1.0	7.6±1.0	5.7±1.4
Embriões grau 1	3.4±0.7	5.8±0.9	3.5±0.7
Embriões transferíveis	4.4±0.7	6.9±1.0	4.6±0.9

^{a,b}Médias sobrescritas com letras distintas diferem estatisticamente (P<0,05).

Adaptado Martins et al.(6).

Da Tabela 1, depreende-se que o tratamento com 2000UI de eCG produz número semelhante de embriões transferíveis comparado ao grupo tratado com FSH, mostrando ser uma alternativa viável para programas de TE com inseminação artificial em tempo fixo em zebuínos (6).

Dentre as vantagens da utilização da eCG em protocolos de superovulação, pode-se citar: a sua disponibilidade, seu baixo custo, e possibilitar a racionalização da mão de obra por facilitar o manejo das doadoras, já que a eCG é aplicada em dose única devido a sua longa meia vida. Este último atributo favorece a redução do estresse provocado aos animais quando comparado com o tratamento com FSH (21).

A meia vida da eCG em vacas está ao redor de 5 dias (22), apesar deste atributo proporcionar a facilidade do manejo das doadoras em programas de TE, esta característica pode resultar também em problemas de estimulação excessiva ou prolongada (20).

A persistência da eCG pode ocasionar o surgimento de uma nova onda de crescimento folicular (23), e provocar um aumento nos níveis de estrógeno. Isto pode levar ao desenvolvimento de um ambiente hormonal desfavorável para o transporte e desenvolvimento embrionário ao longo do oviduto (24), o que afeta a qualidade e recuperação embrionária (12, 25).

A presença de folículos anovulatórios em ovelhas foi citada pela primeira vez por Grant (26), e a incidência de folículos anovulatórios pode chegar a 50% em alguns tratamentos (27). Por sua vez, Veiga-Lopez et al. (28) relataram 34,6% de folículos anovulatórios em ovelhas superovuladas. A causa da não ovulação pode ser determinada pela existência do efeito de um folículo dominante no início do tratamento superovulatório, os folículos subordinados são capazes de crescer até o diâmetro pré-ovulatório, porém a sua ovulação é impedida.

Um diâmetro muito reduzido do segundo maior folículo, ou uma grande diferença no diâmetro do maior folículo para o segundo maior folículo no início do tratamento superovulatório aumenta o aparecimento de falhas da ovulação, sugerindo que folículos imaturos ou folículos no início de atresia são induzidos a desenvolver pelo tratamento com FSH, indicando que isto pode ser uma das causas da falha da ovulação (28).

A administração de grandes doses de preparações de FSH nos protocolos superovulatórios induzem a alteração do padrão endócrino, como por exemplo, a baixa secreção endógena de LH (29) ou pico de LH defeituoso (14).

Em ovinos, a presença de fêmeas que não ovulam ou que ovulam poucos folículos é ainda uma das principais causas da grande variabilidade da qualidade dos programas de MOETE. A incidência desta alteração está entre 20-30% (27). As possíveis causas estão relacionadas a uma deficiência ou uma inexistência do pico pré-ovulatório de LH (30), ou a presença de um folículo não responsivo, durante a regulação dos receptores de LH das células da granulosa e teca (31, 32).

O efeito da superovulação com o eCG sobre a secreção endógena das gonadotrofinas não está muito bem definida em bovinos (7). Sudano et al. (10) relataram, num estudo preliminar, 25% de falha da ovulação em vacas Nelore submetidas ao tratamento superovulatório com eCG.

Bevers et al. (33) sugerem que enquanto a secreção de LH durante a fase luteal não é afetada pelo tratamento com eCG, o pico pré-ovulatório de LH é inibido, sendo observado também, uma redução significativa da secreção de FSH, provavelmente devido ao efeito inibitório dos folículos anovulatórios.

Para superar esta característica desfavorável, foi introduzida a administração do soro anti-eCG (anticorpo monoclonal ou policlonal) nos protocolos superovulatórios com o uso da eCG. Este processo, já foi testado extensivamente e permitiu aumento na taxa de ovulação, no número total de estruturas recuperadas e na qualidade dos embriões transferíveis (21, 20).

É desconhecido o mecanismo de ação do soro anti-eCG. Conjectura-se que ele esteja associado ao estágio de maturação final dos folículos e oócitos (34), pois a atividade de LH da eCG, especialmente em altas doses, altera o crescimento folicular e induz a ativação prematura do oócito (35). A neutralização da eCG e, portanto, os efeitos de FSH e LH antes da ovulação, podem resultar em maior sincronização entre a maturação folicular e oocitária.

Segundo Gonzalez et al. (7), a concentração plasmática de estradiol durante o estro aumenta de acordo com o aumento da dose de eCG nos tratamentos superovulatórios. Porém, após o estro, o estradiol declina para níveis basais quando se utiliza o soro anti-eCG no tratamento, enquanto que com a administração apenas da eCG, ocorre uma ligeira queda associada com a ovulação seguido por aumento contínuo até o dia da colheita embrionária, também em uma relação dose dependente (Figura 1).

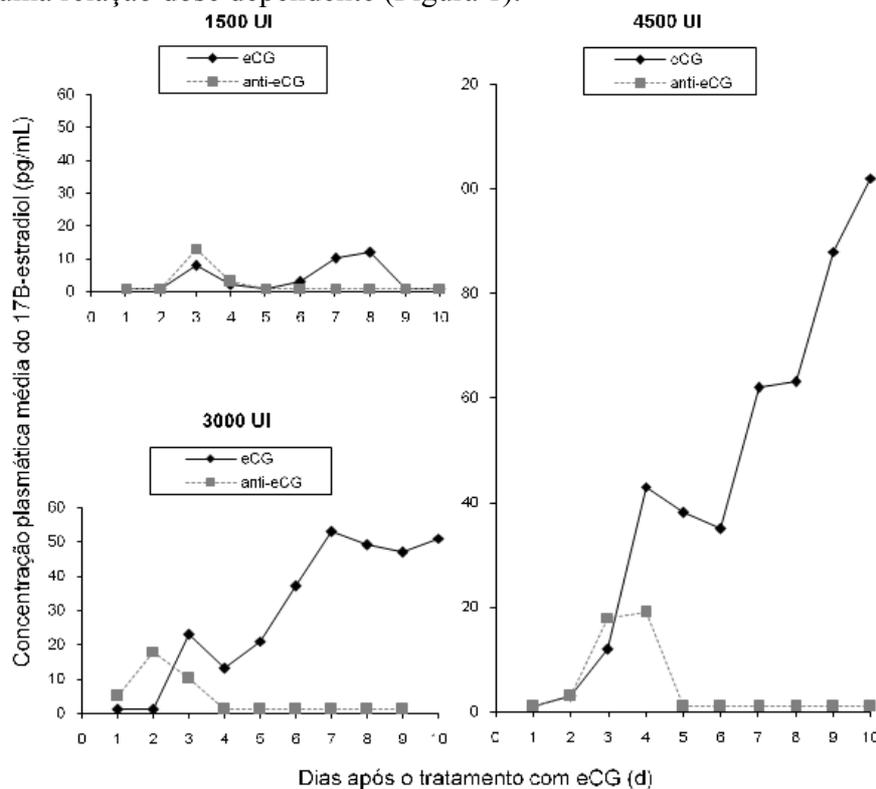


Figura 1: Concentração plasmática média de 17β-estradiol (pg/mL) em novilhas de corte tratadas com 1500, 3000 ou 4500 UI de eCG (grupo eCG) e de novilhas de corte tratadas com 1500, 3000 ou 4500 UI de eCG associada a dose equivalente neutralizante de soro anti-eCG 60 horas após a aplicação de prostaglandina (grupo anti-eCG). Fonte: Adaptado Gonzalez et al. (7).

Próximo do momento da ovulação, 65% dos folículos pré-ovulatórios não atresícos contêm 4 vezes mais estradiol do que folículos de animais não estimulados (34). Este microambiente impróprio pode ser prejudicial para o potencial de desenvolvimento embrionário após a ovulação do oócito.

O tratamento superovulatório com eCG associada ao soro anti-eCG resulta em maior taxa de ovulação quando comparado ao grupo tratado apenas com eCG. Fato este confirmado devido a presença de maior número de corpos lúteos e menor número de folículos anovulatórios (>10mm) para os grupos 1500, 3000 ou 4500UI de eCG associado a dose equivalente de soro anti-eCG quando comparados aos grupos com apenas os tratamentos de 1500, 3000 ou 4500UI de eCG, sem a associação do soro anti-eCG (Tabela 2). Além disso, a associação do soro anti-eCG ao tratamento superovulatório resulta no aumento do número de estruturas recuperadas e de embriões transferíveis (7).

Tabela 2: Média do número de corpos lúteos, folículos anovulatórios, resposta ovariana total e taxa de ovulação em novilhas de corte tratadas com eCG associado ou não ao tratamento com anticorpo monoclonal anti-eCG.

Tratamento		n	Corpo lúteo	Folículos anovulatórios	Resposta ovariana	Taxa de ovulação (%)
ECG (UI)	Anti-eCG (UI)					
1500	0	12	9,0±2,5 ^a	9,4±3,4 ^a	17,6±2,9	48,9 ^a
1500	1500	10	11,2±1,8 ^a	4,0±1,2 ^b	15,2±1,5	73,6 ^b
3000	0	10	8,0±2,0 ^a	16,5±4,7 ^a	27,0±3,4	35,0 ^a
3000	3000	11	16,3±2,0 ^b	4,7±0,7 ^b	21,0±1,4	76,2 ^b
4500	0	10	10,8±3,3 ^a	26,9±8,3 ^a	38,7±5,7	30,5 ^a
4500	4500	11	16,3±3,4 ^{ab}	8,8±1,7 ^a	25,1±2,6	64,8 ^b

^{ab} Valores nas colunas com sobrescritos distintos diferem significativamente (P<0,05).

Adaptado Gonzalez et al. (7).

De acordo com Gonzalez et al. (7), a administração de anticorpos promove o desenvolvimento e ovulação do pool de folículos do ovário superestimulado com eCG em novilhas mestiças de corte. Ficou demonstrado neste trabalho, que o uso de anticorpos permite redução significativa no desenvolvimento folicular do ovário após o estro, levando a redução do número de folículos anovulatórios no dia da colheita embrionária. O tratamento com o soro monoclonal anti-eCG em novilhas superestimuladas com eCG também preveniu qualquer aumento pós-ovulatório dos níveis plasmáticos de estradiol que é originado provavelmente dos folículos anovulatórios ou de uma nova onda de crescimento folicular estimulada pela permanência da ação da eCG após a ovulação.

CONCLUSÃO

Apesar da eCG possuir vantagens intrínsecas da sua aplicação em tratamentos superovulatórios em programas de TE, a sua utilização está comumente associada a falha da ovulação de número considerável de folículos, o que pode levar a redução da eficiência desta gonodotrofina em programas de TE e ocasionar distúrbios reprodutivos as doadoras submetidas a este tratamento.

Uma alternativa para contornar este problema é o tratamento superovulatório com eCG associado ao anticorpo monoclonal anti-eCG, garantindo resposta efetiva das doadoras, resultando em aumento das taxas de ovulação e prevenindo desta maneira, a falha da ovulação em tratamentos superovulatórios com a administração de eCG. Sua facilidade de aplicação é uma opção interessante para o sistema de produção de bovinos de corte no Brasil.

REFERÊNCIAS

1. Nogueira MFG, Barros BJP, Teixeira AB, Trinca LA, D'occhio MJ, Barros CM. Embryo recovery and pregnancy rates after the delay of ovulation and fixed time insemination in superstimulated beef cows. *Theriogenology*. 2002; 57: 1625-34.
2. Bó GA, Moreno D, Cutaia L, Baruselli PS, Reis EL. Manipulação hormonal do ciclo estral em doadoras e receptoras de embrião bovino. *Acta Sci Vet*. 2004; 32: 1-22.
3. Thibier M. More than half a million bovine embryos transferred in 2002: a report from the IETS data retrieval committee. *IETS Newsl*. 2003; 21: 12-9.
4. Kanagawa H, Shimohira I, Saitoh N. Manual of bovine embryo transfer. Japan: Livestock Technology Association; 1995.
5. Baruselli PS, Sá Filho MFD, Martins CM, Nasser LF, Nogueira MFG, Barros CM, et al. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*. 2006; 65: 77-88.
6. Martins CM, Torres-Júnior JRS, Gimenes LU, Souza AH, Baruselli PS. Superovulação com eCG ou FSH em doadoras Nelore (*Bos indicus*) inseminadas em tempo fixo. *Acta Sci. Vet*. 2006; 34: 527.
7. Gonzalez A, Wang H, Carruthers TD, Murphy BD, Mapleloft RJ. Increased ovulation rates in PMSG-stimulated beef heifers treated with a monoclonal PMSG antibody. *Theriogenology*. 1994; 41: 1631-42.
8. Rubianes E, Ungerfeld R, Ibarra D. Serum anti-eCG improves luteal function and increases ova/embryos recovery in eCG-superovulated ewes. *Small Rumin Res*. 1996; 21: 105-11.
9. Ungerfeld R, Ibarra D, Rubianes E. The use of anti-ECG serum improve ovarian response of ewes superovulated with ECG. *Theriogenology*. 1995; 43: 365.
10. Sudano MJ, Bernal PN, Fala AM, Souza-Junior EBC, Barbosa RT, Bergamaschi MACM, et al. Falha da ovulação em tratamentos superovulatórios com eCG em vacas nelore (relato de caso). In: Anais do 2º Simpósio de Iniciação Científica da Embrapa Pecuária Sudeste; 2007, São Carlos. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste; 2007. p13. (Documento 76)
11. Reichenbach H, Oliveira MALO, Lima PF, Santos Filho AS, Andrade JCO. Transferência e criopreservação de embriões bovinos. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. São Paulo: Livraria Varela; 2001. p.127-78.
12. Moor RM, Osborn JC, Crosby IM. Gonadotrohin-induced abnormalities in sheep oocytes after superovulation. *J Reprod Fertil*. 1985; 74: 167-72.
13. Kaifi M, McGowan MR. Factors associated with variation in the superovulatory response in cattle. *Anim Reprod Sci*. 1997; 48: 137-57.
14. D'occhio MJ, Jillella D, Lindsey BR. Factors that influence follicle recruitment, growth and ovulation during ovarian superstimulation in heifers: opportunities to increase ovulation rate and embryo recovery by delaying the exposure of follicles to LH. *Theriogenology*. 1999; 51: 9-35.
15. Liu J, Sirois J. Follicle size-dependent induction of prostaglandin G/H synthase-2 during superovulation in cattle. *Biol Reprod*. 1998; 58: 1527-32.

16. Murphy MG, Boland MP, Roche JF. The effects of dose and duration of administration of pFSH during the first follicular wave on the ovulation rate of beef heifers. *Theriogenology*. 1998; 49: 557-69.
17. Dieleman SJ, Bevers MM, Wurth YA, Gielen JTH, Willemse AH. Improved embryo yield and condition of donor ovaries in cows after PMSG superovulation with monoclonal anti-PMSG administered shortly after the preovulatory LH peak. *Theriogenology*. 1989; 31: 473-87.
18. Manning AW, Rajkumar K, Bristol F, Flood PF, Murphy BD. Genetic and temporal variation in serum concentrations and biological activity of horse chorionic gonadotropin. *J Reprod Fertil*. 1987; 35: 389-97.
19. Callesen H, Bak A, Greve B, Avery P, Golfredsen P, Holm P, et al. Hormonal parameters for evaluation of superovulated heifers. *Theriogenology*. 1989; 39: 180.
20. Alfuraiji MM, Atkinson T, Broadbent PJ, Hutchinson JSM. Superovulation in cattle using PMSG followed by PMSG-monoclonal antibodies. *Anim Reprod Sci*. 1993; 33: 99-109.
21. Dieleman SJ, Bevers MM, Vos PLAM, De Loos FAM. PMSG/anti-PMSG in cattle: a simple and efficient superovulatory treatment? *Theriogenology*. 1993; 39: 25-41.
22. Bevers MM, Dieleman SJ. Superovulation of cow with PMSG: variation in plasma concentrations of progesterone, oestradiol, LH, cortisol, prolactin, and PMSG and in number of preovulatory follicles. *Anim Reprod Sci*. 1987; 15: 37-52.
23. Murphy BD, Martinuk SD. Equine chorionic gonadotropin. *Endocr Rev*. 1991; 12: 7-44.
24. Boland MP, Crosby TF, Gordon I. Factors affecting egg "quality" after superovulation in cattle. *Theriogenology*. 1978; 9: 87.
25. Schiewe MC, Fitz TA, Brown JL, Stuart LD, Wildt DE. Relationship of oestrus synchronization method, circulating hormones, luteinizing hormone and prostaglandin F-2a receptors and luteal progesterone concentration to pre-mature luteal regression in superovulated sheep. *J Reprod Fert*. 1991; 93: 19-30.
26. Grant R. Studies on the physiology of reproduction in the ewe. Part III. Gross changes in the ovaries. *Trans Roy Soc Edin*. 1934; 58: 36-47.
27. Gonzalez-Bulnes A, Santiago-Moreno J, Cocero MJ, Lopez-Sebastian A. Effects of FSH commercial preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in Spanish Merino ewes. *Theriogenology*. 2000; 54: 1055-64.
28. Veiga-Lopez A, Gonzalez-Bulnes A, Tresguerres JAF, Dominguez V, Sriznavarreta C, Cocero MJ. Causes, characteristics and consequences of anovulatory follicles in superovulated sheep. *Domest Anim Endocrinol*. 2006; 30: 76-87.
29. Kendall NR, Gonzalez-Bulnes A, Campbell BK. The use of urinary and recombinant human FSH preparations to induce superovulation in sheep and the effect on FSH and LH concentrations. In: *Proceedings Annual Meeting British Society of Animal Science; 2004*, Penicuik. Penicuik: British Society of Animal Science; 2004. p.59.
30. Gonzalez-Bulnes A, Garcia-Garcia RM, Castellanos V, Santiago-Moreno J, Ariznavarreta C, Dominguez V. Influence of maternal environment on the number of transferable embryos obtained in response to superovulatory FSH treatments in ewes. *Reprod Nutr Dev*. 2003; 43: 17-28.
31. Lopez-Diaz MC, Bosu WTK. A review and an update of cystic ovarian degeneration in ruminants. *Theriogenology*. 1992; 37: 1163-83.

32. Boland MP, Goulding D, Roche JF. Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. *Theriogenology*. 1991; 35: 5–17.
33. Bevers MM, Dielamen SJ, Van Tol HTM, Blankentein DM. Aberrations in gonadotrophin hormone secretion in PMSG-superovulated cows. In: *Proceedings of 11th International Congress of Animal Reproduction and Artificial Insemination*; 1988, Dublin. Dublin: University College Dublin; 1988. p141.
34. Dieleman SJ, Bevers MM, Kruip THAM, Van Tol HTH, Blankentein DM. Steroid profiles and micromorphology of the follicle population before ovulation in PMSG-superovulated cows with or without monoclonal anti-PMSG administered shortly after the preovulatory peak. In: *Proceedings of 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination*; 1988, Dublin. Dublin: University College Dublin; 1988. p.154.
35. Moor RM, Kruip TAM, Green D. Intraovarian control of folliculogenesis: limits to superovulation. *Theriogenology*. 1984; 21: 103-16.

Recebido em: 22/08/2008

Aceito em: 07/09/2009