

TARCILLA DUTRA BARBOSA CALDAS

**EFEITOS DA REINSERÇÃO DE DISPOSITIVO INTRAVAGINAL DE
PROGESTERONA SOBRE PARÂMETROS ENDÓCRINOS E EMBRIONÁRIOS EM
OVELHAS SUPEROVULADAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Jeferson Ferreira da Fonseca

Coorientadores: Felipe Zandonadi Brandão
Bruna Waddington de Freitas

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

C145e
2022
Caldas, Tarcilla Dutra Barbosa, 1996-
Efeitos da reinserção de dispositivo intravaginal de
progesterona sobre parâmetros endócrinos e embrionários em
ovelhas superovuladas / Tarcilla Dutra Barbosa Caldas. –
Viçosa, MG, 2022.

1 dissertação eletrônica (44 f.): il.

Inclui anexos.

Orientador: Jeferson Ferreira da Fonseca.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Medicina Veterinária, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.085>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Ovelhas - Reprodução. 2. Luteólise. 3. Corpo lúteo.
4. Superovulação. I. Fonseca, Jeferson Ferreira da, 1972-
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Medicina
Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina
Veterinária. III. Título.

CDD 22. ed. 636.30824


TARCILLA DUTRA BARBOSA CALDAS

**EFEITOS DA REINserÇÃO DE DISPOSITIVO INTRAVAGINAL DE
PROGESTERONA SOBRE PARÂMÉTROS ENDÓCRINOS E EMBRIONÁRIOS EM
OVELHAS SUPEROVULADAS**


Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 12 de dezembro de 2022.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 TARCILLA DUTRA BARBOSA CALDAS
Data: 31/03/2023 11:49:55-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Tarcilla Dutra Barbosa Caldas
Autora

Documento assinado digitalmente
 JEFERSON FERREIRA DA FONSECA
Data: 31/03/2023 15:54:21-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Jeferson Ferreira da Fonseca
Orientador

A todas as mulheres da minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À minha mãe e todas as mulheres da minha família que com toda sua força me criaram e me inspiraram, vovó Graça, tia Melina, tia Mirna, tia Mylene e tia Eliane.

Ao meu avô Dau e ao meu tio Marlon que foram minhas figuras paternas.

Aos meus primos que são meus irmãos e amigos mais próximos, Lucas, Mateus, João, Camilla, Isabella e em especial a Hannah, minha irmã de coração, companheira, melhor amiga e confidente.

À Kitty e a Lindinha que foram minhas gatinhas de estimação e me acompanharam por 17 anos da minha vida e não se encontram mais presente. A Paçoca minha ratinha que me acompanhou nessa fase final me dando amor e alegria. Ao Rex que foi companheiro mais alegre de minha vida.

Ao Pedro Navarro, meu namorado e acima de tudo a pessoa que eu escolhi para me acompanhar para a vida toda, por todo suporte, alegria e companheirismo.

À Diana, minha querida amiga da UFV que foi minha família em Minas.

Ao professor Dr. Rodrigo Amaral que me incentivou a seguir a carreira acadêmica.

Ao professor Dr. Alexandre Tonin pela amizade e suporte.

Ao meu orientador Dr. Jeferson Fonseca que me recebeu de braços abertos e sempre foi compreensivo.

Aos meus coorientadores professor Felipe Brandão e professora Bruna Waddington pela mentoria e tempo disponibilizados.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a Pós-Graduação.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

A Embrapa Caprinos e Ovinos, Projeto SUPEROVI – 3 (20.22.03.004.00.00) pelo suporte financeiro.

“O mundo não se divide em pessoas boas e más. Todos temos luz e trevas dentro de nós. O que importa é o lado o qual decidimos agir. Isso é o que realmente somos.”
(Harry Potter e a Ordem da Fénix)

RESUMO

CALDAS, Tarcilla Dutra Barbosa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2022. **Efeitos da reinserção de dispositivo intravaginal de progesterona sobre parâmetros endócrinos e embrionários em ovelhas superovuladas.** Orientador: Jeferson Ferreira da Fonseca. Coorientadores: Bruna Waddington de Freitas e Felipe Zandonadi Brandão.

Este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia do uso de dispositivo de progesterona do quarto ao oitavo dia após a superovulação de ovelhas mestiças Dorper/Santa Inês sobre a função luteal e produção *in vivo* de embriões. Um total de 20 ovelhas multíparas receberam um dispositivo intravaginal de progesterona (P4; 0,36 g; Primer[®], Agener União Saúde Animal, Brasil) por nove dias, inserido (D0) e retirado (D9) no período da tarde (18:00 h), bem como seis doses decrescentes (25, 25, 15, 15, 10, 10%) de 133 mg de pFSH i.m. (Folltropin[®], Vetoquinol, Brasil) em intervalos de 12 h. Sendo a superovulação iniciada 60h antes da remoção do dispositivo e terminando concomitantemente com a remoção do dispositivo. Todas as ovelhas receberam 125 µg de cloprostenol i.m. (Sincrocio[®]; Ourofino, Brasil) na quinta e sexta doses de pFSH e 50 µg de gonadorelina i.m. (Gestran[®], Tecnopec, São Paulo, Brasil) no D10, e foram submetidas a monta natural a cada 12 h durante o estro. No D13, as ovelhas previamente detectadas em estro e com corpos lúteos viáveis (CL; n=19) foram igualmente alocadas para receber seus próprios implantes intravaginais usados alguns dias antes (G-P4; n=10) ou não (G-Control; n=9). No D17, os dispositivos foram novamente removidos e todas as fêmeas receberam o protocolo de relaxamento cervical incluindo 125 µg de cloprostenol i.m. e 0,5 mg de benzoato de estradiol i.m. (Gonadiol[®]; Zoetis, Brasil) ambos 16 h antes, bem como 50 UI de ocitocina i.v. (Ocitocina Forte[®], UCB, Brasil) 20 min antes da recuperação não cirúrgica de embriões. A contagem e a viabilidade do CL foram realizadas por ultrassonografia transretal modo B e Doppler colorido antes da reinserção do implante (D13) e na sua remoção (D17). Amostras de sangue foram em D9, D13 e D17 para a determinação das concentrações circulantes de progesterona (P4). Os dados não paramétricos e paramétricos foram analisados pelo teste de Mann-Whitney e ANOVA, respectivamente. As frequências foram avaliadas pelo teste Qui-quadrado ou exato de Fisher. As diferenças foram consideradas significativas

quando $p < 0,05$. A resposta do estro foi de 95% (19/20). Todas as ovelhas em estro apresentaram pelo menos um CL viável no D13. As concentrações plasmáticas de P4 foram semelhantes ($P > 0,05$) em D9 ($1,0 \pm 0,2$ vs. $1,9 \pm 0,7$ ng/mL) e 13 ($1,1 \pm 0,4$ vs. $1,6 \pm 0,5$ ng/mL), mas diferiu em D17 ($4,0 \pm 1,3$ vs. $9,2 \pm 2,8$) para G-Control e G-P4, respectivamente. A regressão do CL foi semelhante ($P > 0,05$) nas ovelhas G-Control (44,4%) e G-P4 (33,3%). A taxa média de recuperação não diferiu entre os grupos ($P > 0,05$) e os óvulos/embriões recuperados foram inferiores ($P < 0,05$) no G-Controle ($24,5 \pm 10,6\%$ e $3,7 \pm 2,0$) do que no G-P4 ($52,7 \pm 10,5\%$ e $11,6 \pm 2,9$) ovelhas, respectivamente. A taxa de viabilidade embrionária foi semelhante ($P > 0,05$) ao G-Control (9,1% ou 2/22) e G-P4 (23,5% ou 19/81). Em conjunto, esses dados sugerem que a reinserção do implante intravaginal de progesterona por quatro dias após a superovulação promove maior concentrações de P4 circulante, resultando em maior recuperação embrionária.

Palavras-chave: Regressão Prematura de Corpo Lúteo. Superovulação. Colheita de embrião não cirúrgica.

ABSTRACT

CALDAS, Tarcilla Dutra Barbosa, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2022. **Effects of reinsertion of an intravaginal progesterone device on endocrine and embryonic parameters in superovulated ewes.** Advisers: Jeferson Ferreira da Fonseca. Co-advisers: Bruna Waddington de Freitas and Felipe Zandonadi Brandão.

This study aimed to assess the efficacy of using a progesterone device from fourth to eighth day after superovulation device on the luteal function and in vivo embryos production in crossbred Dorper/Santa Inês ewes. A total of 20 multiparous ewes received an intravaginal progesterone device (P4; 0.36 g; Primer[®], Agener União Saúde Animal, Brazil) for nine days, inserted (D0) and removed (D9) in the afternoon (18:00 h), as well as six decreasing doses (25, 25, 15, 15, 10, 10%) of 133 mg pFSH i.m. (Folltropin[®], Vetoquinol, Brazil) at 12 h intervals, starting 60 h before device removal and finishing concomitantly to device removal. All ewes received 125 µg cloprostenol i.m. (Sincrocio[®]; Ourofino, Brazil) at fifth and sixth FSH doses, and 50 µg gonadorelin i.m. (Gestran[®], Tecnopec, São Paulo, Brazil) on D10, and were subjected to natural mating every 12 h while in estrus. On D13, the ewes previously detected in estrus and with viable corpora lutea (CL; n=19) were equally allocated for receiving their own intravaginal implants used a few days before (G-P4; n=10) or not (G-Control; n=9). On D17, the devices were again removed, and all females received the cervical relaxation protocol including 125 µg cloprostenol i.m. and 0.5 mg estradiol benzoate i.m. (Gonadiol[®]; Zoetis, Brazil) both 16 h before, as well as 50 IU oxytocin i.v. (Ocitocina Forte, UCB, Brazil) 20 min before non-surgical embryo recovery (NSER). CL count and viability were performed by transrectal B-mode and color Doppler ultrasonography before implant re-insertion (D13) and at its removal (D17). Blood samples were done before implant removal or insertion on D9, D13, and D17 for plasma progesterone (P4) analyses. Non-parametric and parametric data were analyzed by Mann-Whitney test and ANOVA, respectively. Frequencies were assessed by Chi-square or Fisher exact test. Differences were considered as significant when $p < 0.05$. The estrous response was 95% (19/20). All ewes in estrus showed at least one viable CL on D13. P4 was similar ($P > 0.05$) on D9 (1.0 ± 0.2 vs. 1.9 ± 0.7 ng/mL) and 13 (1.1 ± 0.4 vs. 1.6 ± 0.5 ng/mL) but differed on D17 (4.0 ± 1.3 vs.

9.2±2.8) for G-Control and G-P4, respectively. CL regression was similar ($P>0.05$) in G-Control (44.4%) and G-P4 (33.3%) ewes. The difference of average recovery rate was not significant ($P>0.05$) and ova/embryos recovered were inferior ($P<0.05$) in G-Control ($24.5 \pm 10.6\%$ and 3.7 ± 2.0) than in G-P4 ($52.7 \pm 10.5\%$ and 11.6 ± 2.9) ewes, respectively. The embryo viability rate was similar ($P>0.05$) to G-Control (9.1% or 2/22) and G-P4 (23.5% or 19/81). Altogether, these data suggest that the reinsertion of the intravaginal progesterone implant for four days after superovulation promotes greater P4, resulting in a greater ova/embryo recovered.

Keywords: Corpus luteum. Estrous synchronization. NSER.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	Ciclo Estral na Ovelha	13
2.2	Luteogênese e Luteólise.....	14
2.3	Regressão Luteal Precoce na Ovelha	15
2.4	Superovulação na Ovelha	16
3	HIPÓTESE.....	16
4	OBJETIVOS	17
4.1	Objetivo Geral.....	17
4.2	Objetivos Específicos.....	17
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	18
6	CAPÍTULO 1	24
7	ANEXOS	44

1 INTRODUÇÃO

A maioria dos embriões ovinos produzida no mundo tem sido obtida por meio da produção *in vivo*. Para tanto, a múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE) é a opção de escolha e oficialmente reportada como sendo suporte das atividades comerciais da espécie (Souza-Fabjan et al., 2020). Recentemente no Brasil, um incremento substancial do conhecimento foi gerado sobre a superovulação de ovelhas com sucesso reportado em várias raças (Fonseca e Oliveira, 2021) a partir do uso de um protocolo comum de superovulação (Fonseca e Oliveira, 2020).

Uma série de fatores intrínsecos e extrínsecos podem impactar negativamente os resultados da múltipla ovulação e transferência de embrião (Bartlewski et al., 2016). Potencialmente, esses fatores poderiam ser bem controlados com um protocolo de superovulação eficiente que pudesse obter produção média de resposta ovulatória próxima a 10 corpos lúteos (CL) e recuperação média entre cinco e sete embriões viáveis por doadora coletada (Fonseca e Oliveira, 2021). Todavia, mesmo com uma boa resposta ovulatória, um importante fator que afeta a produção embrionária e assume papel decisivo nesse cenário é a regressão prematura de corpos lúteos (RPCL; Rodriguez et al., 2015).

A RPCL é o encurtamento da fase luteal em decorrência de uma disfunção luteal com repercussão imediata na redução das concentrações plasmáticas de progesterona (Forde e Lonergan, 2017). Trata-se de uma ocorrência comum tanto em cabras (Saharrea et al., 1998) quanto em ovelhas (Rodrigues et al., 2019; Rocha et al., 2022) superovuladas. O uso de estratégias anti-luteolíticas como administração de flunixin-meglumine, apresentou efeitos positivos sobre este fenômeno, já que a produção de embriões viáveis reportada foi bastante significativa quando da utilização desta estratégia (Figueira et al., 2020; Fonseca et al., 2021). Por outro lado, estratégia luteotrófica, como administração pós-ovulação de gonadotrofina coriônica humana (hCG), foi capaz de melhorar a produção endógena de P4 e também melhorar a taxa de recuperação de embriões (Dias et al., 2022). A primeira estratégia envolve administração por três dias seguidos, enquanto a segunda prevê apenas uma.

Considerando os resultados interessantes da administração de hCG, quatro dias após a retirada do dispositivo vaginal (última aplicação de FSH; Dias et al., 2022), hipotetizou-se que a P4 provida pela reinserção do próprio dispositivo anteriormente retirado pudesse ter efeitos semelhantes aos da hCG sobre a P4 e assim, repercutir positivamente sobre a recuperação embrionária de ovelhas superovuladas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ciclo Estral na Ovelha

As ovelhas são animais considerados poliéstricos estacionais de dias curtos em regiões onde as estações são bem caracterizadas (Balaro et al., 2014). No entanto, em latitudes mais baixas, ovelhas apresentam comportamento estral contínuo, favorecendo a ciclicidade reprodutiva durante todo o ano (Simplício et al., 1982; Fonseca, 2006). Já em latitudes onde as estações são bem caracterizadas, o ápice reprodutivo ocorre no outono e o anestro fisiológico na primavera (Balaro et al., 2014).

O ciclo estral na ovelha dura aproximadamente 17 dias, sendo constituído por duas fases características. A fase luteal, onde a progesterona é o hormônio predominante, tem uma duração média de 14 dias, ao passo que a fase folicular, na qual o estrógeno é o hormônio predominante, apresenta duração média de três dias. No decorrer deste período, os hormônios gonadotróficos folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), controlam o desenvolvimento folicular e esteroidogênese, culminando na secreção de estrógenos que levam ao comportamento do estro (Hafez e Hafez, 2004; Fonseca, 2005). A duração do estro nas ovelhas apresenta uma duração média de 36 horas, com a ovulação ocorrendo próxima ao final do estro (Cavalcanti et al., 2012). Essa duração pode variar em função de fatores como estado nutricional, sanidade, raça, idade, estação do ano e a presença de macho (Hafez e Hafez, 2004).

Durante a fase lútea há produção e acúmulo de ocitocina luteal, porém a progesterona inibe a expressão uterina de receptores endometriais para ocitocina (Wathes et al., 1996), os quais ocorre aumento em número e atividade em função de estrógenos à medida que o ciclo estral se aproxima da fase folicular e luteólise. Neste momento, pulsos iniciais de prostaglandina produzida pelo endométrio disparam a liberação de ocitocina luteal, que por sua vez intensifica a produção de PGF₂ α , a cascata luteolítica, terminando em crescimento e maturação folicular, seguida de ovulação (Lamming e Mann, 1995; Wathes e Lamming, 1995).

2.2 Luteogênese e Luteólise

2.2.1 Luteogênese

O CL desenvolve-se poucos dias antes da ovulação e regridem rapidamente. Após 24 horas da ovulação, todas as células remanescentes da teca encontram-se em estado avançado de degeneração. Inicia-se um processo hipertrófico e de luteinização das células da granulosa após a ovulação (Hafez e Hafez, 2007). A formação do CL resulta do crescimento, diferenciação, reorganização e luteinização das células da teca e da granulosa remanescentes do folículo ovulatório (Davis e Rueda, 2002).

A presença de um folículo pré-ovulatório no ovário determina altas concentrações plasmáticas de estradiol, condição determinante para a ocorrência de um pico pré-ovulatório de LH e da ovulação (Bertan et al., 2006). O corpo hemorrágico reorganiza-se para formar o CL sob influência de vários fatores angiogênicos e mitogênicos como o fator de crescimento dos fibroblastos, fator de crescimento I semelhante à insulina, fator de crescimento semelhante à heparina e fator de crescimento endotelial vascular, entre outros (Gospodarowicz et al., 1985; Suh et al., 1992; Grazul-Bilska et al., 1992; Redmer e Reynolds, 1996).

A deterioração das funções do CL está associada à diminuição da atividade da AMH, produção de estradiol e progesterona, ao aumento da atividade do FSH e ao aumento de anovulação. A progesterona é secretada pelas células luteínicas na forma de grânulos. Em animais de idade avançada, as funções do CL declinam resultando na inabilidade das células foliculares em responder aos estímulos, modificações quantitativas e/ou qualitativas da secreção hormonal e na redução de estímulos para a secreção hormonal.

2.2.2 Luteólise

Um embrião deve estar presente no útero de 12 a 13 dias após o acasalamento, para que o CL seja mantido. Esse período representa o estado em que o útero inicia as primeiras providências que levarão à luteólise. Se não ocorrer a fecundação ou o processo de implantação falhar, (após 11-12 dias na ovelha e 13-14 dias na cabra), o endométrio libera pulsos de 29 prostaglandina (PGF₂α),

hormônio anti-luteolítico, que induz a regressão do CL (luteólise), que diminui de tamanho, torna-se pálido (corpo albicans) e a secreção de P4 diminui (Garverick et al., 1992).

A prostaglandina F2 (PGF) é a luteolisina natural e é secretada pelo endométrio em pulsos em muitas espécies animais, incluindo bovinos (Silvia et al., 1991; McCracken et al., 1999; Schams e Berisha, 2004; Weems et al., 2006; Skarzynski et al., 2008).

2.3 Regressão Luteal Precoce na Ovelha

A RPCL é caracterizada por uma luteólise pré-matura encurtando o período luteal normal (Sá Filho e Vasconcelos, 2008; Rodriguez et al., 2015). Trata-se de uma ocorrência comum em cabras (Saharrea et al., 1998) e ovelhas (Rocha et al., 2022) superovuladas. A PGF 2α é o hormônio luteolítico em mamíferos (Goravanahally et al., 2007), que leva à indução a regressão prematura do corpo lúteo através da interrupção da fase progestacional do ciclo estral, iniciando, assim, um novo ciclo (Hackett & Robertson, 1980; Herrera et al., 1990).

Uma das consequências primárias da RPCL é a queda nas concentrações plasmáticas de P4 (Saharrea et al., 1998). A RPCL é importante obstáculo na produção *in vivo* de embriões dessas espécies (Stubbings e Walton, 1986), visto que pode resultar na principal consequência na baixa taxa de recuperação de estruturas viáveis (Gomes et al., 2014).

Protocolos hormonais que causam superestimulação podem ocasionar em folículos anovulatórios persistentes que permanecem produzindo estrógeno e promovem a liberação precoce de PGF 2α e a regressão luteal, acontecendo o mesmo com o uso de FSH em doses altas (Okada et al., 2000). Ovelhas não cíclicas, são acometidas pela RPCL na maioria dos tratamentos com ausência de pré-tratamento com P4 (Liu et al., 2007), assim como, a maturação inadequada do folículo pré-ovulatório no momento do pico de hormônio luteinizante, que ocasiona o desenvolvimento de CL anormal (Stubbings et al., 1986).

2.4 Superovulação na Ovelha

A superovulação consiste em um dos principais passos da biotécnica de Múltipla Ovulação e Transferência de Embrião (MOTE) e tem como princípio o fornecimento de hormônios que estimulam o crescimento de um maior número de folículos e subsequente ovulação destes (Clemente C et al., 2013). Os programas de MOTÉ têm se tornado mais acessível e apresentado resultados significativamente positivos para os produtores, aumentando a disseminação da técnica e a popularizando (Fonseca et al., 2007). A MOTÉ promove maior intensidade de seleção e obtenção de maior número de embriões de fêmeas superiores geneticamente (Gusmão e Andrade Moura, 2005; Fonseca et al., 2010). Em contraponto, a principal desvantagem da MOTÉ se dá pelo custo relacionado aos fármacos empregados e a criopreservação dos embriões (Balaro e Brandão, 2013).

Os hormônios gonadotróficos utilizados para a superovulação são: gonadotrofina coriônica equina (eCG), FSH e gonadotrofina menopausal humana (hMG) (Fonseca et al., 2007).

Vários protocolos são empregados em ovelhas. Atualmente, um protocolo foi desenvolvido em ovelhas da raça Lacaune (Figueira et al., 2020a, b, c; Fonseca e Oliveira, 2020), tendo sido reportado sucesso em várias raças, como Morada Nova, Santa Inês, Somalis e Laucane, o protocolo consiste na inserção de dispositivo intravaginal a base de P4 e aplicação de 6 doses decrescentes de 133mg de pFSH, nas ovelhas das raças Morada Nova e Santa Inês tiveram uma taxa de sucesso de recuperação superior a 80% (99,3 e 82,9% respectivamente) e as raças Somalis e Laucane apresentaram taxa de sucesso de recuperação inferior a 60% (52,7 e 54,5 respectivamente) (Fonseca e Oliveira et al., 2021).

3 HIPÓTESE

A suplementação exógena de progesterona provida pela reinserção do próprio dispositivo vaginal anteriormente retirado impacta positivamente os parâmetros endócrinos e embrionários em ovelhas superovuladas. Conseqüentemente obter um maior número de embriões recuperados.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Estudar os efeitos da reinserção de dispositivo intravaginal de progesterona sobre parâmetros superovulatórios e de quantidade de produção de embriões em ovelhas.

4.2 Objetivos Específicos

- (1) Verificar os efeitos da reinserção de dispositivo intravaginal de progesterona sobre a função luteal de ovelhas superovuladas por meio da avaliação ultrassonográfica ovariana e das concentrações plasmáticas de P4;
- (2) Verificar os efeitos da reinserção de dispositivo vaginal sobre parâmetros de recuperação embrionária em ovelhas superovuladas.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amiridis, G. S., Cseh, S., 2012. Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. *Animal Reproduction Science*, n. 130, p. 152-161. <http://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.01.009>.
- Bartlewski, P. M., Seaton, P., Oliveira, M. E. F., Kridli, R. T., Murawski, M., Schwarz, T., 2016. Intrinsic determinants and predictors of superovulatory yields in sheep: circulating concentrations of reproductive hormones, ovarian status, and antral follicular blood flow. *Theriogenology*, v. 86, n. 1, p. 130-143. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.024>.
- Balaro, M. F. A., Fonseca, J. F., Oba, E., Cardoso, E. C., Brandão, F. Z., 2014. Is the Santa Inês sheep a typical non-seasonal breeder in the Brazilian Southeast? *Tropical Animal Health Production*, v. 46, p. 1533-1537. <http://doi.org/10.1007/s11250-014-0672-8>.
- Brasil, O. O., Moreira, N. H., Ramos, A. F., 2014. Situação atual da superovulação em ovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 38, n. 3, p. 147-153.
- Dias, J. H., Gonçalves, J. D., Arrais, A. M., Batista, R. I. T. P., Souza-Fabjan, J. M. G., Bastos, R., Siqueira, L. G. B., Oliveira, M. E. F., Fonseca, J. F., 2022. Single dose of 300 IU hCG in the early luteal phase of superovulated ewes: effects on corpora lutea, progesterone profile, and embryo recovery. *Animal Reproduction Science*. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.107101>.
- Diaz, T., Schmitt, E. J. P., De La Sota, R. L., Thatcher, M. J., Thatcher, W. W., 1998. Human Chorionic Gonadotropin-Induced Alterations in Ovarian Follicular Dynamics During the Estrous Cycle of Heifers. *Journal Animal Science*, p. 1929-1936. <https://doi.org/10.2527/1998.7671929x>.
- Figueira, L. M., Alves, N. G., Batista, R. I. T. P., Brair, V. L., Lima, R. R.; Oliveira, M. F., Fonseca, J. F., Souza-Fabjan, J. M. G., 2019. Pregnancy rate after fixed-time transfer of cryopreserved embryos collected by non-surgical route in Lacaune sheep. *Reproduction In Domestic Animals*, v. 54, n. 11, p. 1493-1496.2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/rda.13550>.
- Figueira, L. M., Alves, N. G., Souza-Fabjan, J. M. G., Oliveira, M. E. F., Lima, R. R., Souza, G. N., Fonseca, J. F., 2020a. Preovulatory follicular dynamics, ovulatory response and embryo yield in Lacaune ewes subjected to synchronous estrus

induction protocols and non-surgical embryo recovery. *Theriogenology*, v. 145, p. 238-246. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.11.004>.

Figueira, L. M., Alves, N. G., Maia, A. L. R. e S., Souza-Fabjan, J. M. G., Batista, R. I. T. P., Arrais, A. M., Lima, R. R., Oliveira, M. E. F.; Fonseca, J. F., 2020b. In vivo embryo production and recovery in laccaune ewes after imposing a superovulation treatment regimen is related to pFSH dose. *Animal Reproduction Science*, v. 223, p. 106625. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106625>.

Figueira, L. M., Alves, N. G., Maia, A. L. R. S., Souza-Fabjan, J. M. G., Batista, R. I. T. P., Morais, M. C. C., Lima, R. R., Oliveira, M. E. F., Fonseca, J. F., 2020c. Embryo yield and quality are associated with progestogen treatment during superovulation protocol in lactating Lacaune ewes. *Theriogenology*, v. 155, p. 132-138. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.06.004>.

Fonseca, J. F., Torres, C. A. A., Costa, E. P., Mafilli, V. V., Carvalho, G. R., Alves, N. G., Rubert, M. A., 2005. Progesterone profile and reproductive performance of estrous induced Alpine goats given hCG five days after breeding. *Animal Reproduction*, v. 2, n. 1, p. 54-59.

Fonseca, J. F. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16, 2005, Goiânia, GO. Anais: Palestras [online].

Fonseca, J. F., Oliveira, M. E. F., Viana, J. H. M., 2011. Uso de procedimentos não cirúrgicos para a produção, recuperação e inovulação de embriões em pequenos ruminantes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* [online] v. 35, n. 2, p.113 -117.

Fonseca, J. F., Batista, R. I. T. P., Souza-Fabjan, J. M. G., Oliveira, M. E. F., Brandão, F. Z., & Viana, J. H. M., 2018. Freezing goat embryos at different developmental stages and quality using ethylene glycol and a slow cooling rate. *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária E Zootecnia*, 70, 1489–1496. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10196>.

Fonseca, J. F., Castro, A. C. R., Arashiro, E. K. N., Oliveira, M. E. F., Zambrini, F. N., Esteves, L. V., Brandão, F. Z., Souza-Fabjan, J. M. Z., 2018. Efeitos da administração de hCG na formação do corpo lúteo acessório e na produção de progesterona em ovelhas Santa Inês nulíparas induzidas pelo estro. *Animal Reproduction*, p. 135 - 139, 10,21451 / 1984-3143-AR2017-957.

Fonseca, J. F., Castro, A. C. R., Arashiro, E. K. N., Oliveira, M. E. F., Zambrini, F. N., Esteves, L. V., Brandão, F. Z., Souza-Fabjan, J. M. G., 2018. Effects of hCG

administration on accessory corpus luteum formation and progesterone production in estrous-induced nulliparous Santa Inês ewes. *Animal Reproduction*, v. 15, n. 2, p. 135-139. Colegio Brasileiro de Reproducao Animal - CBRA. <http://dx.doi.org/10.21451/1984-3143-ar2017-957>.

Fonseca, J. F., Oliveira, M. E. F., 2020. Protocolos Embrapa para superovulação de cabras e ovelhas. Embrapa Caprinos e Ovinos. Comunicado Técnico, 201.

Fonseca, J. F., Vergani, G. B., Lima, M. S. D., Silva, K. M., Monteiro, A. W. U., Ramos, A. F., Alves, B. R. C., Souza-Fabjan, J. M. G., Oliveira, M. E. F., Batista R. I. T. P., 2021. Nonsurgical Embryo Recovery as a Feasible Tool for Supporting Embryo Biobanks of Locally Adapted Brazilian Sheep and Goats. *Biopreservation and Biobanking*. ahead of print <http://doi.org/10.1089/bio.2021.0066>.

Fonseca, J. F., Oliveira, M. E. F., 2021. Produção in vivo e recuperação não cirúrgica de embriões ovinos no Brasil. Sobral-CE: Embrapa Caprinos e Ovinos (Circular Técnica 50).

Forde, N, Lonergan, P., 2017. Interferon-tau and fertility in ruminants. *Reproduction*, v. 154, n. 5, p. 33-43, nov. 2017. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0403>.

Freitas, V. J. F., Oliveira, M. A. L., Simplício, A. A., Baril, G., Pulin. N., Cognié, Y., 2002. Produção, Criopreservação e Transferência de Embriões em Pequenos Ruminantes In: Gonçalves, P. B. D.; Figueiredo, J. R.; Freitas, V. J. F. *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*. São Paulo, p. 241-259.

Gómez-Brunet, A, Santiago-Moreno, J., Monotor, V., Garde J., Pons, P., González-Bulnes, A., López-Sebastian, A., 2007. Reproductive performance and progesterone secretion in estrus-induced Manchega ewes treated with hCG at the time of AI. *Small Ruminant Research*, v.71, p.117-122. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2006.04.015>.

Khan, T. H., Beck, N. F. G., Khalid, M., 2009. The effect of hCG treatment on day 12 post-mating on ovarian function and reproductive performance of ewes and ewe lambs. *Animal Reproduction Science*, v.116, p.162-168. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2009.01.010>.

Liu, X., Hart, E. J., Dai, Q., Rawlings, N. C., Pierson, R. A., Bartlewski, P. M., 2007. Ultrasonographic image attributes of nonovulatory follicles and follicles with different luteal outcomes in gonadotropin-releasing hormone (GnRH)- treated anestrous ewes. *Theriogenology*, v.67, p.957-969.

- Maciel, G. S., Rodriguez, M. G. K., Santos, V. J. C., Uscategui R. A. R, Nociti, R. P, Maronezi, M. C., Oliveira, C. S., Feliciano, M. A. R., Vicente W. R. R, Fonseca, J. F., Oliveira, M. E. F., 2019. Dinâmica folicular e produção in vivo de embriões em ovelhas Santa Inês tratadas com pequenas doses de pFSH. *Animal Reproduction Science*, p. 106137. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106137>
- Maillo, V., Duffy, P., O'Hara, L. Frutos, C., Kelly, A. K., Lonergan, P., Rizoz, D., 2014. Effect of hCG administration during corpus luteum establishment on subsequent corpus luteum development and circulating progesterone concentrations in beef heifers. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 26, n. 3, p. 367. CSIRO Publishing. <http://dx.doi.org/10.1071/rd12353>.
- Moore, N. W., Rowson, L. E. A., 1960. Egg transfer in sheep factors affecting the survival and development of transferred eggs. *Journal Reproduction Fertilization*, v.1, p. 332 - 349. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0010332>.
- Okada, A., Kamada, S., Jeon, C. W., Miyamoto, A., Fukui, Y., 2000. Incidence of abnormal corpus luteum in superovulated ewes. *Journal of Reproduction and Development*, v.46, p.397-402.
- Oliveira, M. E. F., Zambrini, F. N., Souza-Fabjan, J. M. G., Bartlewski, P. M., Guimarães, J. D., Brandão, F. Z., Fonseca, J. F., 2020. Repeated transcervicalembryo recoveries in Santa inês ewes subjected to short- or long-term superovulatory treatment regimens. *Animal Reproduction Science*, 217, 106469. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106469>.
- Oliveira, M. E. F., Figueira, L. M., Fabjan, J. M. G. S., Fonseca, J. F., 2021. New approaches to superovulation in goats and sheep. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 45, n. 4, p. 229-235. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal - CBRA. <http://dx.doi.org/10.21451/1809-3000.rbra2021.029>.
- Pinto, P. H. N., Balaro, M. F. A., Saraiva, H. F. R., Brair, V. L., Alfradique, V., Côrtes, V., Cosentino, I., Souza-Fabjan, J. M. G., Fonseca, J. F., 2020. Successive in vivo embryo production in Santa Inês sheep. *Animal Production Science*, p. 497–502, <https://doi.org/10.1071/AN18740>
- Rocha, M. S., Maia, A. L. R. S, Rangel, P. S. C., Oliveira, M. E. F., Fonseca, J. F., Oliveira, A. C., Souza-Fabjan, J. M. G., 2022. Occurrence of premature regression of corpus luteum in MOET programs in Dorper ewes under subtropical

climate. *Livestock Science*, Si, v. 255, n. 104808, p. 1-4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2021.104808>.

Rhind, S. M., Chesworth, J. M., Robinson, J. J., 1978. A seasonal difference in ovine peripheral plasma prolactin and progesterone concentrations in early pregnancy and in the relationship between the two hormones. *Journal Reproduction Fertilization*, v. 52, p. 79-81. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0520079>.

Rocha, C. C., Martins, T., Mello, B. P., Mello, G. D., Motta, I. G., Lemes, K. M., Binelli, M., Madureira, E. H., Pugliesi, G., 2022. Comparing the effect of estradiol benzoate and 17 β -estradiol plus progesterone on follicular turnover and development, and pregnancy outcomes in a timed artificial insemination protocol. *Theriogenology*, v. 192, p. 73-80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.08.033>.

Rodriguez, M. G. K., Campanholi, S. P., Maciel, G. S., Oliveira, M. E. F., (2015). Regressão luteal prematura em pequenos ruminantes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 39, n. 2, p.270-276.

Saharrea, A., Valencia, J., Balcázar, A., Mejía, 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*, v.50, p.1039-1052. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00206-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00206-4).

Schmitt, E. P., Barros, C. M., Fields, P. A., Fields, M. J., Diaz, T., Kluge, J. M., Thatcher, W. W., 1996. A cellular and endocrine characterization of the original and induced corpus luteum after administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist or human chorionic gonadotropin on day five of the estrous cycle. *Animal Science* J.74 (8), 1915–1929. <https://doi.org/10.2527/1996.7481915x>.

Souza-Fabjan, J. M. G., Batista, R. I. T. P., Correia, L. F. L., Paramio, M. T., Fonseca, J. F., Freitas, V. J. F., Mermillod, P., 2021. In vitro production of small ruminant embryos: latest improvements and further research. *Reproduction Fertility And Development*, v. 33, p. 31-54. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.02.001>.

Stubbings, R. B., Bosu, W. T. R., Baker, C. A., King, G. J., 1986. Serum progesterone concentrations associated with superovulation and premature corpus luteum failure in dairy goats. *Can Journal Veterinarian Resourch*, v.50, p.369-373.

Vergani, G. B., Fonseca, J. F., Trevisan, J. T., Pereira, V. S. A., Garcia, A. R., Esteves, S. N., Brandão, F. Z., Souza-Fabjan, J. M. G., Oliveira, M. E. F., 2020.

Luteotropic effects of human chorionic gonadotropin administered 7.5 days after synchronous estrous induction in Morada Nova ewes. *Animal Reproduction Science*, v. 223, p. 106644. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106644>.

6 CAPÍTULO 1

Intravaginal progesterone device reinsertion during the early luteal phase affects luteal function and embryo yield in superovulated ewes

Abstract

This study checked the efficacy of progesterone (P4) device reinsertion during the early luteal phase on luteal function and embryo yield in superovulated crossbred ewes. Twenty multiparous ewes received an intravaginal P4 device for nine days (D0 to D9) followed by six decreasing doses (25, 25, 15, 15, 10, 10%) of 133 mg pFSH i.m. at 12 h intervals, starting 60 h before P4 device removal. Ewes were naturally mated at 12 h intervals while in estrus. On D13, ewes with viable corpora lutea (CL; n=19) were equally allocated for receiving their P4 device reinsertion (G-P4; n=10) or not (G-Control; n=9). On D17, the P4 device was removed, and all females received the cervical relaxation protocol 16 h to 20 min before non-surgical embryo recovery (NSER). CL count and their functionality classification were performed on D13 and D17 by transrectal B-mode and color Doppler ultrasonography. Plasma P4 concentrations were measured on D9, D13, and D17. Plasma P4 concentrations (ng/mL) of G-P4 ewes increased ($P < 0.05$) over the days, being greater on D17 (9.2 ± 2.8) than on D9 (1.9 ± 0.7) and D13 (1.6 ± 0.4). Premature regression of CL (PRCL) percentage and ova/embryos recovered were greater ($P < 0.05$) in G-P4 (7.7% and 11.6 ± 2.9) compared with G-Control (28.4% and 3.7 ± 2.0), respectively. Altogether, the reinsertion of the P4 device for four days after superovulation in ewes promotes greater P4 concentrations, resulting in lower PRCL occurrence and greater ova/embryos recovered.

Keywords: early luteal regression, progesterone, superovulation, NSER, sheep

1. Introduction

Multiple ovulation and embryo transfer (MOET) programs remains the most prominent source for supporting embryo production in sheep (Souza-Fabjan et al., 2021). In addition to many intrinsic and extrinsic factors negatively affecting embryo yield (Bartlewski et al., 2016) up to ovulation, in the following, corpora lutea (CL) generated are associated with the maintenance of the adequate uterine environment needed for early embryo development.

When superovulated, small ruminants are more likely to undergo premature regression of corpora lutea (PRCL), reaching up to 58% of females (Saharrea et al., 1998; Oliveira et al., 2018), and this phenomenon was not associated with the season, donor age, body condition score, and the number of MOET repetitions (Rocha et al., 2022). The occurrence of PRCL will determine the embryo yield, since it leads to low progesterone (P4) concentrations (Cervantes et al., 2007), directly affecting the uterine milieu and embryo development (Forde and Lonergan, 2017).

In small ruminants, attempts to reduce PRCL occurrence are focused either on maintaining CL function by administering human chorionic gonadotropin (hCG) or gonadotropin-releasing hormone (GnRH) during the early luteal phase (Saharrea et al., 1998; Dias et al., 2022) or inhibiting PGF2- α synthesis, by using flunixin-meglumine (Figueira et al., 2020; Fonseca et al., 2021). In a recent study, an attempt to avoid potential malefic effects of PRCL on embryos by administering hCG four days after the last FSH dose was associated with increased P4 concentration on the day before non-surgical embryo recovery (NSER), followed by greater embryo recovery rate in ewes (Dias et al., 2022). Another even less explored possibility is the supplementation of P4 during the early luteal phase. In this way, the use of intravaginal sponges impregnated with fluorogestone acetate immediately after the last mating improves embryo yield in superovulated goats although the PRCL occurrence was increased (Cervantes et al., 2007).

It was previously demonstrated that a potential P4 content remained in intravaginal silicon devices impregnated with P4 previously used for 10 days (Pinna et al., 2012). In this study, similar plasma P4 concentrations were observed until 120h after the P4 device insertion among ewes with new, once-used (five days), and twice-used P4 devices (10 days). Thus, we hypothesized that the reinsertion during the early luteal phase of a previously used P4 device could increase the P4 plasma concentrations, similarly to those previously

achieved with the hCG administration in superovulated ewes (Dias et al., 2022), and consequently, mitigating the PRCL negative effects on luteal function and increasing embryo yield in superovulated ewes.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics, location, and experimental animals

This research was approved by the Animal Care Committee of Universidade Federal Fluminense (protocol 3614141221). The experiment was performed in September, during the local non-breeding season (Balara et al., 2014). Twenty clinically healthy crossbred Dorper/Santa Inês sheep, housed in a commercial farm in Aracitaba, MG, Brazil (latitude 21°19' S, longitude 43°19' W, altitude 657 m) were used. Animals were kept in collective pens and received a diet of two meals with *Pennisetum purpureum schum* or corn silage supplied to the trough, and mineral salt and water *ad libitum*. The mean body condition score (BCS: 1=very thin and 5=very fat) was 3.2 ± 0.1 , and the mean (\pm standard deviation) body weight of ewes at the beginning of the study for G-Control and G-P4 was 59.7 ± 11.8 kg and 62.7 ± 7.8 , respectively.

2.2. Treatments and experimental groups

There is a simplified schematic depiction of experimental procedures in Fig. 1. For synchronous estrus induction, all ewes received an intravaginal silicone device containing 0.36 g of P4 (Primer PR[®]; Tecnopec, Brazil) that was inserted on a random day of the anovulatory period (D0) and maintained for 9 days (D0 – D9). A total of 133 mg pFSH (Folltropin-V[®], Vetoquinol, Mairiporã, Brazil) was intramuscularly administered in six decreasing doses (25-25-15-15-10-10%) at 12 h intervals (06:00 AM and 06:00 PM) starting 60 h before P4 device removal. All ewes also received two i.m. injections of 125 µg of cloprostenol (Sincrocio[®]; Ouro Fino, Cravinhos, Brazil) at the fifth and sixth pFSH doses, and 50 µg of gonadorelin i.m. (Gestran[®], Tecnopec, São Paulo, Brazil) at 24 h after P4 device

removal. Ewes were naturally mated for fertile rams up to three times at 12 h intervals while in estrus. All previously used P4 devices were washed with running water, dried at room temperature, inserted into identified bags, and kept at 4 °C until reinsertion in the same female. On D13, mated ewes were allocated into two experimental groups according to body weight and body condition score for either receiving the P4 device reinsertion (G-P4; $n = 10$) or no (G-Control; $n = 9$). In G-P4 the reinserted P4 device was removed on D17.

2.3. Ovarian ultrasonographic evaluation

Ultrasonographic evaluations (B- and color Doppler mode) were performed in all ewes at the time of the P4 device reinsertion (D14) and at its removal (D17; 16 h before NSER to determine the CL count and their functional classification). Ovaries were scanned with a portable ultrasound scanner (M5 Vet[®]; Mindray, Shenzhen, China) equipped with an 8.0 MHz transrectal transducer taped to a stiffening PVC tube to facilitate external manipulation. Ewes were examined in a standing position, fecal pellets were removed manually from the rectum, and 10 mL of carboxymethylcellulose gel (Carbogel UTL; Carbogel Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, Brazil) was deposited with a syringe into the rectum.

Each CL was carefully scanned by color Doppler-mode ultrasound to detect color signals indicative of tissue blood perfusion, and consequently, their functionality classification, as normal or prematurely regressed (PRCL, corpora lutea in which no signs of blood perfusion were identified). The Color Doppler settings were maintained during all evaluations (Pulse repetition frequency (PRF): 1.0 kHz; Gain: 72%; Depth: 4.3 cm; CFM (Frequency): 4.6 MHz; and Wall Filter (WF): 1.

2.4. Plasma progesterone concentrations

Blood was sampled via the jugular vein into vacutainer tubes containing EDTA on D9 (immediately before the P4 device removal from estrus induction protocol), D13 (immediately before P4 device reinsertion), and D17 (immediately before reinserted P4

device removal). Blood samples were centrifuged at 1000 g for 15 min, plasma was recovered and stored at -20°C until the progesterone dosage assay was performed. Plasma P4 values were determined using a solid-phase radioimmunoassay utilizing a commercial kit (MP Diagnostics Division, Orangeburg, New York, USA). Samples were analyzed in a single assay, with a sensitivity of 0.05 ng/mL and an intra-assay coefficient of variation of 9.1%, with all values within the curve.

2.5 Non-surgical embryo recovery procedures

The NSER was performed on D18 (8.5 days after the first device removal), after the cervical dilation protocol, which started with 125 μg of cloprostenol (Sincrocio[®]; Ouro Fino, Cravinhos, Brazil) and 0.5 mg of estradiol benzoate (Gonadiol[®]; Zoetis, Campinas, Brazil) i.m. 16 h (D17) and 50 IU of oxytocin (Ocitocina Forte[®], UCB, Jaboticabal, Brazil) 20 min before NSER. The anesthetic procedure consisted of the administration of 10 mL of a hyoscine/dipyrone solution being a half i.v. and another half i.m. (Buscofin Composto[®]; Agener União, Taboão da Serra, Brazil), 2 mL of lidocaine/xylazine solution (Bloc[®]; JA Animal, Patrocinio Paulista, Brazil) for epidural block, 5 mL of lidocaine 2% (Lidovet[®]; Bravet Ltda, Rio de Janeiro, Brazil) soaked in latero-lateral cotton to the opening of the caudal ostium of the cervix. The NSER was performed according to the previously described by Figueira et al. (2020). Ova/zona pelucidae/embryos recovered were morphologically evaluated using a stereomicroscope with a magnification of 40X, while using the same criteria as those for cattle (Mapletoft et al., 2020). Grade 1, 2, and 3 embryos were considered viable embryos. Grade 1 and 2 embryos were cryopreserved and stored (Fonseca et al., 2018).

2.6. Variables and statistical analysis

The following endpoints were recorded: estrus response (%); ewes with at least one CL on the day before NSER (%); overall CL count per ewe; ewes with at least one PRCL (%); number of PRCL per ewe; overall PRCL rate (number of PRCL x 100 / overall number

of CL); ewes successfully penetrated and flushed (%); overall CL count per ewe flushed; number of ova/zona pelucidae/embryos recovered; recovery rate (%); number of viable embryos recovered, unfertilized ova and zona pelucidae; embryo viability rate (%); and ewes with ova/zona pelucidae/embryos and viable embryos recovered (%).

Statistical analysis was performed using the software BioEstat 5.3, Belém, Brazil. Non-parametric data were analyzed by the Mann-Whitney test and parametric data were analyzed by t-test and ANOVA, also for repeated measures. When variances were not homologous, data were Log 10 transformed for ANOVA. Frequencies were assessed by Chi-square or Fisher's exact test. The results are shown as means \pm standard error of the means (MEANS \pm SEM). Differences were considered significant when $P \leq 0.05$, or as otherwise noted.

3. Results

Plasma P4 concentrations of G-P4 ewes increased ($P < 0.05$) over the days and tended to be greater ($P = 0.055$) on D17 compared with G-Control ewes (Fig. 2). Data related to estrus, ovarian responses, and NSER are presented in Table 1. The overall CL count per ewe tended to be greater ($P = 0.09$) in G-P4 compared with G-Control. In G-P4 the overall PRCL rate was lower ($P < 0.05$) while the number of ova/zona pelucidae/embryos recovered was greater ($P < 0.05$) compared with G-Control. The recovery rate tended to be greater ($P = 0.054$) in G-P4 ewes compared with the control ones. From ewes in which NSER was unsuccessful ($n = 6$), cervical transposing was possible only with a Hegar dilator in three ewes (G-Control = 1 and G-P4 = 2). In two (G-Control = 1 and G-P4 = 1), cervical os could not be clipped because of vestibulo-vaginal stenosis, and cervical transposing was incomplete by Hegar dilator in the other one (G-Control=1).

4. Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study aiming to supplement P4 after estrus/ovulation (i.e., during the early luteal phase) through the reinsertion of previously used P4 devices in superovulated ewes. The postulated hypothesis that the own reinserted P4 device could significantly enhance P4 concentrations and mitigate potential malefic effects of PRCL enough to positively affect the NSER-associated parameters was confirmed. Therefore, this study provides an essential and field-applied strategy for circumventing possible harmful effects of PRCL in superovulated donor ewes.

The P4 device reinsertion strategy tested in the present study was not able to fully prevent the occurrence of PRCL (30.0% for G-P4 vs. 44.4% for the G-Control group; $P > 0.05$). However, the time of reinsertion did not increase the PRCL rate as observed in donor goats receiving fluorogestone-impregnated sponges after the last mating (Cervantes et al., 2007). Interestingly, after laparotomy and visual classification of CL viability in superovulated goats (normal CL as structures with orange or red bright and CL in regression as those with white or pink pale color), it was possible to count both types of CL (Cervantes et al., 2007). In the present study, a similar count was performed but taking into account ultrasonography features as proposed earlier (Rodrigues et al., 2019), and showed a significant reduction in overall PRCL rate, which was almost four times superior to G-Control (28.4% or 14/183 CL) than in G-P4 (7.7% or 25/88 CL) ewes.

Previous results in superovulated Santa Inês ewes (Rodrigues et al., 2019) and Dorper ewes (Rocha et al., 2022), that were not subjected to any anti-luteolytic strategies such as flunixin-meglumine administration, reported experimental groups with up to 45.2% of CLs with morphological characteristics of premature regression and 25% of ewes with PRCL, respectively. Although the cascade causing PRCL was possibly already in progress at the time of reinsertion of the P4 device, the strategy tested indicates having either avoided additional

PRCL and/or maintain the normal functioning of most CLs. The PRCL is a major cause of naturally occurring subfertility in ruminants (Yaniz et al., 2008) and its occurrence is exacerbated in superovulated animals (Okada et al., 2000; Oliveira et al., 2018; Rodriguez et al., 2019; Rocha et al., 2022), and can occur in up to 75% of females (Fukui et al., 1998). Although multifactorial causes have been postulated, this phenomenon is not completely elucidated. There are indications of being initially triggered by changes in hormonal profiles (Cognié et al., 1982; Braden et al., 1989; Lamming and Mann, 1995; Saharrea et al., 1998; Chemineau et al., 2006), and/or in follicular (Cognié et al., 1982; Stubbings and Walton, 1986; Chemineau et al., 2006) and luteal cells (Braden et al., 1989; Okada et al., 2000; Chemineau et al., 2006).

The P4 is synthesized by luteal cells, but they also play a crucial role in maintaining their functionality. Due to the insufficient concentrations of P4, the chain responsible for the release of oxytocin and prostaglandin is more sensitive to estrogens (Chemineau et al., 2006), consequently, CLs are more sensitive to luteolytic substances (Braden et al., 1989). In addition, P4 is known for its downregulation of oxytocin receptors in the luminal epithelium (Wathes et al., 1996). Although not investigated in the present study, it could be circumvented in part, progressive RPCL occurrence, because the strategy of P4 device reinsertion was efficient to provide significantly superior plasma P4 concentrations during the presumed critical days of most potential malefic effects of PRCL, when comparing P4 concentration on the day before NSER in G-Control (4.0 ± 1.3 ng/mL) and G-P4 ewes (9.2 ± 2.8 ng/mL). As well as device reinsertion in the present study, in a recent study, ewes receiving 300 IU hCG on Day 4 after device removal showed superior plasma P4 concentration on the day before NSER (11.1 ng/mL) when compared to control ewes (6.9 ng/mL) (Dias et al., 2022). In both studies, the recovery rate was greater in treated sheep, and yet this group in the present study had the greater number of ova/zona pelucidae/embryos recovered. Thus, possibly, the

strategy of increasing P4 levels through an endogenous or exogenous way can be a valuable tool to increase embryo production in superovulated sheep.

Despite the significantly greater number of ova/zone pelucidae/embryos recovered in G-P4 compared to G-Control, no difference was seen in the number of viable embryos recovered, since the embryo viability rate was low in both groups. Fertilization failures are recurrent in multiple ovulation and embryo transfer programs in sheep (Evans and Armstrong, 1984). It can occur for several reasons, from poor oocyte quality to changes in the uterine and oviductal environment that led to interference in sperm transit (Armstrong, 1993). The problem may still have been potentiated in the present study because it was developed during the non-breeding season (121°19' S latitude; Balaro et al., 2014), which may have reduced the reproductive capacity of males (Benmoula et al., 2017), as already shown by the difference in fertilization rate between breeding and non-breeding seasons in superovulated ewes (Okada et al., 1999).

Summarizing, the three most important effects of reinsertion of the P4 device during the early luteal phase in superovulated ewes were observed: (1) increase of P4 concentration on days before the NSER, (2) reduction of CL dysfunction, and (3) increased of embryo yield. These interesting and positive effects can be cost-effective because the device was reinserted and reduced management when compared to three flunixin-meglumine administrations, used to prevent PRCL (Figueira et al., 2020). This strategy reduces waste (syringes/needles) and the amount of P4 in the final device discarded, which means less environmental contaminants. Thus, intravaginal device reinsertion is more associated with the principles of 3Rs (Russell and Burch, 1959) and green, clean, and ethical (Martin and Kadokawa, 2006) in animal experimentation.

5. Conclusions

The reinsertion of the intravaginal P4 device increases the plasma P4 concentration on days before NSER and promotes a decrease in the percentage of PRCL, leading to a consequent greater number of structures recovered. It can be considered as an additional tool attempting to circumvent the potential negative effects of precocious CL regression in superovulated ewes.

Declarations of competing interests

All authors declare that they do not have any actual or potential conflict of interest including any financial, personal, or other relationships with other people or organizations.

Credit authorship contribution statement

T.D.B. Caldas: Methodology, Investigation, Writing - review & editing

M.E.F. Oliveira: Methodology, Writing - review & editing

J.N.D. Rodrigues: Methodology, Investigation, Writing - review & editing

G.B. Vergani: Methodology, Investigation, Writing - review & editing

L.V. Esteves: Methodology, Investigation

P.C.C. Rangel: Statistical analyses

J.M.G. Souza-Fabjan: Methodology, Investigation, Writing - review & editing

F.Z. Brandão: Methodology, Investigation, Writing - review & editing

J.F. Fonseca: Conceptualization, Methodology, Resources, Investigation, Writing - review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition.

Acknowledgments

This study was supported by the CNPq (303727/2021-7), and the EMBRAPA (Project Superovi – 22.13.06.026.00.04). The authors also thank all the farmers involved. LRC was supported by CNPq. MEFO, FZB and JMGS-F are fellows of FAPERJ. Moreover, FZB, JFF, JMGSJ, and MEFO are CNPq fellows.

References

- Armstrong, D.T., 1993. Recent advances in superovulation of cattle. *Theriogenology*. 39, 7–24. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(93\)90021-V](https://doi.org/10.1016/0093-691X(93)90021-V).
- Balaro, M.F.A., Fonseca, J.F., Oba, E., Cardoso, E.C., Brandão, F.Z., 2014. Is the Santa Inês sheep a typical non-seasonal breeder in the Brazilian Southeast?. *Trop. Anim. Health Prod.* 46, 1533–1537. <https://doi.org/10.1007/s11250-014-0672-8>
- Bartlewski, P.M., Seaton, P., Oliveira, M.E.F., Kridli, R.T., Murawski, M., Schwarz, T., 2016. Intrinsic determinants and predictors of superovulatory yields in sheep: circulating concentrations of reproductive hormones, ovarian status, and antral follicular blood flow. *Theriogenology* 86, 130–143. <https://10.1016/j.theriogenology.2016.04.024>.
- Benmoula, A., Badi, A., El Fadili, M., El Khalil, K., Allai, L., El Hilali, A., El Amiri, B., 2017. Effect of season on scrotal circumference, semen characteristics, seminal plasma composition and spermatozoa motility during liquid storage in INRA180 rams. *Animal Reproduction Science* 180, 17-22. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.02.008>
- Braden, T.D., Swyer, H.R., Niswender, G.D., 1989. Functional and morphological characteristics of the first corpus luteum formed after parturition in ewes. *J. Reprod. Fertil.*, 86, 525-33. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0860525>
- Cervantes, M.J., Juárez, M.L., Mejía, V.O., Berruecos, V.J.M, Vera, A.H., Valecia, J. 2007. Use of fluorogestone acetate after breeding to reduce the effect of premature luteal regression in dairy goats when superovulation is induced with FSH. *Anim. Reprod. Sci.*, 97, 47-54. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.01.008>
- Chemineau, P., Pellicer-Rubio, M.T., Lassoued, N.L., Khaldi, G., Monniaux, D., 2006. Male-induced short oestrous and ovarian cycles in sheep and goats: a working hypothesis. *Reprod. Nutr. Dev.*, 46, 129–417. <https://doi.org/10.1051/rnd:2006022>

Cognie, Y., Gray, S.J., Lindsay, D., Oldham, C.M., Pearce, D.T., Signoret, J.P., 1982. A new approach to controlled breeding in sheep using the “ram effect”. *Proc. Aust. Soc. Anim. Prod.* 14, 519–522.

Dias, J.H., Guimarães, J.D., Arrais, A.M., Batista, R.I.T.P.; Souza-Fabjan, J.M.G., Bastos, R., Siqueira, L.G.B., Oliveira, M.E.F., Fonseca, J.F. Single dose of 300 IU hCG in the early luteal phase in superovulated ewes: effects on corpora lutea, progesterone profile, and embryo recovery, 2022. *Anim. Reprod. Sci.*, 247, 107101. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2022.107101>

Evans, G., Armstrong, D.T., 1984. Reduction of sperm transport in ewes by superovulation treatments. *J. Reprod. Fertil.* 70, 47–53. <https://doi.org/10.1530/JRF.0.0700047>.

Figueira, L.M., Alves, N.G., Maia, A.L.R.S., Souza-Fabjan, J.M.G., Batista, R.I.T.P., Arrais, A.M., Lima, R.R., Oliveira, M.E.F., Fonseca, J.F. 2020. In vivo embryo production and recovery in superovulated Lacaune ewes is related to pFSH dose. *Anim. Reprod. Sci.*, 223, 106625. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106625>

Fonseca, J.F., Batista, R.I.T.P., Souza-Fabjan, J.M.G., Oliveira, M.E.F., Brandão, F.Z., Viana, J.H.M., 2018. Freezing Goat Embryos at different developmental stages and quality using Ethylene Glycol and a Slow Cooling Rate. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 70, 1489–1496. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-10196>.

Fonseca, J.F., Vergani, G.B., Lima, M.S.D., Silva, K.M., Monteiro, A.W.U., Ramos, A.F., Alves, B.R.C., Souza-Fabjan, J.M.G., Oliveira, M.E.F., Batista, R.I.T.P., 2021. Nonsurgical Embryo Recovery as a Feasible Tool for Supporting Embryo Biobanks of Locally Adapted Brazilian Sheep and Goats. *Biopreservation and Biobanking*, <https://doi.org/10.1089/bio.2021.0066>

- Fonseca, J.F., Zambrini, F.N., Alvim, G.P., Peixoto, M.G.C.D., Verneque, R.S., Viana, J.H.M., 2013. Embryo production and recovery in goats by non-surgical transcervical technique. *Small Ruminant Research*, 111, 96–99. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.08.007>
- Forde, N., Lonergan, P., 2017. Interferon-tau and fertility in ruminants. *Reproduction*, 154, 5, 33-43. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0403>.
- Fukui, Y., Okada, M., Ishida, N., 1998. Incidence of Premature Luteal Regression in Ewes Superovulated with a Single Injection of Follicle-Stimulating Hormone Combined with Equine Chorionic Gonadotropin. *J. Reprod. Develop.* 44, 407-412. <https://doi.org/10.1262/jrd.44.407>
- Lamming, G.E., Mann, G.E., 1995. Control of endometrial oxytocin receptors and prostaglandin F2 α production in cows by progesterone and oestradiol. *J. Reprod. Fertil.*, 103, 69-73. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1030069>
- Maia, A.L.R.S., Arrais, A.M., Prellwitz, L., Batista, R.I.P., Figueira, L.M., Correia, L.M., Fonseca, J.F.F., Souza-Fabjan, J.M.G., 2020. Embryo development is impaired in goats that are treated for hydrometra and subsequently subjected to superovulation. *Vet. Rec.*, 187, e88-e88. <https://doi.org/10.1136/vr.105906>
- Mapletoft, R.J., Remillard, R., Lindsey, B.R., 2020. Chapter 9. Certification and identification of embryos. *Man. Int. Embryo Transf. Soc.* 95–108.
- Martin, G.B., Kadokawa, H., 2006. “Clean, Green and Ethical” animal production. Case study: Reproductive efficiency in small ruminants. *J. Reprod. Fertil*, 52, 145–152. <https://doi.org/10.3390/ani9121053>

- Okada A, Kamada S, Jeon CW, Miyamoto A, Fukui Y. 2000. Incidence of abnormal corpus luteum in superovulated ewes. *Journal of Reproduction and Development*, 46, 397-402. <https://doi.org/10.1262/jrd.46.397>
- Oliveira, M.E.F., Ribeiro, I.F., Rodriguez, M.G.K., Maciel, G.S., Fonseca, J.F., Brandão, F.Z., Bartlewski, P.M. 2018. Assessing the usefulness of B-mode and colour Doppler sonography, and measurements of circulating progesterone concentrations for determining ovarian responses in superovulated ewes. *Reprod. Dom. Anim.*, 53, 742– 750. <https://doi.org/10.1111/rda.13165>
- Pinna, A.E., Brandão, F.Z., Cavalcanti, A.S., Borges, A.M., Souza, J.M.G., Fonseca, J.F. 2012. Reproductive parameters of Santa Inês ewes submitted to short-term treatment with re-used progesterone devices. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 64, 333-340. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352012000200012>
- Rocha, M.S., Maia, A.L.R.S., Rangel, P.S.C., Oliveira, M.E.F., Fonseca, J.F., Oliveira, C.A., Souza-Fabjan, J.M.G. 2022. Occurrence of premature regression of corpus luteum in MOET programs in Dorper ewes under subtropical climate. *Liv. Sci.*, 255, 104808. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2021.104808>
- Rodriguez, M.G.K., Maciel, G.S., Uscategui, R.A.R., Santos, V.J.C., Nociti, R.P., Silva, P.D.A., Feliciano, M.A.R., Brandão, F.Z., Fonseca, J.F., Oliveira, M.E.F. 2019. Early luteal development in Santa Inês ewes superovulated with reduced doses of porcine follicle-stimulating hormone. *Reprod. Dom. Anim.*, 54, 456–463, <https://doi.org/10.1111/rda.13374>
- Russell, W.M.S., Burch, R. 1959. *The Principles of Humane Experimental Technique*. London, UK: Methuen. <https://doi.org/10.5694/j.1326-377.1960.tb73127.x>
- Saharrea, A., Valencia, J., Balcázar, A., Mejía, 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, 1039-1052, [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00206-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00206-4)

Souza-Fabjan, J.M.G., Batista, R.I.T.P., Correia, L.F.L., Paramio, M.T., Fonseca, J.F., Freitas, V.J.F., Mermillod, P., 2021. In vitro production of small ruminant embryos: latest improvements and further research. *Reproduction, Fertility and Development*, 33, 31–54. <https://doi.org/10.1071/RD20206>

Stubbings, R.B., Walton, J.S. 1986. Relationship between plasma progesterone concentrations and pregnancy rates in cattle receiving either fresh or previously frozen embryos. *Theriogenology*, 26, 145-155. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(86\)90019-1](https://doi.org/10.1016/0093-691x(86)90019-1)

Yaniz, J., López-Gatiús, Bech-Sàbat, G., García-Ispuerto, I., Serrano, B., Santolaria, P. 2008. Relationships between Milk Production, Ovarian Function and Fertility in High-producing Dairy Herds in North-eastern Spain. *Reprod. Dom. Anim.* 43, 38–43, <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01227.x>

Wathes, D.C., Mann, G.E., Payne, J.H., Riley, P.R., Stevenson, K.R., Lamming, G.E. 1996. Regulation of oxytocin, oestradiol and progesterone receptor concentrations in different uterine regions by oestradiol, progesterone and oxytocin in ovariectomized ewes. *J. Endocrinol.* 151 (3), 375-93. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1510375>.

Table 1. Endpoints (% or mean \pm S.E.M.) of crossbred Dorper/Santa Inês ewes receiving (G-P4) or not (G-Control) reinsertion of intravaginal progesterone (P4) device, for four days, during the early luteal phase promoted by synchronous estrus induction protocol followed to superovulatory treatment*.

Endpoints	G-Control	G-P4	<i>P value</i>
Estrus response (%)	90.0 (9/10)	100.0 (10/10)	n.s.
Ewes with at least one CL on the day before NSER (%)	100.0 (9/9)	100.0 (10/10)	n.s.
Overall CL count per ewe	9.8 \pm 2.4 (88)	18.3 \pm 4.4 (183)	0.09
Ewes with at least one PRCL on the day before NSER (%)	44.4 (4/9)	30.0 (3/10)	n.s.
Number of PRCL per ewe	2.8 \pm 1.9 (25)	1.4 \pm 0.7 (14)	n.s.
Overall PRCL rate (%)	28.4 (25/88)	7.7 (14/183)	0.01
Ewes successfully penetrated and flushed (%)	66.7 (6/9)	70.0 (7/10)	n.s.
Overall CL count per ewe flushed	12.7 \pm 2.8 (84)	23.0 \pm 5.3 (177)	n.s.
Ova/zona pelucidae/embryos recovered	3.7 \pm 2.0 (22)	11.6 \pm 2.9 (81)	0.03
Recovery rate (%)	24.5 \pm 10.6 (22)	57.3 \pm 10.5 (81)	0.054
Viable embryos recovered**	0.3 \pm 0.3 (2)	2.7 \pm 1.8 (19)	n.s.
Unfertilized ova	2.3 \pm 2.1 (17)	8.0 \pm 2.7 (57)	n.s.
Zona pelucidae	0.5 \pm 0.3 (3)	0.7 \pm 0.7 (5)	n.s.
Embryo viability rate (%)	9.1 (2/22)	23.5 (19/81)	n.s.
Ewes with ova/zona pelucidae/embryos recovered (%)	66.7 (4/6)	100.0 (7/7)	n.s.
Ewes with viable embryos recovered (%)	16.7 (1/6)	57.1 (4/7)	n.s.

() number of variables involved.

* Intravaginal device (0.36 g of progesterone) for nine days plus six decreasing doses of pFSH (133 mg, Folltropin-V[®], from 60 h before P4 device removal) and two intramuscularly (i.m.)

injections of 125 µg of cloprostenol at the fifth and sixth pFSH doses, and 50 µg of gonadorelin i.m. at 24 h after P4 device removal.

**Grade 1, 2, and 3 embryos.

Figure legends:

Fig. 1. Schematic representation of the experimental procedures designed to evaluate the effects of reinsertion of progesterone (P4) device (G-P4 vs. G-Control) in superovulated crossbred Dorper/Santa Inês ewes that underwent non-surgical embryo recovery (NSER). pFSH: porcine follicle stimulating hormone; Folltropin-V®; i.m. intramuscular; i.v. intravenous; CL: corpora lutea.

Fig. 2. Plasma progesterone (P4) concentration of superovulated ewes immediately before the P4 device removal from the estrus induction protocol (D9), at the P4 device reinsertion (D13), and at immediately before the reinserted P4 device removal (D17; 16 h before non-surgical embryo recovery procedure) in crossbred Dorper/Santa Inês ewes submitted to a 9-day progesterone-based estrus induction protocol associated with a superovulatory treatment using six decreasing doses of pFSH (133 mg, Folltropin-V®, from 60 h before P4 device removal).

^{a,b} Means with different superscripts for days within the G-P4 group ($P < 0.05$). * $P = 0.055$ for statistical comparison between groups on D17.

Fig. 1

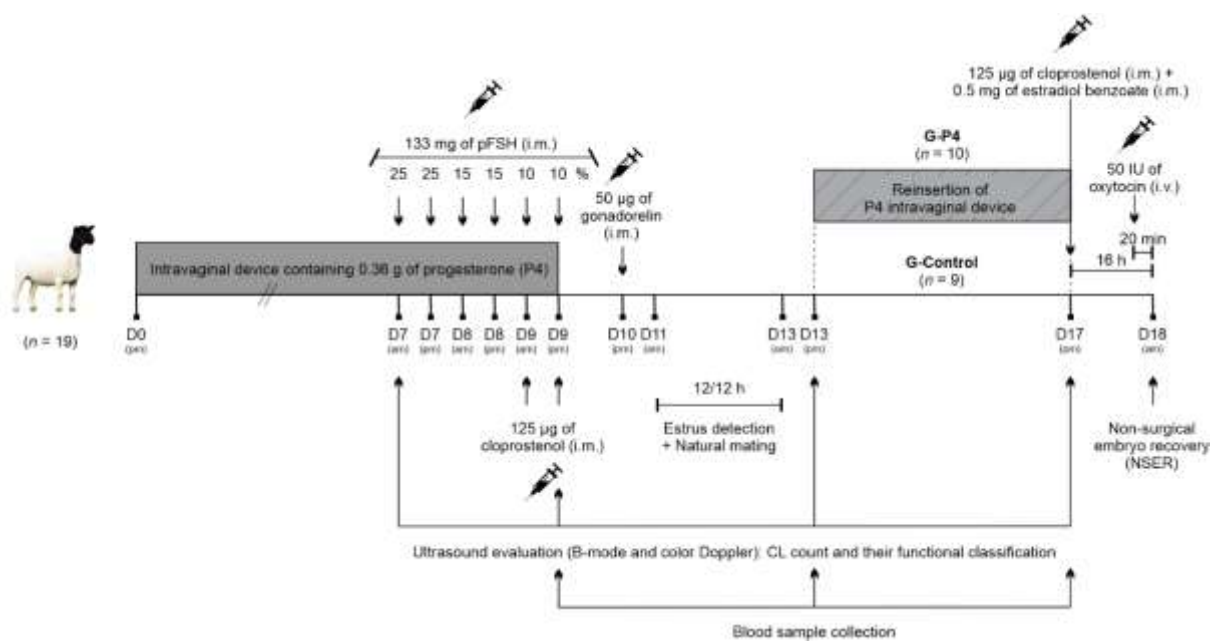
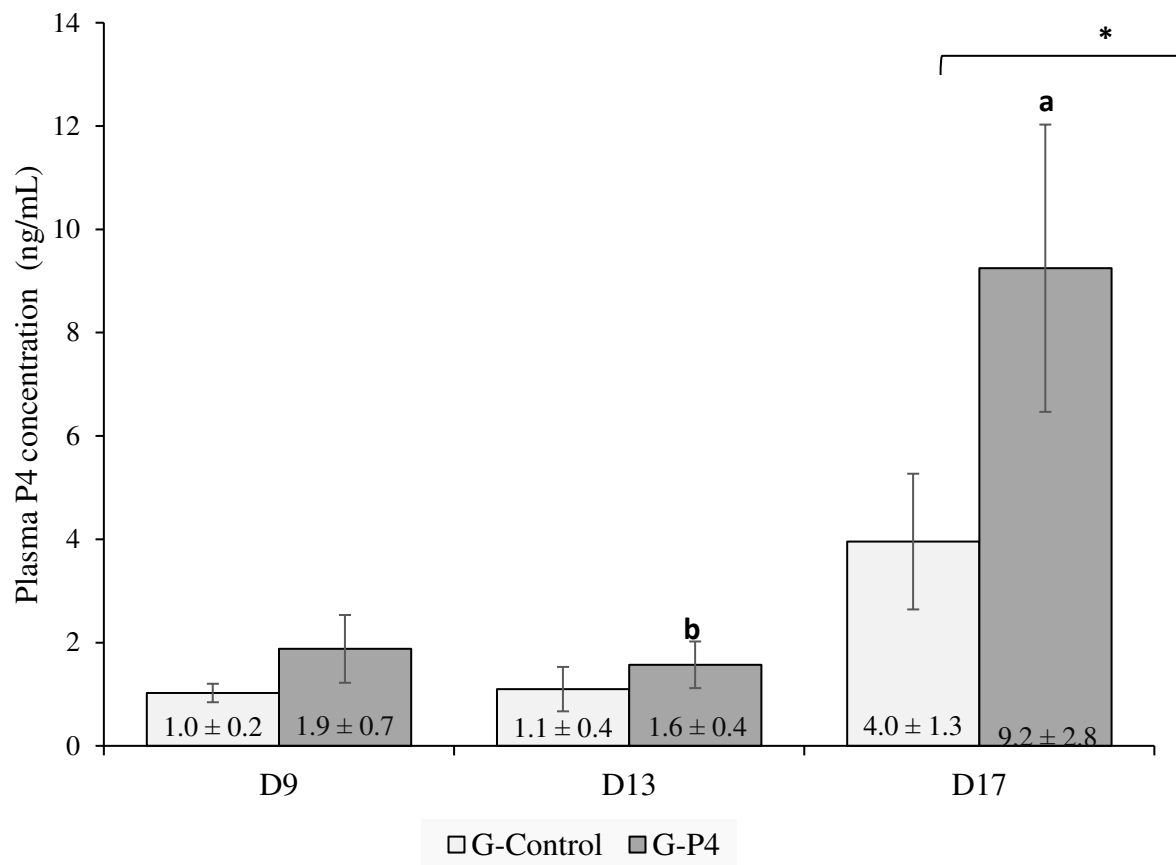


Fig. 2.



7 ANEXOS



Universidade
Federal
Fluminense



Universidade Federal Fluminense
Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Administração de hCG em ovelhas receptoras: avaliação do efeito sobre características luteais, perfil plasmático de progesterona e taxa de gestação de embriões ovinos", protocolada sob o CEUA nº 3614141221 (10 001355), sob a responsabilidade de **Felipe Zandonadi Brandão e equipe; Jeferson Ferreira da Fonseca** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal Fluminense (CEUA/UFF) na reunião de 10/03/2022.

We certify that the proposal "Administration of hCG in recipient ewes: evaluation of the effect on luteal characteristics, progesterone plasma profile and rate of gestation of sheep embryos", utilizing 210 Ovines (10 males and 200 females), protocol number CEUA 3614141221 (10 001355), under the responsibility of **Felipe Zandonadi Brandão and team; Jeferson Ferreira da Fonseca** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University Fluminense (CEUA/UFF) in the meeting of 03/10/2022.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 04/2022 a 12/2023 Área: Medicina Veterinária

Origem: Animais de proprietários	sexo: Fêmeas	idade: 12 a 60 meses	Quantidade: 150
Espécie: Ovinos		Peso: 30 a 60 kg	
Linhagem: Santa Inês			
Origem: Animais de proprietários	sexo: Fêmeas	idade: 12 a 60 meses	Quantidade: 50
Espécie: Ovinos		Peso: 30 a 60 kg	
Linhagem: Dorper			
Origem: Animais de proprietários	sexo: Machos	idade: 12 a 60 meses	Quantidade: 10
Espécie: Ovinos		Peso: 35 a 60 kg	
Linhagem: Dorper			

Niterói, 27 de outubro de 2022

Carla Eponina P. Pinto
Profª Carla Eponina

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Fluminense

Caroline Souza Barros

Profª Caroline de Souza Barros
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal Fluminense

