





## Reutilização de dispositivo de progesterona não afetou a produção de embriões em ovelhas brasileiras localmente adaptadas

[ Reuse of progesterone device did not affect embryo yield in locally adapted Brazilian sheep ]

Lucas Machado Figueira<sup>1</sup> , Monalisa Sousa Dias Lima<sup>2</sup> , Gabriel Brun Vergani<sup>3</sup> , Kleibe de Moraes Silva<sup>4</sup> , Alexandre Weick Uchôa Monteiro<sup>4</sup> , Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista<sup>1</sup> , Dárcio Ítalo Alves Teixeira<sup>2</sup> , Maria Emilia Franco Oliveira<sup>3,4</sup> , Jeferson Ferreira da Fonseca<sup>\*4</sup> 

1 Universidade Federal Fluminense (UFF), Niterói, Rio de Janeiro, Brasil 

2 Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, Ceará, Brasil 

3 Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Jaboticabal, São Paulo, Brasil 

4 Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral, Ceará, Brasil

\*autor correspondente: jeferson.fonseca@embrapa.br

Recebido: 05 de junho de 2025. Aceito: 25 de fevereiro de 2026. Publicado: 10 de abril de 2026.

Editores: Rondineli P. Barbero e José Felipe W. Spricigo

**Resumo:** A reutilização de dispositivos de progesterona é segura, eficiente e economicamente viável em pequenos ruminantes, o que respalda a avaliação de protocolos de reutilização estendida em ovelhas superovuladas. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência da reutilização de dispositivos de progesterona em ovelhas superovuladas. Ovelhas das raças Morada Nova (MN, n = 20) e Santa Inês (SI, n = 20) foram igualmente distribuídas nos tratamentos G-Novo (n = 20) e G-Usado (n = 20). Exames ultrassonográficos nos modos B e Doppler colorido foram realizados nos dias D0 (inserção do dispositivo), D7, D9 (remoção do dispositivo), D11 e D15 para avaliar a dinâmica ovariana. A superovulação consistiu na administração de seis doses decrescentes de p-FSH (133 mg no total), por via intramuscular, em intervalos de 12 h, iniciando-se 60 h antes da remoção do dispositivo. No D16, realizou-se a recuperação não cirúrgica de embriões (RNCE) nas ovelhas que apresentaram pelo menos um CL. O número de folículos após o tratamento com p-FSH foi maior ( $p < 0,05$ ) na raça SI. Houve interação raça  $\times$  tratamento ( $p < 0,05$ ) para o intervalo até o estro, número de corpos lúteos e estruturas luteinizadas. Observou-se discreto atraso no início do estro e menor resposta superovulatória apenas nas ovelhas MN do grupo G-Novo (60 % com CL e  $4,7 \pm 0,7$  CL), embora tenham apresentado números satisfatórios de CL e de embriões viáveis por ovelha submetida à lavagem uterina ( $7,8 \pm 0,9$  e  $6,6 \pm 1,1$ , respectivamente). O número médio total de embriões viáveis neste ensaio foi de  $9,2 \pm 1,7$ . Além disso, foram observadas correlações positivas ( $p < 0,05$ ) entre a perfusão sanguínea ovariana no D15 e o número de estruturas luteinizadas/CL no G-Novo ( $r = 0,79$ ) e no G-Usado ( $r = 0,54$ ); contudo, apenas no G-Novo houve correlação com o número de estruturas recuperadas ( $r = 0,63$ ) e de embriões viáveis ( $r = 0,63$ ). Conclui-se que a reutilização do dispositivo de progesterona por nove dias (protocolo de médio prazo) apresentou eficácia equivalente à do dispositivo novo quanto à produção de embriões em ovelhas brasileiras localmente adaptadas submetidas a protocolo superovulatório e à recuperação não cirúrgica de embriões.

**Palavras-chave:** não cirúrgico, ovino, reutilizado, superovulação, ultrassom.



**Abstract:** The reuse of progesterone devices is safe, efficient, and economically viable in small ruminants, supporting the evaluation of extended reuse protocols in superovulated ewes. Thus, the objective of this study was to test the efficiency of progesterone device reuse in superovulated ewes. Morada Nova (MN, n = 20) and Santa Inês (SI, n = 20) ewes were equally assigned to G-New (n = 20) and G-Used (n = 20) treatments. Ultrasound examinations in B- and Color Doppler modes were performed on D0 (device insertion), D7, D9 (device removal), D11, and D15 to assess ovarian dynamics. Superovulation consisted of six decreasing doses of p FSH (133 mg total) administered intramuscularly at 12 h intervals, starting 60 h before device removal. On D16, nonsurgical embryo recovery (NSER) was performed in ewes presenting at least one corpus luteum (CL). The number of follicles after p FSH treatment was greater ( $P < 0.05$ ) in SI ewes. A breed-by-treatment interaction ( $P < 0.05$ ) was observed for the interval to estrus, number of corpora lutea, and luteinized structures. Notably, a slight delay in estrus onset and poorer superovulatory responses occurred only in G-New MN ewes (60 % with CL and  $4.7 \pm 0.7$  CL). However, they presented satisfactory numbers of CL and viable embryos per ewe flushed ( $7.8 \pm 0.9$  and  $6.6 \pm 1.1$ , respectively). The average total number of viable embryos in this trial was  $9.2 \pm 1.7$ . Positive correlations ( $P < 0.05$ ) were found between ovarian blood perfusion on D15 and the number of luteinized structures/CL in G-New ( $r = 0.79$ ) and G-Used ( $r = 0.54$ ). However, correlations with recovered structures ( $r = 0.63$ ) and viable embryos ( $r = 0.63$ ) were observed only in G-New. In conclusion, reusing a progesterone device once for nine days (mid-term protocol) was as effective as using a new device in terms of embryo yield in locally adapted Brazilian ewes submitted to a superovulatory protocol and NSER.

**Keywords:** nonsurgical, ovine, reused, superovulation, ultrasound.

## 1. Introdução

As raças ovinas Santa Inês (SI) e Morada Nova (MN) são raças brasileiras localmente adaptadas, criadas em condições semiáridas da Caatinga e incluídas no Banco Brasileiro de Germoplasma para Conservação. Essas raças representam importantes recursos genéticos para a produção pecuária sustentável em ambientes desafiadores <sup>(1)</sup>.

Recentemente, a produção in vivo de embriões por superovulação foi realizada nas raças MN <sup>(2,4)</sup> e SI <sup>(3)</sup> utilizando um protocolo de médio prazo (9 dias). Esse protocolo de nove dias, inicialmente desenvolvido em ovelhas Lacaune, foi baseado no padrão de dinâmica folicular ovariana <sup>(5)</sup>, priorizando o início do tratamento com FSH na presença de um maior número de folículos pequenos e evitando a presença de folículos ovarianos maiores, além de possibilitar a estimulação de folículos provenientes de duas ondas foliculares <sup>(6)</sup>. Apesar dos resultados promissores em termos de produção embrionária, ainda não há relatos sobre a utilização desse protocolo associada à reutilização do dispositivo de progesterona.

Foi demonstrado que um dispositivo de progesterona previamente usado por 12 dias pode manter concentrações plasmáticas de progesterona por mais seis dias em um protocolo de indução de estro de curto prazo em cabras acíclicas <sup>(7)</sup>, totalizando 18 dias de liberação funcional de progesterona. De forma semelhante, em ovelhas Santa Inês, dispositivos reutilizados pela segunda vez (10 dias totais) ou terceira vez (15 dias totais) em protocolos de 5 dias mantiveram concentrações supraluteais de progesterona e resultaram em taxas de ovulação e fertilidade comparáveis às obtidas com dispositivos novos <sup>(8)</sup>. Considerando que a reutilização do dispositivo de progesterona tem se mostrado sanitariamente segura em cabras <sup>(7,9)</sup>, eficiente <sup>(8)</sup> e uma alternativa benéfica e economicamente viável em ovinos <sup>(10)</sup>, o protocolo de 9 dias pode proporcionar uma oportunidade adicional para reutilização do dispositivo por mais nove dias, reforçando a eficácia previamente relatada em ovelhas MN <sup>(2,4)</sup> e SI <sup>(3)</sup>.

A reutilização de materiais representa uma estratégia eficaz para reduzir as exigências de insumos e minimizar a geração de resíduos agropecuários. Essa abordagem sustentável contribui para mitigar impactos ambientais, ao mesmo tempo em que se alinha aos princípios de uma produção animal limpa, verde e eticamente responsável <sup>(11)</sup>. Além disso, embora os dispositivos intravaginais representem um componente de custo menor em comparação ao FSH em protocolos de superovulação, conforme previamente relatado <sup>(6,12)</sup>, sua reutilização pode proporcionar benefícios econômicos adicionais, aumentando a viabilidade comercial desta biotecnologia.

Embora concentrações reduzidas de progesterona durante a superestimulação com FSH possam favorecer a recuperação de embriões <sup>(13)</sup>, ainda há informações limitadas sobre a reutilização do dispositivo de progesterona em protocolos de médio prazo (9 dias) para superovulação em ovinos. Investigar essa lacuna é relevante, pois a reutilização do dispositivo pode reduzir custos e a geração de resíduos ambientais sem comprometer a eficiência do protocolo, aspecto fundamental para a viabilidade econômica e a sustentabilidade da produção de embriões em programas de conservação genética.

Diante desse contexto, o presente estudo teve como objetivo comparar a eficiência do uso de dispositivos de progesterona novos e reutilizados (previamente utilizados uma vez) em protocolos de superovulação em ovelhas Santa Inês e Morada Nova.

## 2. Material e métodos

### 2.1 Aspectos éticos e animais experimentais

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Embrapa Caprinos e Ovinos (Processo ID: 006/2016) e conduzido entre outubro a novembro em Sobral, Ceará, Brasil (latitude 3°4'58.4"S e longitude 40°16'50.5"W).

Foram selecionadas 40 ovelhas multíparas de raças brasileiras naturalizadas (Santa Inês, n = 20; Morada Nova, n = 20), com peso vivo (PV) médio de 40,6 ± 2,1 kg (média ± EPM – erro padrão da média), escore de condição corporal de 3,3 ± 0,3 (escala 0–5), idade média de 5,2 ± 0,2 anos e número médio de partos de 3,7 ± 0,9.

As fêmeas foram mantidas em sistema intensivo de produção com acesso livre a silagem de milho, sal mineral e água ad libitum. Concentrado balanceado (200 g/animal) foi fornecido duas vezes ao dia.

### 2.2 Desenho experimental: sincronização de estro e superovulação em ovelhas doadoras de embriões

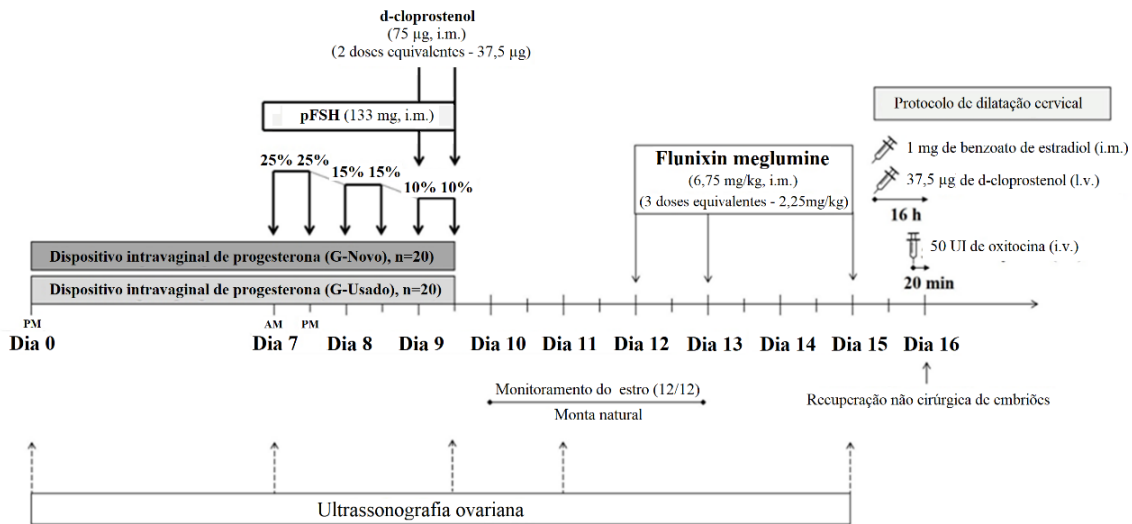
Ovelhas de ambas as raças foram alocadas aleatoriamente em dois grupos experimentais e submetidas a um de dois protocolos de sincronização de estro, iniciados à noite em um dia aleatório do ciclo estral (D0).

Cada fêmea recebeu um dispositivo intravaginal de progesterona novo (G-Novo; n = 10 ovelhas Santa Inês e n = 10 ovelhas Morada Nova) ou previamente utilizado uma vez (G-Usado; utilizado previamente por nove dias; n = 10 ovelhas Santa Inês e n = 10 ovelhas Morada Nova). Os dispositivos (0,33 g de progesterona; CIDR® Eazi-Breed®, Zoetis, Nova Zelândia) permaneceram in situ por nove dias.

Todas as ovelhas receberam tratamento superovulatório iniciado 60 h antes da remoção do dispositivo, consistindo em seis doses decrescentes (25 %, 25 %, 15 %, 15 %, 10 % e 10 %) de p-FSH (133 mg no total; Folltropin V®, Vetoquinol, Canadá), administradas por via intramuscular

(i.m.) em intervalos de 12 h. No D9, duas doses iguais de d-cloprostenol (37,5 µg; Prolise®, Agener União, Brasil) foram administradas por via intramuscular concomitantemente à 5ª e à 6ª injeções de p-FSH.

Todas as ovelhas também receberam três administrações intramusculares de flunixin meglumine (2,25 mg/kg; Banamine®, MSD, São Paulo, Brasil) nos dias D12, D13 e D15 (Figura 1).



**Figura 1.** Representação esquemática dos procedimentos experimentais, incluindo protocolos de sincronização de estro seguidos de tratamento superovulatório e protocolo de dilatação cervical em ovelhas submetidas à recuperação embrionária não cirúrgica de embriões (RNCE) em 6,5 dias após remoção do dispositivo; p-FSH: hormônio folículo-estimulante porcino; i.m.: intramuscular; i.v.: intravenosa; l.v.: latero-ovular.

### 2.3 Detecção de estro e monta natural

As ovelhas foram mantidas com bodes vasectomizados equipados com peitorais marcadores com tinta (proporção 10:1), e os sinais de estro foram observados duas vezes ao dia (08h e 16h) durante 30 min, no período entre 12 e 60 h após a remoção do dispositivo. A partir da primeira marcação, as fêmeas foram acasaladas três vezes em intervalos de 12 h. As ovelhas foram acasaladas com bodes da mesma raça (proporção 5:1), previamente avaliados como aptos à reprodução em exame andrológico. Os bodes foram submetidos a exame clínico completo, com ênfase na avaliação do trato reprodutivo. A libido foi avaliada durante coletas de sêmen e por meio de observações comportamentais, enquanto a qualidade seminal foi determinada pela avaliação da motilidade em massa (movimento ondulatório), motilidade progressiva, concentração espermática e morfologia espermática.

### 2.4 Ultrassonografia ovariana em modo B e Doppler colorido

Avaliações ultrassonográficas ovarianas foram realizadas nos D0 (inserção do dispositivo), D7 (primeira administração de p-FSH), D9 (sexta e última administração de p-FSH e remoção do dispositivo), D11 (36 h após a remoção) e D15 (12 h antes da RNCE) (Figura 1). Os exames foram conduzidos por técnico experiente utilizando equipamento de ultrassom Z5 Vet (Mindray®, Z5Vet, Sistema de Imagem Ultrassonográfica Digital, Brasil) acoplado a transdutor multifrequencial transretal (5–10 MHz).

As configurações do equipamento foram padronizadas da seguinte forma: modo B (profundidade 4,6 cm; ganho 90 %; taxa de frames 55 f/s; alcance dinâmico 120 dB) e modo Doppler colorido (frequência 5,7 MHz; ganho 50 %; filtro de parede 183 Hz; frequência de repetição de pulso 1,1 kHz).

Todos os folículos antrais visíveis ( $\geq 2,0$  mm) e os corpos lúteos (CL) detectáveis no modo B foram contados. Duas medidas perpendiculares foram obtidas para cálculo do diâmetro folicular médio. Os folículos antrais foram classificados como pequenos (FP,  $\leq 3,9$  mm), médios (FM, 4,0–5,9 mm) ou grandes (FG,  $\geq 6,0$  mm).

No D15, foram quantificados os CL e os folículos anovulatórios luteinizados (FAL). Os FAL correspondem a estruturas resultantes de falha ovulatória, com diâmetro entre 5,0 e 10,0 mm<sup>(14)</sup>. O número total de estruturas lúteas (CL + FAL) foi calculado, uma vez que a ultrassonografia isolada não permite distinguir folículos ovulados de não ovulados na ausência de monitoramento serial diário, sendo esse parâmetro utilizado como indicador da capacidade lútea total. A porcentagem de folículos anovulatórios luteinizados foi calculada como (FAL/estruturas lúteas totais  $\times$  100), permitindo avaliar a eficiência ovulatória entre os grupos.

O modo Doppler colorido foi utilizado para avaliar a perfusão sanguínea ovariana nos D11 e D15. A porcentagem média de área perfundida (área de sinal Doppler colorido/área seccional ovariana  $\times$  100) foi calculada no software ImageJ (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), com base em três frames consecutivos centrados no sinal Doppler de maior intensidade.

## 2.5 Recuperação não cirúrgica de embriões

Ovelhas com CL detectados por ultrassom foram submetidas à lavagem uterina para RNCE no D16 (6,5–7 dias após remoção do dispositivo).

O protocolo hormonal para dilatação cervical consistiu de d-cloprostenol (37,5  $\mu$ g) i.v. e benzoato de estradiol (1 mg; Estrogin®, Biofarm, SP, Brasil) i.m., ambos 16 h antes da RNCE. Oxitocina (50 UI; Oxytocin Forte®, UCB, SP, Brasil) i.v. foi administrada 20 min antes da lavagem uterina.

A RNCE foi realizada como previamente descrita<sup>(15,16)</sup>. Animais receberam o protocolo Embrapa de analgesia/anestesia: maleato de acepromazina 1 % (0,1 mg/kg PV, i.m., 20 min antes; Aceproven®, Vencofarma, Londrina, PR, Brasil); dipirona e brometo de N-butilhioscina (5 mL i.v. e 5 mL i.m., 20 min antes; Buscofin Composto®, Agener União, Taboão da Serra, Brasil); lidocaína 2 % (2 mL/animal epidural S5–C1 e 5 mL intravaginal, 5 e 3 min antes, respectivamente; Lidovet®, Bravet, Rio de Janeiro, Brasil).

O fluido de recuperação foi filtrado e examinado em estereomicroscópio (Olympus SZ; Olympus Optical Co., Ltd., Tóquio, Japão) com ampliação de 20–40 $\times$ . Estruturas foram mantidas em meio de suporte (Holding Plus, 0,4 % BSA; Embriocare, Cultilab, Brasil) e classificadas de acordo com a 5ª edição do Manual da International Embryo Technology Society<sup>(17)</sup>. Embriões Grau 1–3 foram considerados viáveis.

## 2.6 Variáveis e análise estatística

Parâmetros avaliados: populações foliculares nos D0, D7, D9 e D11 (número total folículos antrais, FP, FM, FG; diâmetro do maior folículo antral em mm); resposta ao estro (% fêmeas em estro/fêmeas tratadas  $\times$  100); intervalo ao estro (h da remoção ao primeiro estro); duração comportamental do estro (h do primeiro ao último estro); duração do estro (h entre primeira e

última aceitação de monta); % ovelhas com CL um dia antes da RNCE; área de perfusão ovariana (%) nos D11 e D15 (área Color Doppler/área ovariana  $\times$  100); nº de CL e nº de FAL no D15; % ovelhas penetradas e coletadas na RNCE; nº de CL/ovelha lavada; nº de estruturas recuperadas e nº de embriões viáveis.

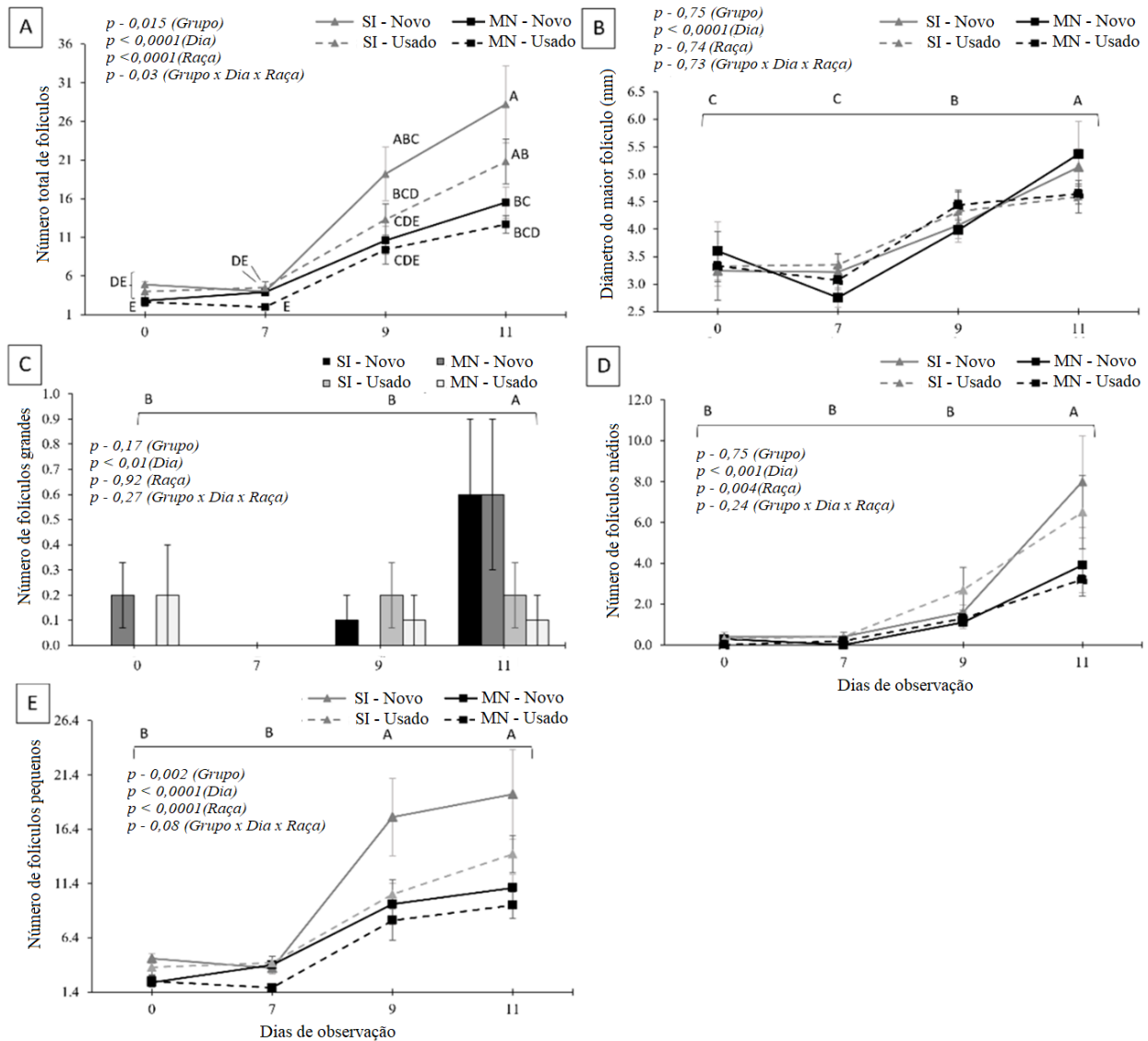
Taxa de recuperação: (nº de estruturas recuperadas/ nº de CL)  $\times$  100. Se o número de estruturas fosse maior que o número de CLs, a taxa por ovelha foi limitada a 100 %. Taxa de viabilidade: (nº de embriões viáveis/ nº de estruturas recuperadas)  $\times$  100. Ovelhas classificadas por resposta superovulatória (< 10 ou  $\geq$  10 CL um dia antes da RNCE) para o % embriões viáveis por classe de CL.

Os dados analisados no R (Foundation for Statistical Computing, Viena, Áustria; versão 3.6.1, 2019). Foi utilizado um arranjo fatorial 2 $\times$ 2 em delineamento inteiramente casualizado (DIC), com tempo como subparcelamento. Efeitos fixos: tratamento, raça, dia e interações de acordo com modelo proposto para fatorial 2 $\times$ 2<sup>(18)</sup>. Variáveis de estro, resposta superovulatória e produção embrionária foram testadas por normalidade via ANADEV. Testes significativos: teste de Tukey, teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher para comparações pareadas. Dados longitudinais discretos (populações foliculares ovarianas) foram analisados por ANADEV com modelos lineares mistos generalizados (distribuições binomial negativa ou Poisson, ligação logarítmica). As interações com efeito de dia foram analisadas por ANOVA e pelo teste de Tukey (post-hoc). Coeficientes de correlação de Pearson foram calculados entre perfusão ovariana (%) e parâmetros de estro, resposta superovulatória e produção embrionária. Os resultados são apresentados como médias dos mínimos quadrados (LSMEANS)  $\pm$  erro padrão da média (EPM). As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

### 3. Resultados

#### 3.1 População ovariana

As populações foliculares ovarianas registradas nos grupos experimentais no momento da inserção do dispositivo intravaginal de progesterona (Dia 0), na primeira (Dia 7) e na última (Dia 9) administrações de p-FSH, e 36 h após a remoção do dispositivo (Dia 11), estão apresentadas na Figura 2. Uma interação significativa entre os efeitos principais (tratamento, raça e dia de avaliação) foi observada apenas para o número total de folículos, que foi maior ( $p < 0,05$ ) 36 h após a remoção do dispositivo em ovelhas da raça Santa Inês. Observou-se efeito principal de tratamento ( $p < 0,05$ ) para o número total de folículos (G-Novo: 11,1  $\pm$  1,2; G-Usado: 8,7  $\pm$  0,9) e para o número de folículos pequenos (G-Novo: 9,0  $\pm$  1,0; G-Usado: 6,7  $\pm$  0,6). Também foi detectado efeito de raça ( $p < 0,05$ ) para o número total de folículos (SI: 12,4  $\pm$  1,3; MN: 7,4  $\pm$  0,7), para o número de folículos pequenos (SI: 9,7  $\pm$  1,0; MN: 6,0  $\pm$  0,5) e para o número de folículos médios (SI: 2,5  $\pm$  0,5; MN: 1,2  $\pm$  0,2). Além disso, foi observado efeito significativo do dia de avaliação ( $p < 0,05$ ) para o número total de folículos, número de folículos pequenos, médios e grandes, bem como para o diâmetro do maior folículo, sendo os maiores valores observados no Dia 11 em comparação ao Dia 0.



**Figura 2.** Populações foliculares ovarianas (média  $\pm$  erro padrão das médias) no momento da inserção do dispositivo intravaginal de progesterona (Dia 0, p.m.), na primeira (Dia 7, a.m.) e na última (Dia 9, p.m.) administrações de p-FSH, e 36 h após a remoção do dispositivo intravaginal (Dia 11, a.m.) em ovelhas brasileiras localmente adaptadas (SI: Santa Inês; MN: Morada Nova) submetidas a protocolo de sincronização de estro de 9 dias com dispositivo intravaginal de progesterona novo (Novo) ou reutilizado (Usado; previamente utilizado uma vez por nove dias), associado ao tratamento superovulatório e à recuperação não cirúrgica de embriões. <sup>A,B</sup> Letras sobrescritas diferentes indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

### 3.2 Estro, resposta superovulatória e recuperação de embriões

O comportamento de estro não foi observado em nenhuma ovelha no momento da remoção do dispositivo. O intervalo entre a remoção do dispositivo e o início do estro foi inferior a 24 h em todos os grupos, exceto nas ovelhas MN do grupo G-Novo. Os dados gerais relacionados ao comportamento de estro, à resposta superovulatória e à recuperação embrionária estão apresentados na Tabela 1. A RNCE foi realizada com sucesso (isto é, com penetração cervical e lavagem uterina bem-sucedidas) em 93,7 % (15/16) das ovelhas MN e em 89,5 % (17/19) das ovelhas SI.

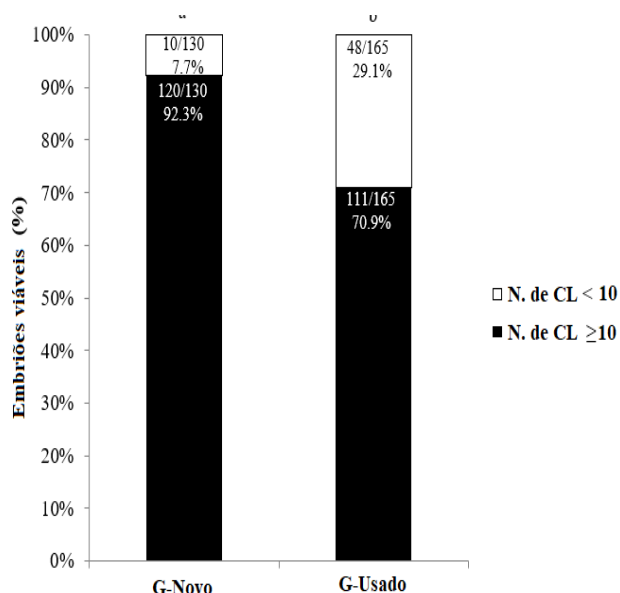
Interações significativas entre tratamento e raça foram observadas para o intervalo até o estro, o número de (CL) e o número total de estruturas luteinizadas ( $p < 0,05$ ). Nas ovelhas MN do grupo G-Novo, o intervalo até o estro foi maior ( $p < 0,05$ ) em comparação às ovelhas MN do grupo G-Usado. Respostas superovulatórias mais baixas, refletidas por menores números de CL e de estruturas luteinizadas totais, também foram observadas em ovelhas MN do G-Novo. Em contraste, maiores respostas superovulatórias (SOV) foram observadas em ovelhas SI do grupo G-Novo. O número de CL por ovelha lavada, o número de estruturas recuperadas e o número de embriões viáveis não diferiram ( $p > 0,05$ ) entre os grupos de tratamento. O número médio geral de embriões viáveis por ovelha lavada foi de  $9,2 \pm 1,7$ . O coeficiente de variação para o número de embriões viáveis foi de 103 % no total (G-Novo MN: 92 %; G-Novo SI: 143 %; G-Usado MN: 52 %; G-Usado SI: 88 %).

**Tabela 1.** Dados de estro, resposta superovulatória e produção in vivo de embriões (LSMEANS  $\pm$  EPM) em ovelhas brasileiras localmente adaptadas submetidas a um protocolo de sincronização de estro de 9 dias com dispositivo intravaginal de progesterona novo (G-Novo) ou reutilizado (G-Usado), associado ao tratamento superovulatório e à recuperação não cirúrgica de embriões.

Variáveis	Tratamento				valor de <i>p</i>
	G-Novo		G-Usado		
	Morada Nova	Santa Inês	Morada Nova	Santa Inês	
Resposta ao estro (%)	100,0 [10/10]	100,0 [10/10]	100,0 [10/10]	90,0 [9/10]	0,99
Intervalo ao estro (h)*	25,0 $\pm$ 1,6 <sup>A</sup>	20,8 $\pm$ 1,4 <sup>AB</sup>	20,2 $\pm$ 1,4 <sup>B</sup>	23,0 $\pm$ 1,6 <sup>AB</sup>	0,03
Duração do estro (h)	20,4 $\pm$ 1,4	22,8 $\pm$ 1,5	21,6 $\pm$ 1,5	22,7 $\pm$ 1,6	0,65
Ovelhas com CL um dia antes da RNCE (%)	60,0 [6/10]	90,0 [9/10]	100,0 [10/10]	90,0 [9/10]	0,98
Número de corpos lúteos ( <i>n</i> )	4,7 $\pm$ 0,7 <sup>C</sup> (0-18; 47)	13,8 $\pm$ 1,2 <sup>A</sup> (2-24; 138)	8,9 $\pm$ 0,9 <sup>B</sup> (3-12; 89)	11,8 $\pm$ 1,1 <sup>AB</sup> (0-27; 118)	<0,01
Folículos anovulatórios luteinizados ( <i>n</i> )	1,7 $\pm$ 0,4 (0-6; 17)	3,0 $\pm$ 0,5 (0-8; 30)	2,2 $\pm$ 0,5 (1-4; 22)	1,7 $\pm$ 0,4 (0-5; 17)	0,07
Total de estruturas luteinizadas ( <i>n</i> )	6,4 $\pm$ 0,8 <sup>C</sup> (0-20; 64)	16,8 $\pm$ 1,3 <sup>A</sup> (2-29; 168)	11,1 $\pm$ 1,1 <sup>B</sup> (6-15; 111)	13,5 $\pm$ 1,2 <sup>AB</sup> (1-27; 135)	<0,01
% de folículos anovulatórios	26,6 $\pm$ 5,5	17,9 $\pm$ 3,0	19,8 $\pm$ 3,8	12,6 $\pm$ 2,9	0,95
Ovelhas penetradas e coletadas com sucesso na RNCE (%)	83,3 [5/6]	90,0 [9/10]	100,0 [10/10]	88,9 [8/9]	0,98
Número de CL por ovelha coletada ( <i>n</i> )	7,8 $\pm$ 1,1 (4-18; 47)	13,7 $\pm$ 1,2 (2-24; 138)	8,9 $\pm$ 0,9 (3-12; 89)	13,1 $\pm$ 1,2 (5-27; 118)	0,42
Estruturas recuperadas por ovelha coletada ( <i>n</i> )	7,8 $\pm$ 1,2 (3-14; 39)	13,3 $\pm$ 1,2 (2-47; 120)	9,7 $\pm$ 1,0 (3-18; 97)	11,5 $\pm$ 1,2 (4-27; 92)	0,11
Taxa de recuperação de estruturas (%)	85,0 $\pm$ 13,7	64,0 $\pm$ 7,6	93,5 $\pm$ 10,7	91,8 $\pm$ 11,7	0,31
Embriões viáveis por ovelha coletada ( <i>n</i> )	6,6 $\pm$ 1,1 (0-14; 33)	10,8 $\pm$ 1,1 (0-42; 97)	8,8 $\pm$ 0,9 (3-16; 88)	9,6 $\pm$ 1,0 (0-27; 77)	0,11
Taxa de viabilidade (%)	84,6 $\pm$ 5,7	80,8 $\pm$ 3,6	90,7 $\pm$ 2,9	83,7 $\pm$ 3,9	0,58
Ovelhas com embriões viáveis recuperados (%)	80,0 [4/5]	88,9 [8/9]	100,0 [10/10]	87,5 [7/8]	0,98
Perfusão sanguínea ovariana no Dia 11 (%)	10,3 $\pm$ 1,3	11,3 $\pm$ 2,6	6,4 $\pm$ 2,4	15,9 $\pm$ 2,2	0,65
Perfusão sanguínea ovariana no Dia 15 (%)	31,4 $\pm$ 4,6	28,4 $\pm$ 4,5	15,6 $\pm$ 6,4	31,4 $\pm$ 3,3	0,84

\* Intervalo entre a remoção do dispositivo e o início do estro. ( ) Os valores entre parênteses indicam o intervalo observado (mínimo–máximo) e o número total observado. [ ] A frequência observada é apresentada entre colchetes. <sup>A,B</sup> Teste de Tukey foi realizado para comparações múltiplas de médias; letras sobrescritas diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Ovelhas com contagem de CL < 10 antes da RNCE contribuíram com maior porcentagem ( $p < 0,05$ ) para a produção total de embriões no grupo G-Novo, em comparação ao G-Usado (Figura 3).



**Figura 3.** Porcentagens de embriões viáveis após recuperação não cirúrgica de embriões em ovelhas Morada Nova e Santa Inês com <10 ou ≥10 corpos lúteos (CL) que foram submetidas a protocolo de sincronização de estro de 9 dias com dispositivo intravaginal de progesterona novo (G-Novo) ou reutilizado (G-Usado), associado ao tratamento superovulatório. <sup>A,B</sup>Comparação pelo teste do qui-quadrado; letras diferentes indicam diferença significativa (p < 0,05).

Correlações positivas e negativas significativas (p < 0,05) foram observadas entre a porcentagem de perfusão sanguínea ovariana no Dia 11 e as características de estro, a resposta superovulatória e as variáveis de recuperação embrionária apenas no grupo G-Usado. No Dia 15, correlações significativas foram detectadas em ambos os grupos de tratamento (Tabela 2).

**Tabela 2.** Correlações significativas entre a porcentagem de perfusão sanguínea ovariana nos Dias 11 e 15 e as respostas de estro, as respostas superovulatórias e a produção de embriões em ovelhas brasileiras localmente adaptadas submetidas a protocolo de sincronização de estro com dispositivo intravaginal de progesterona novo (G-Novo) ou reutilizado (G-Usado), associado ao tratamento superovulatório e à recuperação não cirúrgica de embriões.

	Variável de entrada	Variável de saída	r	Valor de p
G-Novo	Porcentagem de perfusão sanguínea ovariana no Dia 11	Intervalo ao estro*	-0,66	<0,01
		Duração do estro	0,48	0,03
		Total de estruturas luteinizadas	0,78	<0,01
		Número de corpos lúteos	0,81	<0,01
		Número de embriões viáveis	0,57	0,03
	Porcentagem de perfusão sanguínea ovariana no Dia 15	Número de corpos lúteos	0,81	0,01
		Total de estruturas luteinizadas	0,79	0,01
		Número de estruturas recuperadas	0,63	0,01
G-Usado	Porcentagem de perfusão sanguínea ovariana no Dia 15	Número de embriões viáveis	0,63	0,01
		Intervalo ao estro*	-0,54	0,02
		Número de corpos lúteos	0,53	0,01
		Total de estruturas luteinizadas	0,54	0,01

r-coeficiente de correlação. \*Intervalo entre a remoção do dispositivo e o início do estro.

## 4. Discussão

O comportamento de estro foi observado em todas as fêmeas do grupo G-Novo, independentemente da raça, e apenas uma ovelha Santa Inês do grupo G-Usado não apresentou sinais de estro. Essa elevada taxa de sincronização sugere que as concentrações de progesterona foram mantidas em níveis suficientes para prevenir a ovulação espontânea e promover estro sincronizado <sup>(9,19)</sup>. Esses achados são corroborados pelo monitoramento ultrassonográfico da população folicular ovariana. Embora apenas pequenas diferenças no comportamento de estro tenham sido observadas entre os tratamentos, interações significativas tratamento × raça foram detectadas para a resposta superovulatória, refletidas pelo número total de corpora lutea (CL) e pelo total de estruturas luteinizadas.

O número total de folículos foi menor nas ovelhas Morada Nova em comparação às Santa Inês. Sabe-se que os efeitos de raça são conhecidos por influenciar as respostas superovulatórias <sup>(20)</sup>, e alguns autores relatam que diferenças relacionadas à raça podem explicar aproximadamente 30 % da variabilidade na produção de embriões <sup>(21)</sup>. A contagem de folículos antrais (CFA) é um dos principais determinantes da resposta superovulatória e da produção de embriões em ovinos, tendo sido sugerida como critério para seleção de doadoras, evitando procedimentos estressantes em animais com potencial superovulatório limitado <sup>(22, 23)</sup>.

Curiosamente, 40 % das ovelhas Morada Nova do grupo G-Novo não apresentaram CL na ultrassonografia realizada antes da recuperação embrionária. A proporção de ovelhas com ausência ou ovulação limitada representa uma importante fonte de variabilidade em programas de MOET, com incidência relatada de aproximadamente 20–30 % <sup>(24, 25)</sup>. Um fator que pode reduzir as taxas de ovulação é a presença de folículos dominantes no momento da primeira administração de p-FSH, uma vez que folículos subordinados podem crescer até tamanho pré-ovulatório, mas falhar na ovulação <sup>(26)</sup>.

A classificação de folículos grandes ( $\geq 6,0$  mm) foi eficaz para confirmar a ausência de folículos dominantes no início do tratamento (Dia 7), condição crítica para o sucesso da superovulação <sup>(24,25,26)</sup>. A presença de folículos grandes ( $\geq 6$  mm) no início do tratamento com FSH tem sido associada à redução da resposta ovulatória <sup>(20, 25, 26)</sup>. Entretanto, esse ponto de corte pode ser menos apropriado para identificar folículos pré-ovulatórios no Dia 11, quando a maturação folicular já está avançada e o estro é evidente na maioria das ovelhas. Outros estudos definiram folículos grandes ou pré-ovulatórios utilizando limiares menores ( $\geq 5,0$  mm) <sup>(4,27)</sup>, o que pode proporcionar maior sensibilidade para detectar folículos maduros. Ainda assim, essa limitação não afetou o objetivo principal de comparar a produção de embriões entre dispositivos novos e reutilizados. Falha ovulatória e presença de folículos anovulatórios persistentes também têm sido relatadas mesmo sob o “Protocolo Dia 0”, que foi desenvolvido para iniciar a superestimulação na ausência de folículos dominantes <sup>(27)</sup>.

A produção de embriões no presente estudo foi maior do que a relatada em estudos utilizando protocolos semelhantes em ovelhas Lacaune <sup>(12)</sup> e/ou doses comparáveis de p-FSH em ovelhas Santa Inês <sup>(28)</sup>, apesar das menores porcentagens de FAL relatadas nesses estudos (7 % e 3,1–13,7 %, respectivamente). Quando produções embrionárias satisfatórias (~7 embriões viáveis) são obtidas, taxas de falha ovulatória de 15 % <sup>(6)</sup> e 30 % <sup>(29)</sup> também têm sido documentadas. No presente estudo, a reutilização do dispositivo de progesterona não pareceu influenciar a formação de folículos anovulatórios.

No grupo G-Novo, a perfusão sanguínea ovariana foi um forte preditor da resposta superovulatória, correlacionando-se positivamente com o número de CL, o total de estruturas luteinizadas e o número de embriões viáveis nos Dias 11 e 15. No grupo G-Usado, correlações positivas moderadas foram observadas entre o número de CL, o total de estruturas luteinizadas e a perfusão sanguínea ovariana no Dia 15. Correlações negativas moderadas foram detectadas entre o intervalo até o estro e a perfusão sanguínea ovariana no Dia 11 (G-Novo) e no Dia 15 (G-Usado).

Como correlação indica associação e não causalidade, esses achados devem ser interpretados com cautela. A maior variabilidade nas respostas superovulatórias observada no grupo G-Novo pode ter contribuído para a correlação negativa observada nesse grupo no Dia 11. Um aumento rápido na secreção de estradiol pelos folículos pré-ovulatórios seria esperado desencadear prontamente os sinais de estro, resultando em um intervalo mais curto entre a remoção do dispositivo e o início do estro. Em conjunto, esses dados sugerem que uma melhor perfusão ovariana está associada a intervalos mais curtos até o estro, respostas superovulatórias mais intensas e maior produção de embriões.

As correlações observadas entre perfusão sanguínea ovariana e comportamento estral, resposta superovulatória e produção de embriões são consistentes com estudos anteriores que avaliaram a utilidade da ultrassonografia Doppler colorida para a avaliação da função luteal <sup>(30)</sup> e do potencial de recuperação embrionária <sup>(6,14,31)</sup>. Embora a contagem de CL utilizando Doppler colorido possa apresentar ligeira redução na precisão à medida que o número de CL aumenta <sup>(32)</sup>, a estimativa global permanece clinicamente valiosa. Ovelhas que apresentam  $\geq 10$  CL contribuem com aproximadamente 90 % da produção total de embriões, enquanto aquelas com  $< 10$  CL contribuem com apenas cerca de 10 % <sup>(4)</sup>. Portanto, em casos de incerteza na enumeração de CL, a avaliação da área total de perfusão sanguínea ovariana — dada sua forte correlação com o número de embriões viáveis — pode auxiliar na tomada de decisão quanto à realização da RNCE por meio de avaliação ultrassonográfica não invasiva.

A média de embriões viáveis não diferiu entre os grupos tratamento  $\times$  raça. Entretanto, embora sem significância estatística, dispositivos novos produziram tanto os menores quanto os maiores valores, com os maiores coeficientes de variação observados entre os grupos genéticos (Morada Nova e Santa Inês, respectivamente). Além disso, ovelhas G-Usado com menor resposta ovulatória ( $< 10$  CL) contribuíram com maior proporção de embriões viáveis em comparação às G-Novo, sugerindo respostas mais homogêneas. Nas condições do presente estudo, a reutilização do dispositivo pareceu reduzir a variabilidade individual, característica desejável em programas de MOET <sup>(20)</sup>.

Além de sustentar elevada produção de embriões viáveis, o protocolo de médio prazo permitiu efetivamente a reutilização dos dispositivos intravaginais, totalizando 18 dias de permanência do dispositivo. Em condições comerciais ou experimentais (cross-over), as doadoras são comumente superovuladas duas vezes em intervalos de 30 dias <sup>(12)</sup> a 60 dias <sup>(6)</sup>. Assim, a reutilização de um dispositivo intravaginal na mesma doadora durante protocolos superovulatórios sequenciais pode ser viável. Considerando a manutenção da produção embrionária, a reutilização do dispositivo representa uma estratégia prática para reduzir custos da superovulação e minimizar resíduos ambientais, alinhando-se aos princípios “Green, Clean and Ethical” para reprodução controlada em ovinos <sup>(13)</sup>.

Este estudo é o primeiro a relatar a reutilização bem-sucedida de dispositivos intravaginais de progesterona em ovelhas Santa Inês e Morada Nova submetidas à superovulação, duas raças brasileiras localmente adaptadas. A reutilização já foi previamente descrita em protocolos de sincronização de estro em cabras Toggenburg após autoclavagem <sup>(7, 9)</sup> e em ovelhas Santa Inês após lavagem e secagem em temperatura ambiente <sup>(8)</sup>. Em cabras Toggenburg, dispositivos utilizados por 12 dias mostraram-se eficazes posteriormente em um protocolo adicional de indução de estro de 6 dias <sup>(7)</sup>, indicando manutenção de concentrações plasmáticas de progesterona acima de 1 ng/mL por até 18 dias. Em ovelhas Santa Inês, as concentrações circulantes de progesterona não diferiram entre dispositivos novos e reutilizados (usados por dez dias) do dia 3 até o final do protocolo de sincronização de cinco dias <sup>(8)</sup>. Apesar das diferenças na resposta superovulatória após o tratamento com p-FSH, altas produções embrionárias por ovelha coletada foram observadas entre os tratamentos. A CFA total parece ser o principal fator subjacente às diferenças entre raças. Notavelmente, a reutilização do dispositivo reduziu a variabilidade individual das respostas, mantendo elevada eficiência na produção de embriões.

## 5. Conclusão

A reutilização de um dispositivo intravaginal previamente utilizado por nove dias resultou em produções embrionárias comparáveis às obtidas com um dispositivo novo, demonstrando que protocolos de médio prazo (9 dias) podem sustentar de forma eficaz a reutilização de dispositivos intravaginais de progesterona para superovulação em ovelhas. Quando combinados com estratégias adequadas de dose e administração de FSH, protocolos utilizando dispositivos novos ou reutilizados promoveram respostas ovarianas robustas, que, juntamente com a monta natural eficiente e a RNCE, resultaram em elevados números de embriões viáveis recuperados de ovelhas brasileiras localmente adaptadas.

### Declaração de conflito de interesses

Nenhum dos autores possui conflito de interesses a declarar.

### Declaração de disponibilidade de dados

Os dados serão disponibilizados mediante solicitação ao autor correspondente.

### Contribuições do autor

Conceitualização: Lima, M. S. D., Teixeira, D. Í. A., Oliveira, M. E. F., Fonseca, J. F.; Análise formal: Figueira, L. M., Lima, M. S. D., Vergani, G. B., Batista, R. I. T. P., Teixeira, D. Í. A., Oliveira, M. E. F.; Curadoria de dados: Figueira, L. M., Lima, M. S. D., Vergani, G. B., Batista, R. I. T. P., Fonseca, J. F.; Investigação: Lima, M. S. D., Vergani, G. B., Silva, K. M., Monteiro, A. W. U., Batista, R. I. T. P., Fonseca, J. F.; Metodologia: Lima, M. S. D., Vergani, G. B., Batista, R. I. T. P., Teixeira, D. Í. A., Fonseca, J. F.; Administração do projeto: Fonseca, J. F.; Redação: Lima, M. S. D., Fonseca, J. F., Figueira, L. M., Vergani, G. B., Silva, K. M., Monteiro, A. W. U., Batista, R. I. T. P., Teixeira, D. Í. A., Oliveira, M. E. F.

### Declaração de uso de IA generativa

Os autores não utilizaram ferramentas ou tecnologias de inteligência artificial generativa na elaboração ou edição de qualquer parte deste manuscrito.

### Agradecimentos

Os autores agradecem aos colaboradores da Embrapa Caprinos e Ovinos por toda a ajuda e apoio durante a realização deste experimento. Este estudo contou com apoio da Embrapa (Projetos 11.15.02.003.01.00 e 22.13.06.026.00.04). Jeferson F. Fonseca e Maria E. F. Oliveira são bolsistas do CNPq.

### Referências

1. Fonseca JF, Silva KM. Brazilian Germplasm Bank: conservation of genetic resources of sheep and goats. (Documents 142) Sobral: Embrapa Goats & Sheep; Nov 2021. [cited 2025 Feb 06]. Available from: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/bitstream/doc/1137604/1/CNPC-2021-Art99.pdf>

2. Arrais AM, Mello MRB, Vergani GB, Figueira LM, Esteves SN, Pereira VSA, Bartlewski PM, Oliveira MEF, Souza-Fabjan JMG, Fonseca JF. NonSurgical Embryo Recovery from Estrus Synchronized or Superovulated Morada Nova Ewes: A Feasible Strategy for Sheep Embryo Banking. *Biopreserv Biobank*. 2021;189:360–368. <https://doi.org/10.1089/bio.2020.0125>
3. Fonseca JF, Vergani GB, Lima MSD, Silva KM, Monteiro AWU, Ramos AF, Alves BRC, Souza-Fabjan JMG, Oliveira MEF, Batista RITP. Nonsurgical Embryo Recovery as a Feasible Tool for Supporting Embryo Biobanks of Locally Adapted Brazilian Sheep and Goats. *Biopreserv Biobank*. 2021;20:6. <https://doi.org/10.1089/bio.2021.0066>
4. Oliveira MEF, Arrais AM, Mello MRB, Vergani GB, Figueira LM, Esteves SN, Pereira VSAP, Garcia AR, Bartlewski PM, Fonseca, J.F. Study of the factors affecting embryo yields and quality in superovulated Morada Nova ewes that underwent non-surgical uterine flushing. *Reprod Domest Anim*. 2022;57(4):393-401. <https://doi.org/10.1111/rda.14077>
5. Figueira LM, Alves NG, Souza-Fabjan JMG, Oliveira MEF, Lima RR, Souza GN, Fonseca JF. Preovulatory follicular dynamics, ovulatory response and embryo yield in Lacaune ewes subjected to synchronous estrus induction protocols and non-surgical embryo recovery. *Theriogenology*. 2020;145:238-246. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.11.004>
6. Figueira LM, Alves NG, Maia ALRS, Souza-Fabjan JMG., Batista RITP, Arrais AM, Lima RR, Oliveira MEF, Fonseca JF. In vivo embryo production and recovery in Lacaune ewes after imposing a superovulation treatment regimen is related to pFSH dose. *Anim Reprod Sci*. 2020; 223:106625. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106625>
7. Souza JMG, Torres CAA, Maia ALRS, Brandão FZ, Bruschi JH, Viana JHM, Oba E, Fonseca JF. Autoclaved, previously used intravaginal progesterone devices induces estrus and ovulation in anestrus Toggenburg goats. *Anim Reprod Sci* 2011; 129:50-55. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2011.09.012>
8. Pinna AE, Brandão FZ, Cavalcanti AS, Borges AM, Souza JMG, Fonseca JF. Reproductive parameters of Santa Inês ewes submitted to short-term treatment with re-used progesterone devices. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2012; 64:333-340. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352012000200012>
9. Souza-Fabjan JMG, Torres CAA, Maia ALRS, Brandão FZ, Oba E, Bertoldo MJ, Fonseca JF. Re-used progesterone devices efficiently synchronise oestrus and ovulation after autoclaving process in Toggenburg goats during the breeding season. *Anim. Reprod. Sci*. 2014; 55: 818-822. <https://doi.org/10.1071/AN14056>
10. Swelum AA, Saadeldin IM, Moumen AF, Ali MA, Ba-Awadh H, Alowaimer AN, Efficacy of using previously used controlled internal drug release (CIDR®) insert on the reproductive performance, hormone profiles and economic measures of sheep. *Reprod. Domest. Anim*. 2018; 53:114-1122. <https://doi.org/10.1111/rda.13212>.
11. Martin BG, Kadokawa H. Clean, Green, and Ethical" Animal Production. Case Study: Reproductive Efficiency in Small Ruminants. *J Reprod Develop*. 2006; 52:145-152. <https://doi.org/10.1262/jrd.17086-2>
12. Figueira LM, Alves NG, Maia ALRS, Souza-Fabjan JMG, Batista RITP, Morais, MCC, Lima RR, Oliveira MEF, Fonseca JF. Embryo yield and quality are associated with progestogen treatment during superovulation protocol in lactating Lacaune ewes. *Theriogenology*. 2020; 155:132-138. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2020.06.004>
13. Marques JCS, Maciel JPO, Denis-Robichaud J, Conceicao RS, Bega AM, Moore S, Sirard MA, Baes CF, Cerri RLA. The effect of progesterone concentrations during superovulation of Holstein heifers in a randomized trial. *J Dairy Sci*. 2023 106:9677–9690. <https://doi.org/10.3168/jds.2022-23065>
14. Oliveira MEF, Ribeiro IF, Rodriguez MGK, Maciel GS, Fonseca JF, Brandão FZ, Bartlewski PM. Assessing the usefulness of B-mode and colour Doppler sonography, and measurements of circulating progesterone concentrations for determining ovarian responses in superovulated ewes. *Reprod. Domest. Anim*. 2018; 53:742e50. <https://doi.org/10.1111/rda.13165>
15. Fonseca JF. Classificação de ovelhas para a colheita de embriões pela via transcervical de acordo com o grau de facilidade de transposição cervical. *Circular Técnica 45* [Internet]. Sobral: Embrapa Caprinos e Ovinos; 2017 jul [cited 2025 Feb 06]. Available from <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/1071938>
16. Fonseca JF, Oliveira MEF, Brandão FZ, Batista RITP, Garcia AR, Bartlewski PM, Souza-Fabjan JMG. Non-surgical embryo transfer in goats and sheep: the Brazilian experience. *Reprod Fert Develop*. 2019;31:17–26. <https://doi.org/10.1071/RD18324>
17. IETS 2024. Manual of International Embryo Technology Society (IETS), 5th edition [Internet] Champaign IL International Embryo Technology Society (IETS); [cited 2025 Feb 06] Available from: <https://www.iets.org/Publications/IETS-Manual>. (accessed 15 May 2024).
18. Kaps M, Lamberson WR. *Biostatistics for Animal Science*, 3rd Edition, Wallingford, United Kingdom: CABI Publishing; 2004. 459p.
19. Scaramuzzi RJ, Adams NR, Baird DT, Campbell BK, Downing JA, Findlay JK. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reprod Fert Develop*. 1993; 5:459-478. <https://doi.org/10.1071/RD9930459>

20. Bartlewski PM, Seaton P, Oliveira MEF, Kridli RT, Murawski M, Schwarz T. Intrinsic determinants and predictors of superovulatory yields in sheep: Circulating concentrations of reproductive hormones, ovarian status, and antral follicular blood flow. *Theriogenology*. 2016; 86:130–143. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.024>
21. Khan SU, Jamal MA, Su, Y, Wei H-J, Qing Y, Cheng W. Towards Improving the Outcomes of Multiple Ovulation and Embryo Transfer in Sheep, with Particular Focus on Donor Superovulation. *Vet Sci*. 2022; 9:117. <https://doi.org/10.3390/vetsci9030117>
22. Pinto PHN, Balaro MFA, Souza-Fabjan JMG, Ribeiro LS, Bragança GM, Leite CR, Arashiro EKN, Silva KM, Fonseca JF, Brandão FZ. Anti-Müllerian hormone and antral follicle count are more effective for selecting ewes with good potential for in vivo embryo production than the presence of FecGE mutation or eCG pre-selection tests. *Theriogenology*. 2018a.; 113:146-152. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.02.018>
23. Brasil OO, Moreira NH, Souto PLG, Silva CMG, Ramos AF. Ovarian assessment for pre-selection of embryo donor ewes. *Small Rumin Res*. 2022; 216:106803. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2022.106803>
24. Cagnie Y. State of the art in Sheep-Goat embryo transfer. *Theriogenology*. 1999; 51: 105–116. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00235-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00235-0)
25. 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; 54:1055–1064. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(00\)00414-3](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(00)00414-3)
26. Veiga-Lopez A, Gonzalez-Bulnes A, Garcia-Garcia RM, Dominguez V, Cocero MJ. The effects of previous ovarian status on ovulation rate and early embryo development in response to superovulatory FSH treatments in sheep. *Theriogenology*. 2005; 63:1973–1983. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.055>
27. Ribeiro ACS, Pinto PHN, Santos JDR, Ramalho NP, Laeber CCR, Balaro MFA, Batista RITP, Souza-Fabjan JMG, Fonseca JF, Ungerfeld R, Brandão FZ. The pFSH dose affects the efficiency of in vivo embryo production in Santa Inês ewes. *Anim Reprod Sci*. 2024; 264:107459. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2024.107459>
28. Maciel GS, Rodriguez MGK, Santos VJC, Uscategui RAR, Nociti RP, Maronezi MC, Oliveira CS, Feliciano MAR, Vicente WRR, Fonseca JF, Oliveira MEF. Follicular dynamics and in vivo embryo production in Santa Inês ewes treated with small doses of pFSH. *Anim Reprod Sci*. 2019; 209:106137. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106137>
29. Veiga-Lopez A, Gonzalez-Bulnes A, Tresguerres JAF, Dominguez V, Ariznavarreta C, Cocero MJ. Causes, characteristics, and consequences of anovulatory follicles in superovulated sheep. *Domest Anim Endocrinol*. 2006; 30:76–87. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2005.06.001>
30. Figueira LM, Fonseca JF, Arashiro EKN, Souza-Fabjan JMG, Ribeiro ACS, Oba E, Viana, JHM, Brandão FZ. Colour Doppler ultrasonography as a tool to assess luteal function in Santa Inês ewes. *Reprod Domest Anim*. 2015; 50:643-650. <https://doi.org/10.1111/rda.12543>
31. Oliveira MEF, Feliciano MAR, D'Amato CC, Oliveira LG, Bicudo SD, Fonseca JF, Vicente WRR, Visco E, Bartlewski PM. Correlations between ovarian follicular blood flow and superovulatory responses in ewes. *Anim Reprod Sci*. 2014; 144: 30-37. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.10.012>
32. Pinto PHN, Bragança GM, Balaro MFA, Arashiro EKN, dos Santos GB, Souza-Fabjan JMG, Fonseca JF, Brandão FZ. Colour-Doppler ultrasound imaging as a laparoscopy substitute to count corpora lutea in superovulated sheep. *Reprod Domest Anim*. 2018b; 53:266–269. <https://doi.org/10.1111/RDA.13089>