

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

**Gonadotrofina coriônica equina recombinante para indução de estro e
ovulação em ovelhas lanadas**

Julia Nobre Blank Camozzato

Pelotas, 2025

Julia Nobre Blank Camozzato

**Gonadotrofina coriônica equina recombinante para indução de estro e
ovulação em ovelhas lanadas**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Reprodução e Patologia Animal)

Orientador: Bernardo Garziera Gasperin

Coorientadores: Arnaldo Diniz Vieira

Fernando Caetano de Oliveira

Pelotas, 2025

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

C185g Camozzato, Julia Nobre Blank

Gonadotrofina coriônica equina recombinante para indução de estro e ovulação em ovelhas lanadas [recurso eletrônico] / Julia Nobre Blank Camozzato ; Bernardo Garziera Gasperin, orientador ; Arnaldo Diniz Vieira, Fernando Caetano de Oliveira, coorientadores. — Pelotas, 2025.
64 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2025.

1. Ovelhas. 2. Gonadotrofina sérica de égua prenha (PMSG). 3. Sazonalidade. 4. Anestro. 5. reCG. I. Gasperin, Bernardo Garziera, orient. II. Vieira, Arnaldo Diniz, coorient. III. Oliveira, Fernando Caetano de, coorient. IV. Título.

CDD 636.30824

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Julia Nobre Blank Camozzato

Gonadotrofina coriônica equina recombinante para indução de estro e ovulação em
ovelhas lanadas

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em
Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária,
Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 27/02/2025

Banca examinadora:

Prof. Dr. Bernardo Garziera Gasperin (Orientador)
Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Gustavo Desire Antunes Gastal
Doutor em Agricultural Sciences pela Southern Illinois University

Prof. Dr. Felipe Zandonadi Brandão
Doutor em Ciência Animal pela Universidade Federal de Minas Gerais

Dr^a. Daniele Missio
Doutora em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, à minha família, que sempre esteve ao meu lado, oferecendo amor, apoio e motivação em todos os momentos. Aos meus pais, André e Denise, sou grata por todas as oportunidades que me proporcionaram. Ao meu irmão, minha dinda, tios, tias e primas, agradeço o carinho e compreensão contínuos. Aos meus avós (*in memoriam*), especialmente ao meu avô Joel, agradeço o exemplo de perseverança e autodesenvolvimento.

Ao meu namorado e melhor amigo, Lucas, por estar ao meu lado durante esses 20 anos de história e parceria. Aos meus amigos, tanto dentro quanto fora da faculdade, agradeço por todo apoio e risadas.

Ao grupo FiBRA agradeço a oportunidade, a experiência e o conhecimento. Sou imensamente grata aos professores, pós-graduandos e graduandos que colaboraram com a elaboração e execução deste projeto, em especial aos meus orientadores e coorientadores. Agradeço, também, às propriedades parceiras que disponibilizaram seus animais para a realização dessa pesquisa.

Ao Programa de Pós-graduação em Veterinária (PPGV-UFPeI), à Faculdade de Veterinária (FaVet-UFPeI) e à Universidade Federal de Pelotas (UFPeI), agradeço a estrutura e o suporte. Por fim, sou grata à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, código de financiamento 001) pela bolsa de mestrado e aos órgãos de fomento CNPq e FAPERGS, que tornaram possível a realização dessa pesquisa.

Resumo

CAMOZZATO, Julia Nobre Blank. **Gonadotrofina coriônica equina recombinante para indução de estro e ovulação em ovelhas lanadas**. 2025. 64f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2025.

A sazonalidade impacta negativamente na intensificação da produção em rebanhos ovinos. Alternativas ao uso de gonadotrofina coriônica equina purificada (eCG) para induzir o crescimento folicular e ovulação em ovelhas em anestro têm sido exploradas, mas ainda não há tratamento tão eficiente quanto a eCG purificada. Neste estudo, objetivamos comparar os efeitos do uso da eCG purificada e da eCG recombinante (reCG) sobre diâmetro folicular, manifestação do estro, ovulação, função lútea e prenhez em ovelhas lanadas durante o anestro até o período de transição. No experimento 1, foram utilizadas 27 ovelhas adultas. No D0, os animais receberam um dispositivo intravaginal (DIV) contendo 0,36g de progesterona, mantido por 7 dias. No D7, todas as ovelhas receberam 250 µg de cloprostenol sódico IM e foram aleatoriamente alocadas em um dos três grupos: controle (n=9), eCG (n=9) e reCG (n=9). As ovelhas não receberam nenhum tratamento adicional, 400 UI de eCG ou 105 UI de reCG nos grupos controle, eCG e reCG, respectivamente. As avaliações de diâmetro folicular foram realizadas por ultrassonografia transretal 24, 36 e 48 horas após a remoção do DIV. A ovulação foi verificada no D14 pela presença, área e perfusão do corpo lúteo (CL). Função lútea foi avaliado pela perfusão sanguínea do CL foi avaliada por Doppler colorido e mensurada no ImageJ. A função lútea foi avaliada 7 e 12 dias após a remoção do DIV pela concentração sérica de P4. No experimento 2, 441 ovelhas (controle = 117; eCG = 170; reCG = 154) foram tratadas com protocolo similar ao experimento 1, de início de dezembro até janeiro, para avaliar o comportamento estral e avaliação das taxas de prenhez e de concepção por monta natural. O diagnóstico de prenhez foi realizado de 25 a 30 dias após a remoção dos carneiros. Os dados do experimento 1 foram analisados por ANOVA e teste de Tukey. As taxas de ovulação, prenhez e estro foram avaliadas usando regressão logística e o teste exato de Fisher. No experimento 1, o tamanho folicular pré-ovulatório após 48h foi maior ($P<0,01$) no grupo eCG ($5,22\pm0,23$) e tendeu a ser maior ($P=0,052$) no grupo reCG ($4,8\pm0,23$) em comparação ao grupo controle ($3,98\pm0,23$). A taxa de crescimento entre a primeira (24h) e a última (48h) avaliação foi maior no grupo eCG ($1,07\pm0,27$) e reCG ($1,05\pm0,27$) comparado ao grupo controle ($0,01\pm0,27$) ($P<0,05$). A taxa de ovulação foi maior no grupo eCG (100%; 9/9) e reCG (88,9%; 8/9) de que no grupo controle (0%; 0/0) ($P<0,0001$). Não houve diferença na área e perfusão do CL entre os tratamentos, mas as concentrações séricas de P4 foram maiores no grupo eCG em comparação aos grupos reCG e controle; e mais altas no grupo reCG em comparação ao controle nos dias 7 e 12. No experimento 2, as ovelhas tratadas com eCG apresentaram uma taxa de estro maior (93,45%) em comparação ao controle (76,32%) ($P<0,001$), enquanto o grupo reCG (87,58%) apresentou resultado

intermediário. O tratamento com eCG ou reCG não afetou as taxas de prenhez ($P=0,73$) ou de concepção ($P=0,75$). Durante a transição para a estação reprodutiva, ambas reCG e eCG têm impacto limitado nas taxas de prenhez e concepção por monta natural em comparação ao tratamento com P4+PGF. Contudo, durante período de anestro, reCG demonstra ser uma alternativa ao eCG purificado para promover o crescimento folicular e induzir a ovulação.

Palavras-chave: ovelhas; gonadotrofina sérica de égua prenha (PMSG); sazonalidade; anestro; reCG

Abstract

CAMOZZATO, Julia Nobre Blank. **Recombinant equine chorionic gonadotropin for induction of estrus and ovulation in woolly ewes.** 2025. 64f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2025.

Seasonality negatively impacts the intensification of production in sheep flocks. Alternatives to the use of purified equine chorionic gonadotropin (eCG) to induce follicular growth and ovulation in anestrus ewes have been explored but, so far, there is no treatment as efficient as purified eCG. In this study we aimed to compare purified eCG and recombinant eCG (reCG) on follicular dynamics, ovulation, luteal function, estrus and pregnancy in ewes during anestrus to transition period. In experiment 1, 27 adult ewes were used. On Day 0 (D0), the animals received an intravaginal device (IVD) containing 0.36g of progesterone, which was maintained for 7 days. On D7, all ewes received 250 µg of sodium cloprostenol IM and were randomly allocated into one of three groups: control (n=9), eCG (n=9), and reCG (n=9). The ewes did not receive any additional treatment in the control group, 400 IU of eCG in the eCG group, and 105 IU of reCG in the reCG group. Follicular diameter was assessed by transrectal ultrasonography at 24, 36, and 48 hours after the IVD removal. Ovulation was confirmed on D14 by the presence, area, and perfusion of the corpus luteum (CL). Luteal function was evaluated by blood perfusion of the CL using color Doppler and measured with ImageJ. Luteal function was assessed 7 and 12 days after IVD removal by serum P4 concentration. In experiment 2, 441 ewes (control = 117; eCG = 170; reCG = 154) were treated with a protocol similar to experiment 1, from early December to January, to assess estrus behavior and evaluate pregnancy and conception rates through natural mating. Pregnancy diagnosis was performed 25 to 30 days after ram removal. Data from experiment 1 were analyzed by ANOVA and Tukey's test. Ovulation, pregnancy, and estrus rates were evaluated using logistic regression and Fisher's exact test. In experiment 1, the pre-ovulatory follicle size after 48 hours was greater ($P<0.01$) in the eCG group (5.22 ± 0.23) and tended to be larger ($P=0.052$) in the reCG group (4.8 ± 0.23) compared to the control group (3.98 ± 0.23). The growth rate between the first (24h) and last (48h) evaluation was greater in the eCG (1.07 ± 0.27) and reCG (1.05 ± 0.27) groups compared to the control group (0.01 ± 0.27) ($P<0.05$). The ovulation rate was higher in the eCG group (100%; 9/9) and reCG group (88.9%; 8/9) compared to the control group (0%; 0/0) ($P<0.0001$). There was no difference in the area and perfusion of the CL between treatments, but serum P4 concentrations were

higher in the eCG group compared to the reCG and control groups; and higher in the reCG group compared to the control group on days 7 and 12. In experiment 2, ewes treated with eCG had a higher estrus rate (93.45%) compared to the control group (76.32%) ($P < 0.001$), while the reCG group (87.58%) showed an intermediate result. Treatment with eCG or reCG did not affect pregnancy rates ($P = 0.73$) or conception rates ($P = 0.75$). During the transition to the breeding season, both reCG and eCG had a limited impact on pregnancy and conception rates through natural mating compared to P4+PGF treatment. However, during the anestrus period, reCG proves to be an alternative to purified eCG to promote follicular growth and induce ovulation.

Keywords: sheep; pregnant mare serum gonadotropin (PMSG); seasonality; anestrus; reCG

Lista de Figuras

- Figure 1 A) Effect of group on mean ($\pm$ SEM) follicle diameter of the largest follicle at 24, 36 and 48 hours (Control=9; eCG=9; reCG = 9) after treatment in anestrus ewes. B) Follicular growth ($\pm$ SEM) between 24 and 48 hours after treatment. Each symbol represents one animal. ^{a,b} Different letters indicate difference among groups ($P < 0.05$). 46
- Figure 2 Ovulation rate (%) by group in anestrus ewes (Control=9; eCG=9; reCG=9). ^{a,b} Different letters indicate difference among groups ($P < 0.001$). 47
- Figure 3 CL area (mean $\pm$ SEM) (A) and blood perfusion in CL area (%) (B) in ewes treated with eCG (n = 9) and reCG (n = 8). Parameters were measured using ImageJ Software. 48
- Figure 4 Median serum P4 concentrations on D7 and D12 after treatment in ewes with one CL on D7 (eCG=5; reCG=6). Each symbol represents one animal. (*) indicate differences among groups ($P < 0.05$). 49

Lista de Tabelas

Table 1	Estrus, pregnancy and conception rate by natural mating according to treatment, farm, body condition score and P4 treatment duration. Estrus: ewes detected in estrus / ewes exposed to rams $\times$ 100; pregnancy: pregnant ewes / ewes exposed to rams $\times$ 100; conception rate: pregnant ewes / ewes detected in estrus $\times$ 100. ^{a,b} Different letters indicate difference among groups (P < 0.05).....	50
---------	--	----

Lista de Abreviaturas

BE	Benzoato de estradiol
CHO	Células de ovário de hamster chinês
CL	Corpo lúteo
DIV	Dispositivo intravaginal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECC	Escore de condição corporal
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
E ₂	Estradiol
FSH	Hormônio folículo-estimulante
g	Gramas
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
IA	Inseminação artificial
IATF	Inseminação artificial em tempo fixo
L	Litros
LH	Hormônio luteinizante
mg	Miligramas
MN	Monta natural
ng	Nanogramas
OTR	Receptores de ocitocina
P4	Progesterona
PGF ₂ α	Prostaglandina F ₂ α
reCG	Gonadotrofina coriônica equina recombinante
μ g	Microgramas
μ L	Microlitros

Sumário

Introdução.....	12
2 Objetivos.....	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15
3 Revisão de Literatura.....	16
3.1 Fisiologia reprodutiva da fêmea ovina.....	16
3.1.1 Sazonalidade.....	20
3.2 Protocolos hormonais.....	21
3.3 Proteínas recombinantes	23
3.3.1 eCG purificada e recombinante.....	25
4 Artigo	28
Considerações Finais	52
Referências	53
Anexos	63

1 Introdução

A ovinocultura possui grande impacto na subsistência, garantindo a segurança alimentar em diversas regiões (Matte e Waquil, 2021; Scortichini *et al.*, 2016). Em escala comercial, a exportação de lã e carne ovina movimentaram mundialmente aproximadamente US\$ 3,2 e 8,5 bilhões em 2023, respectivamente (FAOSTAT, 2025). No Brasil, a ovinocultura é um agronegócio em expansão, com crescente aumento na comercialização de carne, resultando no crescimento do rebanho em 26% entre 2013 e 2023, totalizando aproximadamente 22 milhões de cabeças (FAOSTAT, 2025). Ainda assim, a produção interna não é suficiente para suprir a demanda do país (Viana e Waquil, 2020), visto que em 2023 foram importadas mais de 4,2 mil toneladas de carne ovina (FAOSTAT, 2023).

Apesar da ovinocultura competir diretamente por área, quando bem administrada, pode ser uma excelente atividade de diversificação de renda, complementar a outras atividades agropecuárias como bovinocultura e agricultura (Lunardi *et al.*, 2008; Rutter, 2010). Todavia, para que a atividade seja rentável, é necessária a melhoria da eficiência reprodutiva dos rebanhos, principalmente em sistemas focados em produção de carne, de modo a maximizar a produtividade e garantir o sucesso a longo prazo do rebanho de forma sustentável (Fonseca, 2006).

Os ovinos são animais com grande potencial reprodutivo que pode ser explorado por meio de manejos associados a biotécnicas reprodutivas modernas. De maneira geral, são animais poliéstricos estacionais, com período de reprodução e parição sazonal em regiões subtropicais, normalmente produzindo de um a dois cordeiros por ano (Corner *et al.*, 2013). Durante períodos com maiores horas de luminosidade, há diminuição da pulsatilidade do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) e, conseqüentemente, do hormônio luteinizante (LH) como resposta a diminuição da melatonina (Goodman *et al.*, 2010; Nestor *et al.*, 2018) causando, assim, ausência de ovulações e anestro.

Assim, a intensificação de produção dessa espécie em períodos de anestro sazonal é possível com protocolos de indução ao estro. Nesses protocolos é essencial a utilização de gonadotrofinas exógenas, como a eCG, capazes de suprir o déficit de

gonadotrofinas endógenas, necessárias para crescimento folicular e ovulação (Dias *et al.*, 2020). O uso desses hormônios permite a distribuição e concentração dos partos em mais de um período ao longo do ano, de forma a melhor atender o mercado, aumentar o número de cordeiros nascidos por ovelha e facilitar o manejo dos animais (Abecia, Forcada e González-Bulnes, 2011).

Algumas estratégias para sincronização de estro de ovinos, através da indução de crescimento folicular e ovulação vem sendo estudadas, como o uso do hormônio folículo-estimulante (FSH) associado ao benzoato de estradiol (BE) ou GnRH (Silveira *et al.*, 2021), GnRH isolado, que apresentou efeito significativo quando usado em ovelhas cíclicas (Pereira *et al.*, 2024), mas não em protocolos de inseminação em tempo fixo (IATF) (Maggi *et al.*, 2024) e da gonadotrofina coriônica humana (hCG) (Dias *et al.*, 2020, 2018). No entanto, os melhores resultados para ovelhas em anestro estacional e em períodos de transição são obtidos com o uso da gonadotrofina coriônica equina (eCG) purificada associada a exposição prévia de progesterona (P4) (Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2020).

Em ovinos, a eCG estimula o desenvolvimento folicular (Dias *et al.*, 2020) sincronizando estro, promovendo ovulação (Ali, 2007) e aumentando as taxas de prenhez e fecundidade (Ali, 2007; Quintero-Elisea *et al.*, 2011). Contudo, nos últimos anos tem se intensificado, particularmente na Europa, o debate sobre a substituição do uso de eCG purificada (Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2020), devido ao possível comprometimento do bem-estar animal pela forma de obtenção da eCG, que requer coleta de sangue frequente de éguas prenhes (Vilanova *et al.*, 2019).

Neste contexto, a eCG recombinante (reCG) surge como uma nova e promissora possibilidade de substituição a eCG purificada. Produzida através de tecnologia recombinante, a reCG pode apresentar vantagens em relação a eCG purificada, como a eliminação da necessidade de obtenção de material biológico proveniente de animais, produção em larga escala mais eficiente, maior pureza e maior estabilidade (Villaraza *et al.*, 2020), visto que a eCG purificada é comercializada na forma liofilizada (Wang, 2000).

Em bovinos, o uso da reCG tem se provado eficiente em promover ovulações (Villaraza *et al.*, 2020), contribuindo com maiores taxas de estro e prenhez (Cattaneo *et al.*, 2024). Porém, não temos conhecimento do uso da reCG em ovinos e do possível efeito sobre o crescimento folicular, ovulação, luteogênese e fertilidade,

quando utilizada em ovelhas em anestro ou no período de transição, substituindo ou associando a gonadotrofinas endógenas.

Em vista disso, esse estudo se propõe a explorar o uso da reCG sobre a dinâmica folicular, ovulação e função luteal de ovinos em anestro sazonal e nas taxas de estro e prenhez durante o anestro sazonal e período de transição para estação reprodutiva. A hipótese proposta é que a reCG, na dose de 105 UI, pode promover o crescimento folicular final, causando ovulação e consequentemente induzindo taxas de estro e prenhez comparáveis ao uso de eCG purificado, quando usado em protocolos de sincronização durante o anestro sazonal e no período de transição em ovelhas.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Comparar a eficiência da gonadotrofina coriônica equina purificada (eCG) e recombinante (reCG) em protocolos de indução de estro e ovulação utilizando progesterona (P4) em fêmeas ovinas durante o período de anestro sazonal e transição.

2.2 Objetivos Específicos

- 1) Avaliar crescimento folicular e ovulação em ovelhas lanadas em região subtropical no período de anestro após tratamento com P4 ou P4 associada a administração de duas formulações de eCG;
- 2) Avaliar a função lútea em fêmeas ovinas lanadas em anestro tratadas apenas com P4 ou P4 associada a duas formulações de eCG, em comparação com fêmeas não tratadas;
- 3) Avaliar comportamento de estro e taxas de prenhez e concepção em ovelhas lanadas em região subtropical tratadas apenas com P4, P4+eCG ou P4+reCG utilizando monta natural nos períodos de transição para a estação reprodutiva.

3 Revisão de Literatura

3.1 Fisiologia reprodutiva da fêmea ovina

A fêmea ovina é descrita como um animal poliéstrico estacional, de modo que sua fisiologia reprodutiva possui caráter cíclico, marcada por intervalos de manifestações de estro a cada 17 ± 2 dias durante épocas de fotoperíodo negativo (Rosa e Bryant, 2003). Sua ciclicidade está relacionada com diversos fatores como raça, idade, categoria reprodutiva, latitude e condição corporal (Corner *et al.*, 2013); contudo, em regiões de maior latitude, a atividade reprodutiva dessa espécie é afetada negativamente com o aumento das horas de luz por dia, caracterizada pelo anestro sazonal (Goodman *et al.*, 2010; Nestor *et al.*, 2018). Em animais cíclicos, o ciclo estral é dividido em dois principais períodos: folicular e luteal, que se subdividem em proestro e estro, e metaestro e diestro, respectivamente.

A fisiologia reprodutiva é regulada por um complexo processo neuroendócrino com o envolvimento principal do hipotálamo, adeno-hipófise e os órgãos reprodutivos, ovários e útero. O GnRH, produzido pelo hipotálamo, é o hormônio condutor desse processo, atuando sobre os gonadotrófos da adenohipófise, que secretam as gonadotrofinas FSH e LH (Pawson e McNeilly, 2005). As gonadotrofinas são responsáveis pelo desenvolvimento folicular, ovulação e formação do corpo lúteo (CL) (Campbell, Dobson e Scaramuzzi, 1998), impactando na produção de hormônios esteroides sexuais, como estradiol (E₂) e a progesterona (P₄), pelas células foliculares e luteais, respectivamente (Evans *et al.*, 2000).

Por sua vez, esses esteroides sexuais também modulam a secreção de GnRH e gonadotrofinas (Campbell *et al.*, 1990). Apesar dos neurônios de GnRH não possuírem receptores para os hormônios esteroides, esses atuam indiretamente sobre essa liberação por meio de células intermediárias, com alguns estudos sugerindo o envolvimento das kisspeptinas nessa regulação em ovinos (Smith, 2009). A P₄ e o E₂, quando combinados, exercem *feedback* negativo sobre os pulsos de GnRH (Crowder e Nett, 1984; Pawson e McNeilly, 2005). O E₂, todavia, quando em

altas doses e em ambiente de baixa P4, causa *feedback* positivo sobre o pico de GnRH *feedback* positivo sobre o pico de GnRH (Smith et al., 2014; Nestor et al., 2018; Uenoyama et al., 2021).

O GnRH, por possuir uma meia vida curta (2 a 4 minutos), possui um padrão pulsátil dinâmico, cujas variações de frequência e amplitude têm efeitos distintos sobre a secreção das gonadotrofinas (Moenter *et al.*, 1991; Ortmann, Weiss e Diedrich, 2002). Pulsos de GnRH de baixa frequência estimulam FSH, enquanto o LH é estimulado por pulsos de alta frequência (Stamatiades e Kaiser, 2018). Ademais, Seekallu et al., (2010) sugerem a ação de um mecanismo extra independente de GnRH envolvido na estimulação de FSH em ovinos. Logo, o efeito inibitório sobre o GnRH está relacionado a uma diminuição proporcional de LH, mas em menor magnitude de FSH.

A presença de FSH, independente dos efeitos inibitórios sobre GnRH, é importante para garantir a emergência de folículos antrais principalmente em estágios iniciais (1 - 3 mm) (Seekallu *et al.*, 2010), que ocorre mesmo com níveis luteais (>1 ng/mL) de P4 (Baby e Bartlewski, 2011) e durante anestro sazonal (Bartlewski *et al.*, 1998). Apesar do FSH, quando administrado isoladamente em ovinos tratados com antagonista de GnRH, ser capaz de induzir o crescimento folicular até estágios pré-ovulatórios (>5 mm); na ausência de LH a produção de esteroides pelos folículos é alterada (Campbell, Dobson e Scaramuzzi, 1998). Dessa forma, enquanto o FSH é fundamental para emergência e crescimento folicular, sem folículos responsivos a LH não há maturação folicular final e ovulação.

Isso ocorre pois o aumento de E_2 , resultante do crescimento dos folículos antrais, é dependente da ação conjunta de LH e FSH. A síntese de estradiol é intensificada à medida que as células da teca e da granulosa são estimuladas por ambas as gonadotrofinas. O LH e FSH aumentam a expressão das enzimas CYP11A, 3β -HSD, CYP17 nas células da teca e CYP19 e 17β -HSD nas células da granulosa, respectivamente, permitindo a conversão de colesterol em androstenediona e, em sequência, em E_2 (Magoffin, 2005; Simpson *et al.*, 1994; Voss e Fortune, 1993). Todavia, dentre os folículos em crescimento, apenas alguns adquirirão características essenciais para a continuação do seu desenvolvimento, em especial o aumento da expressão de receptores de LH (Baird e Campbell, 1998).

Esse processo ocorre durante a fase folicular, que possui duração de aproximadamente dois dias e 24 a 36 horas para as etapas de proestro e estro,

respectivamente (Fabre-Nys e Martin, 1991). A fase de proestro inicia com a luteólise, com decorrente queda dos níveis de P4 e aumento dos níveis de LH. O aumento de LH contribui no crescimento e maturação dos folículos em seleção (3 – 4 mm) para os estágios de dominância (4 - 5 mm) e, posteriormente, pré-ovulatório (>5 mm) (Campbell *et al.*, 1999).

Em ovinos, a dominância folicular aparenta ser menos expressiva do que em outras espécies monovulatórias como em bovinos. Nesta espécie, de 1 a 4 folículos, provenientes tanto da última quanto da penúltima onda folicular, podem atingir estágio folicular final e ovularem em fêmeas prolíficas (Bartlewski *et al.*, 1999; Gibbons *et al.*, 1999). Outros componentes, como mutações genéticas e fatores raciais podem impactar ainda mais na prolificidade, promovendo a ovulação de múltiplos folículos por ciclo estral (Baird e Campbell, 1998). Dentre as mutações associadas ao aumento de ovulações mais conhecidas estão as alterações nos genes BMPR1B, BMP15 e GDF9, envolvidas na redução de proliferação e aumento da diferenciação das células da granulosa, de modo a antecipar a responsividade folicular ao LH (Garcia-Guerra *et al.*, 2018).

A fase de estro inicia com as alterações comportamentais provenientes do aumento de estradiol, em especial a aceitação da monta. Quando o E₂ produzido pelos folículos atinge seu ápice, associado à diminuição da P4 há o desencadeamento do pico de GnRH, o que por sua vez estimula o pico de LH (Scaramuzzi, Caldwell e Moor, 1970). A ligação do LH aos receptores nas células foliculares, ativa uma série de reações químicas, envolvendo inflamação, proteólise e alteração celular, que culminam na ovulação. A ovulação ocorre no final dessa fase cerca de 24 a 30 horas após o início do estro (Quirke, Hanrahan e Gosling, 1981; Whyman *et al.*, 1979). A duração e intensidade do estro são variáveis e independentes da ovulação (Saïd *et al.*, 2007; Zarazaga *et al.*, 2019), embora uma maior duração do estro esteja relacionada a maior ocorrência de ovulações múltiplas (Saïd *et al.*, 2007).

Em seguida, a etapa luteal compreende o período entre os processos de luteinização a início da luteólise, que possui duração média de 3 a 5 dias para a fase de metaestro e 7 a 10 dias para fase de diestro (Pugh *et al.*, 2020). A luteinização ocorre durante a fase de metaestro após ovulação, envolvendo desde a formação do CL até aquisição de função luteal (Pugh *et al.*, 2020). Nesse processo, as células foliculares, da granulosa e da teca se diferenciam em células luteais grandes e pequenas (ou paraluteais), respectivamente. Durante essa fase, o CL em formação

apresenta diâmetro entre 6 e 8 mm (Bartlewski, Beard e Rawlings, 1999) e produção de P4 inferior a 1 ng/mL (Gonzalez De Bulnes *et al.*, 2000).

Durante a fase de diestro as concentrações de P4 sobem a níveis luteais à medida que as células luteais grandes aumentam em tamanho e as células luteais pequenas aumentam em quantidade até o 12º e 8º dia após ovulação, respectivamente (Farin, Sawyer e Niswender, 1989). Ambas as células contribuem para o crescimento do CL, que permanece linear até o 12º dia do ciclo. Gonzalez De Bulnes *et al.* (2000) reportaram correlação significativa ($P < 0,05$) entre área luteal mensurada por ultrassonografia e concentração plasmática de P4 ao longo de todo o ciclo estral. Nesse mesmo estudo, também foram observados CLs cavitários em 33,3% das ovulações (5/15), mas que não diferiram em área luteal, concentração plasmática de P4 ou duração do ciclo estral para fêmeas com CL sem cavidade.

Ao longo da fase luteal também há a emergência de 3 a 4 ondas foliculares, com durações distintas. As elevações de FSH, responsáveis pelo desenvolvimento dos folículos antrais pequenos está correlacionado a P4 circulante, de modo que o intervalo entre os dois primeiros picos de FSH é maior do que entre os próximos picos (Baby e Bartlewski, 2011). Como mencionado anteriormente, os folículos das primeiras ondas não são capazes de atingir estágio final de maturação devido a presença do CL e altos níveis de P4. Logo, para que isso seja possível, é necessário que ocorra a luteólise no final desta fase.

A luteólise é um processo que envolve a interação entre o endométrio e o CL, que ocorre entre o 12º e o 13º dia após ovulação (Cooke e Ahmad, 1998). Além da P4, o CL também secreta ocitocina, sintetizada principalmente pelas células luteais grandes, que se liga nos receptores de ocitocina (OTR) do epitélio luminal endometrial e epitélio glandular ductal superficial no endométrio, sendo a principal fonte de prostaglandina (Gray *et al.*, 2000; Stormshak, 2003). Esses receptores são expressos em maior quantidade quando estimulados pelo E2 produzido pelos folículos antrais maiores (Fleming *et al.*, 2006; McCracken, Schramm e Okulicz, 1984). Já a P4 produzida pelo CL atua como depressor da expressão dos OTR, de forma que a expressão desse receptor não é detectada entre os dias 5 e 11 do ciclo (Spencer e Bazer, 2004). Contudo, a própria exposição contínua a progesterona por um período de 8 a 10 dias, dessensibiliza os receptores para P4 no útero, consequentemente aumentando os OTR e resultando na secreção de prostaglandina F2 alfa (PGF2 α) pelas glândulas endometriais (Spencer *et al.*, 1995). Em caso de gestação, é

necessário que o conceito se desenvolva suficientemente até esse período e consiga sinalizar sua presença por meio da produção de interferon tau, que suprime a expressão dos OTR (Spencer *et al.*, 1995).

3.1.1 Sazonalidade

Dentre as peculiaridades dos ovinos está a sazonalidade reprodutiva. Este é um fenômeno complexo que envolve alterações na atividade neuroendócrina reprodutiva, sendo regulado principalmente pelo fotoperíodo e pela resposta do sistema neuroendócrino aos sinais ambientais (Goodman *et al.*, 2010).

Em regiões de maiores latitudes, a secreção de GnRH é modulada pela duração das horas de luz solar. Esse sinal luminoso é transmitido para o sistema nervoso central por via retinohipotalâmica, influenciando a liberação de melatonina pela glândula pineal. A melatonina atua sobre os neurônios do GnRH por meio de um complexo sistema neuro-endócrino com o envolvimento de diferentes neuromediadores (Chemineau *et al.*, 2010). Uma característica importante observada durante o anestro sazonal é o maior *feedback* negativo do E₂ sobre a frequência dos pulsos de GnRH e LH (Havern, Whisnant e Goodman, 1994; Karsch *et al.*, 1993; Legan e Karsch, 1980). Alguns estudos sugerem que essa regulação pelo E₂ ocorre por meio da estimulação de neurônios dopaminérgicos A15, cuja secreção de dopamina atua nos receptores D2 de dopamina nas células de Kisspeptina/neurocinina B/dinorfina (KNDy), que suprimem a liberação de kisspeptinas, inibindo a frequência de pulso do GnRH (Goodman *et al.*, 2010; Weems *et al.*, 2017).

Durante o anestro, apesar dos pulsos de menor frequência de GnRH e LH; o crescimento e a regressão folicular continuam (Souza, Campbell e Baird, 1997), visto que o FSH se mantém em níveis semelhantes aos da estação reprodutiva. Outro hormônio que se encontra com produção alterada no anestro é a P4, que diferentemente do estradiol, se mantém em níveis irrisórios durante esse período (Souza, Campbell e Baird, 1996). Ainda assim, os folículos dessas ondas demonstram serem funcionais, responsivos as gonadotrofinas e capazes de ovulação se estimulados com gonadotrofinas exógenas (Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2020).

À medida que o período de estação reprodutiva se aproxima, com o estímulo de diminuição das horas de luz diárias, observa-se aumento gradual na secreção

tônica de LH, acompanhado de breves elevações nos níveis de P4 e E₂ (l'Anson e Legan, 1988). Estima-se que esse período de transição possui duração média de 1 a 4 semanas antes da retomada do primeiro ciclo estral (l'Anson e Legan, 1988). Ademais, ovulações silenciosas, sem apresentação de comportamentos estral, podem ocorrer no início ou no fim da estação reprodutiva (Rosa e Bryant, 2003).

3.2 Protocolos hormonais

O uso de protocolos hormonais na reprodução de ovinos tem se consolidado como estratégia para incrementar a eficiência reprodutiva. Durante a estação reprodutiva, a principal função dos protocolos é sincronizar o ciclo estral, otimizando o manejo reprodutivo e permitindo a realização de inseminação artificial em tempo fixo ou a monta natural em períodos mais restritos (Rosasco *et al.*, 2019). Em ovelhas cíclicas é possível o uso de protocolos baseados em PGF2 α , nos quais são administradas duas injeções de análogos sintéticos de PGF2 α em intervalo de 9 a 14 dias (Fierro *et al.*, 2013). Ainda assim, protocolos a base de PGF2 α tendem a apresentar menor prenhez na IATF do que quando utilizados protocolos com P4 e eCG (Olivera-Muzante *et al.*, 2011; Viñoles *et al.*, 2011).

Já para indução do estro e ovulação durante o período de anestro e transição, são utilizados protocolos com base no uso de progestágenos e gonadotrofinas. Esses protocolos iniciam com a administração de P4 ou análogos por um período de 6 a 14 dias (Ungerfeld e Rubianes, 2002), normalmente administrada por meio de dispositivos intravaginais, embora alguns estudos já utilizaram experimentalmente P4 pela via subcutânea (Blaschi *et al.*, 2014) ou intramuscular (Simões *et al.*, 2024). O *priming* com P4 anterior a ovulação é importante, principalmente durante esse período, por modular o *feedback* de E₂ sobre o hipotálamo, estimulando a produção de GnRH necessária para ovulação (Caraty e Skinner, 1999; Fitzgerald *et al.*, 1985), além de aumentar o número de folículos maiores, responsivos ao LH (Leyva, Buckrell e Walton, 1998).

No caso de protocolos com menos de 12 dias, a retirada do dispositivo é seguida pela aplicação de prostaglandinas, que induzem a luteólise e provocam o início do estro. Essa aplicação faz-se necessária nesses casos, pelo tempo que naturalmente ocorre a luteólise nos ovinos, como mencionado anteriormente. Originalmente, o CL ovino era considerado refratário à prostaglandina a partir do 5º

dia pós-ovulação (Acritopoulou e Haresign, 1980); todavia, estudos mais recentes sugerem que essa refração se limite apenas aos primeiros dois dias após ovulação (Contreras-Solis *et al.*, 2009; Rubianes, Menchaca e Carbajal, 2003).

Ainda assim, em estudos não publicados elaborados pelo nosso grupo, a exposição de P4 por três dias, durante o período de transição, influenciou negativamente a taxa de estro, quando comparado com exposição por oito dias. Esses dados sugerem que durante o anestro e transição para estação reprodutiva, é necessário um maior período de *priming* de P4 para modulação do hipotálamo. Por sua vez, em um estudo elaborado por Ungerfeld e Rubianes (2002), *priming* de P4 por seis dias fora da estação reprodutiva não demonstrou diferença significativa na taxa de concepção quando comparado com uso de P4 por 14 dias. Do mesmo modo, os autores não encontraram diferenças após utilização de diferentes fontes de progesterona, como esponjas de acetato de medroxiprogesterona (MAP) ou fluorogestona (FGA) ou dispositivo comercial de P4 (CIDR).

Ademais, durante o anestro e transição, a eCG se torna essencial para aumentar as taxas de ovulação e prenhez. De acordo com as observações de Dias *et al.* (2020), durante o anestro, em protocolo com uso de DIV de P4 por 12 dias, a aplicação de eCG no momento da retirada do DIV (D12) é capaz de aumentar o diâmetro folicular 36 e 48 horas após retirada do DIV, promover ovulação e aumentar as taxas de prenhez. Já durante a transição para o anestro, o estudo de Zeleke *et al.* (2005) apontou que o uso de 300UI de eCG no momento da retirada do DIV de P4 (D14) foi capaz de impactar significativamente ($P < 0,05$) nas taxas de prenhez, parição e fecundidade.

Contudo, nos últimos anos tem se intensificado, particularmente na Europa, o debate sobre a substituição do uso de eCG purificada (Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2020), principalmente em resposta a um possível comprometimento do bem-estar animal pela forma de obtenção da eCG, que requer coleta de sangue frequente das éguas prenhes (Vilanova *et al.*, 2019). Algumas alternativas a eCG já foram investigadas, tais como o uso do FSH, do GnRH e da gonadotrofina coriônica humana (hCG), porém, sem resposta comparável ao uso do eCG em animais em anestro, ou para IATF.

A eCG apresenta ação semelhante ao LH e, em maior intensidade, ao FSH (Murphy, 2012; Stewart e Allen, 1981). Contudo, quando utilizado FSH, associado a BE ou GnRH, em substituição a eCG durante o anestro sazonal, a concentração

plasmática de progesterona oito dias após protocolo foi inferior nos grupos FSH+BE e FSH+GnRH, em comparação ao grupo eCG, indicando que não foram eficientes em induzir ovulações síncronas (Silveira *et al.*, 2021).

Em relação a hCG, embora essa seja uma gonadotrofina com estrutura semelhante a eCG, possui maior afinidade pelo receptor de LH (Cole, 2009). Apesar do hCG possuir capacidade de sincronizar ovulação quando utilizado nos protocolos, há menor ocorrência de estro e redução da fertilidade de ovinos submetidos a esse tratamento (Dias *et al.*, 2018). No estudo de Bruno-Galarraga *et al.* (2021), essa redução de fertilidade foi associada a alterações do padrão de crescimento folicular e ovulação, sendo observado maior ocorrência de folículos luteinizados e cistos foliculares em fêmeas tratadas com 500 UI de hCG, em comparação às tratadas com 400 UI de eCG.

O GnRH, embora possa ser utilizado em protocolos de sincronização de estro como indutor da ovulação, em substituição ao uso da eCG durante a estação reprodutiva, sua eficácia é limitada durante o anestro sazonal (Santos-Jimenez *et al.*, 2020). Além disso, embora o GnRH seja eficaz na sincronização das ovulações, Maggi *et al.*, (2024) observaram taxa de concepção inferior à obtida com o uso de eCG, quando empregado em protocolos de inseminação artificial mesmo fora do período de anestro.

3.3 Proteínas recombinantes

A crescente demanda pela produção em larga escala de substâncias biológicas, impulsionou a busca por métodos alternativos de produção, que dispensem a necessidade de extração do material de animais e humanos. Os avanços na área de genética nas últimas décadas – desde a descoberta da estrutura e função do ácido desoxirribonucleico (DNA) (Watson e Crick, 1953), até o desenvolvimento das endonucleases de restrição específicas (Loenen *et al.*, 2014) da transcriptase reversa e das técnicas de clonagem e sequenciamento (Heather e Chain, 2016)– possibilitaram o uso de tecnologias de DNA recombinante, abrindo novas perspectivas para a produção dessas substâncias.

O DNA recombinante é uma molécula híbrida, composta por um vetor e o fragmento da sequência de interesse para replicação, denominado inserto (Khan *et al.*, 2016). Essa tecnologia tem como objetivo a inclusão do inserto no genoma de

organismos vivos (Khan *et al.*, 2016), possibilitando a produção de hormônios, vacinas, proteínas terapêuticas e anticorpos monoclonais em alta escala e elevado grau de pureza (Walsh, 2005).

Após isolamento ou sintetização química dos insertos, esses são incorporados ao vetor, que atuam como transportadores para a sequência de interesse. Os plasmídeos, pequenas moléculas de DNA circular encontradas em uma variedade de microorganismos, em especial nas bactérias, são os vetores mais utilizados, se tornando uma ferramenta essencial desde os anos 70 (Cohen *et al.*, 1973). Para inserção do DNA de interesse no vetor, são utilizadas enzimas de restrição, proteínas capazes de cortar o DNA em regiões específicas por hidrolização da ligação fosfodiéster que une os nucleotídeos dentro do DNA (Loenen *et al.*, 2014; Smith e Welcox, 1970). As enzimas de restrição criam extremidades coesivas, tanto no DNA de interesse quanto no vetor. Para ligação da sequência de interesse ao vetor, utiliza-se a DNA ligase, uma enzima que catalisa a formação de ligações fosfodiéster entre as cadeias de nucleotídeos, resultando no DNA recombinante (Lehman, 1974).

A replicação do DNA recombinante ocorre dentro das células hospedeiras, onde o DNA recombinante é integrado ao genoma e utilizado para a síntese de proteínas pelo maquinário celular. Tanto células procarióticas quanto eucarióticas, podem servir como células hospedeiras, sendo os métodos de introdução do DNA recombinante mais utilizados para cada caso a transformação (Dower, Miller e Ragsdale, 1988) e a transfecção (Pham, Kamen e Durocher, 2006), respectivamente. As bactérias *Escherichia coli* são comumente utilizadas nesse contexto, por apresentarem crescimento rápido e relativamente simples (Sivashanmugam *et al.*, 2009), além de uma alta taxa de transformação por eletroporação (Dower, Miller e Ragsdale, 1988). No entanto, apenas as células eucarióticas conseguem realizar modificações pós-traducionais, como a glicosilação (Durocher e Butler, 2009).

A glicosilação é o processo enzimático de ligação de carboidratos complexos, compostos pela união de monossacarídeos, às proteínas, formando glicoproteínas. A porção carboidrato dos glicoconjugados, denominado glicanos, podem auxiliar em diversas funções como estabilização, solubilidade, redução da imunogenicidade e em atividades biológicas dessas proteínas (Zhou e Qiu, 2019). Esse processo também permite a manipulação da meia-vida do produto originado pelo DNA recombinante (Ashwell and Harford, 1982; Erbayraktar *et al.*, 2003).

Dessa forma, para produção de proteínas recombinantes que necessitam de modificações pós-traducionais para seu melhor desempenho, sistemas com células eucarióticas se tornam essenciais (Durocher e Butler, 2009). As células de ovário de hamster chinês (CHO) são as principais linhagens celulares de mamíferos utilizadas para produção de proteínas recombinantes, devido a sua ampla caracterização, capacidade de crescer em meio de suspensão livre de soro fetal bovino e com composição química definida (Nelson *et al.*, 2023) e de produzir proteínas recombinantes em larga escala, atingindo níveis de produção de gramas por litros (g/L) (Wurm, 2004).

3.3.1 eCG purificada e recombinante

A eCG é uma gonadotrofina secretada pelos cálices endometriais de éguas prenhes. Esses cálices são estruturas especializadas que se desenvolvem no endométrio da égua durante a gestação, começando por volta dos dias 36 a 38 (Allen, Hamilton e Moor, 1973). Os cálices endometriais são formados pela invasão do anel coriônico, uma estrutura placentária originada das células trofoblásticas do embrião (Antczak *et al.*, 2013). A presença de eCG pode ser detectada na circulação sanguínea a partir do dia 40 da gestação (Amoroso *et al.*, 1948), com níveis que atingem o pico entre os dias 50 e 80 (Estradé *et al.*, 2016). Embora a produção e os níveis de eCG possam variar entre as fêmeas, os cálices endometriais geralmente persistem até os dias 100 a 120 de gestação, quando se desprendem da superfície endometrial (Wooding *et al.*, 2001).

A eCG é composta por duas subunidades: uma cadeia alfa (96 aminoácidos) e uma cadeia beta (149 aminoácidos). A cadeia alfa é comum entre diversos hormônios glicoproteicos, como FSH, LH e hCG, apresentando variações mínimas. Por outro lado, a cadeia beta é fundamental para a atividade biológica e a especificidade da eCG, sendo sua estrutura responsável pela capacidade de ativar os receptores tanto de FSH quanto de LH. Ainda assim, as atividades de LH e FSH da eCG são perdidas quando ocorre a dissociação das subunidades e restabelecidas após a recombinação, demonstrando que essas funções estão intrinsecamente associadas à molécula de eCG, como observado por Papkoff (1974).

Em relação à meia-vida, a eCG apresenta maior duração na circulação quando comparada a outras gonadotrofinas. Em ratos, a eCG aparenta ter uma meia vida de

aproximadamente 6 horas (Aggarwal e Papkoff, 1985), enquanto em ovinos essa meia vida chega a $21,2 \pm 1,1$ horas (McIntosh, Moor e Allen, 1975). Isso se deve principalmente a grandes quantidades de carboidratos ligados à sua molécula, que representam cerca de 45% do peso molecular da eCG (Villaraza *et al.*, 2020). Em especial, os N-glicanos contendo ácido siálico, desempenham papel crucial na estabilização do hormônio na corrente sanguínea, ao evitar sua rápida eliminação hepática (Murphy e Martinuk, 1991). Esta glicosilação não só prolonga a meia-vida da eCG, mas também modula a atividade biológica nos tecidos-alvo, sendo que o tratamento com neuraminidase, responsável pela remoção do ácido siálico, reduz significativamente a meia-vida da molécula (Martinuk *et al.*, 1991).

Até recentemente os únicos produtos comerciais de eCG disponíveis no mercado consistiam na eCG parcialmente purificada proveniente do sangue de éguas prenhes. Esses produtos, apesar de eficientes, apresentavam desvantagens como a produção variável de eCG pelas éguas prenhes (Estradé *et al.*, 2016), o processo de liofilização, que é uma possível fonte de degradação (Wang, 2000), e diferenças no perfil físico-químico dos lotes de eCG comerciais (Alvarez *et al.*, 2017; Rodríguez *et al.*, 2023). Ademais, movimentos em prol do bem-estar animal incentivam a busca por moléculas semelhantes a eCG que não necessitem da coleta de sangue de éguas prenhes (Gonzalez-Bulnes *et al.*, 2020; Vilanova *et al.*, 2019). Em 2024 foi disponibilizado no Brasil uma formulação comercial de eCG recombinante (reCG; Foli-Rec®, CEVA, Brasil), produzido por meio de tecnologia de DNA recombinante em suspensão de células de ovário de hamster chinês (Villaraza *et al.*, 2020).

Em um estudo conduzido por Rodríguez *et al.*, (2023), foram observadas algumas diferenças na estrutura da reCG em comparação com formulações de eCG purificada. Nesse estudo, a reCG apresentou menor massa molecular (45 kDa) em comparação com a eCG purificada (66 kDa) por cromatografia por exclusão de tamanho (SEC-HPLC). Embora ambas as moléculas tenham apresentado estrutura básica semelhante, demonstraram padrão de glicosilação distinto, com a reCG possuindo quantidade de ácido siálico significativamente menor, que pode estar relacionada a uma menor meia-vida da reCG (Villaraza *et al.*, 2020). Contudo, os autores também mencionam que menor quantidade de ácido siálico poderia resultar em maior afinidade pelos receptores FSH/LH devido ao menor impedimento estérico, por haver menos grupos volumosos na molécula, e menor repulsão de cargas, uma vez que o ácido siálico possui carga negativa.

Apesar das diferenças estruturais e químicas entre as moléculas, a reCG demonstrou atividade biológica efetiva *in vivo*. Em roedores, 5 UI de reCG foi capaz de promover superovulação, com número de oócitos/zigotos por fêmea similar a 5 UI de eCG purificada e superior ao controle sem gonadotrofina exógena (Crispo *et al.*, 2021). A taxa de desenvolvimento embrionário também foi maior ($P < 0,05$) nos grupos tratamento, reCG (48,9%) e eCG (47,2%), do que no grupo controle (29,7%).

Em bovinos, Cattaneo *et al.*, (2024) avaliaram o uso da reCG em diferentes doses na retirada do DIV de P4 em bovinos para protocolos de IATF com E2/P4. Nesse estudo, foi observado taxa de estro e prenhez superior com o uso de 105 UI e 140 UI de reCG em comparação com o controle sem gonadotrofina exógena, em vacas multíparas *Bos taurus*. Em vacas *Bos indicus*, o uso de 84 UI de reCG ou 300 UI de eCG demonstraram ser mais eficientes em aumentar a taxa de prenhez do que 105 UI de reCG, sugerindo uma maior sensibilidade ao reCG nessa subespécie.

Em estudo semelhante de Villaraza *et al.* (2020), foi observado que a administração de 140 UI de reCG em vacas *Bos taurus* x *Bos indicus* em anestro pós-parto foi capaz de aumentar as taxas de ovulação em relação ao controle, não apresentando diferença em relação ao uso de 400 UI de eCG. Quando avaliado a taxa de prenhez em um total de 755 animais, essa foi influenciada positivamente pelo uso de 105 UI (54%), 122 UI (57%), 140 UI de reCG (58%) ou 400 UI eCG (58%) em relação ao controle (41%). Apesar dos relatos publicados do uso de reCG em bovinos, não temos conhecimento do seu uso em ovinos. Acredita-se que, em virtude da eficiência similar observada com o uso da eCG purificada em ambas as espécies bovina e ovina, deve se observar efeitos similar com o uso do reCG em ovinos.

4 Artigo

Recombinant equine chorionic gonadotropin for estrus and ovulation induction in ewes: effects on follicular growth, luteal function and fertility

Julia Nobre Blank Camozzato, Gabriel Maggi, Fabiane Pereira de Moraes, César Andrei Marques da Silveira, Fernando Caetano de Oliveira, Monique Tomazele Rovani, Rogério Ferreira, Thomaz Lucia Jr, Felipe Zandonadi Brandão, Arnaldo Diniz Vieira, Bernardo Garziera Gasperin

Submetido à revista Theriogenology

Recombinant equine chorionic gonadotropin for estrus and ovulation induction in ewes: effects on follicular growth, luteal function and fertility

Julia Nobre Blank Camozzato¹(<https://orcid.org/0009-0005-2954-5084>), Gabriel Maggi¹(<https://orcid.org/0009-0006-2786-824X>), Fabiane Pereira de Moraes¹(<https://orcid.org/0000-0003-2502-4108>), César Andrei Marques da Silveira²(<https://orcid.org/0009-0000-8845-4098>) Fernando Caetano de Oliveira²(<https://orcid.org/0000-0002-5191-9901>), Monique Tomazele Rovani²(<https://orcid.org/0000-0001-8257-3635>), Rogério Ferreira³(<https://orcid.org/0000-0003-1349-7821>), Thomaz Lucia Jr.¹(<https://orcid.org/0000-0002-6609-7023>), Felipe Zandonadi Brandão⁴(<https://orcid.org/0000-0003-4027-5562>), Arnaldo Diniz Vieira¹(<https://orcid.org/0000-0001-6410-2354>), Bernardo Garziera Gasperin¹(<https://orcid.org/0000-0002-3715-2345>).

¹ FiBRA – Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, RS, Brasil;

² Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil;

³ Universidade do Estado de Santa Catarina, Chapecó, SC, Brasil.

⁴ Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, Brasil.

*Corresponding author's present address: Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Av Eliseu Maciel s/n, Campus Universitário, CEP96160-000, Capão do Leão, RS, Brasil, bernardo.gasperin@ufpel.edu.br

Abstract

This study aimed to evaluate the effects of conventional purified eCG and recombinant eCG (reCG) on fertility in ewes during anestrus and transition to breeding season. In Experiment 1, 27 ewes received intravaginal devices (IVD) with progesterone (P4) for 7 days and were

allocated to control, eCG or reCG groups. At IVD removal, all animals received 250 µg cloprostenol, while eCG and reCG groups also received 400 IU eCG and 105 IU reCG, respectively. After IVD removal, follicular diameter was evaluated at 24, 36 and 48 h and serum P4 levels were measured at the 7th and 12th d. In Experiment 2, 441 ewes were allocated to the same groups described in Experiment 1, to evaluate estrus, pregnancy, and conception rates after natural mating (NM). In Experiment 1, eCG (1.07 ± 0.27 mm/day; 100%) and reCG (1.05 ± 0.27 mm/day; 88.9%) treatment increased follicular growth ($P < 0.05$) and ovulation rates ($P < 0.001$) in comparison to control (0.01 ± 0.27 mm/day; 0% ovulation). Serum P4 concentrations of animals with a single CL after treatment (eCG: n=5; reCG: n=6) were higher in eCG than in reCG group ($P < 0.001$). In Experiment 2, the estrus rate was higher in eCG (93.45%) than in control (76.32%) ($P < 0.001$), with reCG showing intermediate results (87.58%). No effect of treatments was observed for pregnancy ($P = 0.82$) and conception rates ($P = 0.72$). In conclusion, reCG effectively promotes follicular growth and induces ovulation in anestrus ewes. During the transition to the breeding season, both reCG and eCG had no effect on pregnancy and conception rates compared to treatment with P4.

Keywords: Sheep; pregnant mare serum gonadotropin; seasonality; anoestrus; reCG

Introduction

Seasonal anestrus in ewes is a limiting factor in sheep farming, especially in regions with higher latitudes. This characteristic is challenging for producing lambs throughout the year and, consequently, for intensifying production. Reproductive strategies such as flushing [1], genetic selection [2,3], sociosexual biostimulation [4], artificial light management [5,6] and hormone therapy [7] can be used to overcome this seasonal anestrus. Among such alternatives, hormone therapy is the most widely used method for achieving precise and synchronized estrus and ovulation within a shorter timeframe [8].

During seasonal anestrus, reduced melatonin concentrations on the hypothalamic-pituitary axis, due to the increase in daily light hours, results in decreased pulsatility of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and, consequently, of luteinizing hormone (LH) [9,10]. Thus, protocols for sheep during out-of-breeding season or transition period, have been based on progesterone (P4) exposure from 6 to 14 days, followed by equine chorionic gonadotrophin (eCG) treatment at P4 withdrawal [7,11,12]

During P4 treatment, LH secretion is inhibited [13]. P4 priming is also known for modulating the feedback of estradiol on GnRH secretion, from inhibition to stimulation [12,14,15], and thus improving the growth of preovulatory follicles due to increased GnRH/LH pulses [16], as well as estrus and pregnancy rates [17] in anestrus ewes. Furthermore, combination with eCG becomes essential in seasonal anestrus due to its similar effects to follicle-stimulating hormone (FSH) and LH, binding to the respective receptors in follicular cells, promoting final follicular growth and overcoming the lack of gonadotropins during this period [18].

However, due to animal welfare concerns, some countries aim to abolish the use of purified eCG [19]. This hormone is secreted by the endometrial cups of pregnant mares and is present in high concentrations between 50 and 80 days of gestation [20]. Thus, to obtain eCG, blood is collected weekly from pregnant mares [21]. Several alternatives to the use of eCG have been investigated, such as FSH, GnRH, and human chorionic gonadotropin (hCG). Nevertheless, none was as efficient as eCG for use in seasonal anestrus [22–24] or in timed artificial insemination (TAI) [25].

Recently, a new formulation of recombinant eCG (reCG) has been released for commercial use in cattle, produced by recombinant DNA technology in Chinese hamster ovary cell suspension [26]. Despite some structural and chemical differences between the eCG and reCG molecules [27], reCG has effective biological activity in vivo [28]. When used in TAI

protocols in cattle, reCG increased ovulation and pregnancy rates compared to untreated-control cows, being as efficient as purified eCG [26,29].

Therefore, this study aims to compare the effects of purified (eCG) and reCG on follicular dynamics, ovulation, luteal function, estrus expression and fertility in sheep outside the reproductive season. We hypothesize that reCG can promote final follicular growth, inducing estrus, ovulation, luteinization and, consequently, pregnancy rates comparable to those obtained with the use of purified eCG, during seasonal anestrus and the transition period.

Materials and Methods

Ethical aspects

All procedures were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals from Federal University of Pelotas (CEUA/UFPel nº 23110.006185), all animals were provided with water and pasture ad libitum.

Experiment 1: Follicular growth, ovulation, and luteal function

This study was performed in Southern Brazil, during early September, late winter to early spring, outside the breeding season in the southern hemisphere (31.8° S, 52.5° W)[30]. Twenty-seven crossbred Corriedale ewes, older than 12 months of age, with mean body condition score (BCS) of 2 ± 0.07 (1–5 scale) and average weight of 45.2 ± 5.0 kg, were used. Anestrus was confirmed in all the ewes by the absence of CL on ultrasound evaluation and by P4 concentration below 1 ng/mL on D0.

On D0, all ewes received an intravaginal device (IVD) containing 0.36g of progesterone (P4; Primer-PR, Agener União, Brazil), which was maintained for 7 days. On D7, all animals were treated 250 µg sodium cloprostenol (PGF; Estron; Agener União, Brazil) and randomly allocated to one of three groups: control (n=9), which received 2 ml of saline solution (0.9%

NaCl; placebo); eCG (n=9), which received 400 IU eCG (SincroeCG Ourofino, Brazil) and reCG (n=9), which received 105 IU of reCG (FOLI-REC, Ceva, Brazil). All treatments were administered via i.m.

Follicular dynamics assessments were performed by transrectal ultrasound 24, 36 and 48 h after IVD removal, with a linear transrectal transducer with a 7.5-MHz frequency (SonoScape E2V, Shenzhen, China). All follicles larger than 2 mm were mapped and the largest follicles were measured using the ultrasound's measurement feature.

Ovulation and luteal characteristics were assessed 7 days after IVD removal using transrectal color Doppler. Short video clips were recorded in color-flow mode of each ovary of all animals for subsequent blind-analyses using ImageJ software (version 1.54p). The best frame was chosen, considering a better representation of the vascularization, avoiding possible overlap with blood vessels. The image scale was adjusted using the ultrasound scale as a reference (analyze > set scale), considering pixels/mm as the unit of measurement. The CL area was delimited using selection brush tool and any cavity was subtracted from the area calculation. The selection was analyzed (analyze > measure) to evaluate the area (mm²), standard deviation and area fraction (%) (analyze > set measurements) and then saved as a region of interest (ROI).

The blood perfusion of CL was considered as the percentage of colored pixels within the CL area. Therefore, to estimate blood perfusion, the image was duplicated (image > duplicate) and converted to an 8-bit format (image > type > 8-bit). The duplicated image, in greyscale, was subtracted from the original image using the image calculator tool (process > image calculator > subtract). The resulting image was also converted to an 8-bit format (image > type > 8-bit) and the threshold was adjusted with the “auto” option (image > adjust > threshold). The selection saved with the ROI manager was applied to current image and analyzed as the percentage of colored pixels within the selected area (analyze > measure).

The serum P4 concentrations 7 and 12 d after IVD removal was used to evaluate the luteal function. Blood samples were collected from the jugular vein by venipuncture, using vacuum tubes. The samples were centrifugation at 1,000 x g for five minutes and serum was stored at -20°C until analysis, which was performed by a chemiluminescence assay (Elecsys Progesteron III Cobas Assay, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany; REF 07092539), with intra-assay coefficient of variation of 3.6% and sensitivity of 0.2 ng/mL. Only ewes with a single CL on day 7 were considered for serum P4 comparison.

Experiment 2: Effect of reCG on estrus, pregnancy and conception rate by natural mating

To evaluate the effects of reCG on estrus and pregnancy rate, a total of 441 ewes (control=117; eCG=170; reCG=154) from five commercial farms (30.5o S, 52.7o W) were used. The protocol used on all farms was based on Experiment 1, slight changes in protocol length were made, to allow the same ram:ewes proportion (1:15). Therefore, the duration of progesterone exposure was 5, 7 or 9 days.

In all farms, ewes were subjected to natural mating (NM). Rams previously approved in the breeding soundness evaluation [31] were kept together with the females on a proportion of 1:15 for 5 days after IVD removal. Rams had their chest painted to identify ewes presenting behavioral estrus and matings. Pregnancy was diagnosed by embryo detection 25 to 30 days after rams' removal, using a B-mode ultrasound, with 7.5-MHz linear transrectal transducer (SonoScape E2V, Shenzhen, China).

Hampshire Down (n=75; control=15, eCG=30, and reCG=30) and Polwarth ewes (n=53; control=10, eCG=21, and reCG=22) with average BCS of 2.81 ± 0.65 and 2.23 ± 0.48 , respectively, were treated during early December (farm 1). During late December to early January, one hundred and twenty-four Hampshire Down ewes from farm 2 (n=81; control=20, eCG=32, reCG=29) and 3 (n=43; control=13, eCG=20, reCG=10) with mean BCS of 3.45 ± 0.42

and 2.78 ± 0.35 , respectively, received the protocol. In farm 4, a total of one hundred and seven Texel crossbreed ewes were used ($n=107$; control=32, eCG=38, reCG=37) with mean 2.37 ± 0.45 BCS during early to mid-January. At the same time, in farm 5, Ile de France ($n=24$; control=7, eCG=11, reCG=6) and Texel crossbreed ewes ($n=58$; control=20, eCG=18, reCG=20) with average BCS of 2.67 ± 0.58 and 2.46 ± 0.55 , respectively, were evaluated.

Statistical analysis

The JMP18 software was used, considering a 5% significance level. A P value between 0.05 and 0.1 was considered as a tendency. After checking normality using the Shapiro-Wilk test, outliers were removed. The follicular diameter at different time-points was compared among groups by two-way ANOVA, followed by Tukey's HSD test. Follicular size at 48 h, follicular growth in 24 h and the number of CLs were assessed by analysis of variance (ANOVA), with comparison of means using the Tukey test. The ovulation, estrus, pregnancy and conception rates were evaluated using logistic regression considering the effect of group, farm, P4 treatment duration and breed. The Wilcoxon signed rank test for paired non-parametric data was used to compare the CL function between ewes that ovulated and presented only one CL on d 7, considering serum P4 concentrations on D7 and D12 after IVD removal. Results were presented as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM) or as median [minimum–maximum] for parametric and non-parametric data, respectively.

Results

Experiment 1

No significant effect of treatment on follicular diameter was observed at 24 h ($P=0.49$) and 36 h ($P=0.24$) after IVD removal. At 48 h, eCG-treated ewes presented greater follicular diameter compared to control ($P \leq 0.05$), whereas reCG-treated ewes did not differ from other

groups (Fig. 1A; control: 3.98 ± 0.23 mm; eCG: 5.22 ± 0.23 mm; and reCG: 4.8 ± 0.23 mm). Follicle growth rate between first (24 h) and last (48 h) evaluation was greater in eCG (1.07 ± 0.27 mm/day) and reCG (1.05 ± 0.27 mm/day) than in control (0.01 ± 0.27 mm/day) ($P < 0.05$; Fig. 1B).

The ovulation rate was lower in control (0%; 0/9) compared to eCG (100%; 9/9) and reCG (88.9%; 8/9) ($P < 0.001$), which did not differ ($P > 0.05$) from each other (Fig. 2). Ewes with multiple ovulations were observed in both treatment groups: 44.44% (4/9) in eCG; and 25% (2/8), in reCG.

Luteal morphology, CL area (mm²) (Fig. 3A) and perfusion (%) (Fig. 3B) did not differ between eCG (56.62 ± 9.86 mm²; $13.6 \pm 6.24\%$) and reCG (55.58 ± 9.89 mm²; $10.66 \pm 3.67\%$) groups 7 days after IVD removal.

Serum P4 concentrations (ng/mL) 7 and 12 days after IVD removal were different between treatments ($P < 0.0001$) and day of evaluation ($P = 0.0019$). On day 7, all ewes (9/9) from control group showed serum P4 below luteal levels (< 1 ng/mL). However, on day 12 only six control ewes (6/9) still had subluteal levels of P4. In the treatment groups, only one ewe from the reCG group (1/9), which did not have a CL on day 7, exhibited subluteal P4 levels on both days 7 and 12. Considering only animals with single ovulations and one CL at D7, eCG-treated ewes had greater P4 concentrations ($n = 5$; D7 = 6.8 [3.76 – 11.16] ng/mL; D12 = 8.6 [4.94 – 14.55] ng/mL) than reCG-treated ewes ($n = 6$; D7 = 3.01 [2.84 – 4.9] ng/mL; D12 = 4.36 [3.35 – 6.18] ng/mL) (Fig. 4).

Experiment 2

The estrus rate was higher in ewes treated with eCG (93.45%) compared to control (76.32%) ($P < 0.001$). The estrus rate in ewes treated with reCG (87.58%) did not differ from those in eCG or control groups. Pregnancy ($P = 0.82$) and conception rate ($P = 0.72$) were not

affected by treatments. A significant effect of the farm was observed for both pregnancy ($P < 0.01$) and conception rates ($P = 0.02$). The BCS also presented a significant effect on reproductive outcome. Ewes with $BCS > 2.5$ had higher pregnancy ($P = 0.03$) and tended to have higher conception rates ($P = 0.058$) than those with $BCS \leq 2.5$. The P4 duration impacted the estrus rate ($P < 0.01$), with ewes exposed to P4 during 9 d presenting lower estrus rate compared to those exposed for 5 or 7 d, but with no effect on pregnancy ($P = 0.37$) and conception rates ($P = 0.73$; Tab.1).

Discussion

The present study evaluated, for the first time, the effects of reCG on follicular growth, luteal function and fertility in ewes during anestrus and the transition to the breeding season. The hypothesis that administration of 105 IU reCG promotes final follicular growth and ovulation, estrus, pregnancy and conception rates comparable to the use of purified eCG during seasonal anestrus and transition period in sheep was confirmed. However, since the fertility trial was performed during the transition period, the effect of both eCG treatments on fertility was likely underestimated. The fact that in experiment 1, during deep anestrus, there was no ovulation when only P4 was administered, while 90% of eCG-treated ewes ovulated, clearly indicates that dramatic effects of eCG treatment on fertility would be observed during anestrus. However, in Southern Brazil, most sheep farmers are not interested in getting ewes pregnant during that period because lambing during summer is associated with lower lamb productive performance [32], and with a dramatic increase in the incidence of cutaneous myiasis [33] in both lambs and ewes.

In this study, the ovarian dynamics evaluation during anestrus season revealed that P4 in association with PGF (control group) was unable to stimulate follicular growth beyond 4 mm at 48h after IVD removal. Those ewes also presented no ovulation, as evidenced by the lack of

CL on day 7 and by serum P4 concentrations below the luteal threshold (1 ng/mL) in all control animals. However, P4 treatment associated with administration of either 400 IU eCG or 105 IU reCG at IVD removal resulted in higher follicular growth between 24h and 48h after treatment and ovulation in nearly all animals. As already evidenced by others, and in agreement with the above-mentioned results, eCG treatment is essential during the anestrus season to improve fertility [34,35], due to its LH and FSH-like effects [36] that supply the lack of LH during this period [37].

Although CL area and blood perfusion were similar in reCG and eCG groups, eCG treated ewes presented higher serum P4 concentrations than reCG. Previous studies demonstrate that eCG has a positive impact on luteal function in ruminants [38,39], which may be due to its effects on follicular growth [40] or directly on luteal cells [36]. In this case, the lower serum P4 concentrations in reCG compared to eCG may be due to a shorter half-life of reCG. Although there is no study evaluating reCG half-life in ewes, the lower amount of sialic acid could reduce its duration, as previously suggested [26,41]. Furthermore, there is no study in ewes evaluating the equivalence of eCG and reCG doses and, therefore, reCG-treated ewes may have been exposed to lower gonadotropin stimulus compared to eCG-treated.

In experiment 2, during the anestrus to transition period, treatment with eCG, but not with reCG, improved estrus rate. Treatment with eCG may have resulted in larger and more estrogenic follicles, leading to higher estrus expression. However, treatment with either gonadotrophin had no effect on pregnancy and conception rates. Progesterone priming may have been enough to stimulate final follicular growth and ovulation during the transition period, since it can mimic the physiological changes that happen at the beginning of the breeding season [42] by modulating the hypothalamic feedback to estradiol [15,43]. The estrus rates observed in the present study were similar to those observed by Viñoles et al. (2001) during the breeding season in Polwarth ewes. However, the pregnancy and conception rates obtained after natural

mating in the present study, regardless of the treatment, were lower than those previously reported by our research group [44] and others [45]. Nevertheless, it is important to consider that those previous studies were conducted with a low number of animals, and under more controlled conditions, whereas the current study was conducted on commercial farms.

As expected, the BCS impacted on pregnancy rate, which was higher in ewes with BCS of >2.5 . Low body condition is associated with lower reproductive outcomes in many studies in ewes [46,47], mainly due to its negative effects on the secretion of GnRH, gonadotrophins, and sex steroids [48]. The farm also had an impact on pregnancy and conception rates, which may have been influenced by several variables not included in this study such as animal handling, nutrition, herd health status, among others. Even though rams underwent andrological examination, libido, individual serving capacity and paddock area, for example, could affect their performance and overall reproduction results. The length of P4 treatment had a minor effect, considering that only estrus, but not fertility, was negatively affected in ewes treated for 9 days.

Conclusion

Treatment with reCG is efficient in promoting final follicular growth and inducing ovulation in ewes during seasonal anestrus. Use of reCG on hormonal protocols is possible, although more studies on its effect on fertility should be conducted during deep anestrus. In the conditions of the current study, during transition to the breeding season, the use of either reCG or eCG had no effect on pregnancy and conception rates by natural mating in comparison to treatment solely with P4 and PGF. Future studies should determine the equivalence between eCG and reCG dosage.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest

Funding

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; grant number INCT 406866/2022-8); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Financial code 001); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS; grant number 22/2551-0000391-5 and 21/2551-0002278-7).

Acknowledgements

The authors are thankful to Centro Agropecuário da Palma (UFPEl) and to all the farmers for providing access to animals and facilities.

References

- [1] Naqvi SMK, Sejian V, Karim SA. Effect of feed flushing during summer season on growth, reproductive performance and blood metabolites in Malpura ewes under semiarid tropical environment. *Trop Anim Health Prod* 2012;45. <https://doi.org/10.1007/s11250-012-0185-2>.
- [2] Smith MC. Veterinary experiences with the Cornell STAR system of accelerated lambing. *Small Ruminant Research*, vol. 62, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2005.07.040>.
- [3] Notter DR. Genetic Aspects of Reproduction in Sheep. *Reproduction in Domestic Animals* 2008;43:122–8. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01151.x>.

- [4] Abecia JA, Chemineau P, Delgadillo JA. Advances in photoperiodic and bio-stimulations of seasonal reproduction in small ruminants. *Small Ruminant Research* 2024;235. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2024.107286>.
- [5] Luhman CM, Slyter AL. The effect of photoperiod and melatonin feeding on reproduction in the ewe. *Theriogenology* 1986;26:721–32. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(86\)90003-8](https://doi.org/10.1016/0093-691X(86)90003-8).
- [6] Walton JS, McNeilly JR, McNeilly AS, Cunningham FJ. Changes in concentrations of follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, prolactin and progesterone in the plasma of ewes during the transition from anoestrus to breeding activity. *Journal of Endocrinology* 1977;75:127–36. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0750127>.
- [7] Leyva V, Buckrell BC, Walton JS. Follicular activity and ovulation regulated by exogenous progestagen and PMSG in anestrus ewes. *Theriogenology* 1998;50:377–93. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00147-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00147-2).
- [8] Rosasco SL, Beard JK, Hallford DM, Summers AF. Evaluation of estrous synchronization protocols on ewe reproductive efficiency and profitability. *Anim Reprod Sci* 2019;210. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106191>.
- [9] Goodman RL, Jansen HT, Billings HJ, Coolen LM, Lehman MN. Neural systems mediating seasonal breeding in the ewe. *J Neuroendocrinol* 2010;22. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2010.02014.x>.
- [10] Goodman RL, Inskeep EK. Neuroendocrine Control of the Ovarian Cycle of the Sheep. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, 2005. <https://doi.org/10.1016/B978-012515400-0/50049-X>.
- [11] Dutt RH. Induction of Estrus and Ovulation in Anestrous Ewes by Use of Progesterone and Pregnant Mare Serum. *J Anim Sci* 1953;12:515–23. <https://doi.org/10.2527/jas1953.123515x>.
- [12] Ungerfeld R, Rubianes E. Short term primings with different progestogen intravaginal devices (MAP, FGA and CIDR) for eCG-estrous induction in anestrus ewes. *Small Ruminant Research* 2002;46:63–6. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(02\)00105-0](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(02)00105-0).

- [13] Hauger RL, Karsch FJ, Foster DL. A new concept for control of the estrous cycle of the ewe based on the temporal relationships between luteinizing hormone, estradiol and progesterone in peripheral serum and evidence that progesterone inhibits tonic LH secretion. *Endocrinology* 1977;101:807–17. <https://doi.org/10.1210/endo-101-3-807>.
- [14] Caraty A, Skinner DC. Progesterone priming is essential for the full expression of the positive feedback effect of estradiol in inducing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone surge in the ewe. *Endocrinology* 1999;140:165–70. <https://doi.org/10.1210/endo.140.1.6444>.
- [15] Fitzgerald BP, Legan SJ, I'ANSON H, Akaydin MS. Importance of short luteal phases in the endocrine mechanism controlling initiation of estrous cycles in anestrus ewes. *Endocrinology* 1985;117:1530–6. <https://doi.org/10.1210/endo-117-4-1530>.
- [16] Adib A, Freret S, Touze JL, Lomet D, Lardic L, Chesneau D, et al. Progesterone improves the maturation of male-induced preovulatory follicles in anoestrous ewes. *Reproduction* 2014;148:403–16. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0263>.
- [17] Husein MQ, Kridli RT. Effect of progesterone prior to GnRH-PGF2 α treatment on induction of oestrus and pregnancy in anoestrous Awassi ewes. *Reproduction in Domestic Animals* 2003;38:228–32. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2003.00411.x>.
- [18] Murphy BD. Equine chorionic gonadotrophin: an enigmatic but essential tool. *Anim Reprod* 2012;9.
- [19] Gonzalez-Bulnes A, Menchaca A, Martin GB, Martinez-Ros P, Gonzalez-Bulnes A, Menchaca A, et al. Seventy years of progestagen treatments for management of the sheep oestrous cycle: where we are and where we should go. *Reprod Fertil Dev* 2020;32:441–52. <https://doi.org/10.1071/RD18477>.
- [20] Estradé MJ, Cazales N, Perdigón F, Cavestany D, Mattos RC. ECG Concentration and Subsequent Reproductive Activity in Mares After Abortion at Day 70. *J Equine Vet Sci* 2016;42. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.04.090>.
- [21] Vilanova XM, De Briyne N, Beaver B, Turner P V. Horse welfare during equine chorionic gonadotropin (eCG) production. *Animals* 2019;9. <https://doi.org/10.3390/ani9121053>.

- [22] Bruno-Galarraga M, Cano-Moreno V, Lago-Cruz B, Encinas T, Gonzalez-Bulnes A, Martinez-Ros P. The use of hcg for inducing ovulation in sheep estrus synchronization impairs ovulatory follicle growth and fertility. *Animals* 2021;11. <https://doi.org/10.3390/ani11040984>.
- [23] Santos-Jimenez Z, Martinez-Herrero C, Encinas T, Martinez-Ros P, Gonzalez-Bulnes A. Comparative efficiency of oestrus synchronization in sheep with progesterone/eCG and progesterone/GnRH during breeding and non-breeding season. *Reproduction in Domestic Animals* 2020;55. <https://doi.org/10.1111/rda.13698>.
- [24] Silveira DC, Vargas SF, Oliveira FC, Barbosa RM, Knabah NW, Goularte KL, et al. Pharmacological approaches to induce follicular growth and ovulation for fixed-time artificial insemination treatment regimens in ewes. *Anim Reprod Sci* 2021;228. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106734>.
- [25] Maggi G, Pires OS, Junior SFV, Oliveira FC, Moraes FP, Ferreira R, et al. Is it possible to replace eCG by GnRH in the hormonal protocol for timed artificial insemination in ewes during the breeding season? *Domest Anim Endocrinol* 2024;89. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2024.106878>.
- [26] Villaraza CJ, Antuña S, Tardivo MB, Rodríguez MC, Mussio P, Cattaneo L, et al. Development of a suitable manufacturing process for production of a bioactive recombinant equine chorionic gonadotropin (reCG) in CHO-K1 cells. *Theriogenology* 2021;172. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.05.013>.
- [27] Rodríguez MC, Mussio PE, Villaraza J, Tardivo MB, Antuña S, Fontana D, et al. Physicochemical Characterization of a Recombinant eCG and Comparative Studies with PMSG Commercial Preparations. *Protein Journal* 2023;42. <https://doi.org/10.1007/s10930-023-10092-x>.
- [28] Crispo M, Meikle MN, Schlapp G, Menchaca A. Ovarian superstimulatory response and embryo development using a new recombinant glycoprotein with eCG-like activity in mice. *Theriogenology* 2021;164. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.01.012>.
- [29] Cattaneo L, Prieto C, Ojeda D, Pereira A, Frutos J, Bó GA. The use of a recombinant equine chorionic gonadotropin (reCG) in fixed-time AI programs in beef cattle. *Theriogenology* 2024;227:77–83. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2024.07.011>.

- [30] D'Avila CA, Moraes FP de, Bohn AP, Rovani MT, Vieira AD, Ferreira R, et al. Injectable progesterone for estrus and ovulation induction in seasonal anestrus ewes. *Livest Sci* 2022;265:105070. <https://doi.org/10.1016/J.LIVSCI.2022.105070>.
- [31] CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3rd ed. Belo Horizonte (MG): 2013.
- [32] Heinzen BC, Weber SH, Maia D, Sotomaior CS. Productive performance of lambs born in different seasons of the year. *Open Vet J* 2023;13:932–41. <https://doi.org/10.5455/OVJ.2023.v13.i7.13>.
- [33] Broughan JM, Wall R. Fly abundance and climate as determinants of sheep blowfly strike incidence in southwest England. *Med Vet Entomol* 2007;21:231–8. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2007.00689.x>.
- [34] Dias JH, Miranda VO, Oliveira FC, Vargas SF, Haas CS, Costa VGG, et al. Treatment with eCG and hCG to induce onset of estrous cycles in ewes during the non-breeding season: Effects on follicular development and fertility. *Anim Reprod Sci* 2020;212. <https://doi.org/10.1016/J.ANIREPROSCI.2019.106232>.
- [35] Barrett DMW, Bartlewski PM, Batista-Arteaga M, Symington A, Rawlings NC. Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to a single dose of 500 IU of eCG following a 12-day treatment with progestogen-releasing intravaginal sponges in the breeding and nonbreeding seasons in ewes. *Theriogenology* 2004;61. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00215-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00215-2).
- [36] Stewart F, Allen WR. Biological functions and receptor binding activities of equine chorionic gonadotrophins. *J Reprod Fertil* 1981;62:527–36. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0620527>.
- [37] Souza CJH, Campbell BK, Baird DT. Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during anoestrus. *J Reprod Fertil* 1996;108:101–6. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1080101>.
- [38] Núñez-Olivera R, De Castro T, García-Pintos C, Bó G, Piaggio J, Menchaca A. Ovulatory response and luteal function after eCG administration at the end of a progesterone

and estradiol' based treatment in postpartum anestrous beef cattle. *Anim Reprod Sci* 2014;146. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.02.017>.

[39] García-Pintos C, Menchaca A. Luteal response and follicular dynamics induced with equine chorionic gonadotropin (eCG) administration after insemination in sheep. *Small Ruminant Research* 2016;136. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2016.02.006>.

[40] Vasconcelos JLM, Sartori R, Oliveira HN, Guenther JG, Wiltbank MC. Reduction in size of the ovulatory follicle reduces subsequent luteal size and pregnancy rate. *Theriogenology* 2001;56:307–14. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00565-9](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00565-9).

[41] Martinuk SD, Manning AW, Black WD, Murphy BD. Effects of carbohydrates on the pharmacokinetics and biological activity of equine chorionic gonadotropin in vivo. *Biol Reprod* 1991;45:598–604. <https://doi.org/10.1095/biolreprod45.4.598>.

[42] I'Anson H, Legan SJ. Changes in LH pulse frequency and serum progesterone concentrations during the transition to breeding season in ewes. *J Reprod Fertil* 1988;82:341–51. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0820341>.

[43] Caraty A, Skinner DC. Progesterone priming is essential for the full expression of the positive feedback effect of estradiol in inducing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone surge in the ewe. *Endocrinology* 1999;140. <https://doi.org/10.1210/endo.140.1.6444>.

[44] Amaral D'Avila C, Pereira de Moraes F, Pastorello Bohn A, Tomazele Rovani M, Diniz Vieira A, Ferreira R, et al. Injectable progesterone for estrus and ovulation induction in seasonal anestrous ewes. *Livest Sci* 2022;265. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2022.105070>.

[45] Viñoles C, Forsberg M, Banchero G, Rubianes E. Effect of long-term and short-term progestagen treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology* 2001;55:993–1004. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00460-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00460-5).

[46] Vatankhah M, Talebi MA, Zamani F. Relationship between ewe body condition score (BCS) at mating and reproductive and productive traits in Lori-Bakhtiari sheep. *Small Ruminant Research* 2012;106:105–9. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2012.02.004>.

- [47] Cam MA, Garipoglu AV, Kirikci K. Body condition status at mating affects gestation length, offspring yield and return rate in ewes. *Arch Anim Breed* 2018;61:221–8. <https://doi.org/10.5194/aab-61-221-2018>.
- [48] Chaves AS, Silva F, Valentim R, Quintas H. Body Condition in Small Ruminants—Effects of Nutrition on the Hypothalamic–Pituitary–Gonad Axis and Ovarian Activity That Controls Reproduction. *Physiologia* 2024;4:213–25. <https://doi.org/10.3390/physiologia4020012>.

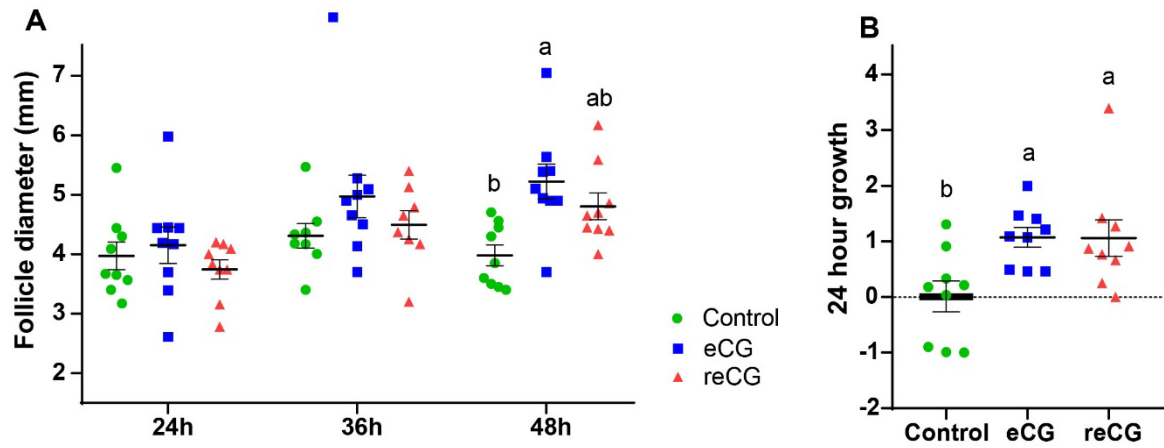


Figure 1. A) Effect of group on mean ($\pm$ SEM) follicle diameter of the largest follicle at 24, 36 and 48 hours (Control=9; eCG=9; reCG = 9) after treatment in anestrus ewes. B) Follicular growth ($\pm$ SEM) between 24 and 48 hours after treatment. Each symbol represents one animal.

^{a,b} Different letters indicate difference among groups (P < 0.05)

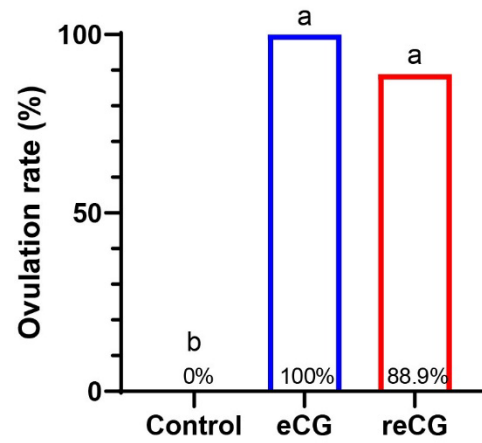


Figure 2. Ovulation rate (%) by group in anestrus ewes (Control=9; eCG=9; reCG=9). ^{a,b}

Different letters indicate difference among groups ($P < 0.001$)

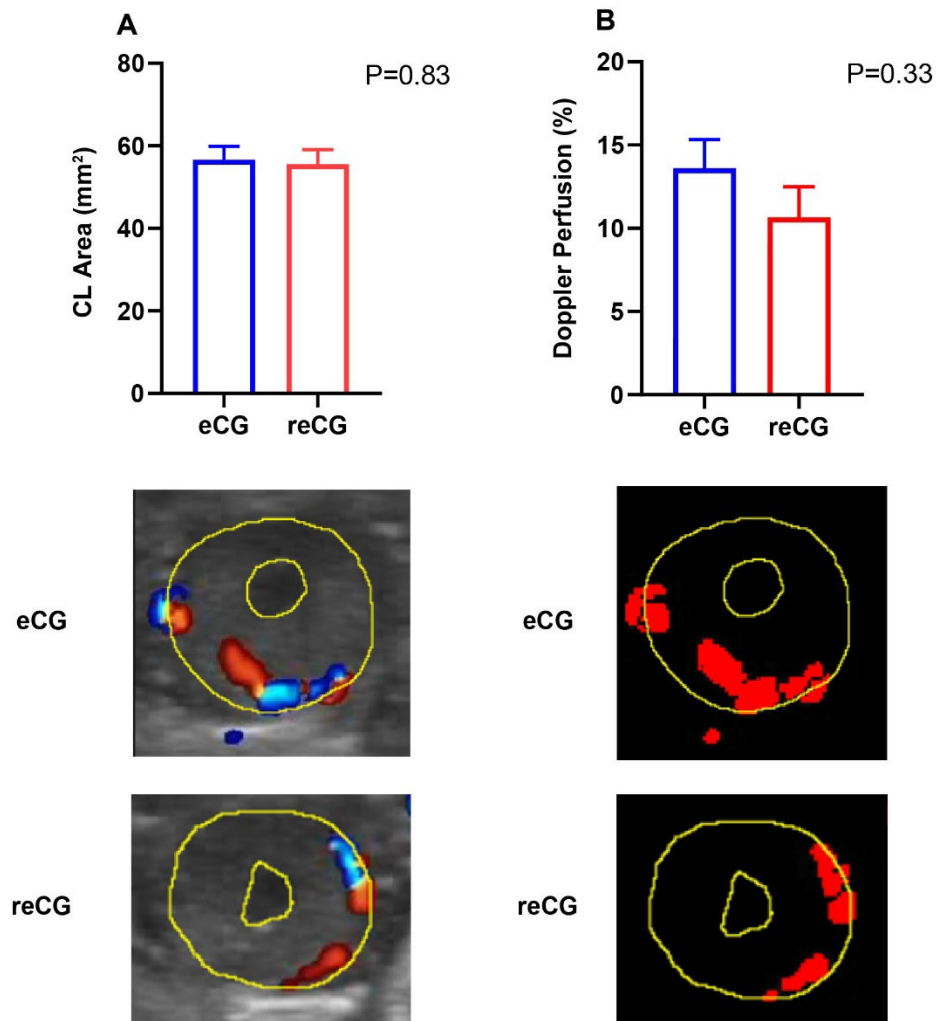


Figure 3. CL area (mean $\pm$ SEM) (A) and blood perfusion in CL area (%) (B) in ewes treated with eCG (n = 9) and reCG (n = 8). Parameters were measured using ImageJ Software.

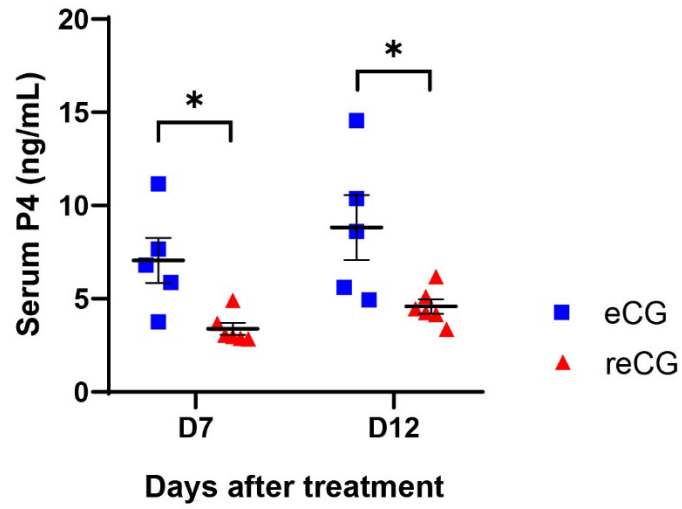


Figure 4. Median serum P4 concentrations on D7 and D12 after treatment in ewes with one CL on D7 (eCG=5; reCG=6). Each symbol represents one animal. (*) indicate differences among groups ($P < 0.05$).

Effect	Estrus rate	Pregnancy rate	Conception rate
	% (n/n)	% (n/n)	% (n/n)
Treatment			
Control	76.32% (87/114) ^b	43.75% (49/112)	57.65% (49/85)
eCG	93.45% (157/168) ^a	48.80% (81/166)	52.60% (81/154)
reCG	87.58% (134/153) ^{ab}	48.32% (72/149)	55.81% (72/129)
<i>P-value</i>	0.001	0.822	0.720
Farm			
1	90.55% (115/127)	48.36% (59/122) ^b	53.63% (59/110) ^{ab}
2	93.82% (76/81)	70.37% (57/81) ^a	75.00% (57/76) ^a
3	79.07% (34/43)	37.21% (16/43) ^b	47.06% (16/34) ^{ab}
4	82.86% (87/105)	34.34% (34/99) ^b	41.46% (34/82) ^b
5	82.93% (68/82)	43.53% (37/85) ^b	54.41% (37/68) ^{ab}
<i>P-value</i>	0.100	0.009	0.022
BCS			
≤2,5	82.35% (168/204)	36.18% (72/199) ^b	44.72% (72/161)
>2,5	90.90% (210/231)	57.02% (130/228) ^a	62.80% (130/207)
<i>P-value</i>	0.115	0.029	0.113
P4 duration			
D5	89.02% (73/82) ^a	45.00% (36/80)	50.70% (36/71)
D7	88.45% (268/303) ^a	49.50% (149/301)	56.65% (149/263)
D9	74.00 (37/50) ^b	36.96% (17/46)	50.00% (17/34)
<i>P-value</i>	0.008	0.373	0.732
Total	86.90% (378/435)	47.31% (202/427)	54.89% (202/368)

Table 1. Estrus, pregnancy and conception rate by natural mating according to treatment, farm, body condition score and P4 treatment duration. Estrus: ewes detected in estrus / ewes exposed to rams $\times 100$; pregnancy: pregnant ewes / ewes exposed to rams $\times 100$; conception rate: pregnant ewes / ewes detected in estrus $\times 100$. ^{a,b} Different letters indicate difference among groups ($P < 0.05$)

5 Considerações Finais

A pesquisa na área de reprodução de ovinos envolve o conhecimento de um complexo mecanismo neuroendócrino com diversas variáveis e particularidades da espécie. Para a rentabilidade da ovinocultura dentro dos sistemas produtivos, é essencial o desenvolvimento de estratégias que busquem a melhoria do desempenho reprodutivo. Apesar da associação P4+eCG já ser amplamente implementada como uma estratégia eficiente para utilização durante anestro sazonal, a busca por alternativas de maior qualidade e sem impacto no bem-estar animal ainda é uma constante.

Como visto no estudo apresentado neste documento, o uso de reCG demonstrou ser eficiente na promoção do crescimento folicular final e na indução da ovulação em ovelhas lanadas durante o anestro sazonal. Contudo, a menor produção de progesterona com o uso de reCG, em comparação com grupo eCG, sugere a necessidade de mais estudos avaliando a meia-vida desse produto e a melhor dose para os efeitos desejados. Embora não tenha sido feito uma avaliação do comportamento estral e taxa de prenhez durante esse período, esses dados já indicam que a reCG pode ser uma alternativa promissora ao eCG.

No período de transição para a estação de reprodução, tanto o uso de reCG quanto de eCG aparentam ter efeito limitado em comparação com o uso exclusivo de progesterona e prostaglandina na taxa de prenhez e concepção por monta natural. Ainda assim, essas gonadotrofinas podem ter efeito sobre características reprodutivas que não foram avaliadas nesse estudo, como diminuição da perda gestacional e aumento dos partos múltiplos, como sugerido pelo experimento 1, no qual os animais apresentaram ovulações múltiplas induzidas por esses hormônios.

Esses resultados respondem algumas das lacunas quanto ao efeito dessa molécula na reprodução de ovinos. Contudo, inúmeras outras dúvidas ainda necessitam serem esclarecidas, tal qual os efeitos do reCG quando utilizado em protocolos de inseminação em tempo fixo, sua meia-vida nessa espécie, sincronia do momento da ovulação e os efeitos dose-dependente.

Referências

ABECIA, J. A.; FORCADA, F.; GONZÁLEZ-BULNES, A. Pharmaceutical Control of Reproduction in Sheep and Goats. **Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice**, v. 27, n. 1, p. 67–79, 2011.

ACRITOPOULOU, S.; HARESIGN, W. Response of ewes to a single injection of an analogue of PGF-2 alpha given at different stages of the oestrous cycle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 58, n. 1, 1980.

AGGARWAL, B. B.; PAPKOFF, H. Plasma clearance and tissue uptake of native and desialylated equine gonadotropins. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 2, p. 173–181, 1985.

ALI, A. Effect of time of eCG administration on follicular response and reproductive performance of FGA-treated Ossimi ewes. **Small Ruminant Research**, v. 72, p. 33–37, 2007.

ALLEN, W. R.; HAMILTON, D. W.; MOOR, R. M. The origin of equine endometrial cups. II. Invasion of the endometrium by trophoblast. **The Anatomical Record**, v. 177, p. 485–501, 1973.

ALVAREZ, R. H. *et al.* Biological Activity of Different Batches of Equine Chorionic Gonadotropin as Determined by Reversed-phase High-performance Liquid Chromatography and in vivo Assay. **Journal of Advances in Medical and Pharmaceutical Sciences**, v. 12, p. 1–9, 2017.

ANTCZAK, D. F. *et al.* **The equine endometrial cup reaction: A fetomaternal signal of significance.** Annual Review of Animal Biosciences, v. 1, n.1, p. 419–442, 2013.

BABY, T. E.; BARTLEWSKI, P. M. Progesterone as the driving regulatory force behind serum FSH concentrations and antral follicular development in cycling ewes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, p. 303–310, 2011.

BAIRD, D. T.; CAMPBELL, B. K. Follicle selection in sheep with breed differences in ovulation rate. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 145, n. 1–2, p. 89–95, 1998

BARTLEWSKI, P. M. *et al.* Ovarian follicular dynamics during anoestrus in ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 113, p. 275–285, 1998.

BARTLEWSKI, P. M. *et al.* Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables throughout the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 115, n. 1, 1999.

BARTLEWSKI, P. M.; BEARD, A. P.; RAWLINGS, N. C. An ultrasonographic study of luteal function in breeds of sheep with different ovulation rates. **Theriogenology**, v. 52, n. 1, 1999.

BLASCHI, W. *et al.* Effects of progestagen exposure duration on estrus synchronization and conception rates of crossbreed ewes undergoing fixed time artificial insemination. **Journal of Veterinary Science**, v. 15, p. 433–437, 2014.

BRUNO-GALARRAGA, M. *et al.* The use of hcg for inducing ovulation in sheep estrus synchronization impairs ovulatory follicle growth and fertility. **Animals**, v. 11, n. 4, 2021.

CAMPBELL, B. K. *et al.* The pattern of ovarian inhibin, estradiol, and androstenedione secretion during the estrous cycle of the ewe. **Endocrinology**, v. 127, p. 227–235, 1990.

CAMPBELL, B. K. *et al.* Examination of the relative role of FSH and LH in the mechanism of ovulatory follicle selection in sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 117, p. 355–367, 1999.

CAMPBELL, B. K.; DOBSON, H.; SCARAMUZZI, R. J. Ovarian function in ewes made hypogonadal with GnRH antagonist and stimulated with FSH in the presence or absence of low amplitude LH pulses. **Journal of Endocrinology**, v. 156, n. 1, 1998.

CARATY, A.; SKINNER, D. C. Progesterone priming is essential for the full expression of the positive feedback effect of estradiol in inducing the preovulatory gonadotropin-releasing hormone surge in the ewe. **Endocrinology**, v. 140, n. 1, 1999.

CATTANEO, L. *et al.* The use of a recombinant equine chorionic gonadotropin (reCG) in fixed-time AI programs in beef cattle. **Theriogenology**, v. 227, p. 77–83, 2024.

CHEMINEAU, P. *et al.* Neuroendocrine and genetic control of seasonal reproduction in sheep and goats. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 42–49, 2010.

COHEN, S. N. *et al.* Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, p. 3240–3244, 1973.

COLE, L. A. New discoveries on the biology and detection of human chorionic gonadotropin. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 7, p. 1–37, 2009.

CONTRERAS-SOLIS, I. *et al.* Efficiency of estrous synchronization in tropical sheep by combining short-interval cloprostenol-based protocols and “male effect”. **Theriogenology**, v. 71, n. 6, 2009.

COOKE, R. G.; AHMAD, N. Delayed luteolysis after intra-uterine infusions of nordihydroguaiaretic acid in the ewe. **Animal Reproduction Science**, v. 52, p. 113–121, 1998.

CORNER, R. A. *et al.* A comparison of the reproductive performance of ewe lambs and mature ewes. **Small Ruminant Research**, v. 114, p. 126–133, 2013.

CRISPO, M. *et al.* Ovarian superstimulatory response and embryo development using a new recombinant glycoprotein with eCG-like activity in mice. **Theriogenology**, v. 164, 2021.

CROWDER, M. E.; NETT, T. M. Pituitary content of gonadotropins and receptors for gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and hypothalamic content of GnRH during the periovulatory period of the ewe. **Endocrinology**, v. 114, p. 234–239, 1984.

DIAS, J. H. *et al.* Treatment with eCG and hCG to induce onset of estrous cycles in ewes during the non-breeding season: Effects on follicular development and fertility. **Animal reproduction science**, v. 212, 2020.

DIAS, L. M. K. *et al.* Although it induces synchronized ovulation, hCG reduces the fertility of Santa Ines ewes submitted to TAI. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 70, n. 1, 2018.

DOWER, W. J.; MILLER, J. F.; RAGSDALE, C. W. High efficiency transformation of E.coli by high voltage electroporation. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 13, 1988.

DUROCHER, Y.; BUTLER, M. Expression systems for therapeutic glycoprotein production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 6, p. 700–707, 2009.

ESTRADÉ, M. J. *et al.* ECG Concentration and Subsequent Reproductive Activity in Mares After Abortion at Day 70. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 42, 2016.

EVANS, A. C. O. *et al.* Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep. **Theriogenology**, v. 53, n. 3, 2000.

FABRE-NYS, C.; MARTIN, G. B. Hormonal control of proceptive and receptive sexual behavior and the preovulatory LH surge in the ewe: Reassessment of the respective roles of estradiol, testosterone, and progesterone. **Hormones and Behavior**, v. 25, n. 3, 1991.

FAOSTAT. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#home>. Acesso em: 29 jan. 2025.

FARIN, C. E.; SAWYER, H. R.; NISWENDER, G. D. Analysis of cell types in the corpus luteum of the sheep. **Journal of reproduction and fertility**. Suppl 37, p. 181–187, 1989.

FIERRO, S. *et al.* The use of prostaglandins in controlling estrous cycle of the ewe: A review. **Theriogenology**, v. 79, n. 3, p. 399–408, 2013.

FITZGERALD, B. P. *et al.* Importance of short luteal phases in the endocrine mechanism controlling initiation of estrous cycles in anestrus ewes. **Endocrinology**, v. 117, p. 1530–1536, 1985.

FLEMING, J. A. G. W. *et al.* Estrogen regulates transcription of the ovine oxytocin receptor gene through GC-rich SP1 promoter elements. **Endocrinology**, v. 147, n. 2, 2006.

FONSECA, J. F. Otimização da Eficiência Reprodutiva em Caprinos e Ovinos. **Embrapa Caprinos**, v. 1, p. 1–10, 2006.

GARCIA-GUERRA, A. *et al.* Mechanisms regulating follicle selection in ruminants: lessons learned from multiple ovulation models. **Animal reproduction**, v. 15, p. 660–679, 2018.

GIBBONS, J. R. *et al.* Follicular and FSH dynamics in ewes with a history of high and low ovulation rates. **Theriogenology**, v. 52, n. 6, 1999.

GONZALEZ DE BULNES, A. *et al.* Relationship between ultrasonographic assessment of the corpus luteum and plasma progesterone concentration during the oestrous cycle in monovular ewes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 35, n. 2, 2000.

GONZALEZ-BULNES, A. *et al.* Seventy years of progestagen treatments for management of the sheep oestrous cycle: where we are and where we should go. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 32, n. 5, p. 441–452, 2020.

GOODMAN, R. L. *et al.* Neural systems mediating seasonal breeding in the ewe. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 22, n. 7, p. 674–681, 2010.

GRAY, C. A. *et al.* Ovine uterine gland knock-out model: Effects of gland ablation on the estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v. 62, p. 448–456, 2000.

HAVERN, R. L.; WHISNANT, C. S.; GOODMAN, R. L. Dopaminergic structures in the ovine hypothalamus mediating estradiol negative feedback in anestrus ewes. **Endocrinology**, v. 134, n. 4, p. 1905–1914, 1994.

HEATHER, J. M.; CHAIN, B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. **Genomics**, v. 107, n. 1, p. 1–8, 2016.

I'ANSON, H.; LEGAN, S. J. Changes in LH pulse frequency and serum progesterone concentrations during the transition to breeding season in ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 82, p. 341–351, 1988.

KARSCH, F. J. *et al.* Seasonal changes in gonadotropin-releasing hormone secretion in the ewe: Alteration in response to the negative feedback action of estradiol. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 1377–1383, 1993.

KHAN, S. *et al.* Role of recombinant DNA technology to improve life. **International Journal of Genomics**, n. 1, p. 2405954, 2016.

LEGAN, S. J.; KARSCH, F. J. Photoperiodic control of seasonal breeding in ewes: modulation of the negative feedback action of estradiol. **Biology of Reproduction**, v. 23, n. 5, 1980.

LEHMAN, I. R. DNA ligase: Structure, mechanism, and function. **Science**, v. 186, p. 790–797, 1974.

LEYVA, V.; BUCKRELL, B. C.; WALTON, J. S. Follicular activity and ovulation regulated by exogenous progestagen and PMSG in anestrus ewes. **Theriogenology**, v. 50, p. 377–393, 1998.

LOENEN, W. A. M. *et al.* Highlights of the DNA cutters: A short history of the restriction enzymes. **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. 3–19, 2014.

LUNARDI, R. *et al.* Rendimento de soja em sistema de integração lavoura-pecuária: Efeito de métodos e intensidades de pastejo. **Ciencia Rural**, v. 38, n. 3, 2008.

MAGGI, G. *et al.* Is it possible to replace eCG by GnRH in the hormonal protocol for timed artificial insemination in ewes during the breeding season? **Domestic Animal Endocrinology**, v. 89, 2024.

MAGOFFIN, D. A. Ovarian theca cell. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 37, n. 7, p. 1344–1349, 2005.

MARTINUK, S. D. *et al.* Effects of carbohydrates on the pharmacokinetics and biological activity of equine chorionic gonadotropin in vivo. **Biology of Reproduction**, v. 45, p. 598–604, 1991.

MATTE, A.; WAQUIL, P. D. Changes in markets for lamb in livestock family farming in Brazil. **Small Ruminant Research**, v. 205, 2021.

MCCRACKEN, J. A.; SCHRAMM, W.; OKULICZ, W. C. Hormone receptor control of pulsatile secretion of PGF2 α from the ovine uterus during luteolysis and its abrogation in early pregnancy. **Animal Reproduction Science**, v. 7, p. 31–55, 1984.

MCINTOSH, J. E. A.; MOOR, R. M.; ALLEN, W. R. Pregnant mare serum gonadotrophin: rate of clearance from the circulation of sheep. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 44, p. 95–100, 1975.

MOENTER, S. M. *et al.* Pattern of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion leading up to ovulation in the ewe: Existence of a preovulatory GnRH surge. **Endocrinology**, v. 129, p. 1175–1182, 1991.

MURPHY, B. D. Equine chorionic gonadotrophin: an enigmatic but essential tool. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 3, p. 223–230, 2012.

MURPHY, B. D.; MARTINUK, S. D. Equine Chorionic Gonadotropin. **Endocrine Reviews**, v. 12, n. 1, p. 27–44, 1991.

NELSON, L. *et al.* Transcriptomics and cell painting analysis reveals molecular and morphological features associated with fed-batch production performance in CHO recombinant clones. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 120, p. 3177–3190, 2023.

NESTOR, C. C. *et al.* Regulation of GnRH pulsatility in ewes. **Reproduction**, v. 156, n. 3, p. 83–99, 2018.

OLIVERA-MUZANTE, J. *et al.* Comparison of prostaglandin- and progesterone-based protocols for timed artificial insemination in sheep. **Theriogenology**, v. 75, p. 1232–1238, 2011.

ORTMANN, O.; WEISS, J. M.; DIEDRICH, K. Gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) and GnRH agonists: mechanisms of action. **Reproductive biomedicine online**, v. 5 p. 1–7, 2002.

PAPKOFF, H. Chemical and biological properties of the subunits of pregnant mare serum gonadotropin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 58, n. 2, 1974.

PAWSON, A. J.; MCNEILLY, A. S. The pituitary effects of GnRH. **Animal Reproduction Science**, v. 88, p. 75–94, 2005.

PEREIRA, R. G. *et al.* GnRH analogs induce a LH peak and increase pregnancy per timed-AI in ewes. **Theriogenology**, v. 215, p.132–137, 2024.

PHAM, P. L.; KAMEN, A.; DUROCHER, Y. Large-scale transfection of mammalian cells for the fast production of recombinant protein. **Molecular Biotechnology**, v. 34, p. 225–237, 2006.

PUGH, D. G. *et al.* Sheep, Goat, and Cervid Medicine. 3rd ed. St. Louis, MO: **Elsevier Health Sciences**, p. 335, 2020.

QUINTERO-ELISEA, J. A. *et al.* The effects of time and dose of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) on reproductive efficiency in hair sheep ewes. **Tropical Animal Health and Production**, v. 43, p. 1567–1573, 2011.

QUIRKE, J. F.; HANRAHAN, J. P.; GOSLING, J. P. Duration of oestrus, ovulation rate, time of ovulation and plasma LH, total oestrogen and progesterone in Galway adult ewes and ewe lambs. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 61, p. 265–272, 1981.

RODRÍGUEZ, M. C. *et al.* Physicochemical Characterization of a Recombinant eCG and Comparative Studies with PMSG Commercial Preparations. **Protein Journal**, v. 42, n. 1, 2023.

ROSA, H. J. D.; BRYANT, M. J. Seasonality of reproduction in sheep. **Small Ruminant Research**, v. 48, n. 3, p. 155–171, 2003.

ROSASCO, S. L. *et al.* Evaluation of estrous synchronization protocols on ewe reproductive efficiency and profitability. **Animal Reproduction Science**, v. 210, p. 106191, 2019.

RUBIANES, E.; MENCHACA, A.; CARBAJAL, B. Response of the 1-5 day-aged ovine corpus luteum to prostaglandin F2 α . **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 47–55, 2003.

RUTTER, S. M. Review: Grazing preferences in sheep and cattle: Implications for production, the environment and animal welfare. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 90, n. 3, 2010.

SAÏD, S. BEN *et al.* Differential estradiol requirement for the induction of estrus behavior and the luteinizing hormone surge in two breeds of sheep. **Biology of Reproduction**, v. 76, n. 4, 2007.

SANTOS-JIMENEZ, Z. *et al.* Comparative efficiency of oestrus synchronization in sheep with progesterone/eCG and progesterone/GnRH during breeding and non-breeding season. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 55, n. 7, 2020.

SCARAMUZZI, R. J.; CALDWELL, B. V.; MOOR, R. M. Radioimmunoassay of LH and estrogen during the estrous cycle of the ewe. **Biology of reproduction**, v. 3, p. 110–119, 1970.

SCORTICHINI, G. *et al.* Sheep farming and the impact of environment on food safety. **Small Ruminant Research**, v. 135, p. 66–74, 2016.

SEEKALLU, S. V. *et al.* Pulsed GnRH secretion and the FSH secretory peaks that initiate ovarian antral follicular wave emergence in anestrus ewes. **Animal Reproduction Science**, v. 120, p. 56–64, jul. 2010.

SILVEIRA, D. C. *et al.* Pharmacological approaches to induce follicular growth and ovulation for fixed-time artificial insemination treatment regimens in ewes. **Animal reproduction science**, v. 228, 2021.

SIMÕES, M. L. *et al.* Combining two injectable progesterone formulas for estrous synchronization in ewes. **Animal Reproduction**, v. 21, 2024.

SIMPSON, E. R. *et al.* Aromatase cytochrome p450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. **Endocrine Reviews**, v. 15, n. 3, 1994.

SIVASHANMUGAM, A. *et al.* Practical protocols for production of very high yields of recombinant proteins using *Escherichia coli*. **Protein Science**, v. 18, p. 936–948, 2009.

SMITH, H. O.; WELCOX, K. W. A Restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*. I. Purification and general properties. **Journal of Molecular Biology**, v. 51, p. 379–391, 1970.

SMITH, J. T. Sex steroid control of hypothalamic Kiss1 expression in sheep and rodents: Comparative aspects. **Peptides**, v. 30, n. 1, p. 94–102, 2009.

SMITH, J. T. *et al.* The role of kisspeptin in reproductive function in the ewe. **Reproduction in Domestic Ruminants VIII: Proceedings of the Ninth International Symposium on Reproduction in Domestic Ruminants**, p. 105–116, 2014.

SOUZA, C. J. H.; CAMPBELL, B. K.; BAIRD, D. T. Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during anoestrus. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 108, p. 101–106, 1996.

SOUZA, C. J. H.; CAMPBELL, B. K.; BAIRD, D. T. Follicular dynamics and ovarian steroid secretion in sheep during the follicular and early luteal phases of the estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v. 56, n. 2, 1997.

SPENCER, T. E. *et al.* Ovine interferon- τ regulates expression of endometrial receptors for estrogen and oxytocin but not progesterone. **Biology of Reproduction**, v. 53, n. 3, 1995.

SPENCER, T. E.; BAZER, F. W. Conceptus signals for establishing and maintenance of pregnancy. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, n. 1, 2004.

STAMATIADES, G. A.; KAISER, U. B. Gonadotropin regulation by pulsatile GnRH: Signaling and gene expression. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 463, p. 131–141, 2018.

STEWART, F.; ALLEN, W. R. Biological functions and receptor binding activities of equine chorionic gonadotrophins. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 62, p. 527–536, 1981.

STORMSHAK, F. Biochemical and endocrine aspects of oxytocin production by the mammalian corpus luteum. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 1–6, 2003.

UENOYAMA, Y. *et al.* Kisspeptin neurons and estrogen–estrogen receptor α signaling: Unraveling the mystery of steroid feedback system regulating mammalian reproduction. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 17, 2021.

UNGERFELD, R.; RUBIANES, E. Short term primings with different progestogen intravaginal devices (MAP, FGA and CIDR) for eCG-estrous induction in anestrus ewes. **Small Ruminant Research**, v. 46, n. 1, p. 63–66, 1 out. 2002.

VIANA, J. G. A.; WAQUIL, P. D. OVINOCULTURA NO RIO GRANDE DO SUL E URUGUAI: uma análise institucional e evolucionária da trajetória econômica. *Em:*

INSTITUIÇÕES, REGRAS E HÁBITOS: proposições teóricas e aplicadas para estudos rurais. Curitiba: Editora CRV, 2020. p. 201–230.

VILANOVA, X. M. *et al.* Horse welfare during equine chorionic gonadotropin (eCG) production. **Animals**, v. 9, n. 12, 2019.

VILLARRAZA, J. *et al.* Development of a suitable manufacturing process for production of a bioactive recombinant equine chorionic gonadotropin (reCG) in CHO-K1 cells. **Theriogenology**, v. 172, p. 8–19 2020.

VIÑALES, C. *et al.* Pregnancy rate and prolificacy after artificial insemination in ewes following synchronisation with prostaglandin, sponges, or sponges with bactericide. **Animal Production Science**, v. 51, p. 565–569, 2011.

VOSS, A. K.; FORTUNE, J. E. Levels of messenger ribonucleic acid for cytochrome p450 17 α -hydroxylase and p450 aromatase in preovulatory bovine follicles decrease after the luteinizing hormone surge. **Endocrinology**, v. 132, n. 5, 1993.

WALSH, G. Therapeutic insulins and their large-scale manufacture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, p. 151–159, 2005.

WANG, W. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 203, n. 1–2, p. 1–60, 2000.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Molecular structure of nucleic acids: A structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature**, v. 171, p. 737–738, 1953.

WEEMS, P. *et al.* Effects of season and estradiol on KNDy neuron peptides, colocalization with D2 dopamine receptors, and dopaminergic inputs in the ewe. **Endocrinology**, v. 158, n. 4, 2017.

WHYMAN, D. *et al.* Intervals between multiple ovulations in PMSG-treated and untreated ewes and the relationship between ovulation and oestrus. **Journal of reproduction and fertility**, v. 55, p. 481–488, 1979.

WOODING, F. B. P. *et al.* A structural and immunological study of chorionic gonadotrophin production by equine trophoblast girdle and cup cells. **Placenta**, v. 22, n. 8–9, 2001.

WURM, F. M. Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells. **Nature Biotechnology**, v. 22, n. 11, p. 1393–1398, 2004.

ZARAZAGA, L. A. *et al.* Photoperiod-treated bucks are equal to melatonin-treated bucks for inducing reproductive behaviour and physiological functions via the “male effect” in Mediterranean goats. **Animal Reproduction Science**, v. 202, 58–64, 2019.

ZELEKE, M. *et al.* Effect of progestagen and PMSG on oestrous synchronization and fertility in Dorper ewes during the transition period. **Small Ruminant Research**, v. 56, p. 47–53, 2005.

ZHOU, Q.; QIU, H. The Mechanistic Impact of N-Glycosylation on Stability, Pharmacokinetics, and Immunogenicity of Therapeutic Proteins. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 108, n. 4, p. 1366–1377.

Anexos

Anexo A - Documento da Comissão de Ética e Experimentação Animal

SEI/UFPEL - 2126808 - Parecer

13/04/2023 13:30



PARECER Nº
PROCESSO Nº

58/2023/CEUA/REITORIA
23110.006185/2023-19

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada "Novas abordagens para o controle do ciclo estral e ovulação em fêmeas ovinas", registrada com o nº 23110.006185/2023-19, sob a responsabilidade de **Rafael Gianella Mondadori** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer FAVORÁVEL a sua execução pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pelotas em reunião de 13/04/2023.

Finalidade	(x) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	Início: 30/04/2023 Término: 31/12/2025
Espécie/linhagem/raça	<i>Ovis aries</i>
Nº de animais	1.316 (1.194 fêmeas e 122 machos)
Idade	1 a 8 anos
Sexo	Fêmeas e machos
Origem	Serão utilizados animais do Centro Agropecuário da Palma da UFPel, localizada na BR116, KM 537, Capão do Leão, Brasil, e de propriedades rurais parceiras.

https://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador.php?acao=documento_i...cd40bdc940508a1636ebb5a31c0423cte021770a861ee377829fd0107c86 Página 1 de 2

SEI/UFPEL - 2126808 - Parecer

13/04/2023 13:30

Código para cadastro nº CEUA 006185/2023-19

Priscila Marques Moura de Leon
Coordenadora da CEUA



Documento assinado eletronicamente por **PRISCILA MARQUES MOURA DE LEON**, Professor do Magistério Superior, em 13/04/2023, às 12:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 4º, § 3º, do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 2126808 e o código CRC 007D0AEA.

Referência: Processo nº 23110.006185/2023-19

SEI nº 2126808