



## Bem-estar animal nos procedimentos de produção *in vivo* de embriões na espécie ovina

*Animal welfare in the in vivo production of sheep embryos*

Ana Clara Sarzedas Ribeiro<sup>1</sup>, Juliana Dantas Rodrigues Santos<sup>1</sup>, Ana Paula Pereira Schmidt<sup>1</sup>, Felipe Zandonadi Brandão<sup>\*1,2</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Veterinária da Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro

### Resumo

A presente revisão tem por objetivo abordar aspectos relacionados ao bem-estar animal na produção *in vivo* de embriões ovinos. A cobrança da sociedade tem impulsionado o uso de práticas que atendam os preceitos de bem-estar na produção animal. Nesse contexto, destaca-se a necessidade de aprimoramento de procedimentos menos invasivos, como a coleta não cirúrgica de embriões. Avanços recentes nos protocolos de dilatação cervical melhoraram os resultados e tornaram essa técnica uma alternativa viável na espécie ovina. No entanto, a avaliação do estado de bem-estar das doadoras submetidas à coleta transcervical mostra a necessidade de melhor controle da dor durante a sua realização. Assim, acreditamos que a associação dos esforços de diferentes pesquisas pode proporcionar a resolução desses entraves e possibilitar maior aplicabilidade comercial da biotécnica.

**Palavras-chave:** coleta de embriões; estresse; controle da dor; múltipla ovulação; ovinos.

### Abstract

*This review aims to address aspects related to animal welfare in the in vivo production of ovine embryos. The use of practices that meet the precepts of welfare in animal production has been driven by demands from society. In this context, there is a need to improve less invasive procedures, such as non-surgical embryo collection. Recent advances in cervical dilation protocols have improved results and made this technique a viable alternative in sheep. However, the assessment of the state of welfare of donors undergoing transcervical collection shows the need for better pain control during its performance. Thus, the association of different research efforts can provide the resolution of these obstacles and enable greater commercial applicability of the biotechnology.*

**Keywords:** embryo collection; stress; pain control; multiple ovulation; sheep

### Introdução

A caprinovinocultura é uma atividade de elevada importância social e econômica, seja pela geração de renda para os produtores, seja pela perpetuação da atividade produtiva para as gerações seguintes. Embora essa atividade se encontre consolidada em algumas regiões do Brasil e possua grande potencial de desenvolvimento, a produção nacional (carne e laticínios) não abastece o mercado interno, cujo consumo ainda é bastante reduzido comparado a outros países. Devido a qualidade nutricional e valor agregado, há um aumento expressivo na demanda por esses produtos (Viana e Silveira, 2009; Batista e Bonifácio, 2015), porém, para expandir os sistemas de produção, faz-se necessário investir em tecnologias que aprimorem características como genética, nutrição, sanidade, reprodução, bem-estar animal e gestão.

Nesse cenário, as biotécnicas reprodutivas, como a transferência de embriões, ganham destaque, principalmente por acelerar o ganho genético desses animais. No entanto, as técnicas de produção de embriões *in vivo* ou *in vitro* em pequenos ruminantes ainda necessitam de avanços técnico-científicos para possibilitar maior viabilidade desses procedimentos (Souza-Fabjan et al., 2014; Fonseca et al., 2016).

A produção *in vivo* de embriões, também conhecida como múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE), envolve as seguintes etapas: indução ou sincronização do estro das doadoras; superovulação; fecundação dos oócitos (por monta natural ou inseminação artificial); colheita dos embriões por meio de lavagem uterina; e posterior transferência (inovulação) para o útero de fêmeas receptoras sincronizadas. Outra possibilidade é a criopreservação dos embriões produzidos para transferência em outro



momento ou mesmo para investigações científicas (Fonseca *et al.*, 2014). A MOTE tem contribuído para a multiplicação dos pequenos ruminantes em todo o mundo, possibilitando que uma fêmea produza um número de crias superior ao que seria fisiologicamente possível durante sua vida produtiva. Ainda, essa biotécnica coopera sobremaneira com programas de conservação de raças ameaçadas de extinção, na importação e exportação de germoplasmas, bem como no apoio a outras biotécnicas relacionadas (Cognié *et al.*, 2003; Fonseca *et al.*, 2014; Pinto *et al.*, 2017).

Entretanto, essa biotécnica ainda possui alguns entraves que limitam sua aplicação na espécie ovina, especialmente de maneira comercial, destacando-se a etapa de coleta dos embriões, tradicionalmente realizada por procedimentos cirúrgicos, que possui desvantagens como custos, riscos à saúde animal e impossibilidade de uso sucessivo das fêmeas (Fonseca *et al.*, 2016). A principal barreira para utilização de técnicas não cirúrgicas nesta espécie é a anatomia da cérvix, que devido a sua tortuosidade dificulta o acesso uterino por via transcervical. Atualmente, tem sido estudadas possibilidades para viabilizar a coleta não cirúrgica em ovelhas, como alternativa aos métodos cirúrgicos (Leite *et al.*, 2018; Fonseca *et al.*, 2019b; Dias *et al.*, 2020, 2023; Santos *et al.*, 2020). Além disso, vale ressaltar que a crescente atenção ao bem-estar animal tem pressionado o aprimoramento dos procedimentos veterinários, incluindo as biotécnicas reprodutivas (Scott *et al.*, 2001; Fitzpatrick *et al.*, 2006; Windsor *et al.*, 2016).

Observados estes pontos, o objetivo desta revisão foi rever os aspectos relacionados à produção *in vivo* de embriões na espécie ovina, com ênfase na técnica de coleta não cirúrgica dos embriões e no bem-estar animal. Procuramos incluir os resultados do nosso grupo de pesquisa vinculados ao tema.

### Coleta de embriões na espécie ovina

A coleta de embriões produzidos *in vivo* é feita através da lavagem dos cornos uterinos entre o sexto e o oitavo dia após o início do estro, período baseado no tempo necessário para que o embrião percorra a tuba uterina e atinja o ápice do corno do útero (Fonseca *et al.*, 2014). Essa etapa da MOTE, em pequenos ruminantes, pode ser realizada por laparotomia, laparoscopia ou por via transcervical, as quais propiciam diferentes resultados quanto ao número de embriões recuperados e danos ao sistema genital das doadoras (Andrioli *et al.*, 1999; Ishwar e Memon, 1996; Fonseca *et al.*, 2019a).

#### *Técnicas de coleta de embriões*

A coleta cirúrgica por laparotomia ainda é o procedimento mais utilizado em ovinos. Essa técnica possui taxas de recuperação de embriões satisfatórias, porém é o método mais invasivo e apresenta como desvantagem o custo relativamente alto, o estresse dos animais e todos os riscos e sequelas inerentes à procedimentos cirúrgicos que envolvem manipulação de órgãos abdominais (Fonseca, 2006; Fonseca *et al.*, 2014, 2016; Santos *et al.*, 2020). Em cabras, por exemplo, Andrioli *et al.* (1999) observaram aderências no sistema genital e nos órgãos circunvizinhos em 100% dos animais a coleta cirúrgica, limitando o uso sucessivo dessas doadoras. Portanto, devido as desvantagens supracitadas, alternativas como a coleta semi-cirúrgica por laparoscopia e a não cirúrgica transcervical ganharam espaço.

A laparoscopia é uma técnica precisa e com boa recuperação embrionária, mas requer equipamentos especiais e pessoal altamente treinado (Fonseca, 2006). Apesar de apresentar menor índice de sequelas que a técnica anterior, ainda há possibilidade de aderências em até 70% das fêmeas submetidas às coletas sequenciais (Andrioli *et al.*, 1999).

Por muito tempo, as coletas cirúrgica ou laparoscópica foram as únicas opções para essa etapa. Mas, nas últimas décadas, o desenvolvimento e aprimoramento da técnica não cirúrgica de coleta de embriões em pequenos ruminantes têm ampliado a sua utilização nos programas de MOTE, visto que minimiza a ocorrência de complicações e possibilita a realização de coletas sucessivas (Fonseca *et al.*, 2014). O Brasil é referência na obtenção não cirúrgica de embriões nessas espécies, atualmente, quase 100% das coletas em cabras são feitas pela via transcervical (Fonseca *et al.*, 2010), com eficiência muito próxima as obtidas por meio de técnicas cirúrgicas (Fonseca *et al.*, 2013).

Resumidamente, para a coleta não cirúrgica de embriões, após a contenção do animal, é inserido um espéculo vaginal e a cérvix é fixada e tracionada caudalmente, com auxílio de pinças. Inicialmente, um dilatador uterino tipo vela de Hegar é utilizado para transpor os anéis cervicais e determinar o “mapa cervical”, permanecendo *in situ* por 30 segundos, sendo substituído, em seguida, por uma sonda uretral guiada com um mandril metálico. Quando o corno uterino é alcançado, retira-se o mandril e a sonda é conectada a um circuito fechado (Circuito Embrapa® para recuperação de embriões caprinos/ovinos), composto por duas vias, uma que se comunica com o filtro de coleta de embriões e a outra com o meio de



lavagem, permitindo assim a lavagem de ambos os cornos e a recuperação dos embriões (Fonseca *et al.*, 2013). Esse método, apesar de simples, exige experiência do técnico para transpor os anéis cervicais e perceber caso não tenha acessado o útero, além da habilidade de recuperar todo o líquido infundido.

Além da incapacidade de manipulação retal do trato reprodutivo, inerente aos pequenos ruminantes, a coleta não-cirúrgica também é dificultada pelas características anatômicas da cérvix ovina. A tortuosidade da estrutura, a quantidade de anéis cervicais e os vários tipos de apresentação (lisa, roseta, papila, fenda, bico de pato ou flap) atrapalham ou impedem a passagem (transposição) de instrumentos por toda a extensão cervical (Kershaw *et al.*, 2005; Gusmão, 2011; Pinto *et al.*, 2019). Na tentativa de reduzir a interferência cirúrgica no trato reprodutivo dessas fêmeas, protocolos de dilatação cervical têm sido estudados (Fonseca *et al.*, 2019a, 2019b, 2019c; Prellwitz *et al.*, 2019; Dias *et al.*, 2020, 2023) objetivando facilitar o acesso uterino na espécie ovina.

#### *Protocolos de dilatação cervical para coleta não cirúrgica de embriões*

Os protocolos hormonais que visam à dilatação cervical têm participação significativa na transposição e coleta não cirúrgica de embriões, bem como na MOTE ovina. Normalmente, esses protocolos mimetizam as concentrações hormonais de eventos fisiológicos que promovem o relaxamento natural da cérvix, como o parto e o estro.

Resumidamente, na fase folicular do ciclo estral e no processo de desencadeamento do parto, há aumento das concentrações de estradiol, ocitocina e prostaglandinas, especialmente prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) e prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>; Liggins *et al.*, 1973). Essas alterações induzem a reorganização das fibras colágenas da matriz extracelular, seja alterando a microestrutura das fibras ou estimulando a produção de glicosaminoglicanos. Como resultado, há o relaxamento da musculatura lisa e, conseqüentemente, a dilatação do colo uterino (Ji *et al.*, 2008; Kershaw-Young *et al.*, 2009).

Na tentativa de simular esses mecanismos, vários hormônios têm sido utilizados para dilatação da cérvix, com diferentes doses, horários e vias de administração, mas, em geral, baseados na associação de estradiol, ocitocina e PGF2 $\alpha$ . Os avanços recentes nesses protocolos melhoraram as taxas de transposição cervical e sucesso da lavagem uterina, tornando a coleta não cirúrgica de embriões uma realidade viável também na espécie ovina (Tab. 1; Gusmão *et al.*, 2007, 2009; Leite *et al.*, 2018; Fonseca *et al.*, 2019b, 2019c; Prellwitz *et al.*, 2019; Dias *et al.*, 2020, 2023).

No Brasil, os primeiros protocolos estudados envolveram o uso de análogos da PGF2 $\alpha$  (cloprostenol sódico) e PGE<sub>2</sub> (Misoprostol), 12 horas e 5 horas antes da coleta, respectivamente. Gusmão *et al.* (2007, 2009) obtiveram resultados promissores com o uso desses fármacos possibilitando a transposição cervical e a coleta de embriões em animais das raças Santa Inês e Dorper.

Posteriormente, Fonseca *et al.* (2016) desenvolveram o “Protocolo Embrapa” para relaxamento cervical e lavagem uterina por via transcervical em ovinos, visando a coleta de embriões. Este protocolo é baseado na administração de 37,5  $\mu$ g de d-cloprostenol (análogo da PGF2 $\alpha$ ) e 1 mg de benzoato de estradiol i.m., 18 a 16 horas antes da coleta, além de 50 UI de ocitocina i.v., 20 minutos antes do procedimento. Sua utilização já foi testada em doadoras das raças Santa Inês (Fonseca *et al.*, 2019b; Oliveira *et al.*, 2020), Dorper (Dias *et al.*, 2020), Lacaune (Figueira *et al.*, 2020a), Morada Nova (Oliveira *et al.*, 2022) e mestiças (Dias *et al.*, 2023).

Leite *et al.* (2018) estabeleceram um protocolo farmacológico com anestesia epidural (2,0 mg.kg<sup>-1</sup> cetamina), associada com benzoato de estradiol (100  $\mu$ g i.v., 12 horas antes), d-cloprostenol (37,5  $\mu$ g i.m., 12 horas antes) e ocitocina (100 UI i.v., 15 minutos antes), que permitiu a transposição cervical em 90% das ovelhas da raça Santa Inês utilizadas. Santos *et al.* (2020) compararam os métodos de coleta cirúrgica e transcervical em ovelhas da mesma raça utilizando o mesmo protocolo de dilatação e observaram maior taxa de recuperação embrionária na coleta não cirúrgica (60,5% vs. 37,1%).

Para maior difusão da biotécnica, o protocolo utilizado para a dilatação cervical, essencial para a coleta não cirúrgica nessa espécie, deve considerar o uso de medicamentos disponíveis mundialmente. Em alguns países, como os da União Europeia e Oceania, o uso de estrógenos na produção animal é restrito ou proibido (Diretiva 81/602/EEC; Diretiva 2008/97/EEC; Decisão de execução 2022/679/EEC). Embora o uso dessas drogas nos protocolos reprodutivos ainda não seja restrito no Brasil, há uma tendência para a sua redução ou remoção, tanto pelos potenciais riscos à saúde humana e ao ambiente, como para o fornecimento de produtos compatíveis com as exigências do mercado externo.

Neste contexto, Dias *et al.* (2020, 2023) estudaram a redução do uso de análogos do estrogênio no “Protocolo Embrapa”. Os resultados evidenciaram que a coleta não cirúrgica pode ser eficientemente realizada em ovelhas Dorper e mestiças (Lacaune x Santa Inês), a partir de um protocolo de relaxamento



cervical utilizando d-cloprostenol e ocitocina, com ausência ou redução da dose (0,5 mg) de benzoato de estradiol. Nesse estudo, a redução ou ausência de estrógeno não prejudicou os resultados relacionados com a eficiência da coleta de embriões.

Vale ressaltar que para maior sucesso da técnica, além do protocolo farmacológico, é necessário selecionar adequadamente as doadoras a serem submetidas à coleta não cirúrgica de embriões. Sabe-se que a raça é um fator determinante, devido a variação na anatomia e no grau de penetração da cérvix entre os vários genótipos ovinos. Da mesma forma, a proximidade do parto deve ser considerada como um fator de seleção, uma vez que nulíparas ou fêmeas que pariram há mais de um ano apresentam maior constrição cervical (Fonseca *et al.*, 2019a). Outros critérios de seleção incluem o teste de transposição cervical no estro, para identificar animais com maior facilidade de transposição (Santos *et al.*, 2019), a avaliação do grau de dificuldade de visualização, pinçamento e retração do colo uterino e a identificação da presença de anormalidades anatômicas que dificultem o procedimento (Fonseca *et al.*, 2016, 2019a; Prellwitz *et al.*, 2019). Outra abordagem que pode ser útil é a definição do “mapa cervical” antes da coleta por ultrassonografia (Figueira *et al.*, 2020b) ou com a vela de Hegar durante a transposição (Fonseca *et al.*, 2019a).

#### *Efeitos dos protocolos de dilatação cervical sobre o ambiente uterino e embriões*

Os embriões geralmente são coletados durante a fase luteal do ciclo estral, quando o ambiente uterino está sob influência de altas concentrações de P4 (Spencer *et al.*, 2004). Assim, a administração de hormônios exógenos nesse momento, pode interferir na motilidade uterina e na atividade das glândulas uterinas (Murray, 1992; Wathes *et al.*, 1996; Stellflug *et al.*, 2001), expondo os embriões a um ambiente modificado durante as últimas horas antes da coleta.

Em ovinos, o efeito dos hormônios administrados *in vivo* para dilatação cervical sobre o ambiente uterino e a qualidade embrionária ainda não está bem elucidado. Dias *et al.* (2023) relataram que protocolos de dilatação cervical, com análogo da PGF2 $\alpha$ , associado ou não ao benzoato de estradiol, interferiram na morfologia do corpo lúteo e alteraram a relação sérica de E2:P4, 16h após a aplicação. Apesar de não terem sido observadas diferenças no número ou na qualidade dos embriões produzidos, as alterações já citadas podem ser críticas para o desenvolvimento inicial dos embriões. Vale ressaltar que não apenas o estradiol, mas também o d-cloprostenol isoladamente afetou a função luteal e o perfil endócrino das ovelhas doadoras.

Oliveira *et al.* (2020) observaram uma correlação positiva entre a concentração de estradiol sérico no momento da coleta transcervical e a taxa de viabilidade embrionária, em doadoras submetidas à regime curto de sincronização de estro. Tal achado sugere que, nesse caso, a alteração endócrina induzida pelo protocolo de dilatação cervical não afetou a morfologia dos embriões.

Nosso grupo estudou a hipótese de que a coleta transcervical em ovinos, utilizando um protocolo de dilatação com estradiol, PGF2 $\alpha$  e ocitocina, 12 horas antes da coleta, poderia afetar a função luteal, a qualidade dos embriões e o ambiente uterino. Não encontramos alterações detectáveis na qualidade morfológica, no estágio de desenvolvimento ou na incidência de apoptose dos embriões produzidos. No entanto, induziu luteólise, reduziu as concentrações de P4 e alterou transitoriamente a expressão gênica embrionária, diminuindo a quantidade de mRNA dos genes NANOG e OCT-4, envolvidos com a diferenciação celular e pluripotência, respectivamente (Santos *et al.*, 2022). O protocolo de dilatação também modificou o perfil proteico do lavado uterino recuperado após a coleta dos embriões. Foram identificadas 1.447 proteínas, das quais 436 foram encontradas exclusivamente no grupo tratado e 126 no grupo controle. Um total de 17 proteínas foram altamente expressas no grupo tratado, incluindo proteínas relacionadas à biossíntese de prostaglandinas e à regulação do estradiol. No grupo controle, cinco proteínas foram reguladas positivamente, incluindo proteínas ligadas à regulação positiva do desenvolvimento embrionário (Santos *et al.* dados não publicados).

A forma mais eficiente de avaliação da qualidade embrionária em programas de MOTE é a confirmação da prenhez, indicando a capacidade do embrião produzido realizar a implantação na receptora. Lewis (2010) avaliou os efeitos da administração de estradiol, ocitocina ou ambos, no dia seis após o acasalamento, não encontrando efeitos em nenhum dos tratamentos sobre a função luteal ou taxa de prenhez das ovelhas. O estudo não envolveu coleta, manipulação, criopreservação e/ou transferência dos embriões, porém é possível inferir que os tratamentos utilizados poderiam influenciar a qualidade embrionária e a taxa de prenhez. Figueira *et al.* (2019) avaliaram a taxa de prenhez após a transferência de embriões criopreservados de ovelhas Lacaune, coletados por via transcervical. A taxa de prenhez obtida foi de 29,3% e a taxa de parto de 18,8%, demonstrando que os embriões expostos à um protocolo hormonal para dilatação da cérvix antes da coleta apresentaram uma competência razoável para estabelecimento da prenhez. Outros



estudos mais aprofundados, envolvendo todas as etapas da MOTE com coleta não cirúrgica dos embriões, podem continuar contribuindo para o melhor esclarecimento dessa relação.

Tabela 1. Coleta não cirúrgica de embriões em ovelhas: protocolos para dilatação cervical, sucesso da técnica e produção de embriões.

Referência	Raça da doadora	Protocolo de dilatação cervical	Sucesso da coleta	Taxa de recuperação	Estruturas recuperadas	Embriões viáveis*
Gusmão et al. (2007) <sup>B</sup>	Santa Inês	Sem fármacos	0% (0/13)	–	–	–
Gusmão et al. (2007) <sup>B</sup>	Santa Inês	50µg CPSOD	59% (10/17)	–	6,5 ± 2	3,3 ± 3,5
Gusmão et al. (2007) <sup>B</sup>	Santa Inês	200µg Misoprostol	63% (12/19)	–	6,5 ± 4,7	4,0 ± 4,3
Gusmão et al. (2009) <sup>B</sup>	Dorper	Sem fármacos	0% (0/10)	–	–	–
Gusmão et al. (2009) <sup>B</sup>	Dorper	200µg Misoprostol	94,8% (55/58)	–	6 ± 3,6	3,5 ± 3,2
Fonseca et al. (2019b) <sup>A</sup>	Santa Inês	37,5µg d-CP 1mg BE 50 UI OT	77,8% (7/9)	–	1 ± 1,2	–
Dias et al. (2020) <sup>A</sup>	Dorper	37,5µg d-CP 50UI OT	83,3% (10/12)	52,6%	1 ± 0,3	–
Dias et al. (2020) <sup>A</sup>	Dorper	37,5µg d-CP 0,5mg BE 50UI OT	91,7% (11/12)	39,1%	0,9 ± 0,3	–
Dias et al. (2020) <sup>A</sup>	Dorper	37,5µg d-CP 1mg BE 50UI OT	100% (12/12)	40%	0,7 ± 0,2	–
Figueira et al. (2020) <sup>B</sup>	Lacaune	37,5µg d-CP 1mg BE 50UI OT	90,9% (20/22)	67,8 %	8,7 ± 1,1	6,9 ± 1,1
Santos et al. (2020) <sup>B</sup>	Santa Inês	0,12mg CPSOD 100µg BE 100UI OT	61,4% (35/57)	60,5 %	4,2 ± 0,7	2,7 ± 0,6
Oliveira et al. (2020) <sup>B</sup>	Santa Inês	37,5µg d-CP 1mg BE 50UI OT	86,7% (13/15)	–	5,8 ± 1,3	2,9 ± 1,0
Oliveira et al. (2022) <sup>B</sup>	Morada Nova	37,5µg d-CP 1mg BE 50UI OT	91,6% (11/12)	71,4%	8,6 ± 1,8	5,8 ± 1,9
Dias et al. (2023) <sup>B</sup>	Mestiça	37,5µg d-CP 50UI OT	90% (9/10)	60,4%	6,1 ± 2,2	3,7 ± 1,5
Dias et al. (2023) <sup>B</sup>	Mestiça	37,5µg d-CP 0,5mg BE 50UI OT	83,3% (10/12)	107,2%	8,9 ± 1,7	6,2 ± 1,7
Dias et al. (2023) <sup>B</sup>	Mestiça	37,5µg d-CP 1mg BE 50UI OT	64,3% (9/14)	82,5%	8,9 ± 2,7	4,8 ± 2,1

A: Ovelhas submetida à sincronização do estro; B: Ovelhas submetida à superovulação; CPSOD: cloprostenol sódico; d-CP: d-cloprostenol; OT: ocitocina; BE: benzoato de estradiol; \*embriões viáveis ou transferíveis classificados como graus I, II ou III.



### Bem-estar na coleta na coleta não cirúrgica de embriões

O bem-estar animal é um conceito complexo e abstrato relacionado à qualidade de vida dos animais, incluindo aspectos físicos e psicológicos, condições de saúde, comportamento e manejo (Scott *et al.*, 2001; Fitzpatrick *et al.*, 2006; Windsor *et al.*, 2016).

A crescente preocupação do público em geral com o bem-estar na produção de alimentos de origem animal tem pressionado a adoção de procedimentos veterinários menos invasivos. Pesquisas comprovam que procedimentos de manejos ainda presentes nos sistemas pecuários causam alterações em parâmetros de bem-estar (Alsemgeest *et al.*, 1995; Petyim *et al.*, 2007; Arthington *et al.*, 2008; Long *et al.*, 2011; Fisher *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2020; Windsor *et al.*, 2016). Consequentemente, a exigência dos consumidores por melhores condições de vida para os animais de produção vem se tornando maior e, em breve, isso deverá se estender aos procedimentos utilizados para a produção de embriões *in vivo*. Logo, é imperativo que haja um controle efetivo da dor e do estresse dos animais em todas as etapas da MOTE (Fonseca *et al.*, 2019a).

Nesse cenário, a coleta não cirúrgica de embriões se apresenta como uma excelente alternativa. Por afetar menos o bem-estar do que a técnica cirúrgica e possuir vantagens como: ser realizada em estação ou decúbito esternal; sem necessidade de jejum prolongado; necessidade mínima de sedativos; recuperação mais rápida; e ocorrência rara de lesões ou sequelas no trato genital da doadora (Andrioli *et al.*, 1999; Fonseca *et al.*, 2019a; Pinto *et al.*, 2019).

#### *Avaliação do bem-estar animal*

O estado de bem-estar em ruminantes pode ser avaliado através de parâmetros como observações comportamentais (apetite, comportamento, interação social), avaliação de sinais clínicos (frequência respiratória, frequência cardíaca, temperatura retal), bem como de marcadores sanguíneos de estresse ou lesão tecidual, como cortisol e proteínas de fase aguda (Fitzpatrick *et al.*, 2006; Stafford, 2014; Costa *et al.*, 2018). Adicionalmente, uma série de escalas para avaliar a gravidade da dor com base em sinais clínicos e patológicos têm sido estudadas em ovinos (Fitzpatrick *et al.*, 2006; McLennan *et al.*, 2016; Häger *et al.*, 2017; Goldberg, 2018;). Porém, o reconhecimento da dor em pequenos ruminantes é uma tarefa difícil, especialmente ovelhas, que tendem a ser estoicos e não mostrar sinais evidentes de desconforto (Plummer e Schleining, 2013).

A dor aguda é capaz de produzir uma resposta sistêmica ao estresse por induzir a ativação do sistema nervoso simpático, secreção de glicocorticóides, hipermetabolismo, retenção de sódio e água e metabolismo alterado de carboidratos e proteínas (Anderson e Muir, 2005). Além disso, há aumento de catecolaminas plasmáticas e efeitos cardiovasculares que geram aumento nas frequências cardíaca e respiratória e alteração de pressão arterial, débito cardíaco e resistência vascular sistêmica (Demarco e Pascoe, 2008; Karas *et al.*, 2008; Stewart *et al.*, 2010). Entretanto, é importante levar em consideração que a manipulação dos animais para a mensuração dessas variáveis também pode interferir nos resultados.

O estresse é uma reação do corpo a um desafio e pode ativar o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, aumentando as concentrações séricas de corticosteroides (Goff, 2015). O cortisol é o biomarcador sanguíneo de estresse e dor mais utilizado (Costa *et al.*, 2018). Além da coleta transcervical de embriões (Santos *et al.*, 2020; Ribeiro *et al.*, 2023), sua elevação foi constatada em outros procedimentos reprodutivos potencialmente estressantes em fêmeas ruminantes, como colocação de implantes intravaginal de progesterona (Long *et al.*, 2011), inseminação artificial (Nakao *et al.*, 1994; Houdeau *et al.*, 2002), laparoscopia (Martin *et al.*, 1981) e aspiração folicular transvaginal (Chastant-Maillard *et al.*, 2003; Petyim *et al.*, 2007). De maneira fisiológica, as variações da glicemia tendem a acompanhar as do cortisol, uma vez que durante o estresse a secreção do cortisol intensifica processos catabólicos, estimulando a gliconeogênese e a elevação da glicemia (Goff, 2015; Lee *et al.*, 2015).

A resposta fisiológica à injúria tecidual envolve inflamação local e o início de eventos que levam a uma reação inflamatória sistêmica. Essa resposta pode determinar alterações na concentração de um grupo de proteínas sanguíneas, chamadas proteínas de fase aguda. De acordo com o nível sérico dessas proteínas, as mesmas podem ser classificadas em positivas, quando suas concentrações aumentam em resposta à inflamação, ou negativas caracterizadas pelo decréscimo das concentrações séricas na presença de processo inflamatório. As principais proteínas de fase aguda positivas em ovinos são haptoglobina e sêrum amiloide A, enquanto a albumina é a principal de fase aguda negativa (Cecilian *et al.*, 2012; Tothova *et al.*, 2014; Iliev e Georgieva, 2018). O potencial uso de proteínas de fase aguda como indicadores de estresse também tem sido estudado em ruminantes (Alsemgeest *et al.*, 1995; Arthington *et al.*, 2008; González *et al.*, 2008; Lomborg *et al.*, 2008). Nessa perspectiva, a avaliação desses marcadores clínicos e sanguíneos pode auxiliar



tanto na análise das condições de bem-estar dos animais de produção, como da eficácia de medidas de controle de dor e estresse.

Recentemente, Santos *et al.* (2020) compararam os métodos de coleta de embriões em ovinos em relação ao bem-estar animal. Nesse estudo foi possível observar respostas menos intensas em marcadores clínicos e bioquímicos de estresse/dor na coleta transcervical, porém nenhuma diferença foi identificada nos parâmetros comportamentais (tempo para levantar-se e comer após as coletas). Intrigantemente, a coleta por via transcervical ainda resultou em elevação da frequência cardíaca e das concentrações de cortisol e glicose em alguns momentos avaliados. Oliveira *et al.* (2018) observaram uma resposta inflamatória aguda em ovelhas submetidas a coleta de embriões cirúrgica ou transcervical, com elevação de proteína total e haptoglobina. Esses autores associaram os resultados encontrados ao estresse e dor gerados pela manipulação cervical, além das lesões decorrentes da coleta. Deste modo, menos sendo menos invasiva essa técnica ainda pode interferir no bem-estar dos animais utilizados, mostrando a necessidade do controle da dor durante o procedimento.

#### *Controle da dor na coleta não cirúrgica de embriões*

O controle da dor é parte integrante do conceito de bem-estar e a utilização de protocolos com analgésicos e anti-inflamatórios durante procedimentos dolorosos pode reduzir o estresse e garantir melhores condições de bem-estar para os animais de produção (Windsor *et al.*, 2016).

O tipo de dor mais fácil de tratar é a induzida, cuja magnitude é influenciada pelo procedimento, pelos métodos utilizados e pela experiência e habilidade do profissional. Dentre as estratégias para minimizar a dor de maneira preventiva estão: anestesia local, anestesia geral, sedação e tranquilização, que inibem a detecção ou modulam a intensidade da dor. Porém esses medicamentos não tratam os processos fisiológicos, como a inflamação, induzidos pela lesão tecidual que podem levar à dor “patológica” após a o procedimento (Anderson e Muir, 2005).

Segundo Adams (2017), a dor associada à inflamação é provavelmente a principal fonte de dor em pequenos ruminantes, comumente acompanhada por alodinia (percepção de um estímulo não nocivo como doloroso) e hiperalgesia (respostas exageradas ou prolongada a estímulos nocivos). Assim, as estratégias de controle da dor nessas espécies devem ser clinicamente eficazes, economicamente viáveis para o proprietário e sempre que possível centradas na analgesia preventiva (Plummer e Schleinig, 2013).

Neste contexto, destacam-se os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), fármacos amplamente utilizados na medicina veterinária, devido à sua facilidade de administração, meia-vida longa e potente ação anti-inflamatória e analgésica, além de não induzir efeito sedativo. Suas propriedades terapêuticas se devem a regulação da enzima ciclooxigenase (COX), reduzindo a produção de mediadores inflamatórios, e a outros efeitos analgésicos mediados centralmente (Lizarraga e Chambers, 2012; Clark-Price, 2014; Adams, 2017). Acredita-se que a associação de AINEs com outros analgésicos pode melhorar a prevenção da dor aguda e minimizar os efeitos colaterais de cada medicamento (Windsor *et al.*, 2016).

Nosso grupo vem estudando diferentes protocolos farmacológicos para o controle da dor em ovelhas Santa Inês submetidas à coleta não cirúrgica de embriões. Nos últimos estudos, avaliamos o efeito da administração do AINE meloxicam ( $1 \text{ mg.kg}^{-1}$  i.v. antes da coleta e i.m. 24 h após) associado ou não ao analgésico dipirona ( $50 \text{ mg.kg}^{-1}$  i.m. antes, 12 h e 24 h após a coleta), sobre alguns parâmetros de bem-estar: frequência cardíaca, frequência respiratória, concentração sanguínea de cortisol, glicose, proteínas totais, albumina e globulinas. Nas condições experimentais, a coleta transcervical induziu alterações transitórias indicativas de estresse e possivelmente dor. A administração de meloxicam foi ineficaz para reduzir essas respostas e sua associação com dipirona promoveu apenas efeitos leves, sem modificar as principais respostas indicativas de bem-estar (Ribeiro *et al.*, 2023). Em outro estudo, a associação de meloxicam ( $1 \text{ mg.kg}^{-1}$  i.v.) com o analgésico opioide butorfanol ( $0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$  i.m.) antes da coleta, também não reduziu as mesmas respostas avaliadas no grupo tratado. De maneira geral, as doadoras apresentaram elevação das frequências cardíaca e respiratória e das concentrações sanguíneas de glicose e cortisol (Schmidt *et al.* dados não publicados). Em ambos os estudos, as principais alterações ocorreram próximas aos momentos de maior manipulação cervical, confirmando que o procedimento causa estresse/dor e interfere no bem-estar das fêmeas coletadas.

É importante ressaltar que a sedação e a anestesia epidural, recomendadas para a realização da coleta não cirúrgica, contribuem para o controle da dor durante o procedimento, que envolve intensa manipulação da vagina e da cervix. Além disso, a anestesia epidural favorece o relaxamento cervical (Derossi *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2009; Leite *et al.*, 2018). O “Protocolo Embrapa” (Fonseca *et al.*, 2016, 2019a, 2019b), por exemplo, recomenda que as doadoras submetidas à coleta de embriões transcervical



recebam: sedação com maleato de acepromazina (0,1 mg.kg<sup>-1</sup> i.m.); epidural sacrococcígea com cloridrato de lidocaína 2% (1–2 mL); anestesia tópica no colo uterino (gaze estéril embebida em 3 mL de cloridrato de lidocaína 2%); e solução de dipirona sódica e N-butilbrometo de hioscina (Buscofin<sup>®</sup>, Agener União; 5 mL i.v. + 5 mL i.m.). Já no protocolo de dilatação cervical recomendado por Leite *et al.* (2018) os animais são previamente sedados com de maleato de acepromazina (0,1 mg.kg<sup>-1</sup> i.v.) e diazepam (0,2 mg.kg<sup>-1</sup> i.v.) e submetidos à anestesia peridural lombossacral com cloridrato de cetamina (2,0 mg.kg<sup>-1</sup>).

Os procedimentos necessários para a coleta não cirúrgica de embriões (manipulação dos animais, sedação, contenção, anestesia, coleta dos embriões) são estressantes e a coleta propriamente dita também é dolorosa. Portanto, outras opções de controle da dor devem continuar sendo consideradas para melhorar o bem-estar de ovelhas submetidas à essa biotécnica reprodutiva.

### Considerações finais

A MOTE tem contribuído sobremaneira para o melhoramento genético, zootécnico e sanitário dos rebanhos ovinos. A coleta de embriões pela técnica não cirúrgica tem se destacado, tanto pelos resultados promissores, como por proporcionar melhores condições de bem-estar aos animais. No entanto, alguns aspectos, como a interferência dos protocolos de dilatação cervical na qualidade embrionária e o controle da dor durante os procedimentos, ainda demandam estudos mais aprofundados. Assim, acreditamos que a resolução desses pontos críticos é fundamental para o maior viabilidade e difusão da produção *in vivo* de embriões na espécie ovina.

### Agradecimentos

Os autores agradecem aos apoios recebidos pela Capes, CNPq Faperj. ACSR e APPS são bolsistas da Capes. JDRS é bolsista da Faperj. FZB é bolsista do CNPq e Faperj.

### Referências

- Adams J. Assessment and management of pain in small ruminants. *Livest*, v.22, n.6, p.324-328, 2017.
- Alsemgeest SP, Lambooy IE, Wierenga HK, Dieleman SJ, Meerkerk B, Van Ederen AM, Niewold TA. Influence of physical stress on the plasma concentration of serum amyloid-A (SAA) and haptoglobin (Hp) in calves. *Vet Q*, v.17, n.1, p.9-12, 1995.
- Anderson DE, Muir WW. Pain management in ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, v.21, n.1, p.19-31, 2005.
- Andrioli A, Simplicio AA, Soares AT, Visintin JA. Efficiency and effect of consecutive embryo recoveries on the reproductive system of goat donors. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.36, n.3, p.136-143, 1999.
- Arthington JD, Qiu X, Cooke RF, Vendramini JMB, Araujo DB, Chase CC, Coleman SW. Effects of preshipping management on measures of stress and performance of beef steers during feedlot receiving. *Sci J Anim Sci*, v.86, n.8, p.2016-2023, 2008.
- Batista NL, Bonifácio DS. Caprinovinocultura no semiárido brasileiro - fatores limitantes e ações de mitigação. *Agrop Cient Sem*, v.11, n.2, p.1-9, 2015.
- Ceciliani F, Ceron JJ, Eckersall PD, Sauerwein H. Acute phase proteins in ruminants. *J Proteomics*, v.75, n.14, p.4207-4231, 2012.
- Chastant-Maillard S, Quinton H, Lauffenburger J, Cordonnier-Lefort N, Richard C, Marchal J, Mormede P, Renard J. Consequences of transvaginal follicular puncture on well-being in cows. *Reprod*, v.125, p.555-563, 2003.
- Clark-Price S. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and Corticosteroids. In: Egger CM, Love M, Doherty T (Ed.). *Pain Management in Veterinary Practice*. Reino Unido: John Wiley & Sons, 2014. p.69-84.
- Cognié Y, Baril G, Poulin N, Mermillod P. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*, v.59, n.1, p.171-188, 2003.
- Costa VGG, Vieira AD, Schneider A, Rovani MT, Gonçalves PBD, Gasperin BG. Systemic inflammatory and stress markers in cattle and sheep submitted to different reproductive procedures. *Cienc Rural*, v.48, n.12, e20180336, 2018.
- Demarco GJ, Pascoe PJ. Anatomy, Physiology, and Effects of Pain. In: Fish R, Danneman PJ, Brown M, Karas A (Ed.). *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals*. Estados Unidos: Elsevier Inc., 2008. p.3-



25.

**Derossi R, Junqueira AL, Lopes RA, Beretta MP.** Use of ketamine or lidocaine or in combination for subarachnoid analgesia in goats. *Small Rumin Res*, v.59, n.1, p.95-101, 2005.

**Dias JH, Gonçalves JD, Arrais AM, Souza-Fabjan JMG, Bastos R, Batista RITP, Siqueira LGB, Oliveira MEF, Fonseca JF.** Effects of different doses of estradiol benzoate used in a cervical relaxation protocol on the success of non-surgical embryo recovery and luteal function in superovulated ewes. *Domest Anim Endocrinol*, v.82, p.106751, 2023.

**Dias JH, Pupin MA, Duarte GS, Brair VL, De Paula CJC, De Sousa MAP, Batista RITP, Souza-Fabjan JMG, Oliveira MEF, Fonseca JF.** Successful transcervical uterine flushing can be performed without or reduced dose of oestradiol benzoate in cervical relaxation protocol in Dorper ewes. *Reprod Domest Anim*, v.55, n.7, p.844-850, 2020.

**Figueira LM, Alves NG, Batista RITP, Brair VL, Lima RR, Oliveira MEF, Fonseca JF, Souza-Fabjan JMG.** Pregnancy rate after fixed-time transfer of cryopreserved embryos collected by non-surgical route in Lacaune sheep. *Reprod Domest Anim*, v.54, n.11, p.1493-1496, 2019.

**Figueira LM, Alves NG, Maia ALRS, Souza-Fabjan JMG, Batista RITP, Arrais AM, Lima RR, Oliveira MEF, Fonseca JF.** In vivo embryo production and recovery in lacaune ewes after imposing a superovulation treatment regimen is related to pFSH dose. *Anim Reprod Sci*, v.223, 2020a.

**Figueira LM, Alves NG, Souza-Fabjan JMG, Vergani GB, Oliveira MEF, Lima RR, Fonseca JF.** Ultrasonographic cervical evaluation: A tool to select ewes for non-surgical embryo recovery. *Reprod Domest Anim*, v.55, n.11, p.1638-1645, 2020b.

**Fisher AD, Giraud A, Martin PAJ, Paton MW.** The use of quantitative risk assessment to assess lifetime welfare outcomes for breech strike and mulesing management options in Merino sheep. *Anim Welf*, v.22, n.2, p.267-275, 2013.

**Fitzpatrick J, Scott M, Nolan A.** Assessment of pain and welfare in sheep. *Small Rumin Res*, v.62, n.1, p. 55-61, 2006.

**Fonseca FF, Souza JMG., Camargo LSA.** Produção de Oócitos e Embriões de Pequenos Ruminantes: Passado, Presente e Futuro. *Acta Sci Vet*, v.38, n.2, p.337-369, 2010.

**Fonseca JF.** Alguns aspectos da transferência de embriões em caprinos. *Acta Sci Vet*, v.34, n.1, p.65-70, 2006.

**Fonseca JF, Cruz RC, Oliveira MEF, Souza-Fabjan JMG, Viana JHM.** *Bioteχνologias Aplicadas à Reprodução de Ovinos e Caprinos*. Brasília: Embrapa, 2014.

**Fonseca JF, Oliveira MEF, Brandão FZ, Batista RITP, Garcia AR, Bartlewski PM, Souza-Fabjan JMG.** Non-surgical embryo transfer in goats and sheep: The Brazilian experience. *Reprod Fertil Dev*, v.31, n.1, p.17-26, 2019a.

**Fonseca JF, Souza-Fabjan JMG, Oliveira MEF, Leite CR, Nascimento-Penido PMP, Brandão FZ, Lehloenya KC.** Nonsurgical embryo recovery and transfer in sheep and goats. *Theriogenology*, v.86, n.1, p.144-151, 2016.

**Fonseca JF, Zambrini FN, Alvim GP, Peixoto MGCD, Verneque RS, Viana JHM.** Embryo production and recovery in goats by non-surgical transcervical technique. *Small Rumin Res*, v.111, n.1-3, p.96-99, 2013.

**Fonseca JF, Zambrini FN, Guimarães JD, Silva MR, Oliveira MEF, Bartlewski PM, Souza-Fabjan JMG.** Cervical penetration rates and efficiency of non-surgical embryo recovery in estrous-synchronized Santa Inês ewes after administration of estradiol ester (benzoate or cypionate) in combination with d-cloprostenol and oxytocin. *Anim Reprod Sci*, v.203, p.25-32, 2019b.

**Fonseca JF, Zambrini FN, Guimarães JD, Silva MR, Oliveira MEF, Brandão FZ, Bartlewski PM, Souza-Fabjan JMG.** Combined treatment with oestradiol benzoate, d-cloprostenol and oxytocin permits cervical dilation and nonsurgical embryo recovery in ewes. *Reprod Domest Anim*, v.54, n.1, p.118-125, 2019c.

**Goff JP.** The Endocrine System. In: Reece WO, Erickson HH, Goff JP, Uemura EE (Ed.). *Dukes' Physiology of Domestic Animals*. 13. ed. Hoboken: Wiley-Blackwell, 2015. p.617-653.

**Goldberg ME.** Pain recognition and scales for livestock patients. *J Dairy Vet Anim Res*, v.7, n.5, p. 236-238, 2018.

**González FHD, Tecles F, Martínez-Subiela S, Tvarijonaviciute A, Soler L, Cerón JJ.** Acute Phase Protein Response in Goats. *J Vet Diagn Invest*, v.20, n.5, p.580-584, 2008.

**Gusmão AL.** State-of-the-art in the transcervical embryo collection in goats and sheep. *Acta Sci Vet*, v.39, n.1, p.37-42, 2011.

**Gusmão AL, Silva JC, Bittencourt TCC, Martins, LEP, Gordiano HD, Barbosa LP.** Coleta



- transcervical de embriões em ovinos da raça Dorper no semiárido do Nordeste brasileiro. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.61, n.2, p.313-318, 2009.
- Gusmão AL, Silva JC, Quintela AA, Moura JCA, Resende J, Gordiano H, Chalhoub M, Ribeiro Filho AL, Bittencourt TCBS, Barbosa LP.** Colheita Transcervical de Embriões Ovinos da Raça Santa Inês no Semi-árido Nordestino. *Rev Bras Saúde Prod An*, v.8, n.1, p.1-10, 2007.
- Häger C, Biernot S, Buettner M, Glage S, Keubler LM, Held N, Bleich EM, Otto K, Müller CW, Decker S, Talbot SR, Bleich A.** The Sheep Grimace Scale as an indicator of post-operative distress and pain in laboratory sheep. *PLoS ONE*, v.12, n.4, e0175839, 2017.
- Houdeau E, Raynal P, Marnet PG, Germain G, Mormède P, Rossano B, Monnerie R, Prud'Homme MJ.** Plasma levels of cortisol and oxytocin, and uterine activity after cervical artificial insemination in the ewe. *Reprod Nutr Dev*, v.42, n.4, p.381-392, 2002.
- Iliev P, Georgieva T.** Acute phase proteins in sheep and goats – function, reference ranges and assessment methods: An overview. *Bulg J Vet Med*, v.21, n.1, p.1-16, 2018.
- Ishwar AK, Memon MA.** Embryo transfer in sheep and goats: a review. *Small Rumin Res*, v.19, n.1, p.35-43, 1996.
- Ji H, Dailey TL, Long V, Chien EK.** Prostaglandin E2-regulated cervical ripening: analysis of proteoglycan expression in the rat cervix. *Am J Obstet Gynecol*, v.198, n.5, p.536e1-536e7, 2008.
- Karas AZ, Danneman PJ, Cadillac JM.** Strategies for Assessing and Minimizing Pain. In: Fish R, Danneman PJ, Brown M, Karas A (Ed.). *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals*. Estados Unidos: Elsevier Inc., 2008. p.195-218.
- Kershaw CM, Khalid M, McGowan MR, Ingram K, Leethongdee S, Wax G, Scaramuzzi RJ.** The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology*, v.64, n.5, p.1225-1235, 2005.
- Kershaw-Young CM, Khalid M, McGowan MR, Pitsillides AA, Scaramuzzi RJ.** The mRNA expression of prostaglandin E receptors EP2 and EP4 and the changes in glycosaminoglycans in the sheep cervix during the estrous cycle. *Theriogenology*, v.72, n.2, p.251-261, 2009.
- Lee DY, Kim E, Choi MH.** Technical and clinical aspects of cortisol as a biochemical marker of chronic stress. *BMB Rep*, v.48, n.4, p.209-216, 2015.
- Leite CR, Fonseca JF, Fernandes DAM, Souza-Fabjan JMG, Ascoli FO, Brandão FZ.** Cervical relaxation for non-surgical uterus access in Santa Inês ewes. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.70, n.6, p.1671-1679, 2018.
- Lewis GS.** Pregnancy rates after ewes were treated with estradiol-17 $\beta$  and oxytocin. *Sheep Goat Res J*, v.25, p.21-26, 2010.
- Liggins GC, Fairclough RJ, Grieves AS, Kendall JZ, Knox BS.** The Mechanism of Initiation of Parturition in the Ewe. *Recent Prog Horm Res*, v.29, p.111-159, 1973.
- Lizarraga I, Chambers J.** Use of analgesic drugs for pain management in sheep. *N Z Vet J*, v.60, n.2, p.87-94, 2012.
- Lomborg SR, Nielsen LR, Heegaard PMH, Jacobsen S.** Acute phase proteins in cattle after exposure to complex stress. *Vet Res Commun*, v.32, n.7, p.575-582, 2008.
- Long ST, Thinh NC, Yusuf M, Nakao T.** Plasma Cortisol Concentrations after CIDR Insertion in Beef Cows. *Reprod Domest Anim*, v.46, n.1, p.181-184, 2011.
- Martin GB, Oldham CM, Lindsay DR.** Effect of stress due to laparoscopy on plasma cortisol levels, the preovulatory surge of LH, and ovulation in the ewe. *Theriogenology*, v.16, n.1, p.39-44, 1981.
- McLennan KM, Rebelo CJB, Corke MJ, Holmes MA, Leach MC, Constantino-Casas F.** Development of a facial expression scale using footrot and mastitis as models of pain in sheep. *Appl Anim Behav Sci*, v.176, p.19-26, 2016.
- Murray MK.** The Effect of Estrogen and Progesterone on Structural Changes in the Uterine Glandular Epithelium of the Ovariectomized Sheep. *Biol Reprod*, v.47, n.3, p.408-417, 1992.
- Nakao T, Sato T, Moriyoshi M, Kawata K.** Plasma Cortisol Response in Dairy Cows to Vaginoscopy, Genital Palpation per Rectum and Artificial Insemination. *J Vet Med A*, v.41, n.1-10, p.1621, 1994.
- Oliveira FC, Haas CS, Ferreira CER, Goularte KL, Pegoraro LMC, Gasperin BG, Schneider A, Mondador, RG, Lucia T, Vieira AD.** Inflammatory markers in ewes submitted to surgical or transcervical embryo collection. *Small Rumin Res*, v.158, p.15-18, 2018.
- Oliveira MEF, Arrais AM, Mello MRB, Vergani GB, Figueira LM, Esteves SN, Pereira VSA, Garcia AR, Bartlewski PM, Fonseca JF.** A study of the factors affecting embryo yields and quality in superovulated Morada Nova ewes that underwent non-surgical uterine flushing. *Reprod Domest Anim*, v.57, n.4, p.393-401, 2022.



- Oliveira MEF, Zambrini FN, Souza-Fabjan JMG, Bartlewski PM, Guimarães JD, Brandão FZ, Fonseca JF.** Repeated trans-cervical embryo recoveries in Santa Inês ewes subjected to short- or long-term superovulatory treatment regimens. *Anim Reprod Sci*, v.217, 106469, 2020.
- Petyim S, Båge R, Madej A, Larsson B.** Ovum pick-up in dairy heifers: Does it affect animal well-being? *Reprod Domest Anim*, v.42, n.6, p.623-632, 2007.
- Pinto PHN, Balaro MFA, Arashiro EKN, Batista RITP, Oliveira MEF, Bragança GM, Ferreira JF, Brandão FZ.** Produção *in vivo* de embriões ovinos. *Rev Bras Reprod Anim*, v.41, n.1, p.208-216, 2017.
- Pinto PHN, Santos JDR, Brandão FZ, Balaro MFA.** Colheita transcervical de embriões em ovelhas e cabras. *Rev Bras Reprod Anim*, v.43, n.2, p.147-155, 2019.
- Plummer PJ, Schleining JA.** Assessment and Management of Pain in Small Ruminants and Camelids. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, v.29, n.1, p.185-208, 2013.
- Prellwitz L, Zambrini FN, Guimarães JD, Sousa MAP, Oliveira MEF, Garcia AR, Esteves SN, Bartlewski PM, Souza-Fabjan JMG, Fonseca JF.** Comparison of the intravenous and intravaginal route of oxytocin administration for cervical dilation protocol and non-surgical embryo recovery in oestrous-induced Santa Inês ewes. *Reprod Domest Anim*, v.54, n.9, p.1230-1235, 2019.
- Ribeiro ACS, Taira AR, Santos VC, Brair VL, Lopes MPF, Balaro MFA, Souza-Fabjan JMG, Fonseca JF, Ungerfeld R, Brandão FZ.** Use of meloxicam with or without dipyrrone in non-surgical embryo recovery in hair sheep: effects on animal welfare. *Reprod Domest Anim*, 2023. No prelo.
- Santos ADF, Santos DC, Conceição JC, Carvalho ALC, Lisboa ML.** O. Taxa de gestação em fêmeas Santa Inês inseminadas pela via transcervical com sêmen fresco associada ou não à anestesia epidural. *Rev Bras Saúde Prod Anim*, v.10, n.1, p.224-230, 2009.
- Santos JDR, Arashiro EKN, Balaro MFA, Souza-Fabjan JMG, Pinto PHN, Souza CV, Leite CR, Fonseca JF, Brandão FZ.** Cervical transposition test using Hegar dilator at oestrus as a tool to select ewes for transcervical embryo collection. *Reprod Domest Anim*, v.54, n.1, p.126-128, 2019.
- Santos JDR, Batista RITP, Ungerfeld R, Taira AR, Espírito Santo CG, Souza-Fabjan JMG, Fernandes DAM, Balaro MFA, Cosentino IO, Brair VL, Pinto PHN, Carvalho ABS, Fonseca JF, Brandão FZ.** Hormonal protocol used for cervical dilation in ewes does not affect morphological embryo quality but reduces recovery rate and temporarily alters gene expression. *Vet Rec*, v.190, n.5, e1064, 2022.
- Santos JDR, Ungerfeld R, Balaro MFA, Souza-Fabjan JMG, Cosentino IO, Brair VL, Souza CV, Pinto PHN, Bade ALC, Fonseca JF, Brandão FZ.** Transcervical vs. laparotomy embryo collection in ewes: The effectiveness and welfare implications of each technique. *Theriogenology*, v.153, p.112-121, 2020.
- Scott EM, Nolan AM, Fitzpatrick JL.** Conceptual and methodological issues related to welfare assessment: A framework for measurement. *Acta Agric Scand A Anim Sci*, v.51, p.5-10, 2001.
- Souza-Fabjan JMG, Panneau B, Duffard N, Locatelli Y, Figueiredo JR, Freitas VJF, Mermillod P.** In vitro production of small ruminant embryos: Late improvements and further research. *Theriogenology*, v.81, n.9, p.1149-1162, 2014.
- Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC.** Implantation mechanisms: insights from the sheep. *Reprod*, v.128, n.6, p.657-668, 2004.
- Stafford KJ.** Recognition and Assessment of Pain in Ruminants. In: Egger CM, Love M, Doherty T (Ed.). *Pain Management in Veterinary Practice*. Reino Unido: John Wiley & Sons, 2014. p.349-357.
- Stellflug JN, Wulster-Radcliffe MC, Hensley EL, Cowardin EA, Seals RC, Lewis GS.** Oxytocin-induced cervical dilation and cervical manipulation in sheep: effects on laparoscopic artificial insemination. *J Anim Sci*, v.79, n.3, p.568-573, 2001.
- Stewart M, Verkerk GA, Stafford KJ, Schaefer AL, Webster JR.** Noninvasive assessment of autonomic activity for evaluation of pain in calves, using surgical castration as a model. *J Dairy Sci*, v.93, n.8, p.3602-3609, 2010.
- Tothova C, Nagy O, Kovac G.** Acute phase proteins and their use in the diagnosis of diseases in ruminants: a review. *Vet Med*, v.9, n.4, p.163-180, 2014.
- Viana JGA, Silveira VCP.** Cadeia produtiva da ovinocultura no Rio Grande do Sul: um estudo descritivo. *Rev Agron Meio Amb*, v.2, n.1, p.9-20, 2009.
- Wathes DC, Mann GE, Payne JH, Riley PR, Stevenson KR, Lamming GE.** Regulation of oxytocin, oestradiol and progesterone receptor concentrations in different uterine regions by oestradiol, progesterone and oxytocin in ovariectomized ewes. *J Endocrinol*, v.151, n.3, p.375-393, 1996.
- Windsor PA, Lomax S, White P.** Progress in pain management to improve small ruminant farm welfare. *Small Rumin Res*, v.142, p.55-57, 2016.
-