

MARCELA SENE ROCHA

**Estratégias para otimizar a técnica de Múltipla ovulação e
Transferência de embriões em ovinos**

São Paulo

2022

MARCELA SENE ROCHA

**Estratégias para otimizar a técnica de Múltipla ovulação e
Transferência de embriões em ovinos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientador:

Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira

Coorientadora:

Profa. Dra. Joanna Maria Gonçalves Souza-Fabjan

São Paulo

2022

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

4238
FMVZ

Rocha, Marcela Sene
Estratégias para otimizar a técnica de Múltipla ovulação e Transferência de embriões em
ovinos / Marcela Sene Rocha. – 2022.
101 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2022.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Alvarenga de Oliveira.

Coorientadora: Profa. Dra. Joanna Maria Gonçalves Souza Fabjan.

1. Ovinos. 2. MOTE. 3. Flunixin meglumine. 4. RPCL. 5. Bem-estar. I. Título.



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Uso do flunixin meglumine para prevenção da RPCL em um protocolo de MOET convencional em ovelhas da raça Dorper avaliando os níveis de dor e estresse após coleta de embriões por via cirúrgica", protocolada sob o CEUA nº 2717181220 (ID 008768), sob a responsabilidade de **Cláudio Alvarenga de Oliveira e equipe; Marcela Sene Rocha** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 14/04/2021.

We certify that the proposal "Use of flunixin meglumine for the prevention of ERCL in a conventional MOET protocol in Dorper ewes assessing pain and stress levels after surgical embryo collection", utilizing 25 Ovines (25 females), protocol number CEUA 2717181220 (ID 008768), under the responsibility of **Cláudio Alvarenga de Oliveira and team; Marcela Sene Rocha** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 04/14/2021.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **06/2021** a **10/2021**

Área: **Reprodução Animal**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Ovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **2 a 8 anos**

N: **25**

Linhagem: **Dorper**

Peso: **50 a 82 kg**

Local do experimento: O experimento será realizado na cabanha ao qual os animais pertencem. Cabanha Origens situada na cidade de São Luís do Paraitinga no estado de São Paulo.

Comentário da CEUA: **Aprovado**

São Paulo, 14 de abril de 2021

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

São Paulo, 04 de fevereiro de 2021
CEUAx N **5362181220**

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Claudio Alvarenga De Oliveira
Área: Reprodução Animal

Título do projeto: "Custo e eficiência da MOET em rebanho ovino da raça Dorper".

Parecer Consubstanciado da CEUA FMVZ

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, na reunião de 04/02/2021, **ANALISOU e APROVOU** o protocolo de estudo acima referenciado. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração do protocolo.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do protocolo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão do protocolo.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: ROCHA, Marcela Sene

Título: **Estratégias para otimizar a técnica de Múltipla Ovulação e Transferência de embriões em ovinos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese,

À Profa. Joanna Maria Gonçalves de Souza Fabjan que me acolheu da maneira mais solidária e carinhosa possível. Sem a sua ajuda, apoio e generosidade eu não teria conseguido chegar até aqui.

Muito obrigada por tudo.

Deixo a minha imensa gratidão e admiração pela profissional incrível e pessoa iluminada que você é.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Prof. Cláudio pela confiança e por ter me proporcionado essa oportunidade, me sinto realmente privilegiada. Agradeço a todos os professores, funcionários e colegas da FMVZ/IUSP e VRA, especialmente ao Prof. Marcílio por todos os ensinamentos e apoio em disciplinas e qualificação.

Muito obrigada a todos do grupo Gerad (grupo de alunos da profa. Joanna) que é composto por uma turma mais do que especial e qualificada. Em especial Lucas Figueira, Lucas Correia, Ana Maia, Paulo Victor Pereira, Paulo Sérgio Rangel e Mirela Dias. Muito orgulho em ter feito parte desse grupo.

Um agradecimento especial ao Dr. Jeferson Fonseca e Dra. Maria Emília Oliveira que estiveram sempre por perto contribuindo com o projeto e artigos.

Agradeço à Universidade Federal Fluminense (UFF) pela parceria através da Profa. Joanna e em especial ao Prof. Felipe Brandão e Profa. Luiza Valente.

Faço um agradecimento mais que especial a minha profa., colega de trabalho, e grande amiga, Silvia Crusco. Muito obrigada pelo apoio, risadas e companhia de todas as horas.

Agradeço o meu marido Luiz Brito por todo o apoio e parceria e aos meus filhos que são a alegria da minha vida, Felipe e Luiza. Amo vocês.

Agradeço ao meu pai e minha mãe (*in memória*) por todo o amor e apoio ao longo da minha vida. Agradeço meus avôs, em especial a Niquinha que é minha segunda mãe, meus irmãos, sobrinhos, minha sogra, Iracy, tias e cunhados.

Agradeço todos os meus amigos, amigas, alunos e colegas de trabalho. Todos são muito especiais.

Deixo a minha gratidão aos animais que participaram dos projetos e aos que fizeram parte da Cabanha Origens. Estarão para sempre em meu coração.

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

RESUMO

ROCHA, M, S. **Estratégias para otimizar a Múltipla Ovulação e Transferência de Embriões em ovinos**. 2022. 101 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

A ovinocultura é uma atividade em expansão, porém apresenta algumas limitações quanto a produtividade. As biotecnologias da reprodução aliadas ao melhoramento genético são capazes de aumentar a eficiência reprodutiva de um rebanho. A múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE) é a biotecnologia mais utilizada nos ovinos para multiplicação da genética materna com a coleta por via cirúrgica como a mais utilizada nos rebanhos comerciais. O presente trabalho buscou avaliar estratégias para o aumento da eficiência e bem-estar na aplicação da MOTE. Para avaliar o impacto do treinamento do médico-veterinário nos custos e viabilidade financeira da biotecnologia foram levantados os custos diretos para realização da MOTE, índices reprodutivos e resultados financeiros da cabanha ao longo de quatro anos. A quantidade média de estruturas totais e embriões transferidos por coleta foi superior ($P < 0,05$) nos últimos anos em relação ao primeiro. Não houve diferença ($P > 0,05$) nas taxas de gestação, aderência permanente e transitória das doadoras. A margem bruta por gestação foi negativa apenas no primeiro ano e aumentou substancialmente nos anos seguintes, estabilizando a variação anual entre custos e valor de venda dos animais. O treinamento e experiência do médico-veterinário foi capaz de diminuir os custos e aumentar a eficiência da MOTE ao longo dos anos, viabilizando financeiramente o uso da técnica. Para avaliar a influência da idade, escore corporal, estação reprodutiva e números de repetições da MOTE na mesma ovelha na ocorrência da RPCL, foram levantadas informações ao longo de quatro anos. A ocorrência total de RPCL foi de 24,7% (26/105) e não teve associação com os fatores estudados. Para avaliar o efeito do tratamento com flunixin meglumine na prevenção da RPCL, vinte e cinco ovelhas foram divididas em grupo tratado (FLU, $n = 13$) ou solução salina (CONT, $n = 12$). O tratamento foi de 2,2 mg/kg/dia de flunixin meglumina por três dias consecutivos, iniciando dois dias após a inseminação artificial (IA). O grupo FLU apresentou menor ($P = 0,10$) número de CL com sinais de regressão lútea ($0,0$ vs. $4,6 \pm 1,6$) do que o grupo CONT. Maior ($P < 0,01$) taxa de recuperação ($79,5 \pm 9,5$ vs. $45,4 \pm 15,9\%$), número de óvulos/embriões recuperados ($9,1 \pm 2,1$ vs. $3,7 \pm 1,3$) e

número de embriões viáveis ($5,1 \pm 1,1$ vs. $2,6 \pm 1,2$). As concentrações séricas de progesterona foram superiores ($P < 0,05$) no FLU do que no CONT dia seguinte da IA até a coleta. O tratamento foi eficiente na prevenção da RPCL aumentando a taxa de recuperação e produção de embrião. Foram avaliados os benefícios da associação entre dipirona e flunixin meglumine em protocolo pós-operatório de coleta cirúrgica de embriões a partir de parâmetros fisiológicos e comportamentais de dor e bem-estar em comparação com o uso isolado de flunixin. A associação foi eficiente em minimizar o estresse de acordo com parâmetros de glicemia, cortisol, linfócitos, monócitos e plaquetas. Em conclusão, houve aumento na eficiência e bem-estar a partir das estratégias propostas.

Palavras-chave: Bem-estar. Flunixin meglumine. MOTE. Ovinos. RPCL.

ABSTRACT

ROCHA, M, S. **Strategies to optimize Multiple Ovulation and Embryo Transfer in Sheep**. 2022. 101 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Sheep farming is an expanding activity, but it has some limitations in terms of productivity. Reproduction biotechnologies combined with genetic improvement are capable of increasing the reproductive efficiency of a herd. Multiple ovulation and embryo transfer (MOET) is the most used biotechnology in sheep for the multiplication of maternal genetics with surgical collection as the most used in commercial herds. The present work sought to evaluate strategies to increase efficiency and well-being in the application of the MOET. To assess the impact of veterinarian training on the costs and financial viability of biotechnology, the direct costs for carrying out the MOET with reproductive indices and financial results over four years were surveyed. The average amount of total structures and embryos transferred per collection was higher ($P < 0.05$) in recent years compared to the first. There was no difference ($P > 0.05$) in the rates of pregnancy, permanent and transient adherence of the donors. Gross margin per pregnancy was negative only in the first year and increased substantially in the following years, stabilizing the annual variation between costs and sale value of animals. The training of the veterinarian was able to reduce costs and increase the efficiency of MOET, making the use of the technique financially viable. To assess the occurrence and influence of age, body score, breeding season and number of repetitions of MOET in the same ewe, information was collected over four years. The total occurrence of PRCL was 24.7% (26/105) and was not associated with the factors studied. To assess the effect of flunixin meglumine treatment on the prevention of PRCL, twenty-five sheep were divided into two groups (FLU, $n = 13$) or saline (CONT, $n = 12$). Treatment was 2.2 mg/kg/day of flunixin meglumine for three consecutive days, two days after artificial insemination (AI). The FLU group had a lower ($P = 0.10$) number of CL with signs of luteal regression (0.0 vs. 4.6 ± 1.6) than the CONT group. Higher ($P < 0.01$) recovery rate (79.5 ± 9.5 vs. $45.4 \pm 15.9\%$), number of eggs/embryos retrieved (9.1 ± 2.1 vs. 3.7 ± 1.3) and number of viable embryos (5.1 ± 1.1 vs. 2.6 ± 1.2). Serum concentrations of progesterone were higher ($P < 0.05$) in FLU than in CONT the day after AI until collection. The treatment was efficient in preventing PRCL, increasing

the recovery rate and embryo production. We evaluated the benefits of the association between dipyron and flunixin meglumine in a postoperative protocol of surgical embryo collection based on physiological and behavioral parameters of pain and well-being in comparison with the use of flunixin alone. The association was efficient in minimizing stress according to parameters of glycemia, cortisol, lymphocytes, monocytes and platelets. In conclusion, there was an increase in efficiency and well-being from the proposed strategies.

Keywords: Flunixin meglumine. MOET. PRCL. Sheep. Welfare.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2 HIPÓTESE	20
3 OBJETIVOS	20
3.1 OBJETIVO GERAL	20
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
4 CUSTO E EFICIÊNCIA DA TÉCNICA DE MÚLTIPLA OVULAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÕES EM OVINOS AO LONGO DE QUATRO ANOS: INFLUÊNCIA DA CAPACITAÇÃO DO MÉDICO-VETERINÁRIO	21
5 OCCURRENCE OF PREMATURE REGRESSION OF CORPUS LUTEUM IN MOET PROGRAMS IN DORPER EWES UNDER SUBTROPICAL CLIMATE	31
6 FLUNIXIN MEGLUMINE IS EFFICIENT TO REDUCE PREMATURE REGRESSION OF CORPORA LUTEA IN SUPEROVULATED DORPER EWES.....	43
7 ASSOCIATION OF FLUNIXIN AND DIPYRONE AFTER EMBRYO COLLECTION TO PAIN CONTROL IN EWES.....	68
8 CONCLUSÕES GERAIS	95
REFERÊNCIAS.....	96

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os ovinos foram uma das primeiras espécies de animais domesticadas pelo homem. Distribuídos por todos os continentes, poucos são os ambientes onde nenhum grupo se adapta, povoando regiões com diferentes climas e relevos (PEREIRA, 2008; VIANA, 2008).

As raças ovinas possuem grande variação nas suas aptidões e fenótipos (PEREIRA, 2008). O Brasil possui vinte e sete raças de ovinos registradas, sendo que sete delas são consideradas nativas de acordo com a Associação Brasileira de Criadores de Ovinos (ARCO, 2022). Dentre a mais popular e distribuída em todo o país está a raça Santa Inês que tem como características principais a habilidade materna e ausência de estacionalidade reprodutiva (AZAMBUJA RIBEIRO; GONZÁLEZ-GARCÍA, 2016). Quanto às raças exóticas, o Dorper, de origem sul africana, originário do cruzamento entre a raça inglesa Dorset e a africana deslanada Persian Black Head, é bastante utilizada no Brasil devido suas taxas de desenvolvimento ponderal e adaptação ao clima, semelhante ao país de origem (NOGUEIRA FILHO; KASPRZYKOWSKI, 2006).

Os ovinos são uma importante fonte de proteína de origem animal, principalmente para países em desenvolvimento (GODBER; WALL, 2014). A carne e o leite de ovelha são alimentos com elevados teores de ácidos graxos, imunoglobulinas, vitaminas, proteínas e minerais (CHIKWANHA et al., 2018; FLIS; MOLIK, 2021).

Segundo a projeção realizada pela FAO (2011), a produção mundial de carne ovina para o ano de 2022 será de 360,5 milhões de toneladas, cerca de 6% a mais se comparado ao acumulado do ano de 2020 e 2021. Dentre os países que se destacam na produção de ovinos, segue em ordem decrescente a China com um efetivo de 14,9% do rebanho mundial, Índia e Nigéria com uma participação de 13,4% e 7,4% do efetivo mundial respectivamente (EMBRAPA, 2022). De acordo com o IBGE (2022), o Brasil acumula um rebanho com 20.628.699 de cabeças de ovinos, estando na 18ª posição mundial, e possui a região nordeste como a de maior efetivo do país, totalizando 14.561.928.

Apesar da expansão da atividade, a ovinocultura ainda apresenta limitações referentes à produção, mão de obra e acesso ao melhoramento genético

(MONTEIRO et al., 2021). De acordo com Fthenakis et al. (2015), a base da lucratividade de um rebanho ovino está diretamente relacionada à sua eficiência reprodutiva. Dessa maneira, as biotecnologias da reprodução são uma ferramenta responsáveis pelo aumento da produtividade animal através do melhoramento genético e melhora da eficiência reprodutiva (ZHU et al., 2018).

As biotecnologias da reprodução revolucionaram a produção animal no século passado (MOORE; HASLER, 2017). Quando aliadas a programas de melhoramento genético, são capazes de melhorar a eficiência reprodutiva e garantir retorno econômico ao produtor (BERGLUND, 2008; BARUSELLI et al., 2018).

O uso das tecnologias reprodutivas teve início com a inseminação artificial (IA) por volta do ano 1900 com o objetivo da disseminação do material genético de touros com alto potencial produtivo (MOORE; HASLER, 2017). Na espécie ovina, os procedimentos de IA iniciaram alguns anos depois, principalmente na América do Sul e Austrália (FAIGL et al., 2012).

Nos ovinos, a IA pode ser realizada por via cervical, transcervical e intrauterina via laparoscopia (FONSECA ET AL., 2006). Ao comparar as três técnicas, Casali et al. (2017), obtiveram maiores taxas de gestação quando o sêmen foi depositado diretamente no útero, o que só foi alcançado em todas as fêmeas apenas por laparoscopia, além de demandar menor tempo na execução e a possibilidade da otimização da genética masculina com a utilização de menor concentração espermática devido o local de deposição se comparado com as demais.

A IA via laparoscopia é uma técnica cirúrgica descrita inicialmente por Evans e Maxwell (1987), onde o sêmen é depositado separadamente em cada corno uterino utilizando uma pipeta de inseminação própria com uma agulha na ponta capaz de alcançar a luz do útero. As taxas de gestação podem variar entre 50 e 85% com sêmen fresco (VILARINÕ et al., 2013), resfriado (MILCZEWSKI et al., 2000) ou congelado-descongelado; (PAU et al., 2020). Apesar de ser uma técnica cirúrgica minimamente invasiva e eficiente devido seus resultados constantes, existe a necessidade da habilidade do médico veterinário, equipamentos específicos e atenção quanto ao bem-estar animal (ALVAREZ ET AL., 2019).

Para a multiplicação do material genético materno, surgiram as tecnologias de produção de embriões *in vivo* que se estabeleceram na espécie bovina ao longo da década de 1970, como a múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE) e em seguida a produção *in vitro* de embriões (PIV), que é a tecnologia mais utilizada

nos bovinos atualmente (HASLER, 2014; FERRÉ et al., 2020). Já na espécie ovina, a MOTE é a biotecnologia mais utilizada no Brasil e no mundo, para produção de embriões (IETS, 2021; SOUZA-FABIAN et al., 2021; FALCHI et al., 2022).

A MOTE consiste na aplicação de protocolos hormonais de superovulação em ovelhas geneticamente superiores para que após inseminadas produzam embriões que serão coletados e transferidos para ovelhas receptoras de menor valor zootécnico, responsáveis por levar a gestação a termo (MOORE; HASLER, 2017; BERGSTEIN-GALAN et al., 2019).

O maior benefício da biotecnologia está relacionado à velocidade do melhoramento genético a partir da diminuição no intervalo das gerações, porém a MOTE apresenta alguns entraves como o alto custo e a variabilidade na resposta superovulatória (FORCADA et al., 2011; AMIRIDES; CSEH, 2012; FIGUEIRA et al., 2020). De acordo com Oliveira et al. (2013), fatores como a seleção das doadoras, protocolo hormonal, método de fertilização e a técnica de coleta dos embriões poderão interferir no resultado da biotecnologia.

A seleção das doadoras deve se basear no mérito genético, conformação corporal, desempenho produtivo e reprodutivo (FONSECA, 2006; OLIVEIRA et al., 2013). Porém, mesmo seguindo os critérios de seleção, a quantidade de embriões pode ser bastante variável ao longo da vida reprodutiva dos animais. Alguns autores relatam a influência de fatores relacionados à idade, raça, condição corporal, quantidade de coletas anteriores até fatores externos como a estação do ano na produção dos embriões (LOPEZ SEBASTIAN et al., 1990; GONZÁLEZ-BULNES et al., 2004; BRUNO-GALARRAGA et al., 2014; BARTLEWSKI et al., 2016; BERGSTEIN-GALAN et al., 2019). De acordo com Amirides e Cseh (2012), a contribuição de cada fator é quase impossível de avaliar.

A superovulação é a etapa mais importante da MOTE pois irá determinar a quantidade de oócitos disponíveis para fertilização, mas pode ser também a fase mais crítica e menos previsível (MOORE; HASLER, 2017). O protocolo tradicional tem início em dia aleatório do ciclo estral e consiste na utilização de implante vaginal a base de progesterona por 12 a 14 dias para mimetizar uma fase lútea, seis a oito aplicações de FSH a cada 12 horas em doses decrescentes responsáveis pelo crescimento folicular e a utilização do eCG e GnRH para a sincronização e indução da ovulação. Inúmeras pesquisas vêm sendo destinadas a busca de melhores resultados relacionados a sincronização da emergência da onda folicular (OLIVEIRA

et al., 2016; SOUZA-FABJAN et al., 2017), protocolos de curta duração e alterações no tempo de uso do dispositivo intravaginal (AÑO-PERELLO et al., 2020; FIGUEIRA et al., 2020) e dosagem de aplicação hormonal reduzida (DATTENA et al., 1994).

A avaliação da resposta superovulatória quanto a presença, quantidade e atividade dos corpos lúteos, antecede a coleta dos embriões e é decisiva para a continuidade do procedimento (AMIRIDIS; CSEH, 2012). A atividade do corpo lúteo (CL) que está relacionada a sua capacidade em secretar progesterona, poderá ser avaliada em sua coloração e secreção de progesterona (GUSMÃO et al., 2013).

A coleta de embriões na espécie ovina pode ser realizada por via cirúrgica, laparoscopia ou transcervical (FONSECA et al., 2016). Apesar das inúmeras vantagens da técnica transcervical (SANTOS et al., 2020), a técnica cirúrgica é ainda a mais utilizada comercialmente ao redor do mundo, devido prioritariamente à dificuldade na transposição da cérvix ovina, o que confere a técnica rapidez e altas taxas de recuperação embrionária (KHAN et al., 2022). Nesta técnica, após um período de 24 horas de jejum alimentar e 12 horas de jejum hídrico, o animal é submetido à anestesia geral para a incisão na linha ventral média do abdômen de cerca de 10 cm. Os cornos uterinos são expostos e é realizada a lavagem com 30 mL de solução DMPBS de cada corno separadamente utilizando uma sonda de Foley de duas vias com o conteúdo transferido para uma placa de Petri para avaliação. Em seguida é realizada a sutura da parede abdominal juntamente com a musculatura e finalizada com a sutura da pele (ISHWAR; MEMON, 1996).

Apesar da eficiência da coleta cirúrgica dos embriões, podem ocorrer problemas no pós-operatório, tendo como principal ocorrência as aderências no trato reprodutivo (CORDEIRO et al., 2003). Juntamente com a busca pela manutenção do bem-estar animal, a técnica de coleta de embriões por via cervical vem se desenvolvendo com resultados satisfatórios além de ser menos invasiva e possibilitar um maior número de procedimentos repetidos no mesmo animal (FONSECA et al., 2016; FONSECA et al., 2019a; FONSECA et al., 2019b).

Em um programa de MOTE, o sucesso não está relacionado exclusivamente às taxas de superovulação ou recuperação embrionária, mas também as taxas de gestação após a transferência dos embriões para as receptoras (KHAN et al., 2022). A taxa de gestação é favorecida quando a receptora está bem sincronizada de acordo com a ovulação da doadora, se tem a presença de CL e os embriões estão bem desenvolvidos em relação ao dia da coleta em estágios 1 e 2 (BARI et al.,

2003) de acordo com a classificação e grau de desenvolvimento (IETS, 1998). Resultados demonstram não ter relação direta com a idade da receptora, gestações anteriores, quantidade de CL nos ovários, devendo constar pelo menos um ativo, se serão transferidos um ou dois embriões para a mesma ovelha ou se são procedentes de sêmen fresco ou congelado-descongelado (KING et al., 2022). Daly et al. (2020) e King et al. (2022), atentam para a influência da fazenda como unidade de manejo e o ambiente das receptoras na taxa de gestação.

A regressão precoce de corpo lúteo (RPCL) é uma disfunção luteal responsável por interferir na atividade secretora do CL (STUBBINGS et al., 1986), podendo acometer fêmeas em diferentes situações fisiológicas como no estabelecimento da reprodução na puberdade ou após um período de anestro (BAIRD, 1992). Sua incidência aumenta em animais submetidos a protocolos hormonais e mais especificamente em doadoras superovuladas em programas de MOTE (BARTLEWSKI et al., 2016). Evento relatado com grande frequência em cabras (SAHARREA et al., 1998; ESPINOSA-MÁRQUEZ et al., 2004; CERVANTES et al., 2007), porém discutido com menor atenção nas ovelhas.

A RPCL acontece com a liberação prematura de prostaglandina $F2\alpha$ (AIUMLAMAI et al., 1990) a partir do terceiro dia após a ovulação (GILBERT et al., 1990). Dentre as principais causas estão a falha na pré-exposição à progesterona (HUNTER, 1991), protocolos que utilizam o eCG como indutor de superovulação (SAHARREA et al., 1998) e a presença de folículos persistentes não ovulatórios (OKADA et al., 2000). Níveis elevados de estradiol ao longo do protocolo de superovulação são responsáveis por estabelecer um padrão luteolítico de secreção de $PGF2\alpha$ (SAHARREA et al., 1998) juntamente com a modulação de receptores de ocitocina (HUNTER, 1991). De acordo com Flint e Sheldrick (1982), liberações de $PGF2\alpha$ induzidas por estresse são capazes de desencadear padrões pulsáteis semelhantes aos associados à luteólise.

A avaliação quanto a resposta superovulatória e ocorrência da RPCL pode ser realizada via laparoscopia para contagem das estruturas e avaliação da coloração dos CLs (GUSMÃO et al., 2013), ultrassonografia em modo Doppler para avaliação da atividade do CL através do fluxo sanguíneo (FIGUEIRA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2018) e contagem das estruturas que pode ser prejudicada no caso de uma resposta superovulatória elevada (PINTO et al., 2018) e dosagem de

progesterona pela técnica de radioimunoensaio que irá demonstrar resposta do tipo qualitativa referente a ocorrência de ovulação (AMIRIDIS et al., 2002).

Saharrea et al. (1998) relataram que a mudança na aparência visual do CL regredido é significativa entre os dias 3 e 6. Um CL classificado como normal irá apresenta a coloração laranja ou rosa brilhante, enquanto que um CL com regressão terá a aparência rosa pálido a branco e tamanho menor que 5 mm (SMITH; MURPHY et al., 1984).

Em animais que não apresentam a regressão luteal, os níveis de progesterona se encontram elevados até o momento da coleta, já nas fêmeas com RPCL, a queda se dá a partir do terceiro dia até atingir níveis abaixo de 1ng/mL (STUBBINGS et al., 1986).

A RPCL prejudica a migração embrionária ao longo do oviduto, além de gerar um ambiente tóxico para os embriões (BRIDGES et al., 2000), interferindo na taxa de recuperação e qualidade embrionária (ARMSTRONG et al., 1987). Pintado et al. (1996), relataram uma média de 0,5 embriões coletados de cabras com regressão precoce e 5,5 em doadoras com função lútea normal, enquanto que Armstrong et al. (1982) ao coletar em um período anterior a ocorrência da regressão, obtiveram uma taxa de recuperação embrionária de 80%.

Diante da necessidade em melhorar a eficiência da MOTE, algumas propostas foram realizadas para evitar ou controlar a RPCL. Utilizando estratégia baseada na suplementação de progesterona, se realizada no início do protocolo superovulatório é capaz de evitar a formação de receptores de ocitocina endometriais (HUNTER, 1991) e realizada após a fertilização, com o intuito de incrementar a oferta de progesterona no início da fase luteal, o tratamento melhora a qualidade dos embriões, porém não é capaz de prevenir a RPCL (ESPINOSA-MÁRQUEZ et al., 2004) além de aumentar a incidência de CLs regredidos (CERVANTES et al., 2007). Outra estratégia é a utilização de um hormônio luteotrófico, o hCG 84 horas após o início do estro foi capaz de prevenir a ocorrência da RPCL (SAHARREA et al., 1998). Homeida e Khalafalla (1987) conseguiram prevenir a RPCL em cabras utilizando um antagonista de ocitocina. E a estratégia que atua na prevenção da luteólise a partir da inibição da liberação de prostaglandina com o uso do flunixin meglumine tem mostrado resultados satisfatórios (GILBERT et al., 1990; SALLES et al., 1998).

O flunixin meglumine é um antiinflamatório não esteroide amplamente utilizado na rotina clínica de ruminantes (VISCARDI et al., 2021) mas também apresenta efeitos importantes relacionados a reprodução animal, como a redução na biossíntese de prostaglandina (GILBERT et al., 1990). É um potente inibidor das enzimas ciclooxigenase COX 1 e COX2, que são responsáveis pela conversão do ácido araquidônico em um precursor comum de várias formas de prostaglandinas, incluindo PGF2 α (KASIMANICKAM et al., 2018). De acordo com Aiumlamai et al. (1990), o tratamento com flunixin é capaz de manter os níveis de progesterona sem alteração, reduzindo um dia após a interrupção que é quando dá início o processo de luteólise. Responsável até por evitar o abortamento em vacas com quadros de endotoxina provenientes de infecções ao evitar a liberação de PGF2 α (GRAHAM et al., 1995) e aumentar taxa de gestação de receptoras após a transferência de embriões (KARASAHIN et al., 2021).

O tratamento com flunixin meglumine é eficiente na prevenção da RPCL em cabras iniciando dois dias após a fertilização na dosagem de 2,2 mg/kg com uma aplicação diária (GILBERT et al., 1990; SALLES et al., 1998). Em ovinos, Aké-López et al. (2005), verificaram que ovelhas tratadas com flunixin meglumine apresentaram um prolongamento na fase luteal do ciclo estral, porém até o momento nenhum estudo havia utilizado o tratamento em ovinos com o objetivo de prevenção da RPCL na MOTE.

2 HIPÓTESE

É possível aumentar a eficiência e conseqüente rentabilidade da MOTE em ovinos a partir do treinamento do médico-veterinário, controle da RPCL e da promoção do bem estar animal de doadoras após coleta de embriões por via cirúrgica.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar estratégias para o aumento da eficiência e bem estar animal na aplicação da MOTE em rebanhos ovinos

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o impacto do treinamento do médico-veterinário nos custos e viabilidade financeira da MOTE em rebanho comercial;
- Avaliar os efeitos de idade, escore corporal, estação reprodutiva e número de repetições de MOTE na ocorrência da RPCL em doadoras;
- Avaliar o efeito do tratamento com flunixin meglumine na prevenção da RPCL em ovelhas superovuladas;
- Avaliar os benefícios da associação de dipirona e flunixin meglumine em protocolo pós-operatório de coleta cirúrgica de embriões a partir de parâmetros fisiológicos e comportamentais de dor e bem estar

4 Custos e eficiência da MOTE relacionados ao treinamento técnico em rebanho ovino da raça Dorper

MOET costs and efficiency related to technical training in Dorper sheep herd

Costos y eficiencia del MOET relacionados con la capacitación técnica en el rebaño de ovejas Dorper

Marcela Sene Rocha

ORCID:<https://orcid.org/0000-0002-3505-8021>

Universidade de São Paulo, Brasil

E-mail: marcela_sene@hotmail.com

Paulo Victor dos Santos Pereira

ORCID:<https://orcid.org/0000-0003-4784-9450>

Universidade Federal Fluminense, Brasil

E-mail: vitor_paulo@id.uff.br

Paulo Sergio Cerqueira Rangel

ORCID:<https://orcid.org/0000-0003-3956-9408>

Universidade do Grande Rio, Brasil

E-mail: paulorangel1102@gmail.com

Luiza Carneiro Mareti Valente

ORCID:<https://orcid.org/0000-0001-8131-632X>

Universidade Federal Fluminense, Brasil

E-mail: lmareti@id.uff.br

Cláudio Alvarenga de Oliveira

ORCID:<https://orcid.org/0000-0002-4143-7212>

Universidade de São Paulo, Brasil

E-mail: cadolive@usp.br

Joanna Maria Gonçalves Souza-Fabjan

ORCID:<https://orcid.org/0000-0002-4872-1718>

Universidade Federal Fluminense, Brasil

E-mail: joannavet@gmail.com

Resumo

A produção de embriões *in vivo* (MOTE) é a biotecnologia mais utilizada nos rebanhos comerciais ovinos, porém, vários fatores podem interferir no sucesso e viabilidade financeira da técnica. O objetivo do trabalho foi avaliar o impacto do treinamento técnico nos custos e viabilidade financeira da biotecnologia. O estudo foi realizado ao longo de quatro anos (2017-2020) em uma cabanha no estado de SP, Brasil. Ovelhas pluríparas da raça Dorper (n=35) foram submetidas ao programa de MOTE utilizando protocolo convencional (256mg FSH) por até cinco vezes (n=65). A inseminação artificial aconteceu no dia 16 por laparoscopia e a coleta cirúrgica dos embriões com transferência para as receptoras (n=140) cinco dias após. Foram levantados os custos diretos para realização da MOTE, índices reprodutivos e resultados financeiros da cabanha. A análise estatística utilizou o *software* Bio Estat 5.0 (Belém, Brasil), considerando nível de significância de 5% ($P < 0.05$). Teste de Shapiro Wilk para verificar normalidade, variáveis não paramétricas analisadas por teste de Kruskal-Wallis, teste de qui-quadrado e teste exato de Fisher. A quantidade média de estruturas totais e embriões transferidos por coleta apresentou diferença significativa entre os anos ($P < 0,05$), não havendo diferença ($P > 0,05$) nas taxas de gestação, aderência permanente e transitória das doadoras. O resultado financeiro por gestação que se apresentou negativo no ano 1 aumentou nos anos seguintes, estabilizando a variação anual entre custos e valor de venda dos animais. A obtenção de resultados mais efetivos do técnico aliado ao melhoramento genético do rebanho resultou em maior efetividade e viabilidade financeira da MOTE.

Palavras-chave: Biotecnologia; Embrião; Investimento; Melhoramento genético.

Abstract

The *in vivo* embryo production (MOET) is the most used biotechnology in commercial sheep herds, however, several factors can interfere with the success and financial viability of the technique. The objective of the work was to evaluate the impact of technical training on the costs and financial feasibility of biotechnology. The study was carried out over four years (2017-2020) in a cabin in the state of SP, Brazil. Dorper breed ewes (n=35) were submitted to the MOET program using a conventional protocol (256mg FSH) for up to five times (n=65). Artificial insemination took place on day 16 by laparoscopy and embryos were surgically collected with transfer to recipients (n=140) five days later. Direct costs for carrying out the MOET, reproductive rates and financial results of the cabanha were raised. Statistical analysis used the Bio Estat 5.0 software (Belém, Brazil), considering a significance level of 5% ($P < 0.05$). Shapiro Wilk test to check normality, non-parametric variables analyzed by Kruskal-Wallis test, chi-square test and Fisher's exact test. The average amount of total structures and embryos transferred per collection showed a significant difference between years ($P < 0.05$), with no difference ($P > 0.05$) in the rates of pregnancy, permanent and transient adherence of donors. The financial result for pregnancy that was negative in year 1 increased in the following years, stabilizing the annual variation between costs and sale value of animals. Obtaining more effective results from the technician combined with the genetic improvement of the herd resulted in greater effectiveness and financial viability of MOET.

Keywords: Biotechnology; Embryo; Investment; Genetical enhancement.

Resumen

La producción de embriones *in vivo* (MOET) es la biotecnología más utilizada en los rebaños comerciales de ovejas, sin embargo, varios factores pueden interferir con el éxito y la viabilidad financiera de la técnica. El objetivo del trabajo fue evaluar el impacto de la capacitación técnica sobre los costos y la viabilidad financiera de la biotecnología. El estudio se llevó a cabo durante cuatro años (2017-2020) en una cabaña en el estado de SP, Brasil. Se enviaron ovejas de raza Dorper (n = 35) al programa MOET utilizando un protocolo convencional (256 mg de FSH) hasta cinco veces (n = 65). La inseminación artificial se realizó el día 16 por laparoscopia y los embriones fueron extraídos quirúrgicamente con transferencia a los receptores (n = 140) cinco días después. Se elevaron los costos directos para realizar el MOET, las tasas de reproducción y los resultados financieros de la cabaña. El análisis estadístico utilizó el *software* Bio Estat 5.0 (Belém, Brasil), considerando un nivel de significancia del 5% ($P < 0.05$). Test de Shapiro Wilk para comprobar la normalidad, variables no paramétricas analizadas

mediante test de Kruskal-Wallis, test de chi-cuadrado y test exacto de Fisher. La cantidad promedio de estructuras totales y embriones transferidos por colección mostró una diferencia significativa entre años ($P < 0.05$), sin diferencia ($P > 0.05$) en las tasas de embarazo, adherencia permanente y transitoria de las donantes. El resultado económico por gestación que fue negativo en el año 1 aumentó en los años siguientes, estabilizando la variación anual entre costos y valor de venta de los animales. La obtención de resultados más efectivos del técnico combinado con el mejoramiento genético del rebaño resultó en una mayor efectividad y viabilidad financiera del MOET.

Palabras clave: Biotecnología; Embrión; Inversión; Mejoramiento genético.

1. Introdução

Avinocultura é uma importante atividade do agronegócio brasileiro, se estendendo por todo o território nacional (ALVES, OSÓRIO, FERNANDES, RICARDO & CUNHA, 2014). A necessidade crescente do aumento da produtividade animal vem sendo possível por meio da eficiência reprodutiva e melhoramento genético dos animais a partir das biotecnologias da reprodução (ZHU, MOAWAD, WANG, LI, REN & DAI, 2018). A múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE) gera grande impacto nos programas de melhoramento genético e disseminação da genética de animais superiores (BRASIL, MOREIRA & RAMOS, 2014). Ressalta-se que o Brasil possui grande destaque na produção mundial de embriões comerciais, sendo o país de maior produção de embriões oriundos da MOTE (IETS, 2020).

Embora a técnica transcervical venha sendo estudada e utilizada mais recentemente (FONSECA, OLIVEIRA, BRANDÃO, BATISTA, GARCIA, BARTLEWSKI & SOUZA-FABIAN, 2019), a coleta cirúrgica de embriões ainda é a mais praticada ao redor do mundo. Dentre os entraves para a maior difusão da MOTE estão o custo da técnica, a resposta ao protocolo de superovulação e a manutenção de receptoras sem gestação na propriedade (HEIKKILA & PEIPPO, 2012; BALTRAME, QUIRINO, BARIONI & LIMA, 2010; GALLI et al., 2003). Os resultados positivos no uso de uma biotecnologia reprodutiva estão diretamente associados à competência e habilidade do técnico que irá realizar tal função (GERGER et al., 2017). Sendo assim, a experiência profissional é um fator essencial para o desenvolvimento de um programa de MOTE bem-sucedido (PHILLIPS & JANKE, 2016) com consequente expansão da técnica e maior retorno financeiro para o produtor (BARUSELLI, CATUSSI, ABREU, ELLIFFI, SILVA & BATISTA, 2019).

Apesar das inúmeras vantagens da MOTE, a técnica apresenta um custo relativamente alto que deve ser compensado com elevada efetividade. Avaliações referentes aos custos do uso desta biotécnica e índices obtidos pelo médico-veterinário ao longo de sua capacitação em rebanhos comerciais são escassas, ou mesmo inexistentes, na literatura. O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto do treinamento do técnico nos custos e viabilidade financeira da utilização da MOTE em um rebanho comercial ovino.

2. Metodologia

2.1 Ética e local do estudo

Este estudo foi aprovado no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo sob o número 5362181220. O estudo foi realizado em uma cabanha comercial, na cidade de São Luís do Paraitinga, no estado de São Paulo, Brasil (latitude 23° 22' 36" Sul e longitude 45° 26' 51" Oeste). A propriedade possui animais registrados da raça Dorper com a finalidade de melhoramento genético.

2.2 Desenho experimental

Antes da realização do primeiro procedimento de MOTE, o médico-veterinário responsável pela cabanha inicialmente se capacitou por meio de um curso teórico-prático. Foram realizados protocolos de superovulação, inseminação artificial e coleta por via cirúrgica em ovelhas doadoras da raça Dorper e transferência dos embriões para receptoras cruzadas da raça Santa Inês. Todos os procedimentos foram realizados exclusivamente pelo mesmo profissional. Posteriormente, foram

levantados todos os custos diretos relacionados ao procedimento. Todas as informações referentes ao uso da biotecnologia e informações financeiras foram registradas ao longo de quatro consecutivos (2017 – 2020), denominados como ano 1 a 4.

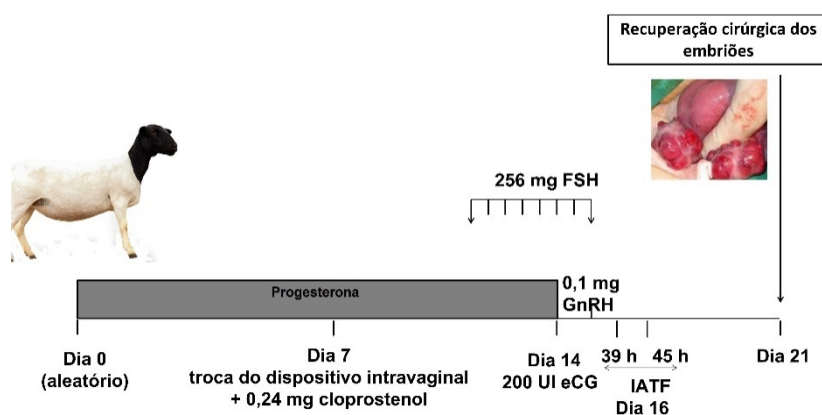
2.3 Doadoras de embriões

As 35 ovelhas utilizadas como doadoras possuíam alto valor genético, idade entre dois e nove anos, escore corporal entre 2 e 4 (escala de 1 a 5) e pelo menos um parto antes de serem incluídas como doadoras (primíparas ou pluríparas). Cada animal passou por pelo menos um procedimento de coleta de embriões e no máximo cinco. No total, as fêmeas receberam protocolo de superovulação por 84 vezes, porém apenas as ovelhas (n=65) que responderam ao protocolo foram submetidas à coleta.

2.4 Protocolo de superovulação

O protocolo de superovulação utilizado ao longo dos quatro anos está representado na Figura 1. No primeiro dia, foi colocado um dispositivo intravaginal de silicone impregnado com 0,33 g de progesterona (CIDR[®], Zoetis, São Paulo, Brasil), trocado no dia sete por outro novo e mantido até o dia 17. Além disso, no dia sete foi realizada a aplicação de 0,24 mg de cloprostenol de sódio (Sincrocio[®], Ourofino Saúde Animal, São Paulo, Brasil). A partir do dia 12 foram feitas aplicações de 256 mg de hormônio folículo estimulante (FSH) (Foltropin[®], Vetoquinol Saúde Animal Ltda., São Paulo, Brasil) em doses decrescentes por quatro dias em intervalos de 12 horas. No momento da retirada do dispositivo foi aplicado 200 UI de gonadotrofina coriônica equina (eCG) (Novormon[®], Zoetis Ltda, São Paulo, Brasil) e 0,1 mg de hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH) (Fertagyl[®], MSD Saúde Animal, São Paulo, Brasil) um dia antes da inseminação artificial.

Figura 1 – Esquema detalhado do protocolo de superovulação realizado em doadoras ovinas da raça Dorper ao longo de quatros anos (2017-2020).



FSH: hormônio folículo estimulante; eCG: gonadotropina coriônica equina; GnRH: hormônio liberador de gonadotropina; IATF: Inseminação artificial em tempo fixo

Fonte: elaborado pelos autores (2021).

2.5 Coleta de sêmen, avaliação e Inseminação Artificial (IA)

O sêmen foi adquirido de diferentes cabanhas de reprodutores de alto valor genético. O sêmen foi colhido um dia antes da inseminação artificial, avaliado e selecionado de acordo com a qualidade seminal (CBRA, 2013). Foi adicionado diluente comercial (Botu-bovi[®], Biotech Ltda, Botucatu-SP) e depois acondicionado em caixa térmica (Botu-flex[®], Biotech Ltda, Botucatu-SP). A IA foi realizada por laparoscopia utilizando sêmen resfriado no volume de 0,3 mL em cada corno uterino na dose inseminante de 100×10^6 de espermatozoides, 36 e 42 horas após a retirada do dispositivo intravaginal. Foi utilizada uma

pipeta de IA de pequenos ruminantes (WTA Ltda, Cravinhos, Brasil) para a deposição do sêmen diretamente na luz uterina de cada corno separadamente (MCKELVEY, ROBINSON, AITKEN & ROBERTSON, 1986).

2.6 Coleta dos embriões

O procedimento se iniciou com a tricotomia da região abdominal, seguida da aplicação intravenosa de xilazina 2% (0,05 mg/kg) e cetamina (2 mg/kg). A coleta dos embriões foi realizada por meio da técnica cirúrgica de laparotomia com exposição dos cornos uterinos cinco dias após a IA (BRUNO-GALARRAGA, CUETO, GIBBONS, PEREYRA-BONNET, SUBIABRE, & GONZALEZ-BULNES, 2015). Cada corno uterino foi lavado com 30 mL de meio PBS (Nutricell, São Paulo, Brasil) utilizando uma sonda de Foley de silicone de duas vias número 10 (Rusch®, EUA). O lavado foi acondicionado em placa de Petri (100 mm) e avaliado sob microscópio estereoscópico. Os embriões foram classificados com base na qualidade e grau de desenvolvimento (IETS, 2010). Após a seleção, os embriões foram mantidos em placa de Petri (35 mm) contendo meio *holding* (Nutricell, São Paulo, Brasil) à temperatura ambiente e protegidos contra a luminosidade até o momento da transferência para as receptoras. A ocorrência de aderências das doadoras foi avaliada e classificada como: transitória (doadoras que foram acasaladas por monta natural posteriormente, tornaram-se gestantes, pariram uma cria viável e em alguns casos até retornaram para novos procedimentos de coleta) ou permanente (não ficaram gestantes após mais de três ciclos reprodutivos, ou seja, perda da habilidade reprodutiva).

2.7 Receptoras de embriões

As receptoras selecionadas (n=140) foram ovelhas de cruzamento da raça Santa Inês, com idade entre dois e cinco anos e escore corporal entre 2 e 3 (escala 1 – 5). Para cada doadora submetida ao protocolo, eram sincronizadas cinco receptoras. Estas foram submetidas à sincronização de estro um total de 283 vezes, sendo que 256 destas, receberam embriões. A utilização das receptoras era dependente do número de embriões disponíveis e do status ovariano no momento da transferência, que será descrito posteriormente.

O protocolo de sincronização iniciava cinco dias após o das doadoras, com a colocação do dispositivo intravaginal de silicone impregnado com 0,33 g de progesterona (CIDR®) de segundo uso, 500 UI de eCG (Novormon®) e 0,24 mg de cloprostenol de sódio (Sincrocio®) no dia 14 do protocolo. Em seguida, as ovelhas foram colocadas com o rufião previamente marcado na região do esterno com uma mistura de óleo de soja com tinta em pó. Deste modo, assim que apresentavam sinais de estro, as fêmeas eram marcadas pelo rufião e separadas das demais.

2.8 Transferência dos embriões e diagnóstico de gestação

Para o procedimento, as ovelhas receberam xilazina 2% (0,05 mg/kg) seguido da tricotomia da região abdominal. Para identificar as receptoras aptas a receber o embrião, os ovários eram avaliados por laparoscopia com a condição da presença de pelo menos um corpo lúteo funcional com a coloração rósea escuro a vermelha em um dos ovários. A inováção dos embriões foi realizada por técnica semi laparoscópica com a exposição de uma pequena porção do corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo ativo. Todas as receptoras receberam apenas um embrião, de qualidade 1 ou 2, em estágio de mórula ou blastocisto. Após o procedimento, elas retornaram ao mesmo local para aguardar a confirmação da gestação. O diagnóstico de gestação ocorreu aos 40 dias após o procedimento por via transretal utilizando transdutor linear de 5 MHz (Chisson Eco 3®, Kilumax, São Paulo, Brasil).

2.9 Custos

Foram levantados todos os custos diretos relacionados à MOTE. Não foram incluídos os custos indiretos, como os referentes a investimento e depreciação da estrutura e outros materiais da cabanha. Isto ocorreu pelo fato desta biotécnica poder ser realizada sem a necessidade de uma estrutura própria, já que os custos das instalações variam de uma propriedade para outra. Dessa maneira, os custos diretos foram os relativos a(o): protocolo hormonal, aquisição do sêmen, mão de obra do

médico-veterinário, salário proporcional ao tempo utilizado pelo funcionário na preparação dos animais e com os procedimentos. Para o protocolo hormonal das doadoras e receptoras foram levantados os valores gastos em nota fiscal com os itens utilizados, calculando de maneira proporcional por cada indivíduo. Os valores acompanharam os praticados pelo mercado no momento da compra. Nos valores do protocolo hormonal, foram incluídas as ovelhas que realizaram o protocolo, mas que por falta de resposta reprodutiva ou falta de embrião para transferência não deram continuidade aos procedimentos.

O sêmen foi adquirido de diferentes cabanhas, com um valor que variou entre R\$ 400 e R\$ 600 reais, cobrado apenas das ovelhas que produziram ao menos um embrião viável. Quando foi utilizado sêmen de reprodutores da própria cabanha foi estimado o valor dos materiais utilizados para a coleta do sêmen e valor proporcional da mão de obra do médico-veterinário, variando de R\$31,00 a R\$34,24 por doadora ao longo dos anos.

Para o valor de mão de obra do médico-veterinário foi considerado o valor de R\$ 700,00 praticado por profissionais da região, sendo calculado o valor por doadora coletada, excluindo as ovelhas que não responderam ao protocolo de superovulação ou apresentaram qualquer condição que não pudesse concluir a coleta e ficando por conta do médico-veterinário a aquisição do material de consumo. Já o valor de mão de obra do funcionário, foi calculado mediante a quantidade de horas proporcionais ao salário mensal, utilizadas com a preparação dos animais e dias dos procedimentos.

2.10 Análise da capacitação profissional

Após o treinamento técnico no início do ano 1, o médico-veterinário foi adquirindo experiência ao longo dos anos a partir da execução e treinamento da MOTE. Para mensurar essa influência foram calculados os índices reprodutivos para cada um dos anos em que a técnica foi realizada no mesmo rebanho e pelo mesmo médico-veterinário. Esses índices foram taxas de estruturas totais por coleta e a quantidade de embriões transferidos por doadora, taxa de gestação das receptoras após a inovulação dos embriões e aderências uterinas nas doadoras resultantes dos procedimentos cirúrgicos.

2.11 Margem brutada MOTE

A margem bruta é um parâmetro de rentabilidade em uma operação econômica e indica qual a porcentagem de lucro obtido em um investimento. Se ela for positiva, o produtor consegue ao menos saldar o investimento e no caso de ser negativa, há a necessidade de captação de outras fontes de recursos para a manutenção do processo produtivo (CNA BRASIL, 2021). Dessa maneira, a margem bruta correspondeu ao resultado financeiro, ou seja, o lucro direto obtido exclusivamente através da utilização da MOTE no rebanho. Foram calculados os custos por embrião produzido, custos da gestação e custos por cordeiro nascido, incluindo os custos diretos com a técnica e o valor médio de venda dos produtos, mostrando a proporção do valor da MOTE no custo por gestação e depois na venda dos animais.

2.12 Estatística

Os parâmetros analisados em cada ciclo de MOTE foram: estruturas totais/doadora; embriões transferidos; gestação; sincronização; aderência permanente e aderência transitória. Para a análise estatística foi usado o *software* Bio Estat 5.0 (Belém, Brasil), considerando o nível de significância de 5% ($P < 0.05$). Teste de Shapiro Wilk foi aplicado para verificar normalidade. Variáveis não paramétricas foram analisadas por teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn, ou teste de qui-quadrado e teste exato de Fisher.

3. Resultados

No que se refere aos parâmetros reprodutivos (Tabela 1), o número médio de estruturais totais recuperadas bem como a média de embriões transferidos por coleta apresentaram diferença ($P < 0,05$) entre os anos. Para ambas as variáveis, o valor máximo foi atingido no ano 4, em patamares distintos do ano 1. Já para gestações, taxa de aderência permanente e transitória não houve diferença ($P > 0,05$), ao passo que a proporção de receptoras sincronizadas que receberam embrião apresentou diferença significativa após o primeiro ano.

Tabela 1. Parâmetros reprodutivos (média $\pm$ SEM ou %) obtidos com a adoção da MOTE ao longo de quatro anos em rebanho comercial ovino da raça Dorper

Variáveis	Ano 1	Ano 2	Ano 3	Ano 4	Total/Média
Número de doadoras/coletas	14	23	14	14	65
Número de estruturas totais recuperadas	34	137	64	115	350
Média de estruturas/doadora	2,4 $\pm$ 0,7 ^a	6,0 $\pm$ 1,0 ^{a,b}	4,6 $\pm$ 1,0 ^{a,b}	8,2 $\pm$ 2,1 ^b	5,3 $\pm$ 2,4
Número de embriões transferidos	24	103	59	85	271
Média de embriões transferidos/doadora	1,7 $\pm$ 0,5 ^a	4,5 $\pm$ 0,7 ^b	4,2 $\pm$ 0,9 ^{a,b}	6,1 $\pm$ 1,8 ^b	4,1 $\pm$ 1,8
Número de gestações (receptoras)	6	41	28	34	109
Taxa de gestação (%)	25,0	39,8	47,5	48,6	40,2
Receptoras recebendo embrião (%)	34,3 ^a	89,6 ^b	84,3 ^b	94,0 ^b	75,5
Número de cordeiros nascidos	5	36	25	30	96
Número de aderências permanentes	2	0	0	0	2
Taxa de aderência permanente (%)	14,3	0	0	0	3,6
Número de aderências transitórias	1	1	2	0	4
Taxa de aderência transitória (%)	7,1	4,3	14,3	0	6,4

^{a,b} Diferença entre anos para médias e taxas (P<0.05).

Fonte: Autores (2021).

Os custos diretos da MOTE apresentados na Tabela 2 mostram as variações no custo do sêmen que foi substancialmente maior no primeiro ano, já que no início do experimento o material foi adquirido de fonte externa e nos anos subsequentes já havia machos com alto valor genético na propriedade aptos a serem coletados e inclusos na reprodução. No ano 2 houve maior custo com mão de obra, visto que a quantidade de animais envolvidos no experimento foi sensivelmente maior, demandando mais tempo de serviço.

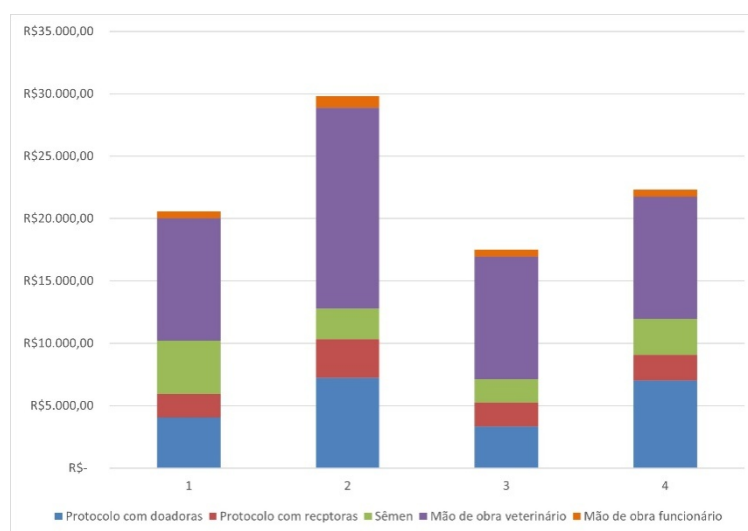
Tabela 2. Custos diretos em reais (R\$) relacionados à adoção da MOTE ao longo de quatro anos em rebanho comercial ovino da raça Dorper

Ano	Protocolo por doadora *	Protocolo por receptora *	Sêmen **	Mão de obra veterinário ***	Mão de obra funcionário ****	Custo direto total ano
1	289,55	27,13	305,00	700,00	563,55	20.586,05
2	314,01	26,94	107,07	700,00	926,71	29.809,64
3	237,37	27,48	135,00	700,00	563,55	17.500,14
4	502,09	29,12	206,30	700,00	563,55	22.319,14

*Valor relativo aos custos de todas as doadoras/receptoras que receberam o protocolo hormonal mesmo que não tenha respondido ao tratamento, dividido pelos animais que foram utilizados; **Valor proporcional por doadora que produziu ao menos um embrião; ***Valor relativo aos procedimentos realizados em cada ano, cobrado por doadora coletada; ****Valor relativo ao tempo necessário para a realização de todos os procedimentos e preparação dos animais.

Fonte: Autores (2021).

Figura 2 –Proporção de cada custo direto no valor total referente à aplicação da MOTE em rebanho ovino comercial no decorrer de quatro anos.



Fonte: Autores (2021).

Quanto aos custos totais diretos por gestação, foi observado um salto no ano 2, a despeito da economia na obtenção do sêmen. Este salto foi impulsionado por maior efetividade na produção de estruturas totais que resultou em incremento na transferência de embriões dada a expertise adquirida, bem como a maior quantidade de animais envolvidos no ano. Tal incremento recuou nos anos subsequentes, no entanto, mantendo sempre os custos por gestação controlados diante da realidade advinda do primeiro ano (Tabela 3).

Tabela 3. Margem bruta (R\$) por gestação da cabanha com a adoção da MOTE

Ano	Custo por embrião produzido	Custo por gestação	Custo por cordeiro nascido	Valor médio de venda	Margem Bruta
1	857,75	3.431,01	4.117,21	3.160,00	-271,01
2	289,41	727,04	828,04	3.042,00	2.314,56
3	296,61	625,00	700,00	3.971,00	3.346,33
4	262,57	656,45	743,97	3.818,00	3.161,11

Fonte: Autores (2021).

4. Discussão

O presente estudo avaliou os parâmetros reprodutivos da MOET a partir dos índices de treinamento e capacitação profissional do médico veterinário, custos relativos à implementação da biotecnologia e valores comerciais de venda dos animais. Bari, Khalid, Wolf, Haresign, Murray e Merrell(2001), demonstraram que a quantidade de estruturas recuperadas ao longo de coletas sucessivas se mantiveram semelhantes ao longo dos procedimentos nos mesmos animais e após um aperfeiçoamento da técnica foi possível observar discreta melhora. Porém, Bruno-Galagarra, Cueto, Gibbons, Pereyra-Bonnet, Catalano e Gonzales-Bulnes (2014), observaram que a quantidade de estruturas totais sofreu um decréscimo ao longo dos procedimentos. Diferentemente do que ocorreu no estudo citado, a taxa de recuperação do ano 1 foi muito inferior às demais e a partir daí os resultados foram apresentando evolução, demonstrando dessa maneira que se tratava de um período de treinamento e aperfeiçoamento do técnico. Apesar de que no ano 3 tenha sido observada uma ligeira queda, provavelmente

decorrente das variações individuais nas respostas superovulatórias (BARTLEWSKI, SEATON, OLIVEIRA, KRIDLI, MURAWSKY & SCHWARZ, 2016).

Como consequência do aumento da quantidade de embriões coletados, houve uma diminuição significativa na quantidade de receptoras sincronizadas que ficaram sem receber embrião no decorrer dos anos. No primeiro ano da utilização da MOET, apenas 34,28% das receptoras sincronizadas receberam embrião, seguido por 89,56%, 84,28% e 94% nos anos seguintes respectivamente. De acordo com Galli et al. (2003) a manutenção de receptoras na propriedade sem estarem produzindo é uma fonte importante de gasto financeiro com a biotecnologia.

A ocorrência de aderências do trato reprodutivo das ovelhas está relacionada com a reprodutibilidade da técnica devido a manipulação do útero (COGNIE, 1999; BRUNO-GALARRARA, CUETO, GIBBONS, PEREYRA-BONNET, CATALANO & GONZALES-BULNES, 2014). As ocorrências de aderências permanentes ou transitórias não apresentaram diferença significativa ao longo dos anos, porém, a ocorrência de perda da habilidade reprodutiva permanente foi observada apenas no primeiro ano em 14,28% dos animais e não foi mais registrada nos anos seguintes. Fato esse que demonstrou a relação desse tipo de aderência com o treinamento do técnico.

As taxas de gestação das receptoras após a transferência dos embriões não apresentaram diferença significativa ao longo dos anos com números de 25,0%; 39,8%; 47,45% e 48,57% ($P>0,05$) do ano 1 ao 4 respectivamente. De acordo com Bari, Khalid, Haresign, Murray & Merrell (2003), tal feito está relacionado a fatores do próprio embrião como a qualidade e estágio de desenvolvimento no dia da coleta e também fatores das próprias receptoras como idade, partos anteriores e número de corpos lúteos no momento da transferência, não havendo nesse caso influência da experiência do médico veterinário.

Em nossa pesquisa, de acordo com os valores que compreendem os custos diretos da MOET ao produtor, os que apresentaram maior variabilidade foram o protocolo hormonal e o preço do sêmen. No ano 3, devido a falta do FSH no mercado nacional foi necessário adquirir medicamentos próximos a data de vencimento e como consequência, conseguiu-se preços inferiores aos praticados normalmente no mercado. E ao contrário, no ano 4 após o início da pandemia de SARS-Cov-2 (COVID-19), foi observado um elevado acréscimo no valor do mesmo. Quanto ao sêmen, o valor gasto no primeiro ano foi o mais elevado em comparação aos demais pois com o melhoramento genético do rebanho a partir dos produtos da MOTE foi sendo possível utilizar os reprodutores da própria cabanha que tiveram a partir daí um aumento no ganho genético, diminuindo assim a quantidade de sêmen adquirido de outras criações.

Ao mesmo tempo, o fator que representou maior participação no valor total do custo da técnica para o produtor foi a mão de obra do médico veterinário, com uma participação de R\$9.800,00 no valor total do ano 1 de R\$20.586,05; de R\$ 16.100 no valor total do ano 2 de R\$ 29.809,64; participando com R\$9.800,00 no valor total do ano 3 de R\$ 17.500,14 e com o total de R\$9.800,00 no valor total do ano 4 de R\$ 22.319,14. Demonstrando dessa maneira que o treinamento e habilidade do técnico é de grande importância para o retorno financeiro da técnica.

Em relação ao custo por embrião produzido, gestação e cordeiro nascido, houve uma diminuição de aproximadamente cinco vezes ao final do estudo se comparado ao primeiro ano, apesar do aumento nos custos referentes aos protocolos hormonais. Essa redução pode ser reflexo do treinamento técnico do médico veterinário, gerando melhores índices reprodutivos devido ao acréscimo no aproveitamento das doadoras e receptoras, sendo estas responsáveis por aproximadamente metade dos custos referentes a um programa de transferência de embriões segundo Simplício, Freitas e Fonseca (2007). Dessa maneira, foi possível observar um aumento da eficiência da técnica.

Ribeiro, Galvão, Thatcher e Santos (2012), demonstraram que a estratégia adotada para a reprodução é o ponto chave para a dinâmica do rebanho, a partir do lucro ou prejuízo que esse manejo pode proporcionar. A partir da MOTE foi possível acelerar o melhoramento genético na cabanha, aumentando o valor médio de venda dos animais, se comparados o primeiro e último ano do estudo. É importante ressaltar que somente no primeiro ano, devido ao início do treinamento técnico, houve prejuízo no custo da MOTE, cenário que foi revertido a partir do segundo ano.

5. Conclusão

Em conclusão, o treinamento técnico do médico veterinário ao longo dos quatro anos foi capaz de diminuir os custos e aumentar a eficiência da MOTE em rebanho ovino da raça Dorper. Este tipo de estudo pode ser determinante para a decisão de aplicação desta biotecnologia da reprodução pelo produtor rural. Outro ponto importante é que este estudo foi realizado em São Paulo, Brasil, e sua utilização como modelo de simulação em outras localidades pode sofrer influências que alterem os seus resultados e aplicabilidade.

Referências

- Alves, L. G. C., Osório, J. C. S., Fernandes, A. R. M., Ricardo, H. A. & Cunha, C. M. (2014). Produção de carne ovina com foco no consumidor. *Enciclopédia Biosfera*, 10(18), 2399-2014.
- Baltrame, R. T., Quirino, C. R., Barioni, R. G. & Lima, V. F. M. H. (2010). Simulação e análise econômica da produção *in vivo* e *in vitro* de embriões. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 45(12).
- Bari, F., Khalid, M., Wolf, B., Haresign, W., Murray, A. & Merrell, B. (2001). The repeatability of superovulatory response and embryo recovery in sheep. *Theriogenology*, 56(1), 147-155.
- Barl, F., Khalid, M., Haresign, W., Murray, A. & Merrell, B. (2003). Factors affecting the survival of sheep embryos after transfer within a MOET program. *Theriogenology*, 59, 1265-1275.
- Bartlewski, P. M., Seaton, P., Oliveira, M. E. F., Kridli, R. T., Murawsky, M. & Schwarz, T. (2016). Intrinsic determinants and predictors of superovulatory yields in sheep: Circulating concentrations of reproductive hormones, ovarian status, and antral follicular blood flow. *Theriogenology*, 86(1), 130-143.
- Baruselli, P. S., Catussi, B. L. C., Abreu, L. A., Elliffi, F. M., Silva, L. G. & Batista, E. O. S. (2019). Challenges to increase the AI and ET markets in Brazil. *Animal Reproduction*, 16(3), 364-375.
- Brasil, O. O., Moreira, N. H., Ramos, A. F. (2014). Situação atual da superovulação em ovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 38(3), 147-153.
- Bruno-Galarraga, M., Cueto, M., Gibbons, A. E., Pereyra-Bonnet, F., Catalano, R. & Gonzalez-Bulnes, A. (2014). Repeatability of superovulatory response to successive FSH treatments in Merino sheep. *Small Ruminant Research*, 120(1), 84-89.
- Bruno-Galarraga, M., Cueto, M., Gibbons, A., Pereyra-Bonnet, F., Subiabre, M. & Gonzalez-Bulnes, A. (2015). Preselection of high and low ovulatory responders in sheep multiple ovulation and embryo transfer programs. *Theriogenology*, 84, 784-790.
- Cognie, Y. (1999). State of the art in sheep-goat embryo transfer. *Theriogenology*, 51(1), 105-116.
- CBRA (2013). COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal* (3a ed., pp. 49-104).
- Fonseca, J.F., Oliveira, M. E. F., Brandão, F.Z., Batista, R.T.P., Garcia, A.R., Bartlewski, P.M. & Souza-Fabjan, J.M.G. (2019). Non-surgical embryo transfer in goats and sheep: the Brazilian experience. *Reproduction, Fertility and Development*, 31(1), 17-26.
- Galli, C., Duchi, R., Crotti, G., Turini, P., Ponderato, N., Colleoni, S., Lagutina, I. & Lazzari, G. (2003). Bovine embryo technologies. *Theriogenology*, 59(2), 599-616.
- Gerger, R.P.C., Rossetto, R., Ribeiro, E.S., Ortigari, I., Zago, F. C., Aguiar, L.H., Costa, U.M., Lopes, R. F. F., Ambrósio, C. E., Miglino, M. A., Rodrigues, J. L., Forell, F., Bertolini, L. R. & Bertolini, M. (2017). Impact of cumulative gain in expertise on the efficiency of handmade cloning in cattle. *Theriogenology*, 95, 24-32.
- Heikkila, A. M. & Peippo, J. (2012). Optimal utilization of modern reproductive technologies to maximize the gross margin of milk production. *Animal Reproduction Science*, 132, 129-138.
- Mckelvey, W. A. C., Robinson, R. P., Aitken, R. P. & Robertson, I. S. (1986). Repeated recoveries of embryos from ewes by laparoscopy. *Theriogenology*, 25(6), 855-865.
- Phillips, P. E. & Janke, M. M. (2016). Embryo transfer: Techniques, donor and recipients. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 32(2), 365-385.
- Ribeiro, E. S., Galvão, K. N., Thatcher, W. W., & Santos (2012). Economics aspects of applying reproductive technologies to dairy herds. *Animal Reproduction*, 9(3), 370-387.
- Simplicio, A. A.; Freitas, VJ de F.; da Fonseca, J. F. (2007). Biotécnicas da reprodução como técnicas de manejo reprodutivo em ovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 31(2), 234-246.
- IETS (2020). SOCIEDADE INTERNACIONAL DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES (IETS), 36(4).
- Zhu, J., Moawad, A. R., Wang, C. Y., Li, H. F., Ren, J. Y. & Dai, Y. F. (2018). Advances in *in vitro* production of sheep embryos. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 6, 15-26.
- <https://www.cnabrazil.org.br/custo-de-produc%C3%A7%C3%A3o-e-ana%C3%81lise-econo%C3%82mico-financeira>. Acessado em 5 de junho de 2021.

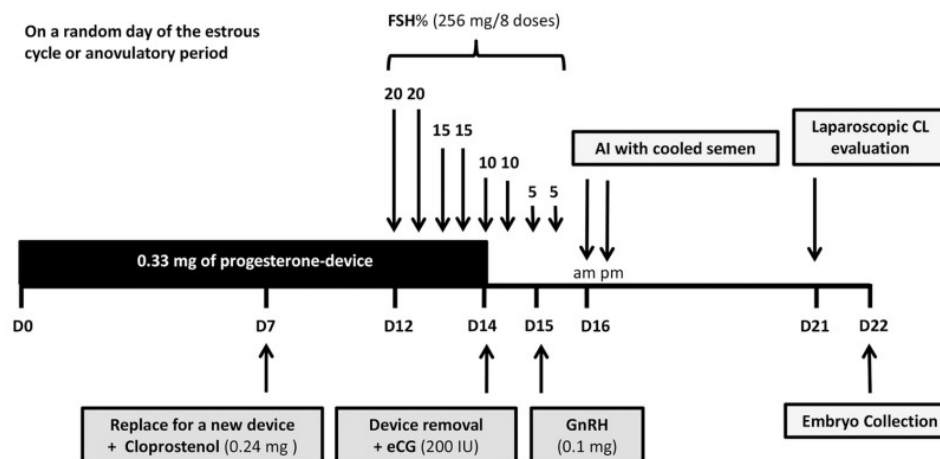


Fig. 1. Schematic presentation of superovulatory protocol in Dorper ewes submitted to artificial laparoscopic insemination followed by corpus luteum evaluation and surgical embryo collection. AI: artificial insemination; CL: corpus luteum; eCG: equine chorionic gonadotropin; FSH: follicle-stimulating hormone; GnRH: gonadotropin-releasing hormone.

Table 1

The occurrence of total premature regression of corpora lutea (PRCL) in Dorper ewes subjected to multiple ovulation and embryo transfer (MOET) programs during four consecutive years under subtropical climate.

Repetitions *	Ewes**	Ewes with PRCL by repetition (%)	PRCL once (%)*	PRCL twice (%)*	Total PRCL	Total MOET
1	13	3 (23)	3 (23)	—	3	13
2	14	10 (71)	8 (57)	2 (14)	12	28
3	7	5 (71)	5 (71)	0 (0)	5	21
4	7	4 (57)	3 (43)	1 (14)	5	28
5	3	1 (33)	1 (33)	0 (0)	1	15
Total	44	23	20	3	26	105

* number of times each ewe was subjected to MOET procedure (1 to 5);

** number of ewes subjected to each MOET repetitions (1 to 5);

*** number of ewes presenting PRCL for the first (once) or second (twice) time through repetitions.

5 Occurrence of premature regression of corpus luteum in MOET programs in Dorper ewes under subtropical climate

Marcela S. Rocha ^a, Ana Lucia R. S. Maia ^b, Paulo Sérgio C. Rangel ^c, Maria Emilia F. Oliveira ^d, Jeferson F. Fonseca ^e, Cláudio A. Oliveira ^a, Joanna M.G. Souza-Fabjan ^{b,*}

^a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, CEP 05508-000, Brazil

^b Faculdade de Veterinária Universidade Federal Fluminense, Niterói, RJ, CEP 24230-340, Brazil

^c Unigranrio, Duque de Caxias, RJ, CEP 25071-202, Brazil

^d Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, CEP 14884-900, Brazil

^e Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral, CE, CEP 62010-970, Brazil

Highlights

- Premature regression of corpus luteum (PRCL) affected 25% of superovulated Dorper ewes;.
- PRCL occurrence was not associated to sheep donor age and body condition score;.
- PRCL occurrence was not associated to the season (breeding, transition, or non breeding);.
- PRCL occurrence was not associated to the number of MOET procedures (one to five) within the same donor.

Abstract

Premature regression of corpus luteum (PRCL) is a functional alteration that occurs mainly in superovulated females hampering the widespread use of multiple ovulation and embryo transfer (MOET). This study evaluated the association of donor age (3–9 years old), body condition score (2 to 4.5), number of MOET (1 to 5) repetitions and season (breeding, transition, or non-breeding) with the occurrence of PRCL in ewes. Multiparous Dorper ewes ($n = 44$) were subjected to MOET during four consecutive years, with the same superovulatory treatment. Before embryo collection, ovaries were laparoscopically performed to assess the corpora lutea (CL). Overall, the total PRCL occurrence was 24.7% (26/105) and it had no association with the studied factors. Percentages of ewes that presented PRCL once or twice were 45.5% (20/44) and 6.8% (3/44), respectively, while the percentage of ewes that had no PRCL was 47.7% (21/44). Proportions of PRCL were similar ($P > 0.05$) among breeding (21%), transition (31%), and non-breeding (24%) season; and also ($P > 0.05$) in lower/thin (20%), average/good (24%), and higher/fat (29%) females. In conclusion, although this phenomenon had no association to the factors studied, the occurrence of PRCL affects ~25% of ewes subjected to MOET procedures and future alternatives to circumvent this obstacle need to be developed.

Keywords: Abnormal CL. Luteal dysfunction. Seasonality, Sheep. Superovulation

1.Introduction

The implementation of reproductive technologies has the potential to enhance the productive efficiency of sheep farming by accelerating genetic gain, increasing selective pressure, and decreasing the generation interval (Smith, 1988). Despite all

these advantages, the use of multiple ovulation and embryo transfer (MOET) on a commercial scale is still impaired by the variability in the individual responses to gonadotropins, unsuccessful fertilization, and occurrence of premature regression of corpus luteum (PRCL) (Forcada et al., 2011). Females subjected exactly to the same treatment present different responses due to intrinsic or extrinsic factors as age, breed, climate, and interval between protocols (Bartlewski et al., 2016).

The PRCL is a luteal dysfunction characterized by low progesterone secretion (< 1.5 ng/mL) and occasionally alteration in the estrous cycle duration, commonly verified in the transition from anestrous to cyclic conditions, as in puberty, after seasonal or lactational anestrous (Baird, 1992). Of note, it is frequently observed in superovulated (SOV) sheep (Okada et al., 2000; Forcada et al., 2011), but its exact cause is not fully understood. The PRCL may occur partially or totally in the ovaries, affecting either some or all the CLs, respectively (Oliveira et al., 2018). Various studies have been carried out to elucidate the connection between PRCL during SOV programs and factors such as: use of different SOV treatments (Forcada et al., 2011), porcine follicle-stimulating hormone (pFSH) doses (Rodriguez et al., 2018), age of donor ewes (Lopes Júnior et al., 2006), breeds and season (Okada et al., 2000), or type of estrus, either natural, induced or in a random day (Quan et al., 2011).

Assessment of the CL morphology by laparoscopy before embryo collection allows the identification of reddish protruding and vascularized CL (normal/functional) or pale whitish small and avascular CL (abnormal/PRCL) (Oliveira et al., 2018). This CL evaluation is crucial in order to determine if the females will whether be subjected to the embryo collection, since it is well known that PRCL leads to low embryo recovery rate (Souza-Fabjan et al., 2017) and a reduction in embryo quality in terms of number of transferable embryos (Quan et al., 2011). This study evaluated the

association of different intrinsic and extrinsic factors with the occurrence of PRCL in Dorper ewes subjected to MOET programs during four consecutive years, under subtropical climate.

2. Materials and methods

2.1. Ethics, period, location

This study was approved by the Animal Care Committee of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of São Paulo (#2717181220). The study was performed over four years (2017–2020) in a commercial sheep herd in São Luís do Paraitinga (23°22' S and 45°26' W), state of São Paulo, Brazil. The ewes were kept in intensive management with corn silage and balanced feed in addition to mineral salt and water *ad libitum*.

2.2. Experimental design

Multiparous Dorper ewes ($n = 44$) aging 3 to 9 years old and presenting body condition score (BCS) from 2 to 4.5 were subjected to MOET programs, with the same SOV protocol, over four years. The ewes were subjected to the procedure at least once and at maximum Five times, with a minimum interval of four months between MOET, totalling 105 procedures. Before each session, the ewes had their age and BCS recorded as well as the season. The BCS was categorized as lower/thin (2 to 2.5), average/good (3 to 3.5) and higher/fat (4 to 4.5) and the season as breeding (February to July), transition (January and August), or nonbreeding (September to December). The effect of age and MOET repetition within each animal were also assessed. The same technician performed the CL evaluation and embryo collection throughout the study.

2.3. Superovulation, artificial insemination, and CL evaluation

On a random day of the estrous cycle or anovulatory period (Day 0), the ewes received an intravaginal device containing 0.33 mg of progesterone (CIDR®, Zoetis, São Paulo, Brazil). On Day 7, the device was replaced for a new one and the ewes received 0.24 mg of cloprostenol (Sincrocio®, Ourofino, São Paulo, Brazil) intramuscularly (i.m.). The SOV treatment with 256 mg of pFSH (Folltropin®, Vetoquinol, São Paulo, Brazil) started on Day 12 and consisted in eight decreasing doses (20/20/15/15/10/10/5/5%) administered i.m. every 12 h for four days. On Day 14, 200 IU of eCG (Novormon®, Zoetis, São Paulo, Brazil) i.m. was given at device removal and 0.1 mg of GnRH (Fertagyl®, MSD, São Paulo, Brazil) i.m. on Day 15 (Fig. 1).

The laparoscopic AI was performed twice (36 and 42 h after removal of the progesterone device) on Day 16 using commercial cooled semen. Five days after AI, ovaries were assessed by laparoscopy to check the presence and morphology of CL, according to Oliveira et al. (2018). Ewes that had only small, pale, and pinkish to whitish color CL were classified with PRCL, while those presenting protruding, bright, and reddish color CL were categorized as having functional CL. Only the latter were submitted to the embryo recovery procedure.

2.4. Statistics

The association of different ages, categories of BCS, seasons and MOET repetition with occurrence of PRCL was assessed. Effect of age was checked by logistic regression, BCS by Fisher test, and season and MOET repetition by Kappa test.

Statistical analyses were performed using the Bio Estat 5.0 software and values of $P < 0.05$ were considered significant.

3. Results

From 105 laparoscopy evaluations, the PRCL was identified in 26 procedures, totalling 24.7% of occurrence. Percentages of ewes that presented PRCL once or twice were 45.5% (20/44) and 6.8% (3/44), respectively, while the percentage of ewes that had no PRCL was 47.7% (21/44) (Table 1). No ewes presented PRCL more than twice. There was no difference ($P > 0.05$) in the proportions of PRCL among breeding season (21%, 10/48), transition period (31%, 10/32) and non-breeding season (24%, 6/25). The BCS did not affect ($P > 0.05$) the occurrence of PRCL, being similar to lower/thin (20%, 2/10), average/good (24%, 16/ 67) and higher/fat (29%, 8/28) females. Similarly, there was no association ($P > 0.05$) between the PRCL occurrence and the age of donors.

4. Discussion

The present study evaluated the association of the occurrence of PRCL in ewes submitted to MOET programs during four consecutive years with factors such as age and BCS of donor female, season, and number of MOET repetitions. Overall, the total PRCL occurrence was 24.7% and it had no association with the studied factors. This percentage was similar to 22.6% of ewes of different breeds presenting abnormal CL (Okada et al., 2000) and slightly higher than the 12.5% reported in Santa Inês ewes (Oliveira et al., 2018) and 9.6% in Ojalada Soriana ewes (Forcada et al., 2011), all studies applying SOV/MOET. Importantly, the complete CL regression after SOV treatment impaired the *in vivo* production as it led to a low number of transferable

embryos. In addition, regarding animal welfare and the possibility of abdominal adhesions (Quan et al., 2011), donors should not be subjected to surgical embryo collection without an assessment of the SOV response and CL functionality. Therefore, the PRCL is an obstacle seen on the efficiency of MOET programs in sheep.

In the current study, the occurrence of PRCL could not be associated with season and MOET repetition. Similarly, the prevalence of ewes presenting abnormal CL in spring and autumn did not differ (Okada et al., 2000). Quan et al. (2011) reported no effect of the season and in the first, second, or third SOV treatment on the number of transferable embryos per ewe, although repetition for three times affected surgical embryo recovery, probably to adherences found. Curiously, it was earlier demonstrated that the number of ewes with PRCL was different in those receiving distinct SOV protocols (Forcada et al., 2011), but, as described above, in the present study the same SOV treatment was applied over the four years, “blocking” this effect.

Both age and BCS did not affect the occurrence of PRCL in the present study. Similarly, no difference on the PRCL rate was reported between different age groups (1–2 vs. 3–4 years old) (Lopes Júnior et al., 2006) and in those SOV-ewes receiving normal diet vs. half energetic diet, although the number of transferable embryos was lower in undernourished ewes (Abecia et al., 2013). The absence of any effect in these variables in our study is probably related to the fact that all the donors were multiparous and their BCS did not involve extremes of undernutrition or obesity.

Considering that in the commercial system where the study was performed a historical average of eight viable embryos per MOET procedure are normally obtained (data not shown), in 26 procedures, we can estimate that approximately 208 viable embryos were not collected due to the relatively high PRCL occurrence, being a substantial financial loss for the producer.

5. Conclusion

Under the conditions of our study, the occurrence of PRCL affects ~25% of ewes subjected to MOET procedures and future alternatives to circumvent this obstacle need to be developed. This phenomenon had no association to the factors studied such as season, donor age, BCS, and number of MOET repetitions.

CRediT authorship contribution statement

Marcela S. Rocha: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Data curation, Visualization, Writing – original draft. **Ana Lucia R.S. Maia:** Methodology, Formal analysis, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Paulo Sergio ´ C. Rangel:** Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing – review & editing. **Maria Emilia F. Oliveira:** Formal analysis, Visualization, Writing – review & editing. **Jeferson F. Fonseca:** Formal analysis, Visualization, Writing – review & editing. **Claudio ´ A. Oliveira:** Supervision. **Joanna M.G. Souza-Fabjan:** Conceptualization, Supervision, Visualization, Writing – original draft, Writing – review & editing, Project administration, Funding acquisition.

Acknowledgements

This study was partly financed by CAPES (Code 001). JFF, MEFO, and JMGS-F are CNPq fellows and JMGS-F and ALRSM are FAPERJ fellows.

References

Abecia, J.A., Forcada, F., Palacín, I., Sanchez-Prieto, L., Sosa, C., Fernandez-Foren,

A., Meikle, A., 2013. Undernutrition affects embryo quality of superovulated ewes. *Zygote* 23, 116–124. <https://doi.org/10.1017/S096719941300035X>.

Baird, D.T., 1992. Luteotrophic control of the corpus luteum. *Anim. Reprod. Sci.* 28, 95–102. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(92\)90096-v](https://doi.org/10.1016/0378-4320(92)90096-v).

Bartlewski, P.M., Seaton, P., Oliveira, M.E.F., Kridli, R.T., Murawski, M., Schwarz, T., 2016. Intrinsic determinants and predictors of superovulatory yields in sheep: circulating concentrations of reproductive hormones, ovarian status, and antral follicular blood flow. *Theriogenology* 86, 130–146. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.024>.

Forcada, F., Ait Amer-Meziane, M., Abecia, J.A., Maurel, M.C., Cebrian-Perez, J.A., Muino-Blanco, T., Asenjo, B., Vazquez, M.I., Casao, A., 2011. Repeated superovulation using a simplified FSH/eCG treatment for *in vivo* embryo production in sheep. *Theriogenology* 75, 769–776. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.10.019>.

Lopes Júnior, E.S., Maia, E.L.M.M., Paula, N.R.O., Teixeira, D.I.A., Villarroel, A.B.S., Rondina, D., Freitas, V.J.F., 2006. Effect of age of donor on embryo production in Morada Nova (white variety) ewes participating in a conservation programme in Brazil. *Trop. Anim. Health Prod.* 38, 555–561. <https://doi.org/10.1007/s11250-006-4344-1>.

Okada, A., Kamada, S., Jeon, C.-W., Miyamoto, A., Fukui, Y., 2000. Incidence of Abnormal Corpus Luteum in Superovulated Ewes. *J. Reprod. Dev.* 46, 397–402. <https://doi.org/10.1262/jrd.46.397>.

Oliveira, M.E.F., Ribeiro, I.F., Rodriguez, M.G.K., Maciel, G.S., Fonseca, J.F., Brandão, F. Z., Bartlewski, P.M., 2018. Assessing the usefulness of B-mode and colour Doppler sonography, and measurements of circulating progesterone concentrations for determining ovarian responses in superovulated ewes. *Reprod. Domest. Anim.* 53, 742–750. <https://doi.org/10.1111/rda.13165>.

Quan, F., Zhang, Z., An, Z., Hua, S., Zhao, X., Zhang, Y., 2011. Multiple Factors Affecting Superovulation in Poll Dorset in China. *Reprod. Domest. Anim.* 46, 39–44. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01551.x>.

Rodriguez, M.G.K., Maciel, G.S., Uscategui, R.A.R., Santos, V.J.C., Nociti, R.P., Silva, P.D.A., Feliciano, M.A.R., Brandão, F.Z., Fonseca, J.F., Oliveira, M.E.F., 2018. Early luteal development in Santa Inês ewes superovulated with reduced doses of porcine follicle-stimulating hormone. *Reprod. Domest. Anim.* 54, 456–463. <https://doi.org/10.1111/rda.13374>.

Smith, C., 1988. Applications of embryo transfer in animal breeding. *Theriogenology* 29, 203–212. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(88\)90040-4](https://doi.org/10.1016/0093-691X(88)90040-4).

Souza-Fabjan, J.M.G., Rosa, R.M., Balaro, M.F.A., Pinto, P.H.N., dos Santos, G.B., Arashiro, E.K.N., Fonseca, J.F., Ungerfeld, R., Brandão, F.Z., 2017. Effect of different

hormonal combinations on follicular wave emergence and superovulatory response
in sheep. *Theriogenology* 103, 24–29.
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.07.036>

6 Flunixin meglumine is efficient to reduce premature regression of corpora lutea in superovulated Dorper ewes

Marcela Sene Rocha^a, Lucas Machado Figueira^b, Jasmine Bantim de Souza Pinheiro^b,
Thais de Almeida Oliveira^b, Felipe Zandonadi Brandão^b, Jeferson Ferreira da Fonseca^c,
Maria Emilia Franco Oliveira^d, Claudio Alvarenga de Oliveira^a, Joanna Maria
Gonçalves Souza-Fabjan^{b*}

^a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, CEP 05508-270, São Paulo, SP, Brazil

^b Faculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, CEP 24320-340, Niterói, RJ, Brazil

^c Embrapa Caprinos e Ovinos, CEP 62011000, Sobral, CE, Brazil

^d Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, CEP 14884-900, Jaboticabal, SP, Brazil

* Corresponding author. E-mail address: joannavet@gmail.com (J.M.G. Souza-Fabjan)

Abstract

This study evaluated the use of flunixin meglumine to reduce the occurrence of premature regression of corpora lutea (PRCL) in superovulated sheep. Twenty-three multiparous Dorper ewes were treated with 2.2 mg/kg/day of flunixin meglumine (FLU, $n = 12$) or saline (CONT, $n = 11$) for three consecutive days, starting two days (D2) after artificial inseminations (AI). Conventional protocol with intravaginal device containing 0.33 mg of progesterone (CIDR®, Zoetis, São Paulo, Brazil), replaced by a new one on Day -9, along with 0.24 mg of cloprostenol (Sincrocio®, Ourofino, São Paulo) intramuscularly. From Day -4, 256mg of FSH (Folltropin®, Vetoquinol, São Paulo, Brazil) was used in eight decreasing doses every 12 h and 200 IU of eCG (Novormon®, Zoetis, São Paulo, Brazil) i.m. on device removal on Day -2 and 0.1 mg GnRH (Fertagyl®, MSD, São Paulo, Brazil) i.m. on Day -1. Laparoscopic AI were performed twice at 36 and 42 h after device removal on D0 with cooled semen. On D6, the ovaries were evaluated by laparoscopy to verify the presence and viability of corpora lutea (CL) before surgical embryo collection. The laparoscopy detected greater ($P=0.01$) PRCL in CONT (64%) than in FLU ewes (0%). The total number of CL did not differ ($P=0.10$) between CONT (9.0 ± 1.0) and FLU (10.5 ± 1.8), the FLU group had a lower ($P=0.10$) number of CL with signals of luteal regression (0.0 vs 4.6 ± 1.6) than CONT group. Greater ($P<0.01$) recovery rate (79.5 ± 9.5 vs $45.4 \pm 15.9\%$), number of ova/embryo recovered (9.1 ± 2.1 vs 3.7 ± 1.3), and number of viable embryos (5.1 ± 1.1 vs 2.6 ± 1.2) were observed in FLU ewes. Blood progesterone concentrations were superior ($P<0.05$) in FLU than in CONT from D1 to D6 and those concentrations (on the day of embryo recovery) were correlated ($P<0.05$) with the number of CLs ($r = 0.79$) and the number of ova/embryo recovered ($r = 0.54$). In conclusion, flunixin

meglumine was able to reduce the occurrence of PRCL, increasing the recovery rate and embryo production in superovulated ewes.

Keywords: eCG, ewes, luteal regression, superovulation, PRCL.

1. Introduction

Among sheep breeds, Dorper stands out on the world stage in genetic improvement programs due to its productive quality of adaptability, growth rate, weight gain, and reproductive efficiency (Ameida et al., 2013; Gavojdian et al., 2015; Kandiwa et al., 2020). Aiming at such genetic improvement programs, the multiple ovulation and embryo transfer (MOET) technique is an essential tool for the multiplication of females (Zhu et al., 2018; Bergsteins-Galan et al., 2019). In fact, the MOET is the most used technique for the production of embryos in sheep in Brazil, as well as in the world, and in greater volume compared to the goat species (Souza-Fabjan et al., 2021). Despite that, there is an urgent need to overcome some obstacles such as donor ovulation rate, the number of embryos per collection, and/or the premature regression of the corpus luteum (PRCL) (Bruno-Galarraga et al., 2014; Bartlewski et al., 2016). Although the latter is usually more described in the goat species (Saharrea et al., 1998; Espinosa-Márquez et al., 2004; Cervantes et al., 2007), estrus-synchronized (Salloum and Saleh, 2022) and superovulated (Souza-Fabjan et al., 2017) sheep may also have a high occurrence of PRCL, such as 23% and 50%, respectively. Our group has recently shown a PRCL rate of 26% over four years of working with a conventional superovulation (SOV) protocol in superovulated Dorper ewes, without any effect regarding the donor age, body condition score, number of MOET procedures, and season (Rocha et al., 2022). Of note, in those aforementioned studies, as well as in most reports found in the literature, no strategy to control PRCL was applied in superovulated ewes.

The PRCL mechanism is frequently associated with high estradiol concentrations, often related to the presence of anovulatory follicles (Saharrea et al., 1998; reviewed by Rodriguez et al., 2016), resulting in an early release of prostaglandin F2 alfa (PGF). This event will consequently decrease the concentration of progesterone (P₄), impairing embryonic migration in the oviduct and its quality (Saharrea et al., 1998; Aké-Lopez et al., 2005; Cervantes et al., 2007). Different approaches have been used in superovulated goats to avoid RPCL, such as the use of hCG (Saharrea et al., 1998), GnRH (Saharrea et al., 1998), and progesterone or its analogue (Gilbert et al., 1990; Cervantes et al., 2007). Of note, the flunixin meglumine, a potent non-steroid anti-inflammatory drug that inhibits the cyclo-oxygenase enzyme synthesis, appears to be an important strategy over the years (Soares et al., 1986; Gilbert et al., 1990; Salles et al., 1998; Maia et al., 2020). In sheep, the flunixin meglumine was only tested after mating, aiming to check its effect on the length of the estrous cycle and luteal phase (Aké-Lopez et al., 2005), but the literature is incipient on the use of this drug to avoid the PRCL in superovulated ewes.

We hypothesized that the use of flunixin meglumine could minimize the occurrence of PRCL in superovulated ewes, increasing the rate of recovery and production of good-quality embryos. Thus, the objective was to verify the effects of flunixin meglumine on superovulation response, embryo collection rates, and embryo quality, evaluating PRCL by laparoscopy, Doppler ultrasonography, and P₄ concentrations.

2. Material and Methods

2.1 Ethics

This research was approved by the Ethical Committee for Animal Use of the São Paulo University (protocol # 2717181220).

2.2 Experimental location, animals, and design

The experiment was conducted at a commercial sheep farm in São Luis do Paraitinga, São Paulo State, Brazil (23° 22'36"S latitude and 45° 26' 51"W longitude). Multiparous Dorper ewes (n = 25) with ages between two and eight years (3.2 ± 0.1), average weight of 64.2 ± 4.0 kg that had been approved in clinical evaluations and presented good body condition scores (3.4 ± 0.2), on a scale of 1 to 5. The animals were kept in a confined system and fed corn silage and concentrate with about 10% crude protein to meet maintenance requirements.

All ewes received the same superovulation treatment and randomly divided into two groups to receive either 2.2 mg/kg of flunixin meglumine (FLU, n = 12) once a day for three days (Day 2 to 4, being Day 0 = Artificial Insemination, AI) or saline solution (CONT, n = 11). Transrectal B-mode and Doppler ultrasounds (US) were performed on Days 3 and 6 to count the CL, the latter time being immediately before laparoscopic evaluation of the ovaries and surgical embryo collection. At the ultrasound, the number of luteal structures, functional CL, regressing CL, and luteinized ovulatory follicles (Oliveira et al., 2018). At laparoscopy, corpora lutea were classified as normal (orange or bright red in color) or in regression (white or pale pink in color, reduced size) (Farin et al., 1986). Serum progesterone was assessed from the day of AI until embryo collection (Day 0 to 6). PRCL was considered to have occurred if progesterone concentrations decreased to <1 ng/mL on Day 6 (Saharrea et al., 1998; Okada et al., 2000).

2.3 Superovulatory protocol and AI

The animals underwent the conventional SOV protocol (Hameed et al., 2021). In brief, an intravaginal device containing 0.33 mg of progesterone (CIDR[®], Zoetis, São Paulo, Brazil) was replaced with a new one on Day -9, along with 0.24 mg of cloprostenol (Sincrocio[®], Ourofino, São Paulo, Brazil) intramuscularly (i.m.). The superovulation treatment with 256 mg of FSH (Folltropin[®], Vetoquinol, São Paulo, Brazil) started on Day -4 and consisted of eight decreasing doses (20/20/15/15/10/10/5/5%) administered i.m. every 12 h for four days plus 200 IU of eCG (Novormon[®], Zoetis, São Paulo, Brazil) i.m. at device removal on Day -2 and 0.1 mg of GnRH (Fertagyl[®], MSD, São Paulo, Brazil) i.m. on Day -1 (Fig. 1).

Ewes were artificially inseminated by laparoscopy method (Mckelvey et al., 1986) on Day 0 (36 and 42 h after removal of the progesterone device) with commercial fresh semen from fertile rams of the same breed with proven fertility and tested according to seminal quality parameters (CBRA, 2013). For this purpose, commercial diluent (Botu-bovi[®], Biotech Ltda, Botucatu, Brazil) was added and then packed in its box (Botu-flex[®], Biotech Ltda, Botucatu, Brazil) remaining at 5 °C for a maximum period of 12 h until the time of AI. In the procedure was used an inseminating dose at a concentration of 125×10^6 sperm in each uterine horn (Fig. 1).

2.4 Ultrasonographic evaluation

For the ultrasonography exam, each ovary was first located using B-Mode, right after Color-Doppler mode was activated, and the number of luteal structures, functional CL, regressing CL, and luteinized ovulatory follicles was determined, as previously described (Oliveira et al., 2018). Portable ultrasound equipment (Mindray Z5, Shenzhen, China) provided with a 7.5 MHz linear transducer was used. We used the following

Doppler settings: 1.0 kHz pulse repetition frequency, 7 cm depth, and 75 kHz wall filter. The same technician performed US assessments on all animals.

2.5 Serum progesterone concentrations

Blood samples were collected in all ewes at jugular vein puncture into tubes Vacutainer[®] with clot activator. Tubes were immediately placed on ice, transported to the laboratory, and centrifuged at $2000 \times g$ for 15 min. Serum was removed and stored at -20°C pending determination of serum progesterone concentrations with a commercial solid-phase radioimmunoassay (RIA) kit (catalogue n^o#07-270105, MP Diagnostics Division; Orangeburg, NY, USA) in a single assay, in which the detection limit was 0.15 ng/mL. The standard curve provided by the kit was used, where the established points were as follows: 0, 0.15, 0.50, 1, 5, 20, and 80 ng/mL. Standard curve points were performed in duplicates. All samples were assayed in the same RIA to eliminate inter-assay variability. The intra-assay coefficient of variation was 9%, and all data were within the minimum and maximum values of the curve.

2.6 Laparoscopy for CL count and embryo recovery

Six days after AI, ewes were submitted to embryo recovery. For that, females were deprived of food and water for 24 h and 12 h, respectively, and then were submitted to general anesthesia made by isoflurane (2-4% with 0-15 mL/kg/min of oxygen). Immediately before embryo recovery, CL and luteinized unovulatory follicles (LUFs) were counted by laparoscopy, as already described (Bruno-Galarraga et al., 2015); ewes were submitted to embryo recovery only if they had three or more CL independent of the presence of PRCL. Embryos were surgically recovered via longitudinal ventral laparotomy. After uterus exposure, an 18-gauge IV catheter (BD,

New Jersey, USA) was inserted near the utero-tubal junction, and the uterine lumen received an injection of 40 mL of warmed (37 °C) buffered phosphate solution (DMPBS, Biodux, São Paulo, Brazil) supplemented with 10% adult bovine serum (Nutricell, São Paulo, Brazil). This flushing medium was recovered using a Foley catheter (size 10 Fr) inserted at the external bifurcation of the uterine horns. Flushing content was recovered in a Petri dish (150 x 20 mm) and sent for evaluation. Embryo morphology was evaluated under a stereomicroscope (NikonSMZ800N, Tokyo, Japan) using magnification from 20 to 40x.

2.7 Endpoints and statistical analysis

We determined the following end points: estrus response (number of ewes in estrus/number of treated ewes x 100); ewes that responded to SOV protocol (ewes that had ≥ 3 CL at laparoscopy); total number of luteinized structures at laparoscopy between regressed and normal; total number of normal CL at laparoscopy; number of regressing corpora lutea at laparoscopy; percentage of ewes presenting luteinized unovulatory follicles at laparoscopy; number of ewes with PRCL at US (number of ewes with CL that regressed/total CL counted at US x 100); number of ewes with PRCL by laparoscopy (number of ewes with CL that regressed/total CL counted at laparoscopy x 100); number of ewes with PRCL by P4 concentrations (number of ewes with $P4 < 1$ ng/mL three days before embryo collection); number of total recovered structures (oocytes, zona pellucida, degenerated and viable embryos) per ewe; number of transferable and non-transferable embryos (all grades) per ewe; number of degenerated embryos per ewe; structures recovery rate (recovered structures/total CL counted at laparoscopy x 100), viability rate (viable embryos/total recovered structures x 100).

The statistical analysis was performed by generalized linear models using the SAS[®] software (Statistical Analysis Software, Cary, NC, United States of America). The binomial variables were expressed as percentages and analyzed using the GLIMMIX procedure, with logit link-function, and treatment as a fixed effect. The Shapiro-Wilk test was performed to evaluate the normality of the parametric data. Data with normal distribution were analyzed with normal distribution by PROC GLM. The Deviance analysis was used for parametric data with POISSON or GAMMA distribution, using the log linkfunction and treatment as a fixed effect.

Data from progesterone concentrations and ultrasonographic assessment of luteal structures on Day 6 after AI (CL, luteinized anovulatory follicles, and total luteal structures) were analyzed as repeated measures using PROC GLIMMIX, with Gamma and Poisson distribution, respectively. The compound symmetry (CS) matrixes were applied to model the residual covariance. The model included treatment (or group), day, ewe (as a random variable), and interactions where necessary. It was considered 5% of significance level for all tests. Correlation coefficients between progesterone concentrations on Day 6 and the total number of luteal structures, number of normal CL, number of regressing CL, and number of viable embryos were evaluated using the Pearson correlations method.

3. Results

It was not possible to visualize the estrus in only one ewe and another one did not respond to the superovulation protocol, presenting less than three luteinized structures on the day of embryo collection (Table 1). Although the responsiveness ($\geq 3\text{CL}$) to the superovulatory treatment regimen and the total number of normal-looking CL counted by laparoscopy did not differ ($P>0.05$) between groups, there was,

however, a greater ($P<0.05$) number of regressing CL and premature luteal regression rate (PLRR) in ewes of the CONT group, observed by US, laparoscopy, and P_4 concentrations (Table 1).

The mean serum P_4 concentrations were greater ($P<0.05$) in FLU than in CONT group from the day of FLU/saline administration to the day before embryo recovery. Ewes without PRCL showed greater P_4 concentrations compared to ewes that had PRCL during this period (Figure 2).

There was no effect of treatment, day, or their interaction on the variables number of anovulatory follicles, CL, or total luteinized structures assessed on day 3 and day 6 by US (Table 2). However, when comparing the ewes that suffered PRCL with the ewes that did not, it was possible to observe an increase ($P<0.05$) in the number of CL on Day 3 (6.4 ± 1.2) and day 6 (7.5 ± 2.1) only in the animals that did not undergo PRCL. The mean number of luteinized anovulatory follicles was greater ($P<0.05$) in ewes that did not undergo PRCL (8.8 ± 1.5) compared to those that did (3.3 ± 1.3). Considering the total of luteinized structures, there was a smaller number in the PRCL group (8.0 ± 2.3 vs 18.9 ± 1.5) on D6 (before embryo collection), with a significant reduction ($P<0.05$) between D3 and D6 only in PRCL ewes (Table 3).

A greater ($P<0.05$) number of recovered ova/embryo and viable embryos was obtained in FLU vs CONT, respectively (Table 4). The embryo recovery rate was greater in FLU compared to CONT group. The embryo viability rate did not differ ($P>0.05$) between treatment groups.

The blood P_4 concentrations on the day of embryo recovery were positively correlated ($P<0.05$) with the number of CL count by laparoscopy ($r=0.42$) and the number of ova/embryo recovered ($r=0.52$) and negatively correlated with the number of CL regressed (-0.57). However, there was no association ($P>0.05$) between P_4

concentrations and the number of viable embryos. Both CL count by US or laparoscopy were positively correlated with the number of ova/embryo recovered ($r= 0.48$ and 0.49 , respectively), however, only CL count by the US was positively correlated ($P<0.05$) with the number of viable embryos ($r=0.52$).

4. Discussion

The treatment with flunixin meglumine proposed by our group proved to be effective in preventing PRCL in superovulated Dorper ewes with a traditional protocol. Gilbert et al. (1990) and Cervantes et al. (2007) with the same aim of preventing PRCL in superovulated goats, proposed treatments using intravaginal sponges impregnated with fluorogestone acetate (FGA). The first group had greater rates of PRCL prevention in the group that used flunixin meglumine, while the second group had greater rates of PRCL in the group treated with FGA sponges compared to the control group that received saline solution, despite having observed beneficial effects of progestin on embryo recovery rate. While treatment with FGA is based on maintaining progesterone levels, Aiumlamai et al. (1990) showed that treatment with flunixin meglumine was able to lower baseline levels of the main circulating metabolite of $\text{PGF2}\alpha$, 15-ketodihydro- $\text{PGF2}\alpha$ by inhibiting the COX enzyme, which acts in its synthesis.

Salles et al. (1998) performed four days of flunixin meglumine treatment with dosages of 1.1 mg/kg and 2.2 mg/kg with one or two applications per day, reporting that the dosage of 1.1 mg/kg/day may not have been sufficient for the proposed treatment and on the other hand that excess flunixin meglumine could reduce the embryo recovery rate. The treatment performed in our study showed that the dosage of 2.2 mg/kg/day in a single application for three consecutive days was sufficient to prevent the occurrence of PRCL in Dorper ewes, not disturbing the embryonic recovery rate in animals without

regression, in addition to increasing the serum P4 levels in the treated group. Ake-Lopez et al. (2005), used 2.2 mg/kg/day of flunixin meglumine to increase fertility and prolificacy after the natural mating of ewes and noticed a prolongation of the luteal phase in the estrous cycle of the animals, demonstrating the pharmacological potential of this drug in preventing early luteolysis, thus maintaining the proper luteogenic process.

Premature luteal regression was characterized by high percentages in the untreated group, by ultrasound, laparoscopy, or hormone P4 measurement. Although it was not the main objective of this study, the methods of evaluation of PRCL used showed some equivalence, with important consequences for the decision-making of whether or not to harvest the embryos, in view of the high probability of low or null non-recovery of embryos and the reduction of the response potential after successive surgical recoveries. Interestingly, US combining B-mode and color Doppler showed the highest correlation coefficient with the number of viable embryos compared to laparoscopic evaluation. The use of this tool is reliable to select donors, minimizing interventions in animals with an insufficient response (Pinto et al., 2018; Figueira et al., 2020) and may serve in future works as a criterion to prioritize donors without RPCL on the day of collection, since laparoscopy is performed just moments before the collection procedure.

On Day 3, during flunixin meglumine treatment, it was possible to observe by ultrasound an equal number of CL, follicles > 5 mm (supposedly anovulatory follicles), and total luteal structures comparing the FLU group with the CONT group. At that time and before collection, there were no differences in the number of CL counted by US comparing the treatments, or the ewes that will undergo PRCL or not. Four animals underwent premature luteal regression as indicated by the drop in progesterone

concentrations to baseline levels between Day 4 and Day 5. These animals had CL regressing on laparoscopy on Day 6, although two of them also had normal-appearing CL at the same time, characterizing partial regression with healthy CL and CL with regression in the same ovary, also described by Saharrea et al. (1997). When considering only ewes with luteal failure on day 6 post-estrus/AI, mean total recovered structures, transferable embryos and percentage of does rendering ≥ 3 transferable embryos. Data from the present study corroborate Okada et al. (2000), who suggest that PRCL in superovulated ewes may be due to the formation of abnormal CL with inadequate luteinization. On the sixth pre-collection day, the number of regressing CL was observed by laparoscopy was mostly found in the group of untreated ewes. The observation of regressing on Day 6, even when P_4 concentrations already reached baseline values, is due to the fact that structural luteolysis requires more time than functional luteolysis (loss in steroidal capacity), once this process involves an apoptotic cascade (luteal cell death and phagocytosis) and replacement by fibroblasts (Niswender, et al., 2000).

5. Conclusions

In conclusion, under the conditions of the present study, flunixin meglumine was able to reduce the occurrence of PRCL in Dorper ewes after imposing a superovulatory regimen using pFSH and eCG, increasing the recovery rate and embryo yield. Considering the financial impact of RPCL and the low cost of treatment, use of flunixin meglumine is recommended in MOET protocols worldwide.

Acknowledgments

The present study was carried out with the support of the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Financing Code 001), FAPERJ, and Embrapa Goats and Sheep (Project Superovi—22.13.06.026.00.03). FZB, JFF, MEFO, and JMGS-F are CNPq fellows, as well as FZB and JMGS-F are FAPERJ fellows. The authors thank the technical support of Lucas Francisco Leodido Correia, Mirela Balistrieri Dias, Paula Renata Cortat de Souza, Maria Clara Cruz Morais, Ana Clara Sarzedas Ribeiro.

References

- Aiumlamai, S.; Odensvik, K.; Stabenfeldt, G.; Kindahl, H., 1990. Regulation of prostaglandin biosynthesis with flunixin meglumine in the bovine species. *J. Vet. Med.* 37, 16-22. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.1990.tb00871.x>
- Aké-López, R., Segura-Correa, J.C., Quintal-Franco, J., 2005. Effect of flunixin meglumine on the corpus luteum and possible prevention of embryonic loss in Pelibuey ewes. *Small Rumin. Res.* 59, 83-87. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2004.11.008>.
- Almeida, A.M., Kilminster, T., Scanlon, T., Araújo, S.S., Milton, J., Oldham, C., Greeff, J.C., 2013. Assessing carcass and meat characteristics of Damara, Dorper and Australian Merino lambs under restricted feeding. *Trop. Anim. Health. Prod.* 45, 1305–1311. <https://doi.org/10.1007/s11250-013-0361-z>.
- Bartlewski, P.M., Seaton, P., Oliveira, M.E.F., Kridili, R.T., Murawski, M., Schwarz, T., 2016. Intrinsic determinants and predictors of superovulatory yields in sheep circulating concentrations of reproductive hormones, ovarian status, and antral follicular blood flow. *Theriogenology* 86, 130-146. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.024>.
- Bergstein-Galan, T.G., Weiss, R.R., Kozicki, L.E., 2019. Effect of semen and donor factors on multiple ovulation and embryo transfer (MOET) in sheep. *Reprod. Domest. Anim.* 54(2), 401-407. <https://doi.org/10.1111/rda.13381>.
- Bruno-Galarraga, M.M., Cueto, M., Gibbons, A.E., Pereyra-Bonnet, F., Catalano, R., Gonzalez-Bulnes, A., 2014. Repeatability of superovulatory response to successive FSH treatments in Merino sheep. *Small Rumin. Res.* 120, 84-89. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.04.002>.
- Bruno-Galarraga, M.; Cueto, M.; Gibbons, A.; Pereyra-Bonnet, F.; Subiabre, Gonzalez-Bulnes, A., 2015. Preselection of high and low ovulatory responders in sheep multiple

ovulation and embryo transfer programs. *Theriogenology* 84, 784-790. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.05.011>

Cervantes, M.J., Juaréz, M.L., Mejía, V.O., Berruecos, V.J.M., Vera, A.H., Valencia, J., 2007. Use of fluorogestoneacetate after breeding to reduce the effect of premature luteal regression in dairy goats when superovulation is induced with FSH. *Anim Reprod Sci*, 97, 47-54.

Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA). Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal, 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 87p.

Espinosa-Márquez, M.C., Valencia, J., Zarco, L., Escobar-Medina, J., Colina-Flores, F., Arechiga-Flores, C.F. 2004. Effect of fluorogestone acetate on embryo recovery and quality in eCG-superovulated goats with premature luteal regression. *Theriogenology* 62, 624-630. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.01.001>.

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

Gavojdian, D., Budai, C., Csiszter, L.T., Csizmar, N., Javor, A., Kusza, S., 2015. Reproduction Efficiency and Health Traits in Dorper, White Dorper, and Tsigai Sheep Breeds under Temperate European Conditions. *Asian-Australas J Anim Sci*. 28(4), 599-603. <https://doi:10.5713/ajas.14.0659>.

Gilbert, D.E., Conrood, S.A., Whiting, C.J., Pashen, R.L., 1990. Comparison of a progesterone intravaginal device (CIDRTM) with flunixin meglumine (FinadyneTM) for reducing the effects of corpora lutea regression in the goat. *Theriogenology* 33(1).

Hameed N., Khan M.I.-u.-R., Zubair M., Andrabi S.M.H. Approaches of estrous synchronization in sheep: Developments during the last two decades: A review. *Trop. Anim. Health Prod.* 2021;53:485. doi: 10.1007/s11250-021-02932-8.

Kandiwa, E., Nguarambuka, U., Chitate, F., Samkange, A., Madzingira, O., Mbiri, P., 2020. Production performance of sheep and goat breeds at a farm in a semi-arid region of Namibia. *Trop. Anim. Health Prod.* 52, 2621–2629. <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02283-w>.

Maia ALRS, Arrais AM, Prellwitz L, Batista RITP, Figueira LM, Correia LFL, Fonseca JF, Souza-Fabjan JMG. Embryo development is impaired in goats that are treated for hydrometra and subsequently subjected to superovulation. *Veterinary Record*, 2020. doi: 10.1136/vr.105906.

McHugh N., McGovern F., Creighton P., Pabiou T., McDermott K., Wall E., Berry DP. Mean difference in live-weight per incremental difference in body condition score estimated in multiple sheep breeds and crossbreds. *Animal*. 2019 Mar;13(3):549-553. doi: 10.1017/S1751731118002148.

McKelvey, W.A.C., Robinson, R.P., Aitken, R.P., Robertson, I.S. 1986. Repeated recoveries of embryos from ewes by laparoscopy. *Theriogenology* 25(6), 855-865. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(86\)90102-0](https://doi.org/10.1016/0093-691X(86)90102-0).

Niswender, G.D., Juengel, J.L., Silva, P.J., Rollyson, M.K., McIntush, E.W., 2000. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological Reviews* 80(1), 1-29. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.1.1>.

Okada, A., Kamada, S., Jeon, C.-W., Miyamoto, A., Fukui, Y., 2000. Incidence of abnormal corpus luteum in superovulated ewes. *J. Reprod. Dev.* 46, 397-402. <https://doi.org/10.1262/jrd.46.397>.

Oliveira, F.C., Haas, C.S., Ferreira, C.E.R., Goulart, K.L., Pegoraro, L.M.C, Gasperin, B.G., Schneider, A., Mondadori, R.G., Lucia Jr., T., Vieira, D., 2018. Inflammatory markers in ewes submitted to surgical or transcervical embryo collection. *Small Rumin Res* 158, 15-18.

Pinto, P. H. N., Bragança, G. M., Balaro, M. F. A., Arashiro, E. K. N., dos Santos, G. B., de Souza, G. N., Souza-Fabjan, J. M. G, Fonseca, J. F., Brandão, F. Z. 2018. Colour-Doppler ultrasound imaging as a laparoscopy substitute to count corpora lutea in superovulated sheep. *Reproduction in Domestic Animal*, 53, 266-269. <https://doi.org/10.1111/rda.13089>

Rocha, M. S., Maia, A. L. R. S., Rangel, P. S. C., Oliveira, M. E. F., Fonseca, J. F., Oliveira, C. A., Souza-Fabjan, J. M. G., 2022. Occurrence of premature regression of corpus luteum in MOET programs in Dorper ewes under subtropical climate. *Livestock Science*, 255, 104808. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2021.104808>

Saharrea, A., Valencia, J., Balcázar, A., Mejía, O., Cerbon, J.L., Caballero, V., Zarco, L., 1998. Premature luteal regression in goats superovulated with PMSG: effect of hCG or GnRH administration during the early luteal phase. *Theriogenology* 50, 1039-1052. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00206-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00206-4).

Salles, H.O., Soares, A.T., Andrioli, A., Sobrinho, P.A.M., Azevedo, H.C., 1998. Different flunixin meglumine administrations to control of the corpus luteum premature regression in superovulated goats. *Ciência Animal* 8, 69-74, 1998.

Salloum, A., Saleh, M. Comparison of GnRH and hCG effects on oestradiol, progesterone and premature luteolysis in Ovsynch-synchronized ewes. *Reprod. Domest. Anim.* 57, 550-555, 2022.

Soares AT, Simpício AA, Pinheiro-Andrioli A, Sales HO, Moura-Sobrinho PA, Soares BA, Moraes JB, Stubbings RB, Bosu WTR, Baker CA, King GJ. Serum progesterone concentrations associated with superovulation and premature corpus luteum failure in dairy goats. *Can J Vet Res*, v.50, p.369-373, 1986.

Souza-Fabjan, J.M.G., Rosa, R.M., Balaro, M.F.A., Pinto, P.H.N., dos Santos, G.B., Arashiro, E.K.N., Fonseca, J.F., Ungerfeld, R., Brandao, F.Z., 2017. Effect of different hormonal combinations on follicular wave emergence and superovulatory response in sheep. *Theriogenology* 103, 24–29. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.07.036>

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

ZHU, J., MOAWAD, A. R., WANG, C. Y., LI, H. F., REN, J. Y., DAI, Y. F., 2018. Advances in *in vitro* production of sheep embryos. *Int. J. Vet. Sci.* 6, 15-26. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2018.02.003>

Table 1. Estrous parameters and superovulatory response of Dorpermultiparous ewes treated with 2.2 mg/kg/day flunixin meglumine (FLU) or saline solution (CONT) for three consecutive days, starting 48 h before (D2) the end of the superovulatory treatment*. Data are expressed as percentage or mean $\pm$ SD.

Endpoints	CONT	FLU	Total	p-value
Estrus response(%)	100.0 (11/11)	91.7 (11/12)	95.7 (22/23)	0.98
Ewes that responded to SOV (%) ¹	100.0 (11/11)	91.7 (11/12)	95.7 (22/23)	0.98
Total number of luteinized structures at laparoscopy	9.0 $\pm$ 1.0 (5 – 15)	10.5 $\pm$ 1.8 (5 – 26)	9.8 $\pm$ 1.1 (5-26)	0.10
Total number of CL normal at laparoscopy	4,4 $\pm$ 1.6 ^b (0 – 14)	10.5 $\pm$ 1.8 ^a (5 – 26)	7.6 $\pm$ 1.4 (0 – 26)	0.02
Nb. of regressing corpora lutea at laparoscopy	4.6 $\pm$ 1.6 ^a (0 – 14)	0.0 $\pm$ 0.0 ^b (0 – 0)	2.2 $\pm$ 0.9 (0 - 14)	0.01
Ewes with ovarian cysts/LUFs** at laparoscopy (%)	80.0 (8/11)	63.6 (7/11)	71.4 (15/21)	0.42
Ewes with PRCL***at laparoscopy (%)	63.6 ^a (7/11)	0.0 ^b (0/11)	31.8 (7/22)	0.01
Ewes with PRCL at US (%)	54.5 ^a (6/11)	0.0 ^b (0/11)	27.3 (6/22)	0.01
Ewes with PRCL at progesterone (%)	54.5 ^a (6/11)	0.0 ^b (0/11)	27.3 (6/22)	0.01

*Dorper multiparous ewes (n=23) received a conventional superovulatory protocol: 14 days (D-16) of progesterone device (replaced by a new one on D-9), and 256 mg FSH (decreasing doses every 12 h, from D-4 to D-1), plus 200 IU eCG at device removal (D-2), and 0.1 mg GnRH on D-1.

** Luteinized unovulatory follicles

*** Premature luteal regression rates (PRCL) were classified according to their color light pink or white in laparoscopy, blood flow at ultrasound doppler imaging (US), or at serum progesterone concentrations.

¹ Superovulatory response was considered when the number of CL ≥ 3 was counted by laparoscopy performed immediately before embryo collection.

Different letters in the same row differ statistically ($P < 0.05$); Minimum and maximum values are presented in parentheses (min - max) when applicable.

Table 2. Endpoints of ultrasonographic evaluation of luteal structures on Days 3 and 6 in ewes treated with saline solution (CONT) or flunixin meglumine (FLU) after traditional superovulatory treatment.

End point	<u>CONT</u>		<u>FLU</u>		<i>p</i> -value		
	Day 3	Day 6	Day 3	Day 6	Trt	Day	Trt*Day
Nb. of LUF*	7.7 ± 1.5	5.0±1.0	9.3 ± 1.8	8.8 ± 2.2	0.25	0.40	0.32
Nb. of corpora lutea	7.4 ± 1.5	9.2 ± 1.9	5.6 ± 1.0	7.8 ± 1.3	0.37	0.18	0.63
Nb. of luteinized structures	15.1 ± 1.7	14.2 ± 2.5	13.8 ± 2.0	16.6 ± 2.1	0.78	0.77	0.30

* LUF: luteinized unovulatory follicles

Table 3.Endpoints of ultrasonographic evaluation of luteal structures on the Day 3 and 6 in ewes with either normal luteal response (Normal) or premature regression of corpora lutea (PRCL) regardless of treatment group [saline solution (CONT) or flunixin meglumine (FLU) after traditional superovulatory treatment].

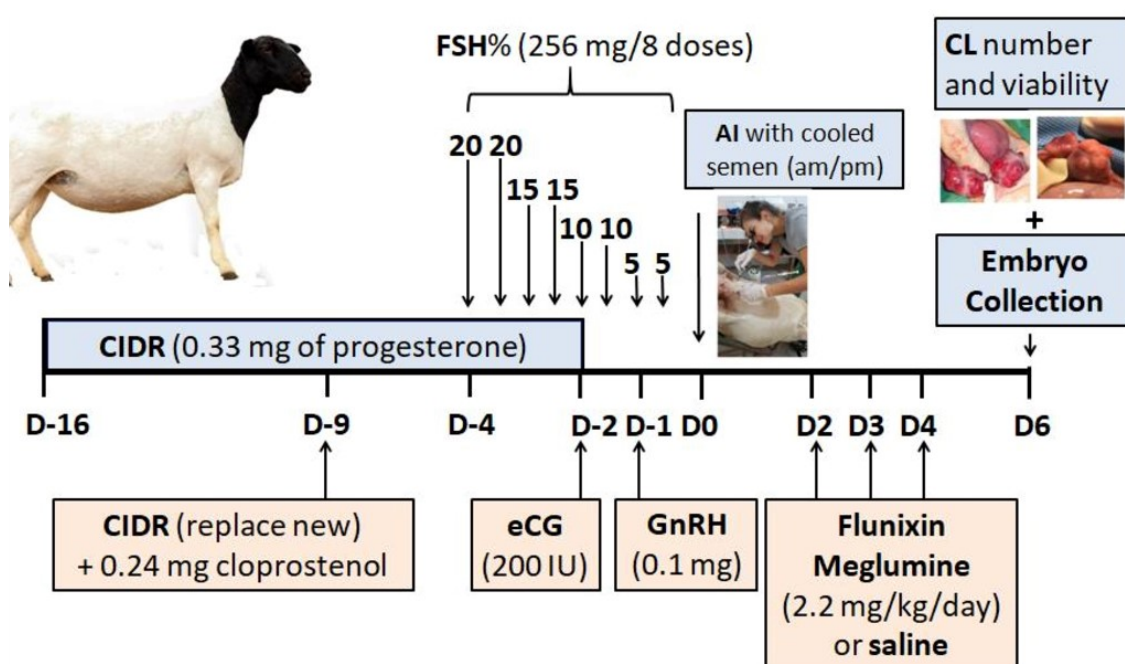
End point	<u>Normal</u>		<u>PRCL</u>		Trt	<i>p</i> -value	
	Day 3	Day 6	Day 3	Day 6		Day	Trt*Day
Nb. of luteinized unovulatory follicles	9.1 ± 1.4	8.8 ± 1.5	6.0 ± 1.5	3.3 ± 1.3	<0.01	0.19	0.25
Nb. of corpora lutea	6.4 ± 1.2	10.1 ± 1.3	7.5 ± 2.1	4.7 ± 1.6	0.19	0.98	0.04
Nb. of luteinized structures	15.5 ± 1.3	18.9 ± 1.5	13.5 ± 2.8	8.0 ± 2.3	<0.01	0.27	0.01

Table 4. Embryo recovery variables in Dorper ewes treated with flunixin meglumine (FLU) or saline solution (CONT) for three consecutive days starting two days (D2) after artificial inseminations (AI)*. Data are expressed as percentage or mean $\pm$ SEM. Minimum and maximum values are presented in parentheses (min - max) when applicable.

Parameter	CONT	FLU	TOTAL	p-value
Nb. of total recovered structures	3.7 $\pm$ 1.3 ^b (0 – 13)	9.1 $\pm$ 2.1 ^a (0 – 26)	6.4 $\pm$ 1.4 (0 – 26)	<0.01
Recovery rate (%)	45.4 $\pm$ 15.9	79.5 $\pm$ 9.5	63.3 $\pm$ 9.6	<0.01
Viable embryos	2.6 $\pm$ 1.2 (0 – 11)	5.1 $\pm$ 1.1 (0 – 14)	3.9 $\pm$ 0.8 (0 - 14)	<0.01
Non-fertilized structures	0.7 $\pm$ 0.4 (0 – 4)	1.1 $\pm$ 0.6 (0 – 6)	0.9 $\pm$ 0.4 (0 - 6)	0.38
Degenerated structures	0.1 $\pm$ 0.1 ^b (0 – 1)	2.4 $\pm$ 1.5 ^a (0 – 16)	1.2 $\pm$ 0.8 (0 – 16)	<0.01
Morulae	0.5 $\pm$ 0.3 (0 – 3)	0.8 $\pm$ 0.3 (0 – 3)	0.7 $\pm$ 0.2 (0 - 3)	0.45
Blastocysts	2.0 $\pm$ 0.9 (0 – 8)	4.0 $\pm$ 1.1 (0 – 13)	3.0 $\pm$ 0.7 (0 -13)	0.01
Viability rate (%)	51.2 $\pm$ 16.0	66.7 $\pm$ 9.4	59.8 $\pm$ 8.7	0.12

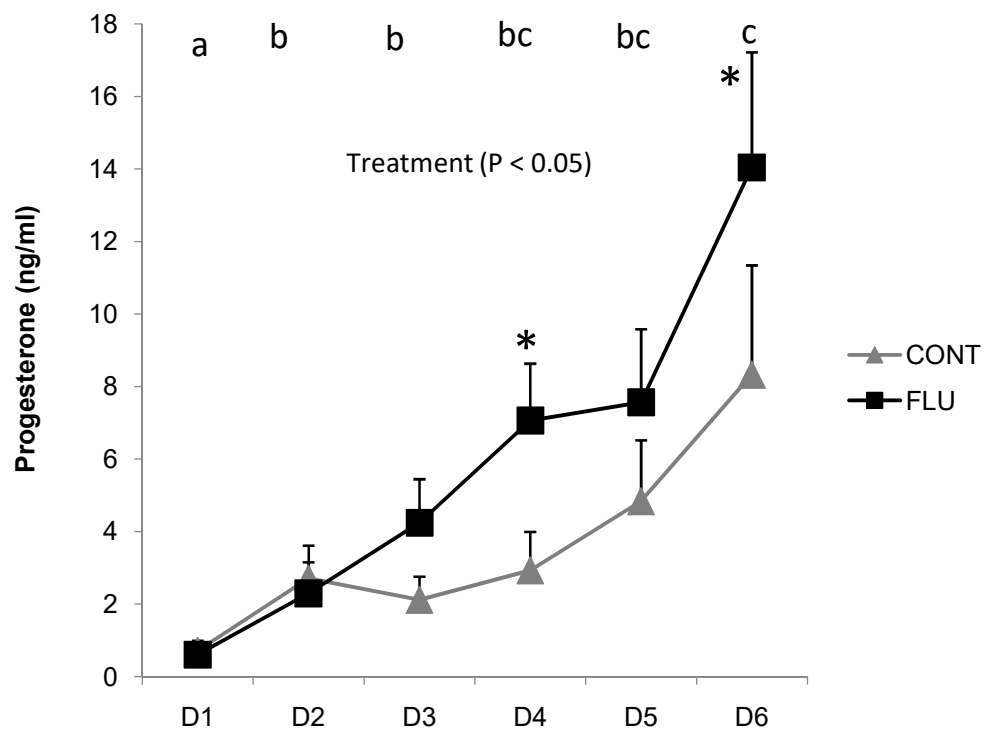
^{ab}Different letters in the same row differ statistically (P < 0.05). *

Fig. 1. Schematic representation of the experimental procedures used to assess the use of flunixin meglumine (FLU) or saline solution (CONT) after a traditional superovulatory protocol for 14 days of progestogen exposure to evaluate embryo yield after surgical embryo recovery in the Dorper breed (FSH: follicle-stimulating hormone; eCG: equine chorionic gonadotropin; AI: artificial insemination).



CIDR: intravaginal device FSH: follicle stimulating hormone; eCG: equine chorionic gonadotropin; GnRH: gonadotropin releasing hormone; AI: laparoscopic artificial insemination; CL: corpus luteum

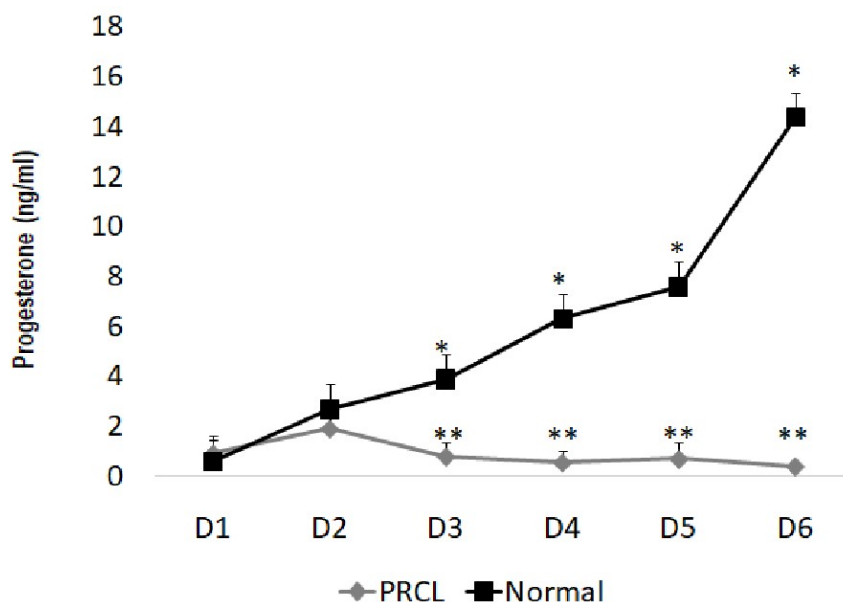
Figure 2: Mean blood progesterone concentrations in Dorper ewes after superovulatory protocol, and treatment with saline (CONT) or flunixin meglumine (FLU).



* indicate differences between treatment groups

^{abc} Different letters indicate significant differences between the days (P < 0.05)

Figure 3. Mean blood progesterone concentrations in Dorper ewes with premature regression (PRCL) or without PRCL (Normal), after traditional superovulatory treatment.



*Indicate there was an effect of the treatment with the use of flunixin meglumine

**Indicate the interaction of the treatment per day, defined from D3 with the curves ascending in completely opposite directions ($P < 0.05$)

7 ASSOCIATION OF FLUNIXIN AND DIPYRONE AFTER EMBRYO COLLECTION TO PAIN CONTROL IN EWES

Marcela Sene Rocha^a, Mirela Balistrieri Dias^b, Paula Renata Cortat de Souza^b, Maria Clara Cruz
Morais^b, Ana Clara Sarzedas Ribeiro^b, Lucas Francisco Leodido Correia^b, Felipe Zandonadi
Brandão^b, Claudio Alvarenga de Oliveira^a, Joanna Maria Gonçalves Souza-Fabjan^b

^a Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Butantã, CEP
05508-270, São Paulo, SP, Brazil

^bFaculdade de Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Rua Vital Brazil, 64, CEP 24320-
340, Niterói, RJ, Brazil

Abstract

This study aimed to evaluate the benefits of dipyrene and flunixin meglumine association in a postoperative pharmacological protocol after surgical embryo recovery in sheep. Ewes were randomly allocated in two groups after surgical embryo collection: Control (CONT; $n = 11$) and Dipyrene (DIPYR; $n = 11$). The CONT group was submitted to a postoperative protocol with the administration of 2 mg/kg flunixin meglumine IM immediately, 24 hours and 48 hours after the surgical procedure. The DIPYR group received 2 mg/kg flunixin meglumine and 50 mg/kg sodium dipyrene IM at the same moments. After embryo collection, welfare responses were recorded, such as interval from surgery to get up and to feed, heart rate, respiratory rate, ruminal movements, rectal temperature and animals' posture and locomotion pattern. Blood samples were collected for hemogram and cortisol, glucose, total plasma proteins, globulins and fibrinogen. Ewes in the group DIPYR showed a shorter interval to eat ($p = 0.001$). Serum cortisol concentrations presented a tendency of interaction between treatment and time ($p = 0.07$). The interaction effect is shown in T3, presenting a higher concentration of cortisol for ewes in the CONT compared to DIPYR ($p = 0.002$). For glycaemia, an interaction between time and treatment was observed ($p = 0.043$). A treatment effect was also observed to overall lymphocyte ($p = 0.01$) and monocyte counts ($p = 0.038$). Ewes in group DIPYR showed a significant lower overall platelet count compared to CONT ($p = 0.01$). In conclusion, ewes treated with association of NSAIDs (flunixin meglumine) and non-opioid analgesics (dipyrene) after laparotomy have less stress than ewes treated only with NSAIDs (flunixin meglumine) until 24 hours after procedure.

Keywords: analgesic, NSAID, sheep, welfare

1. Introduction

Whereas the most used reproductive biotechnology to embryo production in cattle is *in vitro* embryo production (IVP), multiple ovulation and embryo transfer (MOET) is among the primary assisted reproductive technologies used for small ruminant embryos (Souza-Fabjan et al., 2021). The technique is based on estrus induction/synchronization, superovulation, artificial insemination/natural breeding, embryo collection and transfer to previously synchronized recipients. It is an important tool in genetic improvement programs because it enables females of high genetic value to produce more offspring when compared to natural breeding (Bruno-Galarraga et al., 2015). In addition, when associated with cryopreservation, MOET enables the conservation and dissemination of genetic material (Cognié et al., 2003).

In small ruminants, embryo recovery can be performed by surgical laparotomy (Bruno-Galarraga et al., 2015), semi-surgical (laparoscopy; Bari et al., 2001) or non-surgical method (transcervical; Santos et al., 2020). The transcervical technique is less invasive and requires a simple anesthetic protocol (epidural block and local anesthesia deep in the vagina). In sheep, due to the complexity of the cervix, commercially, the surgical method remains the technique of choice. As an invasive procedure that requires general anesthesia and externalization of the reproductive tract, laparotomy has some disadvantages, such as the risk of adhesions in reproductive organs and stress of animals due to surgical manipulation and its consequent inflammatory response (Ledda and Gonzales-Bulnes, 2018). Some studies reported an increase in stress indicators, such as acute phase proteins (Oliveira et al., 2018), heart rate, blood glucose and serum cortisol concentrations (Santos et al., 2020), during the postoperative recovery of sheep submitted to surgical embryo collection. Due to the growing concern to animal welfare, it is necessary to establish protocols to inflammation and pain control, reducing stress and

postoperative discomfort. In small ruminants, the postoperative protocols for pain control are based on non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs; Oliveira et al., 2018; Santos et al., 2020). However, studies regarding the efficiency of such pharmacological protocols are still scarce.

Flunixin meglumine is an NSAID used in different surgical procedures in small ruminants (Ismail, 2017; Graves et al., 2020). It inhibits cyclooxygenase enzymes (COX), reducing the formation of inflammatory mediators. Although the drug induces an effective and long duration visceral analgesia, it may exert a less efficient analgesic effect on skeletal muscle (Anderson and Muir, 2005). In this sense, the association with other analgesic drugs may be a strategy to achieve more effective pain control in small ruminants (Lizarragas and Chambers, 2012). Dipyrone is a non-opioid analgesic that acts by inhibiting COX-3 in the central nervous system. Besides its analgesic effects, dipyrone exerts an antipyretic and spasmolytic effect (Jasiecka et al., 2014). We hypothesize that the association of NSAIDs with dipyrone can promote a more effective modulation of pain and inflammation during the postoperative period in sheep submitted to laparotomy than a postoperative pharmacological protocol using only NSAIDs. Thus, the aim of this study was to evaluate the benefits of dipyrone and flunixin meglumine association in a postoperative pharmacological protocol after surgical embryo collection in sheep.

2. Materials and methods

2.1 Ethics, experimental location, and animals

The study was performed in a commercial sheep herd in São Luiz do Paraitinga (23°22'S and 45°26'W), state of São Paulo, Brazil, during the non-reproductive season. All the

procedures were approved by the Ethics Committee for the Use of Animals of Universidade de São Paulo (protocol #2717181220). A total of 22 healthy Dorper ewes with ages between two and eight years (3.2 ± 0.1), average weight of 64.2 ± 4.0 kg and average body condition score (BCS, 1-5 range) of 3.9 ± 0.1 were used in this study. All animals were maintained in an intensive production system and received corn silage and balanced feed high-energy diet based on ground corn twice a day, mineral salt and water *ad libitum*.

2.2 Experimental design

Ewes were randomly allocated into two groups after surgical embryo collection: Control (CONT; $n = 11$) and Dipyrone (DIPYR; $n = 11$). The CONT group was submitted to a postoperative protocol with the administration of 2 mg/kg flunixin meglumine (Banamine[®], MSD Animal Health) IM immediately after the surgical procedure, 24 hours and 48 hours after, while DIPYR group received both flunixin meglumine (same dosage) and 50 mg/kg sodium dipyrone (D-500[®], Zoetis, São Paulo, Brazil) IM at the same moments (Figure 1). Both groups received 20 mg/kg antibiotic (Terramycin/LA[®], Zoetis) IM immediately after the surgical procedure, 24 hours, and 48 hours after. The effectiveness of each treatment was assessed by welfare responses. In this sense, behavioral and physiological parameters were evaluated at ten different moments, as shown in Figure 1.

After embryo collection, several parameters were recorded, such as interval of surgery to get up and to feed; physiological variables [heart rate (HR), respiratory rate (RR), ruminal movements (RM), and rectal temperature (RT)]; behavioral variables as animals' posture and locomotion pattern. In addition, blood samples were collected for hemogram and subsequent

measurement of inflammatory markers such as cortisol, glucose (GLU), total plasma proteins (TPP), globulin (GLO), albumin (ALB) and fibrinogen (FIB).

2.3 Superovulation, artificial insemination and embryo collection

All ewes were submitted to a superovulation protocol and laparoscopic artificial insemination (AI) twice (36 and 42 h after removal of the progesterone device) using commercial cooled semen (Rocha et al., 2022). Before the embryo recovery, all ewes were kept in the fast of food and water for 24 h and 12 h, respectively. For the anesthetic protocol, animals received 0.1 mg/kg of xylazine hydrochloride 2% via intravenous (IV). The ewes were placed in dorsal decubitus position for abdominal trichotomy and anesthesia. The anesthetic plan was made by isoflurane (2-4% io 10-15 mL/kg/min de oxygen). The embryo recovery was performed by laparotomy according to Bruno-Galarraga et al. (2015).

2.4 Behavioral and physiological parameters

Ewes were observed immediately after the surgical procedure and the intervals to stand up and to eat were recorded for each animal. Animal behavior was classified as vigilant or lethargic, and posture variables were measured according to position (standing or recumbency) and locomotion pattern (normal or lameness) in ten different moments: immediately before anesthetic induction (T1), during surgical procedure (T2), immediately after the surgical procedure (T3), 1 hour (T4), 3 hours (T5), 12 hours (T6), 24 hours (T7), 36 hours (T8), 48 hours (T9) and 72 hours (T10) after the surgical procedure, as shown in figure 1. Physiological parameters (HR, RR, MR and RT) were measured at the same moments. The parameters HR, RR and MR were measured by auscultation and RT was measured using a digital thermometer. The

HR and RF were measured in beats and movements per minute. The MR were measured in movements *per* 2 minutes.

2.5 Hematologic parameters

Blood samples were collected by jugular venipuncture using two 4 mL vacuum collection tubes at the same moments mentioned above (Figure 1), after the evaluation of behavioral and physiological parameters. Samples collected in tubes containing clot activator plus 0.05 mL of glycolysis-inhibiting anticoagulant solution (Glistab[®], Labtest, Brazil) were centrifuged at 3000 rpm for 15 min at 4 °C for serum separation. Aliquots of serum were frozen at -20 °C until analysis. Samples collected in tubes containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) were used for counting of the following blood cell: erythrocytes, total leukocytes, basophils, eosinophils, band neutrophils, segmented neutrophils, lymphocytes, monocytes and platelet (Harvey, 2012).

Serum cortisol concentration was measured by radioimmunoassay using a commercial kit (MP Diagnostics Division, Orangeburg, NY, USA). Sensitivity and coefficient of variation were 10 ng/mL and 9.8%, respectively. All data were contained within the minimum and maximum values of the curve. Glucose (GLU), total plasma proteins (TPP) and serum albumin (ALB) levels were measured using commercial kits in a semi-automatic biochemical analyzer (BIO 2000[®], Lab tests, Brazil). Serum globulin (GLO) levels were obtained calculating the difference between TPP and ALB. Fibrinogen (FIB) levels were obtained using a brix refractometer (Harvey, 2012). Blood cell counts were determined by blood smear examination.

2.6 End points and statistical analysis

The parameters considered to be potential welfare responses was: interval to stand, interval to eat, behavior, posture, locomotion pattern, HR, RF, RM, RT, serum cortisol, GLU, TPP, ALB, GLO, FIB, erythrocytes, total leukocytes, basophils, eosinophils, band neutrophils, segmented neutrophils, lymphocytes, monocytes and platelet.

Data analysis was performed in IBM SPSS version 25. Data were compared using a generalized linear mixed model (GLMM), including the treatment, time, and their interaction (treatment vs time) as main effects in endpoints with repeated measures. The repetition was included as a random factor. For all endpoints, $p < 0.05$ was considered significant and $0.05 \leq p < 0.10$ was considered tendency. Data are presented as means $\pm$ SEM, which adjusted values according to random factors to minimize these effects.

3. Results

There was no difference in the interval to stand up between the groups (CONT: 8.3 ± 0.5 vs. DIPYR: 8.2 ± 0.3 ; $p > 0.05$). However, ewes in the group DIPYR showed a shorter interval to eat (CONT: 12.4 ± 0.4 vs. DIPYR: 9.5 ± 0.3 ; $p = 0.001$). The pharmacological treatments did not affect posture ($p = 0.321$), locomotion ($p = 0.944$) and behavior ($p = 0.332$). However, these parameters were affected through time of evaluation ($p = 0.001$).

The effect of treatments, times of evaluation, and the interaction between them on endpoints are presented in Table 1. The physiological parameters obtained after each treatment and through times are shown in Figure 2. Significant differences were observed in RT throughout the times of evaluation ($p = 0.001$). However, RT was not affected by the treatment nor by the interaction between treatment and time ($p > 0.05$). Both groups showed a minimum temperature at T3 and a peak at T5. The overall HR was significantly higher in DIPYR than in

CONT ($p = 0.005$). This parameter was also affected by time of evaluation ($p = 0.001$), although no interaction between both variables was found ($p > 0.05$). Ewes in DIPYR group showed higher HR at the moments T2 and T3 comparing to CONT group ($p < 0.05$). Afterwards, a similar variation between both groups at the subsequent moments of evaluation were observed. No treatment effect was observed on RF neither RM ($p > 0.05$). These parameters only differed among the times ($p = 0.001$). The fluctuation pattern was similar between the groups over the time, with both groups showing a peak of RF at T10 and a peak of RM at T6.

Serum cortisol concentrations presented a tendency of interaction between treatment and time ($p = 0.07$). The interaction effect is shown in T3, presenting a higher concentration of cortisol for ewes in the CONT compared to DIPYR ($p = 0.002$). The serum cortisol was also affected by the time of evaluation ($p = 0.001$), showing an increase in both groups at T2, followed by a decrease throughout the time. Overall serum cortisol concentrations were similar between the treatments ($p = 0.717$). For glycaemia, an interaction between time and treatment was observed ($p = 0.043$). That effect was observed at T3, being significantly higher the glycaemia in ewes of DIPYR ($p = 0.038$), and at T4, being significantly higher the glycaemia in ewes of CONT ($p = 0.001$). A time of evaluation effect was also observed ($p = 0.001$), the glycaemia varied throughout time with a similar pattern between the groups, with an increase at T2 in relation to T1, and decrease at T5. Overall glycaemia concentrations were similar between the treatments ($p = 0.309$). The serum cortisol and glycaemia over each treatment and through times are shown in Figure 3.

No significant main effects were observed to total protein and to fibrinogen concentrations ($p > 0.05$). Serum albumin presented an effect of time of evaluation in both groups ($p = 0.017$), however, the DIPYR group only presented a tendency ($p = 0.071$) to lower

concentration at T3 compared to T9. There was an interaction between time and treatment in serum globulin ($p = 0.044$). This interaction tended to increase serum globulin in ewes at DIPYR at T7 ($p = 0.06$) and was significantly higher in ewes at CONT at T9 ($p = 0.019$). These parameters over each treatment and through times are shown in Figure 4.

The erythrocytes counts were not affected by treatment and interaction of treatments and times of evaluation ($p > 0.05$). However, these counts were significantly affected by times of evaluation ($p = 0.001$), where both groups varied similarly through the moments as shown in Figure 5. Total leukocyte was affected throughout time of evaluation ($p = 0.001$), but no differences were observed between the treatments ($p > 0.05$). When each leukocyte population were analyzed, time of evaluation exerted a significant effect on basophil, segmented neutrophil, lymphocyte, and monocyte counts ($p = 0.001$), but no effect on eosinophil and band neutrophil counts ($p > 0.05$). A treatment effect was also observed to overall lymphocyte ($p = 0.01$) and monocyte counts ($p = 0.038$). Ewes in group DIPYR showed a significant lower overall platelet count comparing to CONT ($p = 0.01$), which was not affected by the time of evaluation ($p > 0.05$). Ewes in CONT group showed a tendency of higher platelet count in T8 ($p = 0.063$). The overview of blood counts over each treatment and through times are shown in Figure 5. The leukocyte populations over each treatment and through times are shown in Supplementary Figure 1.

4. Discussion

To the best of the authors' knowledge, this is the first study comparing the welfare issues involved in physiological, behavioral, and biochemical responses with or without analgesic drugs associated to NSAIDs after laparotomy in ewes. The present study compared the

effects of the treatments with flunixin meglumine associated or not with dipyrone on the inflammatory responses of ewes submitted to surgical embryo recovery. In addition, the study assessed stress biomarkers throughout time, from the moment prior to anesthetic protocol to 72 hours after the surgery. The results show that the embryo collection procedure induces typical stress responses, in accordance with previous studies (Fonseca et al., 2018; Oliveira et al., 2018; Santos et al., 2020), which demonstrates the necessity to establish effective protocols to prevent discomfort and improve animal welfare. In this sense, we hypothesize that the association of dipyrone with NSAIDs can promote a more effective modulation of pain and inflammation and our results support in part this idea.

A febrile response usually occurs in consequence of acute inflammation and could be expected after invasive procedures. However, in the present study the animals from both CONT and DIPYR groups did not presented fever. Temperature variations throughout the times were similar in ewes subjected to the two pharmacological treatments and appeared to be adequately achieved by both, suggesting that the association with dipyrone in the post-operative protocol shows no additional benefit in fever control when comparing to the protocol using only flunixin meglumine. This result may be explained by the antipyretic effect of NSAIDs, previously described (Botting, 2004). As expected, a decrease in the RT was observed while the ewes were anesthetized, followed by returning to standard values a few hours after the surgical procedure, as described by Mattos Junior et al. (2012). A similar pattern in Santa Ines ewes subjected to surgical embryo collection has been described (Santos et al., 2020).

Although the overall HR was higher in DIPYR, the most significant differences between the groups were observed before the animals received any drug. Therefore, these punctual differences cannot be related with the pharmacological treatment and may be due to

another factor, such as individual animals' response to manipulation. In contrast, the significant postoperative growth of this parameter occurred through the moments of evaluation similarly in ewes subjected to both treatments. As a stress response, the increase of HR in both groups may indicate that, even when subjected to analgesic and anti-inflammatory treatments, the surgical embryo recovery induces pain in ewes within the next 12 hours. Similarly, to our findings, Santos et al. (2020) observed that the HR had an influence of time in ewes subjected to surgical embryo recovery, with its most accentuated increase one hour after the procedure.

Under stressful stimuli, the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis is activated, resulting in cortisol releasing by the adrenal cortex, and the blood glucose elevation is a consequence of this phenomenon (Miller and O'Callaghan, 2002). Therefore, serum cortisol and glycaemia are important stress biomarkers. In the present study, both parameters increased during embryo collection, suggesting an acute inflammatory response to the surgical manipulation. Serum cortisol levels started to decline after the surgery in both groups (immediately after and 3 hours after in DIPYR and CONT, respectively). This pattern was also found in a study conducted by Santos et al. (2020), which described an increase in cortisol levels during the embryo recovery, followed by a decrease 3 h after the procedure and the administration of NSAIDs. In addition, the serum cortisol decrease was followed by a glycaemia decrease in both experimental groups. Despite that, three hours after the surgery serum cortisol levels were significantly lower in DIPYR. It has been described that in sheep the active metabolites of dipyrone may achieve its maximum plasma concentration rapidly after IM administration, and could be detected during approximately 10 hours (Giorgi et al., 2015). In this sense, these results may indicate that the administration of dipyrone immediately after the surgery inhibited the increase of serum cortisol levels due to its analgesic effects. In contrast, 24

and 48 hours after the surgical procedure, serum cortisol levels were lower in ewes that only received flunixin meglumine.

Hematological variables are important points to understand the behavior of the treatments in this study. Acute phase proteins are produced by hepatocytes in response to pro inflammatory cytokines (Germolec et al., 2009), resulting in an increase of total protein levels after injuries. In the present study, however, this parameter showed no differences both between the treatments and throughout time. Although early total protein responses were expected after the procedure in this study, since this parameter usually increases rapidly in response to acute inflammations in sheep, it has been described that the increase can occur belatedly after injuries in the species (Oliveira et al, 2018).

The plasmatic fibrinogen is a positive acute phase protein, considered one classical biomarker of acute inflammation (Germolec et al., 2009). In this study, the overall fibrinogen count was higher than the established standard of normality for sheep, which range from 100 to 500 mg/dL (Ceciliani et al., 2012; Kramer, 2000). No statistical differences were observed in this parameter between the treatments, time or treatments vs. time, suggesting that fibrinogen count may not be a sensitive marker of inflammation or stress (Oliveira et al., 2018).

Platelets are anucleate cell fragments involved in homeostasis and inflammation. Although its primary function is to promote clotting after a vascular injury, thrombocytosis may also be expected as a response to acute inflammatory processes (Germolec et al., 2009). Ewes that received only flunixin meglumine showed a higher overall platelet count than the ones that received the association between this drug and dipyrone. In addition, a significant difference was observed 72 h after the surgery, when the dipyrone treatment appeared to promote a more

effective control of thrombocytosis. These results suggest a beneficial additional effect of the non-opioid analgesic on the inflammation control.

Other acute phase proteins measured were albumin and globulin, which are negative acute phase proteins. Albumin is the main determinant of colloid osmotic pressure and the effects in colloid osmotic pressure is an important factor that results in the formation of edema in acute inflammation. Thus, the serum albumin decrease indicates a colloid osmotic pressure increase as a consequence of an inflammatory process (Fisher et al., 1999). Our results show that serum albumin was negatively affected (CONT) or had a tendency to be positively affected (DIPYR) over time. However, an interaction between time and treatment was observed in serum globulin. This interaction shows that CONT had greater time to increase serum globulin than DIPYR, i.e., only the flunixin meglumine delays more time to recover the effect of acute inflammation than the association of flunixin meglumine and dipyrone.

The erythrocytes counts were affected by the time of evaluation, and both groups varied similarly throughout the moments. However, we observed in CONT at T4 and T6 a greater number of erythrocytes compared to DIPYR. Erythrocytes counts commonly decline after injuries that cause an intense loss of body fluids, such as blood. Thus, the increase observed may be due to an attempt of the body to return to homeostasis controlling the blood volume (Pugh, 2005). Leukocyte levels were similarly affected by the time in both groups. The mobilization of leukocytes is an important response to inflammatory stimuli, as an attempt of the organism to combat any pathological disorder (Stockham and Scott, 2002). In this sense, modifications in blood leukocyte population in response to inflammatory processes caused by surgical procedures could be useful in the assessment of animal welfare (Cockram et al., 1993). The acute phase of inflammation involves primary the mobilization of neutrophils, which contain substances

capable of digest and destroy pathogens after phagocytosis (Stayt, 2022). After the depletion of the mature neutrophils (segmented neutrophils) in response to an acute inflammation, the bone marrow starts to release immature neutrophils (band neutrophils) to fulfil the demand. Thus, although stress may also increase segmented neutrophils, in response to corticosteroid release (Germolec et al., 2009), the increase of band neutrophils is usually related to acute inflammation. In the present study, all ewes showed an increase in band neutrophils counts. This result, in addition to the segmented neutrophils significant variation throughout time in both groups, indicates that the surgical procedure induces acute inflammation despite of the treatment. Basophils, monocytes and lymphocytes levels were also significantly affected by the time, and showed a similar fluctuation pattern between the groups. However, ewes that did not received dipyrone had higher monocytes counts. As a key role to the removal of dead or injured cells, monocytes are usually recruited during inflammatory processes (Germolec et al., 2009). In addition, the increase on the lymphocytes counts may be an indicative of acute stressful response, as a result to the possible release of catecholamines (Pascual-Alonso et al., 2016), an event that appeared to be more effectively controlled in ewes treated with dipyrone. The stress caused by surgical procedure can promote leukocytosis as shown in Figure 5. In this study the count of leukocytes was bigger in CONT until T5. Moreover, there is an increase in populations of lymphocytes and monocytes in the CONT group, this valor may be related to the benefits of associating the dipyrone with anti-inflammatory medicine in the first hour after surgery reducing inflammatory response.

5. Conclusion

Our results support in part the hypothesis that the association of dipyrone with flunixin meglumine can promote a more effective modulation of pain and inflammation. We found that ewes treated with association of NSAIDs and non-opioid analgesics after laparotomy have less stress than ewes treated only with NSAIDs until 24 hours after procedure. That association is important to promote welfare after laparotomy embryo collection.

Acknowledgements

This study was supported by FAPERJ, CNPq and CAPES – Finance Code 001. FZB and JMGSF are CNPq fellows and JMGSF is a FAPERJ fellow.

References

- Anderson, D. E., & Muir, W. W. (2005). Pain management in ruminants. *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, 21(1), 19–31.
- Bari, F., Khalid, M., Wolf, B., Haresign, W., Murray, A., & Merrel, B. (2001). The repeatability of superovulatory response and embryo recovery in sheep. *Theriogenology*, 56(1), 147–155.
- Botting, R. (2004). Antipyretic therapy. *Front Biosci*, 9(956), e66.
- Bruno-Galarraga, M., Cueto, M., Gibbons, A., Pereyra-Bonnet, F., Subiabre, M., & González-Bulnes, A. (2015). Preselection of high and low ovulatory responders in sheep multiple ovulation and embryo transfer programs. *Theriogenology*, 84(5), 784–790.
- Ceciliani F., Ceron J.J., Eckersall P.D., Sauerwein H., Acute phase proteins in ruminants, *Journal of Proteomics*, Volume 75, Issue 14, 2012, Pages 4207-4231, <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.04.004>.

- Chambers, J. P., et al. "The Effects of Opioid and α 2 Adrenergic Blockade on Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Analgesia in Sheep." *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, vol. 18, no. 3, June 1995, pp. 161–66. DOI.org (Crossref), doi:10.1111/j.1365-2885.1995.tb00573.x.
- Cockram, M. S., Imlah, P., Goddard, P. J., Harkiss, G. D., & Waran, N. K. (1993). The behavioural, endocrine and leucocyte response of ewes to repeated removal of lambs before the age of natural weaning. *Applied Animal Behaviour Science*, 38(2), 127–142. doi:10.1016/0168-1591(93)90061-s
- Cognié, Y., Baril, G., Poulin, N., & Mermillod, P. (2003). Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*, 59(1), 171–188.
- Fischer, S. R., Burnet, M., Traber, D. L., Prough, D. S., & Kramer, G. C. (1999). Plasma volume expansion with solutions of hemoglobin, albumin, and Ringer lactate in sheep. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 276(6), H2194–H2203. doi:10.1152/ajpheart.1999.276.6.h2194
- Fonseca, J. F., Esteves, L. V., Zambrini, F. N., Brandão, F. Z., Peixoto, M. G. C. D., Verneque, R. S., Siqueira, L. G. B., Viana, J. H. M. (2014). Viable offspring after successful non-surgical embryo transfer in goats. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 66(2), 613–616.
- Fonseca Jeferson F., Oliveira Maria Emilia F., Brandão Felipe Z., Batista Ribrio I. T. P., Garcia Alexandre R., Bartlewski Pawel M., Souza-Fabjan Joanna M. G. (2018) Non-surgicalembryotransfer in goatsandsheep: theBrazilianexperience. *Reproduction, Fertility and Development* 31, 17-26. <https://doi.org/10.1071/RD18324>

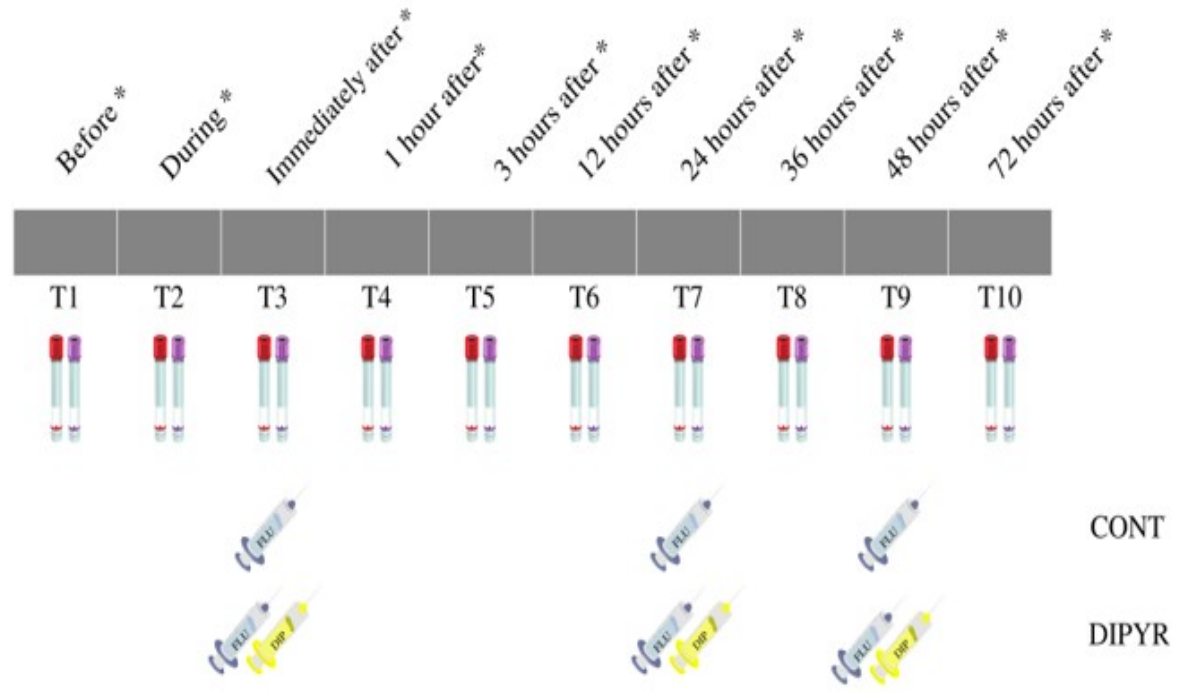
- Germolec, D. R., Frawley, R. P., & Evans, E. (2009). Markers of Inflammation. *Immunotoxicity Testing*, 53–73. doi:10.1007/978-1-60761-401-2_5
- Giorgi, M., De Vito, V., Lee, H. K., Laus, F., Kowalski, C., Faillace, V., ... & Vullo, C. (2015). Pharmacokinetic investigations of the marker active metabolite-4-methylamino-antipyrin after intravenous and intramuscular injection of metamizole in healthy sheep. *Small Ruminant Research*, 132, 143-146.
- Graham MJ, Kent JE, Molony V. Effects of four analgesic treatments on the behavioural and cortisol responses of 3-week-old lambs to tail docking. *Vet J* 1997;53:87–97.
- Graves, M. T., Schneider, L., Cox, S., Caldwell, M., Krawczel, P., Lee, A., & Lear, A. (2020). Evaluation of the pharmacokinetics and efficacy of transdermal flunixin for pain mitigation following castration in goats. *Translational Animal Science*, 4(4), txaa198.
- Harvey J.W. 2012. Hematology procedures, In: Harvey J.W. (Ed). *Veterinary Hematology A Diagnostic Guide Color Atlas*. St. Louis: Elsevier, pp.11–32.
- Ismail, Z. B. (2017). Dystocia in sheep and goats: Outcome and fertility following surgical and non-surgical management. *Macedonian Veterinary Review*, 40(1), 91-96.
- Jasiecka, A., Maślanka, T., Jaroszewski, J. J. (2014). Pharmacological characteristics of metamizole. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 17(1).
- Kramer JW. Normal hematology of cattle, sheep and goats. In Felfman BF, Zinkl JG, Jain NC, editors: *Schalam's veterinary hematology*, ed 5, Philadelphia, 2000, Williams & Wilkins.
- Ledda, S., Gonzalez-Bulnes, A. (2018). ET-Technologies in Small Ruminants. In: Niemann H., Wrenzycki C. (eds) *Animal Biotechnology*, 1, 135–166. Springer, Cham.

- Lizarraga, I., Chambers, J. P. (2012) Use of analgesic drugs for pain management in sheep, *New Zealand Veterinary Journal*, 60:2, 87-94.
- Mattos Junior, E. (2012). Anestesia inalatória em ovinos: estudo comparativo entre o halotano, isoflurano e sevoflurano. Doctoral Thesis, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, University of São Paulo, São Paulo. doi:10.11606/T.10.2012.tde-27092012-174918.
- Oliveira, F.C.; Haas, C.S.; Ferreira, C.E.R.; Goularte, K.L.; Pegoraro, L.M.C.; Gasperin, B.G.; Schneider, A.; Mondadori, R.G.; Lucia, T.; Vieira, A.D. (2018). Inflammatory markers in ewes submitted to surgical or transcervical embryo collection. *Small Ruminant Research*, 158, 15–18.
- Pascual-Alonso, M., Miranda-de la Lama, G. C., Aguayo-Ulloa, L., Villarroel, M., Mitchell, M., & María, G. A. (2016). Thermophysiological, haematological, biochemical and behavioural stress responses of sheep transported on road. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 101(3), 541–551. doi:10.1111/jpn.12455
- Pugh, D.G. *Clínica de Ovinos e Caprinos*, Roca. 2005. 513p.
- Rocha, M.S.; Maia, A.L.R.S.; Rangel, P.S.C.; Oliveira, M.E.F.; Fonseca, J.F.; Oliveira, C.A.; Souza-Fabjan, J.M.G. (2022). Occurrence of premature regression of corpus luteum in MOET programs in Dorper ewes under subtropical climate. *Livestock Science*, 255, 04808. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2021.104808>
- Santos, J. D. R., Ungerfeld, R., Balaro, M. F. A., Souza-Fabjan, J. M. G., Cosentino, I. O., Brair, V. L., Souza, C. V., Pinto, P. H. N., Bade, A. L. C., Fonseca, J. F., Brandão, F. Z. (2020). Transcervical vs. laparotomy embryo collection in ewes: The effectiveness and welfare implications of each technique. *Theriogenology*, 153, 112–121.

- Sejian, V., Maurya, V.P. & Naqvi, S.M.K. Adaptive capability as indicated by endocrine and biochemical responses of Malpura ewes subjected to combined stresses (thermal and nutritional) in a semi-arid tropical environment. *Int J Biometeorol* 54, 653–661 (2010). <https://doi.org/10.1007/s00484-010-0341-1>
- Souza-Fabjan Joanna M. G., Batista Ribrio I. T. P., Correia Lucas F. L., Paramio Maria Teresa, Fonseca Jeferson F., Freitas Vicente J. F., Mermillod Pascal (2021) In vitro production of small ruminant embryos: latest improvements and further research. *Reproduction, Fertility and Development* 33, 31-54.
- Stayt, J. (2022). Hematology of Sheep and Goats. *Schalm's Veterinary Hematology*, 1012-1018. STOCKHAM, S. L.; SCOTT, M. A. *Fundamentals of Veterinary Clinical Patology*. Iowa: Blackwell. 2002. 49-85p.
- Stubsj  en, Solveig M., et al. “Exploring Non-Invasive Methods to Assess Pain in Sheep.” *Physiology & Behavior*, vol. 98, no. 5, Dec. 2009, pp. 640–48. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/j.physbeh.2009.09.019.
- Viana, J. H. M. (2020). 2019 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. In: *Embryo Technology Newsletter*, v. 38, n.4.
- Villaquiran, M., Gipson, T. A., Merkel, R. C., Goetsch, A. L., Sahlu, T. (2004). Body condition scores in goats. American Institute for Goat Research, Langston University.

Table 1. Effect of treatments (CONT and DIPYR), time of evaluation and its interactions on physiological and hematological parameters in Dorper ewes submitted to surgical embryo collection.

Parameters	Treatments		p-value		
	CONT	DIPYR	Treatment	Time	Treatment x Time
Rectal Temperature (°C)	38.7 ± 0.1	38.8 ± 0.1	0.616	0.001	0.850
Heart Rate (bpm)	100.1 ± 2.5	106.2 ± 2.2	0.005	0.001	0.267
Respiratory Frequency	37.3 ± 1.2	37.5 ± 1.4	0.830	0.001	0.598
Rumen movement	1.8 ± 0.1	1.7 ± 0.1	0.856	0.001	0.806
Cortisol (ng/mL)	24.1 ± 2.3	25.6 ± 2.7	0.717	0.001	0.070
Glycaemia (mg/dL)	84.7 ± 4.4	81.8 ± 4.3	0.309	0.001	0.043
Total Protein (g/dL)	6.4 ± 0.1	6.4 ± 0.1	0.835	0.227	0.118
Serum albumin (g/dL)	2.4 ± 0.1	2.4 ± 0.1	0.337	0.017	0.488
Serum globulin (g/dL)	4.0 ± 0.1	4.0 ± 0.1	0.969	0.635	0.044
Fibrinogen (mg/dL)	501.9 ± 26.5	554.5 ± 29.3	0.186	0.263	0.779
Erythrocyte (x10 ⁶ /μL)	3.9 ± 0.2	4.0 ± 0.2	0.632	0.001	0.984
Total Leukocyte (/μL)	5744.5 ± 262.3	5341.9 ± 261.0	0.278	0.001	0.595
Platelets (x10 ³ /μL)	638.9 ± 18.9	572.7 ± 16.3	0.010	0.915	0.912
Basophils (/μL)	14.8 ± 3.2	20.4 ± 3.6	0.231	0.001	0.296
Eosinophils (/μL)	274.8 ± 31.1	214.2 ± 26.6	0.115	0.127	0.986
Band neutrophils (/μL)	14.6 ± 4.3	10.4 ± 3.7	0.467	0.137	0.873
Segmented neutrophils (/μL)	2793.7 ± 179.0	2896.7 ± 178.1	0.684	0.001	0.763
Lymphocytes (/μL)	2403.1 ± 108.1	2008.1 ± 107.6	0.010	0.001	0.770
Monocytes (/μL)	245.6 ± 22.9	192.9 ± 17.6	0.038	0.001	0.907
All data are presented as means ± SEM.					



1
2 **Figure 1.** Moments of parameters evaluation, blood samples collection and treatments in ewes submitted to surgical embryo
3 collection. *Surgical embryo collection; T1: immediately before anesthetic induction; T2: during the surgical procedure; T3:
4 immediately after the surgical procedure; T4: 1 hour; T5: 3 hours; T6: 12 hours; T7: 24 hours; T8: 36 hours; T9: 48 hours; and T10:
5 72 hours after the surgical procedure.

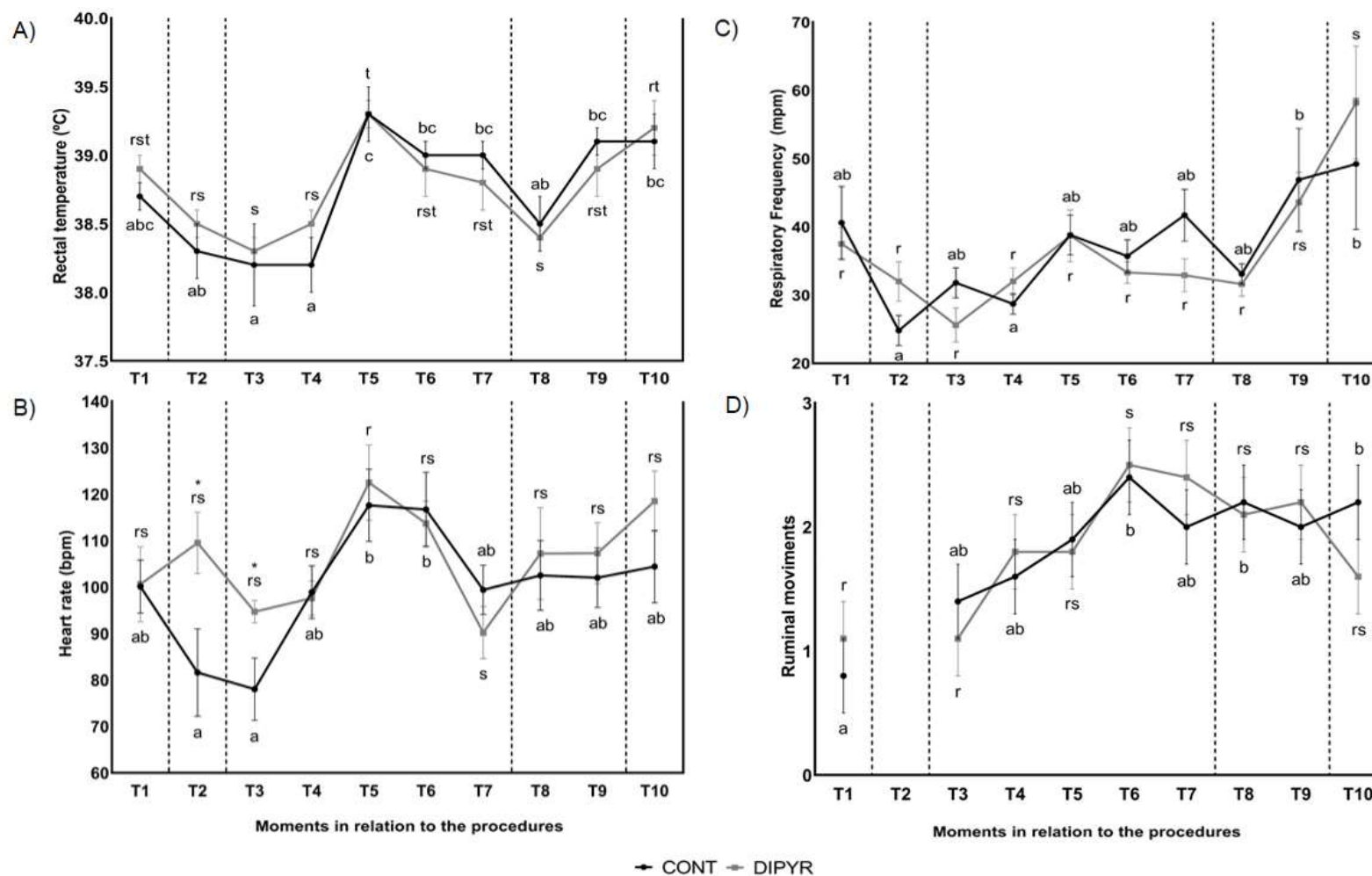


Figure 2. Averages of (A) Rectal temperature (°C), (B) heart rate (bpm), (C) respiratory frequency (mpm), (D) ruminal movements in Dorper ewes submitted to surgical embryo collection. T1: immediately before anesthetic induction; T2: during the surgical procedure; T3: immediately after the surgical procedure; T4: 1 hour; T5: 3 hours; T6: 12 hours; T7: 24 hours; T8: 36 hours; T9: 48 hours; and T10: 72 hours after the surgical procedure. *Indicates difference between treatments ($P < 0.05$) Differences throughout the times of evaluations in each treatment are indicated by different letters (CONT: a, b, c; DIPYR: r, s, t; $p < 0.05$).

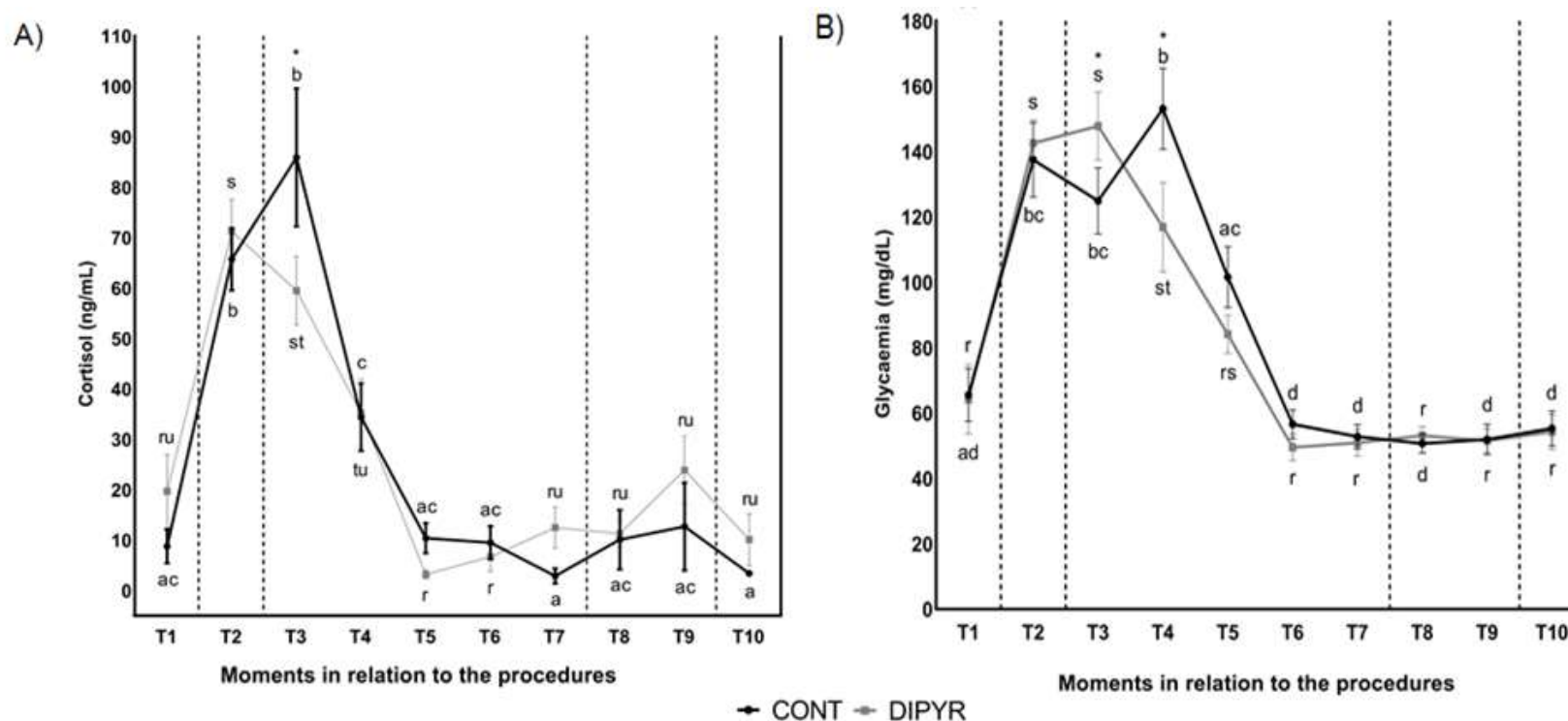


Figure 3. Averages of (A) serum cortisol concentration (ng/mL) and (B) Glycaemia (mg/dL) in Dorper ewes submitted to surgical embryo collection. T1: immediately before anesthetic induction; T2: during the surgical procedure; T3: immediately after the surgical procedure; T4: 1 hour; T5: 3 hours; T6: 12 hours; T7: 24 hours; T8: 36 hours; T9: 48 hours; and T10: 72 hours after the surgical procedure. *Indicates interaction between treatments (CONT and DIPYR) x Time (P < 0.05). Differences throughout the times of evaluations in each treatment are indicated by different letters (CONT: a, b, c, d; DIPYR: r, s, t, u; p < 0.05).

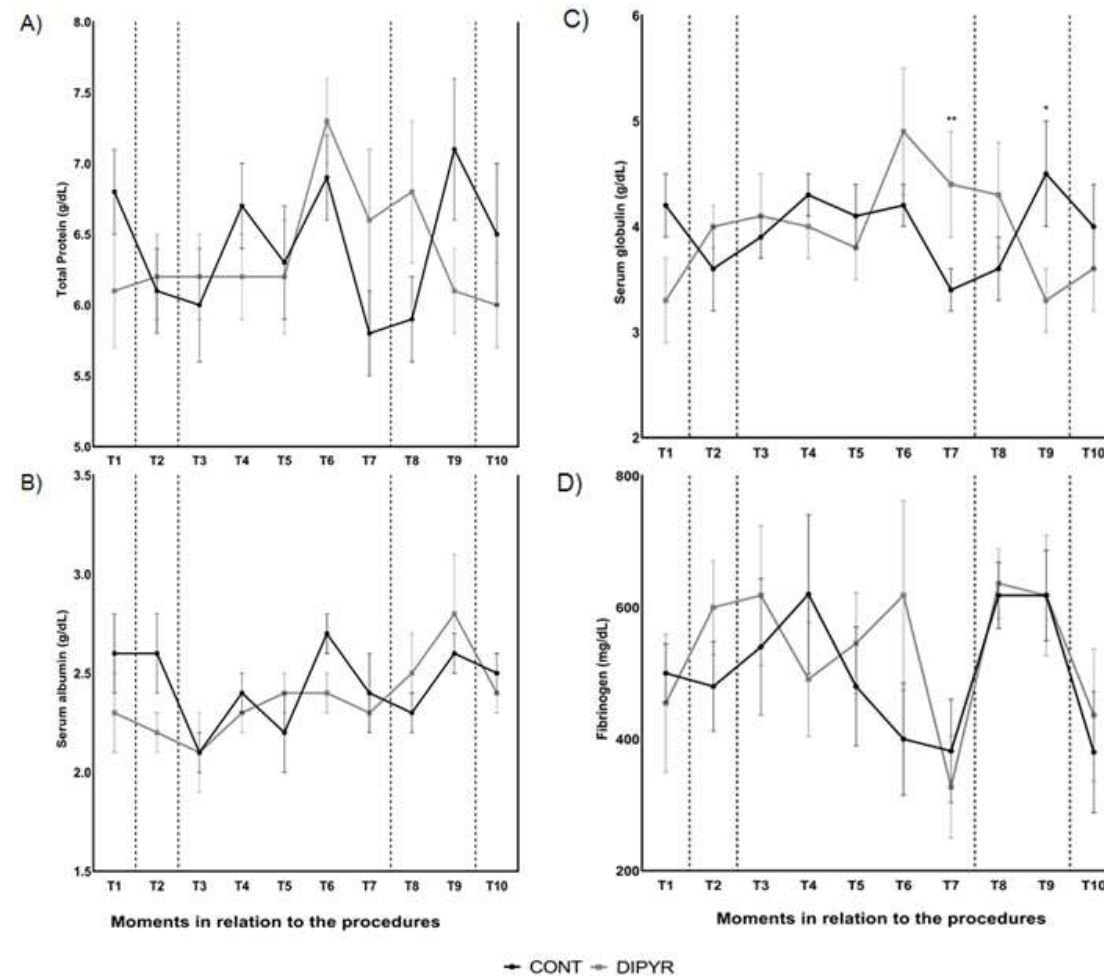


Figure 4. Averages of (A) serum total protein concentration (g/dL), (B) serum albumin concentration (g/dL), (C) serum globulin concentration (g/dL), (D) fibrinogen concentration (mg/dL) in Dorper ewes submitted to surgical embryo collection. T1: immediately before anesthetic induction; T2: during the surgical procedure; T3: immediately after the surgical procedure; T4: 1 hour; T5: 3 hours; T6: 12 hours; T7: 24 hours; T8: 36 hours; T9: 48 hours; and T10: 72 hours after the surgical procedure. *Indicates interaction between treatments (CONT and DIPYR) x Time ($P < 0.05$). **Indicates interaction tendency between treatments (CONT and DIPYR) x Time ($P < 0.10$).

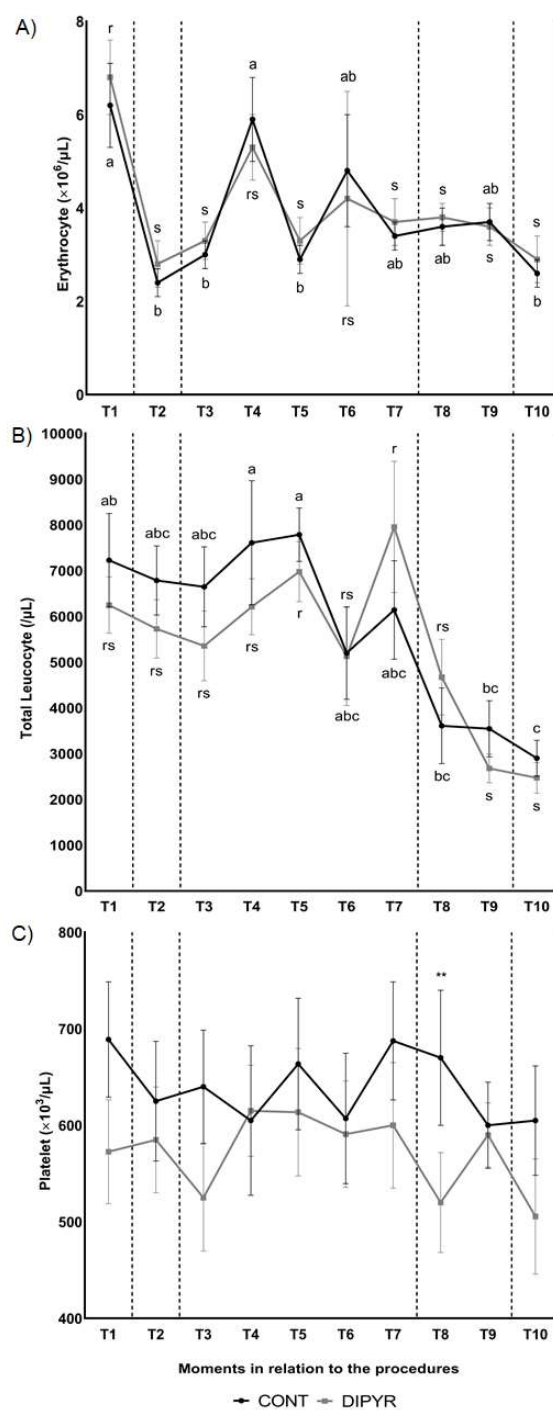
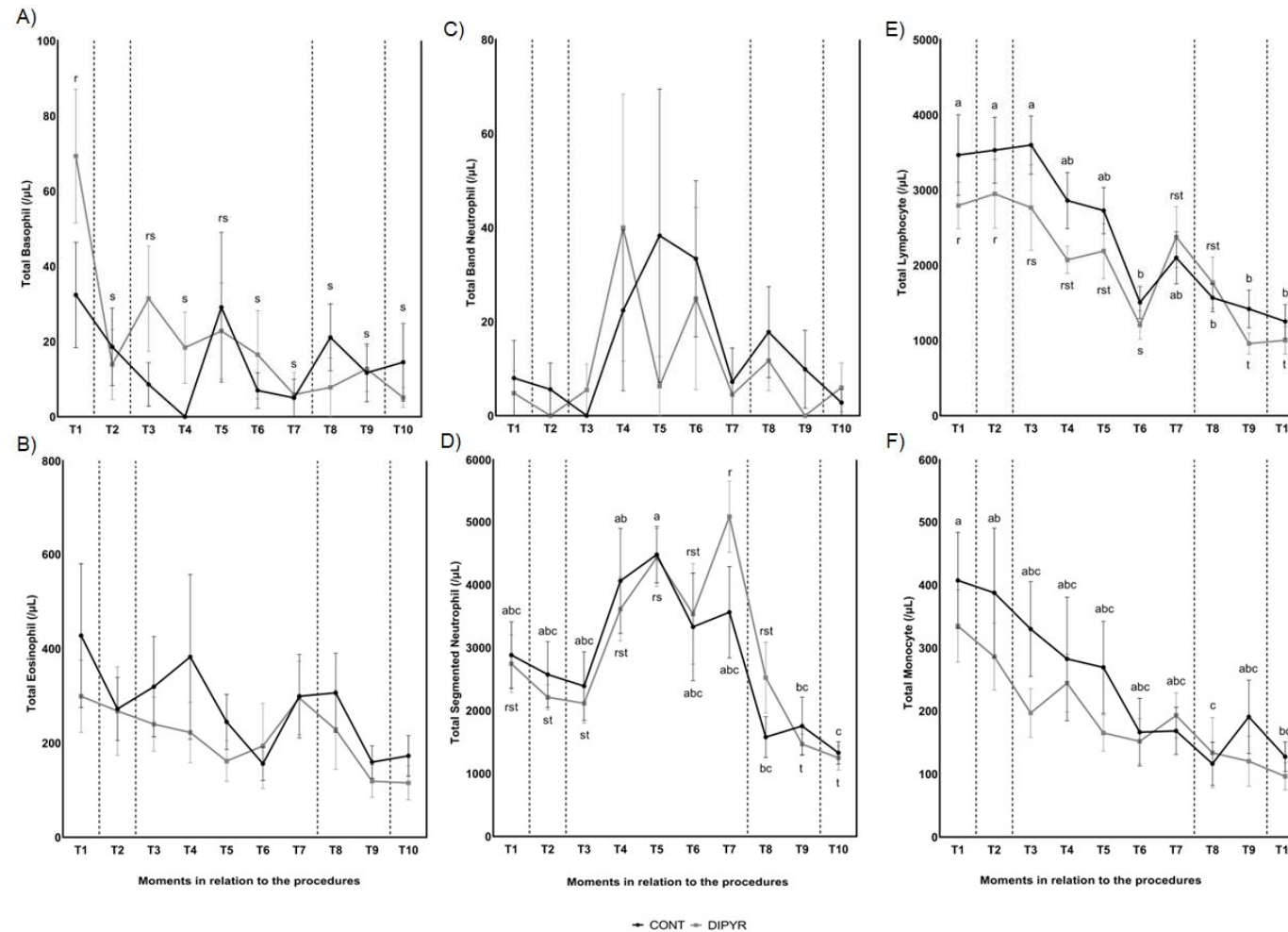


Figure 5. Averages of (A) erythrocyte ($\times 10^6/\mu\text{L}$), (B) total leucocyte ($/\mu\text{L}$), and platelets ($\times 10^3/\mu\text{L}$) in Dorper ewes submitted to surgical embryo collection. T1: immediately before anesthetic induction; T2: during the surgical procedure; T3: immediately after the surgical procedure; T4: 1 hour; T5: 3 hours; T6: 12 hours; T7: 24 hours; T8: 36 hours; T9: 48 hours; and T10: 72 hours after the surgical procedure. **Indicates interaction tendency between treatments (CONT and DIPYR) $\times$ Time ($P < 0.10$). Differences throughout the times of evaluations in each treatment are indicated by different letters (CONT: a, b, c; DIPYR: r, s; $P < 0.05$).



Supplementary Figure 1. Averages of (A) total basophils (μL), (B) total eosinophils (μL), (C) total band neutrophils (μL), (D) total segmented neutrophils (μL), (E) total lymphocytes (μL), (F) total monocytes (μL) in Dorper ewes submitted to surgical embryo collection. T1: immediately before anesthetic induction; T2: during the surgical procedure; T3: immediately after the surgical procedure; T4: 1 hour; T5: 3 hours; T6: 12 hours; T7: 24 hours; T8: 36 hours; T9: 48 hours; and T10: 72 hours after the surgical procedure. Differences throughout the times of evaluations in each treatment are indicated by different letters (CONT: a, b, c; DIPYR: r, s; t; P < 0.05)

8 CONCLUSÕES GERAIS

Em síntese, o presente trabalho se propôs a avaliar estratégias relacionadas à MOTE para aumentar a eficiência e rentabilidade nos rebanhos a partir do uso da biotecnologia e a promoção do bem-estar dos animais envolvidos.

O treinamento do médico-veterinário foi capaz de diminuir os custos da MOTE devido o aumento na eficiência reprodutiva ao longo do seu aperfeiçoamento prático, demonstrando a importância de um técnico qualificado. A melhora dos resultados reprodutivos propiciou a multiplicação do material genético das doadoras ao mesmo tempo em que colaborou com o melhoramento genético do rebanho, influenciando no valor de venda dos animais.

Foi possível determinar a ocorrência da RPCL como um fator importante na diminuição da eficiência da MOTE nos ovinos afetando 25% das doadoras. Porém a idade, escore corporal, estação reprodutiva e número de repetições da MOTE por doadora, não demonstraram interação na ocorrência da RPCL. Recomendamos para futuros estudos, a busca por outros fatores que possam estar relacionados diretamente ou indiretamente às doadoras na ocorrência da RPCL.

O flunixin meglumine foi capaz de prevenir a RPCL em ovelhas superovuladas com protocolo tradicional com pFSH e eCG na dosagem de 2,2 mg/mL aplicado uma vez ao dia por três dias consecutivos com início dois dias após a IA. O tratamento aumentou a taxa de recuperação e qualidade embrionária ao promover a manutenção da atividade lútea e concentrações de progesterona. Pelo fato de ser um medicamento de baixo custo se comparado com o investimento financeiro realizado em um programa de MOTE, recomendamos a introdução do flunixin meglumine nos protocolos de superovulação.

Foi possível determinar que a associação do flunixin meglumine com a dipirona após procedimento cirúrgico de coleta de embriões, foi capaz de garantir um menor estresse através da observação de parâmetros fisiológicos e comportamentais no período pós-cirúrgico de até 24 horas se comparado com o tratamento que utilizou apenas com o flunixin meglumine. Dessa maneira, houve um aumento no bem-estar das doadoras após o procedimento. Recomendamos que tal protocolo seja adotado em procedimentos de coleta de embrião por via cirúrgica.

REFERÊNCIAS

- AIUMLAMAI, S. *et al.* Regulation of prostaglandin biosynthesis with flunixin meglumine in the bovine species **Journal of Veterinary Medicine**, v. 37, p. 16-22, 1990.
- ALVAREZ, M. *et al.* Current challenges in sheep artificial insemination: A particular insight. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, p. 32-40, 2019.
- AÑO-PERELLO, A. *et al.* Use of GnRH for Synchronization of the Follicular Wave in Assisted Reproductive Technologies in Sheep: A Preliminary Study. **Animal**, v. 10, p. 1208, 2020.
- AMIRIDIS, G. S. *et al.* Progesterone concentration as na indicator of ovarian response to superovulation in Chios ewes. **Theriogenology**, v. 57, p. 1143-1150, 2002.
- AMIRIDIS, G. S.; CSEH, S. Assisted reproductive technologies in the reproductive management of small ruminants. **Animal Reproduction Science**, v. 130, p. 152-61, 2012.
- ARCO. Associação Brasileira de Criadores de Ovinos. **Padrões raciais**. <http://www.arcoovinos.com.br/PadraoRacial>. Acessado em 20 de julho de 2022.
- ARMSTRONG, D. T.; PFITZNER, A. P.; SEAMARCK, R. F. Ovarian responses and embryo survival in goats following superovulation and embryo transfer. **Theriogenology**, v. 17, p. 76, 1982.
- AZAMBUJA-RIBEIRO, E. L.; GONZÁLEZ-GARCÍA, E. Indigenous sheep breeds in Brazil: potential role for contributing to the sustainability of production systems. **Tropical Animals Health and Production**, v. 48, p. 1305-13, 2016.
- BAIRD, D. T. Luteotrophic control of the corpus luteum. **Animal Reproduction Science**, v. 28, p. 95-102, 1992.
- BARI, F. *et al.* Factors affecting the survival of sheep embryos after transfer within a MOET program. **Theriogenology**, v. 59, p. 1265-1275, 2003.
- BARUSELLI, P. S. *et al.* Using artificial insemination v. natural service in beef herds. **Animal**, v. 12, p. 45-52, 2018.
- BARTLEWSKI, P. M. *et al.* Intrinsic determinants and predictors of superovulatory yields in sheep: Circulating concentrations of reproductive hormones, ovarian status, and antral follicular blood flow. **Theriogenology**, v. 86, p. 130-143, 2016.
- BERGSTEIN-GALAN, T. G., WEISS, R. R., KOZICKI, L. E. Effect of semen and donor factors on multiple ovulation and embryo transfer (MOET) in sheep. **Reproduction Domestic Animals**, v. 54, p. 401-407, 2018.

BERGLUND, B. Genetic improvement of dairy cow reproductive performance. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 89-95, 2008.

BRIDGES, P. J. *et al.* Ability of induced corpora lutea to maintain pregnancy in beef cows. **Journal of animal science**, v. 78, n. 11, p. 2942-2949, 2000.

BRUNO-GALARRAGA, M. M. *et al.* Repeatability of superovulatory response to successive FSH treatments in Merino sheep. **Small Ruminant Research**, v. 120, p. 84–89, 2014.

CASALI, R. *et al.* Semen deposition by cervical, transcervical and intrauterine route for fixed-time artificial insemination (FTAI) in the ewe. **Theriogenology**, v. 103, p. 30-35, 2017.

CERVANTES, M. J. *et al.* Use of fluorogestone acetate after breeding to reduce the effect of premature luteal regression in dairy goats when superovulation is induced with FSH. **Animal Reproduction Science**, v. 97, p. 47-54, 2007.

CHIKWANHA, O. C. *et al.* Nutritional enhancement of sheep meat fatty acid profile for human health and wellbeing. **Food Research Internacional**, v. 104, p. 25-38, 2017.

CORDEIRO, M. F. *et al.* Embryo recovery rate in Santa Inês ewes subjected to successive superovulatory treatments with pFSH. **Small Ruminant Research**, v. 49, p. 19-23, 2003.

DALY, J. *et al.* Towards Improving the Outcomes of Assisted Reproductive Technologies of Cattle and Sheep, with Particular Focus on Recipient Management. **Animals**, v. 10, p. 293, 2020.

ESPINOSA-MÁRQUEZ, M. C. *et al.* Effect of fluorogestone acetate on embryo recovery and quality in eCG-superovulated goats with premature luteal regression. **Theriogenology**, v. 62, p. 624-630, 2004.

DATTENA, M. *et al.* Superovulatory response and quality of embryos recovered from anestrus ewes after a single injection of porcine FSH dissolved in polyvinylpyrrolidone. **Theriogenology**, v. 42, p. 235–239, 1994.

EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS, Centro de Inteligência e Mercado de Caprinos e Ovinos. **Produção Mundial**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/cim-inteligencia-e-mercado-de-caprinos-e-ovinos/producao-mundial>. Acesso em: 20 de julho de 2022.

ESPINOSA-MÁRQUEZ M. C. *et al.* Effect of fluorogestone acetate on embryo recovery and quality in eCG-superovulated goats with premature luteal regression. **Theriogenology**, v.62, p.624-630, 2004.

EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. Frozen storage of semen. Salamon's artificial insemination of sheep and goats. **Butterworths**, Wellington, p. 122-141, 1987.

FAO. **World livestock 2011**—Livestock in food security

FAIGL, V. *et al.* Artificial insemination of small ruminants - a review. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 60, p. 115-29, 2012.

FALCHI, L.; LEDDA, S.; ZEDDA, M. T. Embryo biotechnologies in sheep: Achievements and new improvements. **Reproduction Domestic Animals**, early view, 2022.

FERRÉ, L. B. *et al.* Review: Recent advances in bovine in vitro embryo production: reproductive biotechnology history and methods. **Animal**, v. 14, p. 991-1004, 2020.

FIGUEIRA, L. M. *et al.* Colour Doppler Ultrasonography as a Tool to Assess Luteal Function in Santa Inês Ewes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, p. 643-650, 2015.

FIGUEIRA, L. M. *et al.* Embryo yield and quality are associated with progestogen treatment during superovulation protocol in lactating Lacaune ewes. **Theriogenology**, v. 155, p. 132-138, 2020.

FLIS, Z.; MOLIK, E. Importance of Bioactive Substances in Sheep's Milk in Human Health. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, p. 4364, 2021.

FONSECA, J. F. **Bioteecnologias da reprodução em ovinos e caprinos**. Embrapa Caprinos e Ovinos-Documents (INFOTECA-E), 2006. <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/533329/1/doc64.pdf>. Acesso em: 25 de julho de 2022.

FONSECA, J. F. *et al.* Nonsurgical embryo recovery and transfer in sheep and goats. **Theriogenology**, v. 86, p. 144-151, 2016.

FONSECA, J. F. *et al.* 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. **Animal Reproduction Science**, v. 203, p. 25-32, 2019a.

FONSECA, J. F. *et al.* Combined treatment with oestradiol benzoate, d-cloprostenol and oxytocin permits cervical dilation and nonsurgical embryo recovery in ewes. **Reproduction Domestic Animals**, v. 54, p. 118-125, 2019b

FORCADA, F. *et al.* Repeated superovulation using a simplified FSH/eCG treatment for in vivo embryo production in sheep. **Theriogenology**, v. 75, p. 769-776, 2011.

FTHENAKIS, G. C. *et al.* Interactions between parasitic infections and reproductive efficiency in sheep. **Veterinary Parasitology**, v. 208, p. 56-66, 2014.

FLINT, A. P. F.; SHELDRIK, E. L. Ovarian secretion of oxytocin is stimulated by prostaglandins, **Nature**, v. 297, p. 587-588, 1982.

GILBERT, D. E. *et al.* Comparison of a progesterone intravaginal device (cidrm) with flunixin meglumine (finadynetm) for reducing the effects of corpora lutea regression in the goat. **Theriogenology**, v. 33, n. 1, p. 230, 1990

GODBER, O. F.; WALL, R. Livestock and food security: vulnerability to population growth and climate change. **Global Change Biology**, v. 20, p. 3092-3102, 2014.

GONZÁLEZ-BULNES, A. *et al.* Multiple factors affecting the efficiency of multiple ovulation and embryo transfer in sheep and goats. **Reproduction Fertility Development**, v. 16, p. 421–435, 2004.

GRAHAM, T. W. *et al.* Associations among prostaglandin F2 alpha, plasma zinc, copper and iron concentrations and fetal loss in cows and mares. **Theriogenology**, v. 44, p. 379-390, 1995.

GUSMÃO, A. L.; BISCARDE, C. E. A.; KIYA, C. K. Superovulação e transferência de embriões em ovelhas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, p. 226-231, 2013.

HUNTER, M. G. Characteristics and causes of the inadequate corpus luteum. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 43, p. 91-9, 1991.

HASLER, J. F. Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences, **Theriogenology**, v. 81, p. 152-169, 2014.

HOMEIDA, A. M.; KHALAFALLA, a. E. Effects of oxytocin-antagonist injections on luteal regression in the goat. **British Journal of Pharmacology**, v. 90, p. 281 -284, 1987.

IBGE. <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/ovino/br>. Acesso em: 17 de julho de 2022.

IETS (2020). **Newsletters**.

IETS. **Manual of the international embryo transfer society**, 1998.

ISHWAR, A.; MEMON, M. Embryo transfer in sheep and goats: A review. **Small Ruminant. Research**, v.19, p. 35–43, 1996.

KASIMANICKAM, R. K. Flunixin meglumine improves pregnancy rate in embryo recipient beef cows with an excitable temperament. **Theriogenology**, v. 107, p. 70-77, 2018.

KARASAHIN T. *et al.* Effect of flunixin meglumine treatment during and after embryo transfer on the pregnancy rate in cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 56, p. 1555-1561, 2021.

KHAN, S. U. *et al.* Towards Improving the Outcomes of Multiple Ovulation and Embryo Transfer in Sheep, with Particular Focus on Donor Superovulation. **Veterinary Sciences**, v. 9, p. 117, 2022.

KING, C.; OSBORN, D.; GRUPEN, C. G. Multiple ovulation and embryo transfer in sheep: Effects of embryo developmental stage and quality on viability in vivo under farm conditions. **Australian Veterinary Journal**, early view, 2022

LOPEZ SEBASTIAN, A. *et al.* Effect of season and duration of FSH treatment on embryo production in sheep. **Theriogenology**, v. 34, p. 175–180, 1990.

MONTEIRO, M. G.; BRISOLA, M. V.; VIEIRA FILHO, J. E. R. **Diagnóstico da cadeia produtiva de caprinos e ovinos no Brasil - 2660**, Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada.- Brasília : Rio de Janeiro : Ipea , Brasília, junho de 2021

MILCZEWSKI, V. *et al.* Inseminação artificial intrauterina e cervical em ovelhas utilizando sêmen refrigerado. **Archives of Veterinary Science**, v.5, p.35-39, 2000.

MOORE, S. G.; HASLER, J. F. A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 10314-10331, 2017.

NOGUEIRA FILHO, A.; KASPRZYKOWSKI, J. W. A. **O agronegócio da caprino-ovinocultura no Nordeste Brasileiro**. Fortaleza: Banco do Nordeste do Brasil, 2006. (Série Documentos do ETENE, n.9).

OKADA, A. *et al.* Incidence of abnormal corpus luteum in superovulated ewes. **Journal of Reproduction and Development**, v.46, p.397-402, 2000.

OLIVEIRA, M. E. F.; TEIXEIRA, P. P. M.; VICENTE, W. R. R. **Biotécnicas Reprodutivas em ovinos e caprinos**, São Paulo: MedVet, p. 103-120, 2013.

OLIVEIRA, M. E. F. *et al.* Follicular wave emergence in Santa Inês ewes subjected to long-term, progesterone-based estrous synchronization protocols at different times of the year. **Animal Reproduction Science**, v. 174, p. 80–86, 2016.

OLIVEIRA, M. E. F. *et al.* Assessing the usefulness of B-mode and colour Doppler sonography, and measurements of circulating progesterone concentrations for determining ovarian responses in superovulated ewes. **Reproduction Domestic in Animals**, v. 53, p. 742–750, 2018.

PAU S. *et al.* Reproductive Performance Following Transcervical Insemination with Frozen Thawed Semen in Ewes Submitted to Surgical Incision of Cervical Folds (SICF): Comparison with Laparoscopic Artificial Insemination. **Animals**, v. 10, p.108, 2020.

PEREIRA, J. C. C. **Melhoramento genético aplicado à produção animal** - 5. ed. - Belo Horizonte : FEPMVZ Editora, 617p. 409-427, 2008.

PINTADO, B. *et al.* Influence of the synchronization treatment on the superovulatory response of Murciana goats. **Small Ruminant Research**, v. 23, p. 135-141, 1996.

PINTO, P. *et al.* Colour-Doppler ultrasound imaging as a laparoscopy substitute to count corpora lutea in superovulated sheep. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, p. 266-269, 2018.

SALLES, H. O. *et al.* Diferentes posologias de Flunixin Meglumine na prevenção da regressão prematura de corpos lúteos em cabras superovuladas. **Ciência Animal**, v.8, p.69-74, 1998.

SAHARREA A. *et al.* Premature luteal regression in goats superovulated with PMSG: effect of hCG or GnRH administration during the early luteal phase. **Theriogenology**, v.50, p.1039-1052, 1998.

SANTOS, J. D. R. *et al.* Transcervical vs. laparotomy embryo collection in ewes: The effectiveness and welfare implications of each technique. **Theriogenology**, v. 153, p. 112-121, 2020.

SMITH, C. L.; MURPHY, C. N. A modified antegrade uterine flush for recovery of ova in the ewe. In: **Proceedings of the 10th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination**, June 10–11. Urbana Champaign: University of Illinois; p. 242–5, 1984.

SOUZA-FABJAN, J. M. G. *et al.* Effect of different hormonal combinations on follicular wave emergence and superovulatory response in sheep. **Theriogenology**, v. 103, p. 24–29, 2017.

SOUZA-FABJAN, J. M. G. *et al.* In vitro production of small ruminant embryos: latest improvements and further research. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 33, p. 31–54, 2021.

STUBBINGS, R. B. *et al.* Serum progesterone concentrations associated with superovulation and premature corpus luteum failure in dairy goats. **Can J Vet Res**, v.50, p.369-373, 1986.

VIANA, J. G. A. Panorama Geral da Ovinocultura no Mundo e no Brasil. **Revista Ovinos**, n. 12, 2008.

VILARIÑO, M.; RUBIANES, E.; MENCHACA, A. Ovarian responses and pregnancy rate with previously used intravaginal progesterone releasing devices for fixed-time artificial insemination in sheep. **Theriogenology**, v. 79, p. 206-210, 2013.

VISCARDI, A. V. *et al.* Analgesic Comparison of Flunixin Meglumine or Meloxicam for Soft-Tissue Surgery in Sheep: A Pilot Study. **Animals**, v. 11, p. 423, 2021.

ZHU, J. *et al.* Advances in in vitro production of sheep embryos. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, v. 6, p. 15-26, 2018.