

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ASPIRAÇÃO FOLICULAR VIDEOLAPAROSCÓPICA EM  
OVELHAS RECÉM-DESMAMADAS SUBMETIDAS À  
ESTIMULAÇÃO OVARIANA**

**Pedro Paulo Maia Teixeira**

Médico Veterinário

2013

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ASPIRAÇÃO FOLICULAR VIDEOLAPAROSCÓPICA EM OVELHAS RECÉM-  
DESMAMADAS SUBMETIDAS À ESTIMULAÇÃO OVARIANA**

MSc. Pedro Paulo Maia Teixeira

Orientador: Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente

Coorientadora: Prof. Dr. Maria Emília Franco Oliveira

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do *Campus* de Jaboticabal – UNESP, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária (Reprodução Animal).

**2013**

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**PEDRO PAULO MAIA TEIXEIRA** - nascido em 13 de junho de 1984, em Belém – PA. Médico Veterinário formado pela Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA, Belém, Pará, em abril de 2008. Realizou aprimoramento em Reprodução de Caprinos e Ovinos de 2007 a 2008, no Centro de Pesquisa em Caprinos e Ovinos do Pará (CPCOP), do Instituto da saúde e Produção Animal (ISPA) da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA). Mestre em Cirurgia Veterinária pelo Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV – UNESP – *Câmpus* de Jaboticabal – SP (de 2008 a 2010), atuando no Setor de Obstetrícia e Reprodução. Ingressou no Doutorado pelo programa de Medicina Veterinária, área de concentração Reprodução Animal em 2011, atuando no mesmo setor. Foi Professor Adjunto na área de Cirurgia de Grandes Animais e Obstetrícia Veterinária, além de trabalhar na rotina do Hospital Veterinário, Setor de Clínica e Cirurgia de Grandes Animais, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Garça (FAEF-FAMED), no ano de 2011. Também foi Professor Adjunto na área de Clínica cirúrgica e Semiologia Veterinária na Universidade Paulista (ASSOBES/IUESO/UNIP), atuando no setor de Clínica e Cirurgia de Grandes Animais da mesma instituição.

“A mente que se abre a uma nova ideia  
jamais volta ao tamanho original”

Albert Einstein

“Haverá um dia em que os homens  
conhecerão o íntimo dos animais, e, nesse  
dia, um crime contra um animal será  
considerado um crime contra a humanidade”.

Leonardo da Vinci

## AGRADECIMENTOS

Este é o fim de uma etapa muito importante em minha vida, depois de quase cinco anos, alcançar esse objetivo não seria possível sem numerosas pessoas...

Minha Família, sem nenhuma dúvida, foi a principal responsável por eu concluir essa fase de minha vida, na qual a única dificuldade real é ficar longe dela.

Sempre fui fã de inúmeros heróis dos quadrinhos e TV, mas com o tempo percebi que na vida real existem verdadeiros heróis com superpoderes. Um dele é meu paizão, exemplo que sigo na minha vida profissional e pessoal, e se faço um trabalho sempre tentando dar o meu máximo é porque aprendi com o melhor. Espero um dia estar à altura do nome do Professor Dr. Pedro Emerson Gazel Teixeira.

Outra heroína é minha mãezona, Helieci Oeiras Maia Teixeira, guerreira que sempre me ofereceu sua dedicação e amor, que não teriam como caber dentro de um ser humano. Em quem também sempre me espelho para enfrentar todas as dificuldades com força e perseverança.

À Juliana Maia Teixeira, minha maninha, obrigado por todo carinho, zelo, companheirismo e apoio em toda a minha vida.

À minha avó, Judith Oeiras Maia, minha segunda mãe, um exemplo de tranquilidade, com sua alegria contagiante que ensina a viver.

Também agradeço à “minha Bebê” Hedy Ribeiro, meu amor, companheira de todas as horas, que superou as dificuldades de um namoro a distância, sendo a melhor namorada que existe. A quem posso contar em momentos de dificuldade, inclusive, estando ao lado dos meus pais, vó, irmã e sobrinha. Obrigado por ter entrado em minha vida e insistido para ficar!

Também não tenho como deixar de agradecer a mais nova princesinha da família, minha sobrinha Cecília Teixeira Seligmann, a lindinha do titio.

Agradecer aos mestres que são responsáveis por nosso aprendizado, sem eles não seríamos nada.

Em meus anos de graduação, quando estudava minha matéria predileta e sonhava em ser alguém importante na área da cirurgia e obstetrícia, lia o “Manual de Obstetrícia Veterinária”, imaginando poder conhecer, conversar, estudar com nomes como do Ilustríssimo Professor Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente. E anos após, tive essa

oportunidade, e descobri que mais do que a referência em Obstetrícia ele é um exemplo de orientador e pessoa, um “encanador de vidas”. Agradeço por toda oportunidade, por ter me aceitado em sua equipe desde meu mestrado, dando a maior liberdade para trabalhar e crescer com profissional, sempre com muito incentivo e confiança, sabendo eu que nas horas de maiores dificuldades, meu orientador estaria presente e que tudo resolveria. Agradeço também pela amizade, além da chance de trabalhar com o meu professor ídolo, por quem hoje tenho ainda maior orgulho e admiração. Serei seu eterno orientado!

Aos meus primos Anderson “Guga” Maia e Adriano Maia e à minha tia Nilza, os quais não tenho nem como agradecer por tudo que fizeram por mim, me dando casa e carinho. E às suas esposas, Rita e Janaina, pela excelente forma em que fui tratado quando estive em suas casas. Aos meus priminhos Vini e Bia pela alegria contagiante, sem esquecer a mais nova integrante Maia, Catarina. Sem nenhuma dúvida foram a família que sempre me recebeu e ajudou enquanto estive longe de casa.

Agradeço também aos colegas de trabalho e amigos, equipe fundamental de toda a fase que estive trabalhando e minha passagem pela FCAV/UNESP, especialmente neste trabalho.

Em especial aos meus quatro braços deste projeto. Ao Leandro “Paquito” Coutinho, amigo de velhos tempos, que espero um dia ter a sua calma, inclusive em momento de extrema pressão. Alanna Silva e sua organização, eficiência e competência inigualável. Ao Felipe Farias Pereira da Câmara “Cabeça Chata” Barros, o qual o coleguismo foi fundamental para o desempenho deste e de outros projetos. À Luciana Padilha, não só pelas avaliações laboratoriais, mas pela sua solidariedade imensurável. Equipe que espero um dia poder trabalhar novamente como professor universitário, e mais, além de colaboradores fundamentais, grandes amigos.

À Maria Emilia Franco Oliveira, obrigado por suas orientações de longas datas e por ter ajudado a abrir as portas para mim na FCAV/UNESP, além de todas nossas parcerias em trabalhos.

Fabíola Flores, Maristela Lopes, minha dupla dinâmica da anestesia deste e de outros projetos, agradeço sua colaboração. Nossos dias de videocirurgia com trilha sonora e muito divertimento jamais serão esquecidos.

Agradeço à Cássia Maria Coelho Molinaro, também minha anestesista particular, que me ensinou que nem sempre as cirurgias devem ser silenciosas (rs...), mesmo com

todo seu “furação”, sempre dá tudo certo! Obrigado por todas as parcerias científicas, mas também pelas festas, divertimentos e amizade.

Ao Marcus “Psico” Rossi Feliciano, obrigado por ter me apresentado ao Antro, por todos os momentos de descontração e colaborações nesta tese.

Aos residentes, principalmente às obstetras, Ana Paula e em especial à Marina Brito, obrigado pela colaboração neste projeto e rotina do Setor de Obstetrícia Veterinária e amizade.

A todos os estagiários, em especial à Maria Eduarda “Francesca”, que tenho todo orgulho de ter colaborado na sua formação e sempre supera minhas expectativas. E Murillinho Kirnew, meus ex-aluno de faculdade, irmão caçula de república. Aos meus orientados Renatinha Mariano, Anelise Trecendi, Alessandro “Carreirinha” Pacheco e Izabella Ribeiro, excelentes alunos e estagiários, obrigado por todos os momentos de aulas, trabalhos e divertimentos.

Muitas vezes longe de casa conhecemos pessoas que acabam se tornando como se fossem parte de nossa família. Agradeço a minha “irmã” caçula Regina “Estrela” Medeiros, obrigado por toda amizade, companheirismo. A Hedy também agradece, por agora achar que ela agora é a mulher que se arruma mais rápido neste mundo (rs...). Agradeço ao meu grande irmão “Marquim” Machado Silva, amigo com o qual aprendi muito, companheiro de momento bons e ruins, que me deu até uma família “nu Goiás”. Com toda certeza ainda vamos trabalhar muito juntos. Ao meu outro irmão Marcio “Meninão” Bandarra, parceiro de todas as horas, obrigado pela amizade e independente de onde esteja sei que posso contar sempre.

Agradeço à república Antro do HV. Em poucos lugares me sinto em casa, mas nestes velhos sobrados tive grandes momentos da minha vida. Obrigado aos amigos Marcio Bandarra, Felipe Barros, Leandro Nassar, Marcus Feliciano, Murillo Kirnew e Marco Silva, já mencionados. Didi do Pijama Cardilli, obrigado pela amizade, parceria em trabalhos, por nossas aventuras pelo oriente médio e inúmeros momentos de risos. Ao Meu Querido Evandro “Cardio-Black” Zaccher, sem nenhuma dúvida um dos melhores clínicos que conheço, fique na paz de Jáh. Ao Miguel Ladino “muchas gracias mi amigo”. André Galvão, por ajudar a botar ordem na casa. Ao Leonardo “Gordinho Viçosa” Vieira, por mostrar que por dentro de uma casca bruta, rústica e sistemática existe um grande coração. Ao Luís Guilherme, obrigado “você”. Ao “Terrível” Fernando “Bahuan” Rosa, por

me dar uma “nora” (rs...), obrigado meu grande amigo. Ao Tata Fidelis Jr., pelo seu toque de alvorada matinal, meu obrigado ao meu vizinho de parede desse ano. Marcos Bruninho Sica, por animar a casa com seus gritos de “Antro do HV”. Ao Betão Thiesen, por mostrar que não se precisa de expressão para ser um parceiro de todas as horas, sem nenhuma dúvida a pessoa que mais confio com um anestésico na mão. Ao Sr. Alexandre “Dedo” Pinto Ribeiro, obrigado por ter me ensinado a fazer estatística, por levar todas as brincadeiras na esportiva (quase sempre) e por tornar os almoços muito hilários. Ao Daniel “Cardio-Bozo” Paulino Jr. por seu grande humor, pelo divertimento musical, mas também ajudar controlar as bagunças na casa. Ao Leandro “Gordinho” Zaine, pela ótima convivência. André “Lingua” Escobar, por mostrar que desentendimentos não estragam a amizade. Ao Gustavinho Gosuen (agradeço mais a frente). Ao JP Pascon, por sua responsabilidade e amizade. A todos que fizeram parte da República Antro do HV, minha casa que levarei a lembrança de grandes momentos.

Agradeço aos meus amigos da “Garça Assombrada”. Ao meu Coordenador, Veterano de república e irmãozinho, Gustavinho Gosuen, obrigado por todo apoio no meu primeiro emprego real como professor universitário, por mostrar que é um grande irmão de república, por lembrar que vale a pena lutar pelas coisas certas, independente das consequências. Aos meus grandes amigos Daniel Tozzetti e Carlão Eduardo Paccini, com os quais foi um prazer dividir nossa minúscula sala e trabalhar como um verdadeiro time, sem nunca concorrer, pelo contrário, sempre somar. As minhas queridas Milena “Cut cut” Torres, Tati Cabrini, Rose Elizabeth, as quais tive a imenso prazer de trabalharmos e nos divertirmos juntos. E mais uma vez a minha irmã caçula, Regina Medeiros. Obrigados meus amigos, por serem sempre corretos, mesmo quando a situação não favorece e companheiros, mesmo sabendo que poderiam se prejudicar no emprego. Nunca vou esquecer nossos almoços no pesqueiro, meu primeiro e único porre e todos nossos momentos.

Agradeço a todos que conheci em minha estada em Goiânia, principalmente ao Sr. Paulo Sergio Silva e Sra. Irene Silva, pessoas iluminadas, pais de meu “irmão” e tenho como se fossem meus “pais”, não só dando moradia, mas, muito mais que isso, carinho, ajuda imensurável.

Aos amigos Paula, Daniel, Sandro, Camila, Suyan, Marcelo, Carolina e Luana, mesmo por pouco tempo, grandes companheiros que encontrei na maravilhosa GYN.



Aos meus alunos, estagiários e orientados, por sempre me darem a oportunidade de crescermos juntos a cada dia. Fora os já mencionados, agradeço ao Rafael “Tupã”, Julinho, Fernandinho, Rômulo, Guilherme Gamba, Guilherme Petrechi, Leticinha, Igor Poláco, Manoel, William Gaguinho, Miguel Paquito, Tita Inforzato, Renatinha, Bruno, Jéssica, Gabriela, Sandoval, Eduardo, Lucas, Luiz, Kênia, Priscila, PH, Carla, entre outros que fizeram parte de meus dias de HV’s.

Agradeço ao Professor Dr. Luiz Fernando de Souza Rodrigues e Professor Frederico Ozanan de Barros pela colaboração desde a graduação, mas por terem aberto as portas para hoje estar concluindo esse Doutorado, além de todas as orientações e colaborações neste trabalho.

Ao Professor Dr. Maurício Velozo Brun, por toda amizade, colaboração não só neste trabalho, mas por todo auxílio e aprendizado principalmente na área da videocirurgia.

Ao professor Dr. Andriago Barboza de Nardi, meu veterano de república e amigo, obrigado pelas inúmeras ajudas dentro da FCAV/UNESP, por ter me dado a oportunidade de contribuir no Setor de Cirurgia, além das grandes contribuições neste trabalho.

Aos professores Dr. Júlio Carlos Canola, Dr. Carlos Augusto Araújo Valadão e Dr. Joaquim Mansano Garcia, mestres e excelências em suas áreas, agradeço por todo aprendizado a mim proporcionado, apoio durante minha passagem nesta universidade e contribuições neste trabalho.

Às professoras Dra Lindsay Unno Gimenes e em especial Dra. Erika da Silva Carvalho Morani e, não só pela colaboração neste trabalho, mas por todas parcerias em trabalhos e boa vizinhança.

Agradecer a Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” e a todos os responsáveis do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” – FCAV/Unesp Jaboticabal.

A todos os funcionários da FCAV/UNESP, em especial ao Sr. Edson Aguiar e Izabel Penariol, exemplos de trabalho e colaboração.

Aos meus “camaradas de roda”, alguns já citados, obrigado por fazerem parte de minha filosofia de vida. Agradeço ao Netinho Nader por mostrar que nenhuma rasteira é forte o suficiente para deixar um capoeira no chão. Ao Ricardo Gomes, por segurar o polo quando em minhas ausências. Titi Crivelaro minha grande amiga. Banana Krolls, Boiadeiro, Gabriel, Fernandinha, e todos dessa família DL que participaram desse “jogo” ao meu lado.

Agradeço a Raquel, Tati Poló e Luísa Teixeira (minha “prima”, rs...), obrigado não só por todos os momentos de amizade e capoeiragem, mas também por me darem a oportunidade de aprender mais nas rotinas do setor de grandes animais do HV.

Agradeço a Arina Mirrasga, Priscila Norberto, Dárcio, Michelle, Sofia, Leandro, Bituca, Marici, Paulinha, Kalina, Paulo, Thiago, Jorge, Fabinho Ferrugem, Marcelinho “Pará”, Caio, Ricardo, Letícia, Andressa, Dona Ruth, Giovana, Erica, Fabiana, Eli, Daniela Tequila, Diana, Anelise, Carol, Chayane, Emílio, Piauí, Victor... e todos mais amigos do setor de obstetrícia, pós-graduação e HV.

Obrigado a todos os amigos que estiveram nesta jornada, em Jaboticabal, Garça e Goiânia.

E a todos os meus filhotes, em especial a Carla Gabriela e o Francisco, meus companheiros nestas jornadas, obrigado pela imensurável força, carinho e companheirismo incondicional, sempre trazendo grandes alegrias.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

A todos meu eterno obrigado!

## SUMÁRIO

RESUMO.....	III
ABSTRACT.....	IV
LISTA DE TABELAS .....	V
LISTA DE FIGURAS .....	VI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. HIPÓTESE .....	2
3. OBJETIVOS.....	3
3.1. Geral .....	3
3.2. Específicos .....	3
4. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
4.1. Avanços da aspiração folicular para produção in vitro .....	4
4.2. Histórico e emprego em pequenos ruminantes .....	5
4.3. Aspiração de folículos ovarianos.....	6
4.4. Estimulação hormonal para punção folicular .....	8
4.5. Aspiração folicular em ovinos e caprinos.....	10
5. MATERIAL E MÉTODOS .....	15
5.1. Animais e tratamentos .....	15
5.2. Videolaparoscopia para aspiração folicular .....	16
5.3. Avaliações intraoperatória .....	18
5.4. Avaliação pós-cirúrgica .....	18
5.5. Análises dos oócitos recuperados e maturação in vitro .....	19

<b>5.6. Análise estatística .....</b>	<b>20</b>
<b>6. RESULTADOS.....</b>	<b>21</b>
<b>6.1. Videolaparoscopia para aspiração folicular e avaliações intraoperatória ..</b>	<b>21</b>
<b>6.2. Avaliação pós-cirúrgica .....</b>	<b>22</b>
<b>6.3. Análises dos oócitos recuperados e maturação in vitro .....</b>	<b>23</b>
<b>7. DISCUSSÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>8. CONCLUSÕES .....</b>	<b>29</b>
<b>9. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>30</b>
<b>ANEXO 1 - GRÁFICOS E TABELAS COMPLEMENTARES.....</b>	<b>37</b>

## RESUMO

### ASPIRAÇÃO FOLICULAR VIDEOLAPAROSCÓPICA EM OVELHAS RECÉM-DESMAMADAS SUBMETIDAS À ESTIMULAÇÃO OVARIANA

O objetivo deste trabalho foi descrever uma técnica de aspiração folicular por videolaparoscopia (LOPU), estabelecendo um protocolo de estimulação ovariana para ovelhas recém-desmamadas. Utilizou-se 36 ovelhas de 4 à 8 semanas de idade, submetidas a um protocolo curto de progestágeno para induzir onda folicular, associado à estimulação ovariana pela administração de 300 UI de eCG e ao emprego de FSH, de acordo com cada grupo experimental: dois grupos controles (GCN - sem tratamento e GCI – com somente protocolo de indução de onda folicular); grupos com aplicação de 80 mg de FSH (G80U - 80 mg de FSH em dose única; G80M - 4 administrações de 20 mg); e grupos que com a aplicação de 160 mg de FSH, administrado de modo similar ao descrito para os grupos de 80 mg, contudo, com o volume duplicado (G160U e G160M). Procedeu-se aspiração folicular por videolaparoscopia, realizando avaliações qualitativa e quantitativa dos oócitos recuperados, além da maturação oocitária. O transcirúrgico foi dividido em etapas intraoperatórias e também observação de comportamento sugestivo à desconforto doloroso, além da dosagem sérica de fibrinogênio. O tempo cirúrgico médio foi de  $24,3 \pm 5,2$  min., e com poucas intercorrências. Os dados relativos à observação de dor e das concentrações séricas de fibrinogênio não foram significativos em relação ao basal ( $p > 0,05$ ). O número de oócitos recuperados para os GCN, GCI, G80U, G80M, G160U e G160M foram de  $1,1 \pm 1,6$ ,  $1,1 \pm 1,8$ ,  $4,6 \pm 3,2$ ,  $2,2 \pm 0,8$ ,  $5,8 \pm 3,1$  e  $3,0 \pm 2,0$ , respectivamente. Já o percentual de oócitos viáveis para cada grupo foi de 57,0%, 14,2%, 51,7%, 18,0%, 70,2% e 33,3%, concomitantemente. Destacando que o G160U apresentou melhor resultados na MIV. Concluiu-se que o protocolo do G160U apresentou melhores resultados, verificando que este já apresenta viabilidade comercial.

**Palavras-chave:** Punção folicular, ovinos, videolaparoscopia, pré-púberes.

## ABSTRACT

### VIDEOLAPAROSCOPIC OVUM PICK-UP IN RECENTLY WEANED SHEEP SUBMITTED TO OVARIAN STIMULATION

The aim of this study was describe a technique of laparoscopic ovum pick-up (LOPU), establishing a ovarian stimulation protocol for newborn weaned lambs. We use 36 sheep, aging 4 to 8 weeks old, subjected to a progestin short protocol to induce follicular wave, associated with ovarian stimulation by administration of 300 IU of eCG and the use of FSH in accordance with following experimental group: two control groups (UCG - untreated and CGI - with single follicular wave induction protocol); groups with application of 80 mg of FSH (S80G - 80 mg single dose of FSH; M80G - 4 doses of 20mg); and groups with application of 160 mg of FSH in similar methodology described for the 80 mg groups, however, doubling the volume (S160G and M160G). Videolaparoscopic follicular aspirations and qualitative and quantitative evaluations of retrieved oocytes were performed, as the oocyte maturation. The surgical procedure was divided in intraoperative stages, observation of behavior suggestive of painful discomfort and serum fibrinogen evaluation. The mean surgical time was  $24.3 \pm 5.2$  min. with rare complications. Data of pain observation and serum fibrinogen concentrations were not significant compared to baseline ( $p > 0.05$ ). The number of a retrieved oocytes for UCG, CGI, S80G, M80G, and S160G M160G were  $1.1 \pm 1.6$ ,  $1.1 \pm 1.8$ ,  $4.6 \pm 3.2$ ,  $2.2 \pm 0.8$ ,  $5.8 \pm 3.1$  and  $3.0 \pm 2.0$  respectively. The percentage of viable oocytes for each group was 57.0%, 14.2%, 51.7%, 18.0%, 70.2% and 33.3%, concomitantly. Highlighting the S160G group showed better results for IVM. The protocol S160G showed better results and prompt commercial viability.

**Keywords:** ovum pick up, ovine, videolaparoscopy, prepubertal.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Resultados relacionados à média, mais desvio padrão de folículos visualizados (FV), folículos aspirados (FA), oócitos recuperados (OR) e taxa de recuperação (TR) por grupo experimental.. .....	23
Tabela 2.	Resultados relacionados à média de qualidade oocitária, total de oócitos viáveis e valores totais por grupo experimental, observando os valores em percentuais e absolutos. ....	24
Tabela 3:	Resultados relacionados à maturação nuclear em relação a cada grupo experimental, observando os valores em percentuais e absolutos. ....	25
Tabela 4:	Grupos e tratamentos experimentais preconizados para ovelhas recém-desmamadas submetidas à aspiração folicular, Anexo 1. .	38

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Figura 1: Laparotomia em fêmea, ovina, adulta, para eternização do trato reprodutivo interno, incluindo o ovário (seta), para aspiração folicular. Fonte: Centro de Pesquisa de Caprinos e Ovinos do Estado do Pará, 2006, arquivo pessoal. .... 8
- Figura 2: Figura 2 – Imagens fotográficas representando as etapas da aspiração folicular por videolaparoscopia (LOPU) em ovelha. (A) Colocação pela técnica fechada do primeiro trocáter com válvula de insuflação (1). (B) Estabelecimento do pneumoperitônio, insuflando pelo primeiro trocáter (1). (C) Posicionamento videoassistido do segundo trocáter (2). (D) Posicionamento videoassistido do terceiro trocáter (3). (E) Posicionamento do endoscópio para o terceiro trocáter (3). (F) Posicionamento final dos portais laparoscópicos, sendo a câmera no terceiro trocáter (3) e pinças atraumáticas no primeiro e segundo trocáter (1 e 2). Fonte: TEIXEIRA et al. 2011c. ... 12
- Figura 3: Imagens videolaparoscópicas da cavidade abdominal de uma ovelha em um aumento de aproximadamente 10X, notando a fixação do ovário (Circulo) pela pinça de apreensão atraumática (1), e a presença de folículos na superfície ovariana (seta) (A); posicionamento da agulha (2) para aspiração(B), e a aspiração dos folículos (C e D). .... 13
- Figura 4: Representação do tempo cirúrgico em cada etapa do procedimento de LOPU. Letras iguais não demonstram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) e letras diferentes demonstram tais diferenças ( $p < 0,05$ ). P1 – Entrada do primeiro portal laparoscópico; P23 – Entrada do segundo e terceiro portais laparoscópicos; MA1 – Manipulação e apreensão do primeiro ovário; MA2 – Manipulação e apreensão do segundo ovário; D – Inspeção final e dermorráfia. .... 21
- Figura 5: Níveis séricos de fibrinogênio em ovinos recém-desmamados submetidos a aspiração folicular, não demonstrando alterações em relação aos valores basais para a espécie ovina (100 a 500 mg/dL -



	JAIN, 1993). .....	23
Figura 6:	Ilustração esquemática do protocolo hormonal de indução de onda folicular e estimulação ovariana a qual foram submetidos os animais experimentais. Uso de progestágeno a base de medroxiprogesterona (MAP) colocado no início do protocolo e retirado no sexto dia (D6), mais aplicação de eCG no quinto dia do protocolo (D5). Nova aplicação de eCG agora somada ao FSH 36 horas antes da aspirações foliculares (LOPU), Anexo 1. ....	37
Figura 7:	Fotomicrografia em microscopia confocal de oócitos de ovelhas corados para avaliação da distribuição dos GC pela técnica de fluorescência ( <i>Lens culinaris</i> , FITC conjugada). A: agregados de GC distribuídos pelo citoplasma; B: GC distribuídos uniformemente pelo citoplasma, sem presença de agregados. C e D: GC migrando para córtex do oócito formando um halo fluorescente ao redor da membrana plasmática. Escala de 20 $\mu$ m, aumento de 40x, Anexo 1. ...	37
Figura 8:	Resultados relacionados à média de folículos visualizados (FV), folículos aspirados (FA) e oócitos recuperados (OR) por grupo experimental em ovelhas recém-desmamadas, Anexo 1. ....	38
Figura 9:	Resultados relacionados à média de qualidade oocitária, total de oócitos viáveis e valores totais por grupo experimental. (GI – oócitos classificados como grau I; GII – oócitos classificados como grau II; GIII – oócitos classificados como degenerados; Deg – oócitos classificados como degenerados; OV – Oócitos Viáveis), Anexo 1. ....	39
Figura 10:	Resultados relacionados à maturação nuclear em relação a cada grupo experimental, observando os valores em percentuais e absolutos. (MII – oócitos maturados; MI – oócitos imaturos; D/NI – oócitos degenerados/não passíveis de determinação; MCC – maturação citoplasmática completa; MCI – maturação citoplasmática incompleta; I – imaturos), Anexo 1. ....	39

**LISTA DE ABREVIATURAS**

IA – Inseminação Artificial;  
µg – microgramas;  
µL – microlitros;  
µm – micrômetros;  
% - porcentagem;  
CAM – concentração alveolar mínima;  
CL – corpo lúteo;  
CO<sub>2</sub> – dióxido de carbono;  
cm – centímetros;  
D0 – dia zero do protocolo;  
D – Inspeção da cavidade, retirada do pneumoperitônio e dermorrafia;  
D5 – quinto dia do protocolo;  
DIV – desenvolvimento *in vitro*;  
dL – decilitro;  
eCG – gonadotrofina coriônica equina;  
EGG – éter-gliceril-guaiacol;  
FIV – fecundação *in vitro*;  
FA – Folículos aspirados;  
FV – Folículos visualizados;  
FSH – Hormônio folículo estimulante;  
FSHp – Hormônio folículo estimulante sintético;  
GCN – Grupo controle não submetido indução de onda folicular;  
GCI – Grupo controle submetido a indução de onda folicular;  
G80U – Grupo de aplicação de 80 mg de FSH em administração única;  
G80M – Grupo de aplicação de 80 mg de FSH em administração múltipla;  
G160U – Grupo de aplicação de 160 mg de FSH em administração única;  
G160M – Grupo de aplicação de 160 mg de FSH em administração múltipla;  
GnRH – Hormônio liberador de gonadotrofinas;  
IP – Início do procedimento;  
IM – Intramuscular;

IV – intravenoso;  
Kg – Quilograma;  
L – litros;  
LH – hormônio luteinizante;  
LOPU – aspiração folicular por videolaparoscopia (*laparoscopic ovum pick-up*);  
MA1 – Manipulação e aspiração do primeiro ovário;  
MA2 – Manipulação e aspiração do segundo ovário;  
MAP – acetato de medroxiprogesterona;  
MIV – maturação *in vitro*;  
mg – miligramas;  
min. – minutos;  
mL – mililitros;  
mmHg – milímetros de mercúrio;  
mm – milímetros;  
MPA – medicação pré-anestésica;  
MOET - *Multiple Ovulation and Embryo Transfer*;  
MII – oócitos maturados;  
MI – oócitos imaturos;  
NaCl – cloreto de sódio;  
OPU – aspiração folicular (*ovum pick-up*);  
OR – Oócitos recuperados;  
PIV – Produção *in vitro*;  
PIA – pressão intrabdominal;  
P1 – Entrada do primeiro portal;  
P2/3 – Entrada do segundo e terceiro portal;  
TE – Transferência de embriões;  
TRO – taxa de recuperação oocitária;  
UI – Unidades internacionais;  
US-OPU – aspiração folicular por ultrassonografia (*ultrasonographic ovum pick-up*).

## 1. INTRODUÇÃO

A ovinocultura vem apresentando um ciclo de crescimento mundial, sobretudo nos países em desenvolvimento, como o Brasil (DEMNICIS et al., 2008). Neste contexto, as biotécnicas da reprodução ganham destaque por serem fortes aliadas, sendo a produção *in vitro* (PIV) uma dessas (TRALDI, 2006).

A foliculocentese associada à PIV inicialmente era utilizada na produção de descendentes com alto valor genético, mas com problemas adquiridos na capacidade reprodutiva ou que não respondiam aos tratamentos superovulatórios convencionais (GIBBONS et al., 2008; BASSO et al., 2008). Entretanto, essa técnica demonstra um potencial de produção de embriões e gestações em um determinado período de tempo inferior ao obtido por outras técnicas, estendendo sua aplicação a fêmeas acíclicas ou em anestro estacional, gestantes, e ainda pré-púberes, além de aplicável no desenvolvimento de outras biotécnicas como a clonagem e a transgenia (BALDASSARRE, 2012; BLASH et al., 2012; WHEELER, 2007).

A alta eficiência desse procedimento está relacionada à sua associação a tratamentos de estimulação ovariana, bem como à possibilidade de seu emprego repetido em intervalos curtos (TEIXEIRA et al., 2011), além de oportunizar a exploração de fêmeas que ainda não atingiram a puberdade (VALASI et al. 2009).

Todavia, mesmo que a técnica cirúrgica de aspiração videolaparoscópica já seja trabalhada há alguns anos, inclusive em animais com idade pré-púbere (TEIXEIRA et al. 2011; WIECZOREK et al., 2010; VALASI et al., 2009), não se encontram descrições sobre cada momento cirúrgico e suas intercorrências, quanto às dificuldades observadas na técnica e sinais comportamentais e clínicos dos animais relacionados à resposta a dor. Ademais, há grande divergência quanto o melhor momento para realizar a recuperação oocitária e o protocolo mais eficiente para estimulação ovariana, principalmente em raças naturais brasileiras, como a Santa Inês, que vem se apresentando como uma das alternativas para a produção ovina em várias regiões do Brasil.

## 2. HIPÓTESE

Espera-se que a aspiração folicular seja uma técnica viável que apresente poucas intercorrências em ovelhas recém-desmamadas, demonstrando poucas adaptações à técnica realizada em animais adultos. Acredita-se o protocolo de estimulação ovariana, com doses mais altas de FSH e possivelmente com aplicações fracionadas, enseje melhor resultado em animais recém-desmamados, proporcionando resultados favoráveis na recuperação oocitária e maturação *in vitro*, de modo a possibilitar que a técnica proposta possa futuramente se tornar viável comercialmente para a indústria de tecnologia de embriões.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Geral

Avaliar a técnica de aspiração folicular por videolaparoscopia (LOPU) em ovelhas recém-desmamadas e estabelecer um protocolo de estimulação ovariana para esses animais.

#### 3.2. Específicos

- Avaliar as etapas intraoperatórias durante o procedimento de aspiração folicular videolaparoscópica;
- Verificar se o procedimento de aspiração folicular por videolaparoscopia promove sinais de desconforto doloroso nos animais;
- Analisar se o procedimento de aspiração folicular por laparoscopia provoca alteração nos níveis séricos de fibrinogênio;
- Determinar a dose e a forma de administrações (única ou múltipla) de FSH mais adequada para estimulação ovariana em ovelhas recém-desmamadas para a produção oocitária e maturação *in vitro* nos diversos protocolos.

## 4. REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1. Avanços da aspiração folicular para produção *in vitro*

É evidente que a pecuária nacional vem se desenvolvendo nos últimos anos em virtude de sua associação com as evoluções científicas e tecnológicas, bem como à várias biotecnologias ligadas à reprodução animal, que estão sendo aprimoradas a fim de aumentar a eficiência reprodutiva, maximizando assim a produção de ovinos geneticamente superiores, além de possibilitar o aproveitamento deste material genético para obtenção do maior número de descendentes em um espaço de tempo reduzido (RENESTO, 2004). Pela monta natural ou inseminação artificial (IA) pode-se obter aproximadamente um produto por ovelha ou cabra por ano, assim, novas biotecnologias foram desenvolvidas para acelerar os processos de melhoramento genético (CROCOMO et al., 2012).

A indústria da tecnologia de embriões recentemente sofreu uma importante mudança com o advento da produção *in vitro* (PIV), ocupando o Brasil lugar de destaque no ranking mundial em número de embriões produzidos dessa natureza (SENEDA, 2005). O Brasil é o primeiro país do mundo em número de embriões produzidos *in vitro*. Mesmo que a quantidade de embriões obtidos *in vivo* seja elevada, os obtidos pelo procedimento *in vitro* vêm ganhando espaço de destaque no país, confirmando que esta tecnologia é economicamente viável, bastante divulgada e empregada na pecuária moderna (SIMPLÍCIO et al., 2007).

Diferentes técnicas de maturação *in vitro* de oócitos imaturos (MIV), sua fertilização por espermatozoides igualmente capacitados *in vitro* (FIV) e desenvolvimento (DIV) em diferentes tipos de meios celulares ou definidos evoluíram nas últimas duas décadas. Essa biotécnica permite a produção de animais transgênicos, de extremo interesse para a medicina, bem como a realização de estudos em clonagem e preservação de animais de excelente nível genético, possibilitando a estocagem de oócitos para fertilização e produção de animais (TRALDI, 2006).

A produção *in vitro* (PIV) de embriões contribui para a aceleração da difusão do patrimônio genético por meio da redução do intervalo entre gerações, além de maximizar do número de nascimentos a partir de fêmeas de alto valor genético, principalmente quando doadoras pré-púberes são utilizadas (CROCOMO et al., 2012). O rendimento dessas técnicas pode ainda ser potencializado com o uso de protocolos de superovulação e criopreservação (LI et al., 2013; CARVALHO et al., 2011). Para a realização da biotécnica de produção *in vitro*, é fundamental a obtenção de oócitos, sendo esta uma etapa essencial (BALDASSARRE, 2012).

#### **4.2. Histórico e emprego em pequenos ruminantes**

A evolução das biotécnicas reprodutivas no Brasil foi iniciada com a Inseminação Artificial (IA), visando a multiplicação das características genéticas de reprodutores de alto valor genético (RENESTO, 2004). Após a introdução de protocolos de superovulação, recuperação e transferência de embriões, mais conhecida como *Multiple Ovulation and Embryo Transfer* (MOET), juntamente com a criopreservação de embriões, na década de 1980, passou-se a ter ferramentas importantes para o aumento o número de gestações em fêmeas de alto mérito genético (RODRIGUES, 2001).

Segundo THIBIER (2000), a produção embrionária por meio da transferência de embrião (TE) é uma biotécnica bastante difundida, que vem mostrando um crescimento acentuado. Já a PIV é considerada a terceira geração biotecnológica, após a IA e a TE. No início da década de 1990, com a introdução da aspiração folicular guiada por ultrassonografia em grandes ruminantes (*ultrasonografic ovum pick-up* – US-OPU), seguida pela produção *in vitro* de embriões, a expectativa no incremento da produtividade das fêmeas aumentou (RENESTO, 2004).

O primeiro bebê de PIV humano foi produzido por STEPTOE e EDWARDS (1978). Em 1982, foi anunciado o nascimento do primeiro bezerro de FIV, porém com oócito maturado *in vivo* (BRACKETT et al., 1982). O primeiro embrião de cordeiros oriundos da PIV fora produzido em meados da década de 1980, de oócitos ovinos maturados *in vitro* ou maturados *in vivo* (CROZET et al., 1987). Alguns anos



mais tarde, fora relatado o nascimento do primeiro cordeiro (CZLONKOWSKA, 1991) oriundo da realização de todas as etapas *in vitro*, isto é, desde a maturação dos oócitos até o desenvolvimento de mórulas.

Em pequenos ruminantes, a espécie ovina é a mais usada na pesquisa científica no campo da medicina, como modelo animal e para medicina veterinária com este mesmo fim, mas também para desígnio comercial. A laparoscopia vem sendo aplicada nessa espécie em diversos trabalhos como inseminação artificial (IA) intrauterina, colheita e transferência de embriões e ainda, para aspiração folicular (*laparoscopic ovum pick-up*, LOPU) para produção *in vitro* de embriões, apresentando resultados eficientes, no entanto, ainda necessitando de estudos para uma maior evolução (TRALDI, 2006; RODRÍGUEZ et al., 2006).

Em caprinos, os relatos são mais limitados, uma vez que a IA e a TE são realizadas predominantemente pela via transcervical. Porém, com o advento da transgenia, os caprinos têm sido bastante utilizados em estudos laparoscópicos, tornando esta área de pesquisa uma ferramenta essencial (BALDASSARRE, 2012). Além do enfoque comercial da produção de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*, a possibilidade de produção de animais transgênicos para indústrias farmacêuticas e produção de clones é tida como destaque (BALDASSARRE e KARATZAS, 2004).

#### **4.3. Aspiração de folículos ovarianos**

Ovários de abatedouros são abundantes fontes de oócitos de menor custo para a produção de embriões em larga escala (MARTINO et al., 1994; WANI, 2002). Além disso, oócitos de animais abatidos têm sido importantes na obtenção de embriões para diferentes propósitos de pesquisa, mas são de uso limitado para programas de melhoramento genético, visto que o histórico e o estado sanitário dos animais doadores são na maioria das vezes desconhecidos (ARMSTRONG et al., 1997).

A recuperação de oócitos de fêmeas vivas, realizada por via transvaginal guiadas por ultrassom, também conhecida como US-OPU, é uma técnica largamente

realizada em bovinos. Em pequenos ruminantes esse método é bastante limitado, principalmente em fêmeas pequenas, o que o torna de difícil execução, até para operadores com habilidade (GRAFF et al., 1999).

Em ovinos não é fácil manipular os órgão do sistema reprodutivo pelo reto, como ocorre em bovinos, bubalinos e equinos, optando-se por intervenções cirúrgicas para facilitar o diagnóstico e manejo reprodutivo (TERVIT, 1996). O rendimento da coleta de oócitos em cabras pela ultrassonografia não é maior que outras técnicas de OPU, como por laparotomia e por laparoscopia, podendo ser mais traumática ao ovário por não perfurar apenas o córtex durante a aspiração, enquanto que durante a colheita por ultrassom, a agulha usualmente alcança o folículo mediante perfuração do estroma ovariano (PIERSON et al., 2004).

A laparotomia é uma das técnicas na qual se realiza a exteriorização do trato reprodutivo (Figura 1), inevitavelmente acarreta considerável trauma cirúrgico, necessitando de extremo cuidado para reduzir a probabilidade de formação de aderências pós-operatórias, envolvendo útero, tubas e ovários dos animais (ISHWAR e MEMON, 1996). Durante o procedimento de aspiração, os ovários são expostos e as porções uterinas devem ser constantemente umedecidas com solução fisiológica, sendo os órgão supracitados lavados, ao término da aspiração, com a solução de NaCl 0,9% com 1% de DMSO e 0,2% de Heparina (BASSO et al., 2008). Pelo alto risco de infertilidade provocado pelas aderências formadas pelo procedimento, tais consequências tornam-na imprópria como método de obtenção de oócitos, a médio e longo prazo, especialmente em fêmeas de alto valor genético (FREITAS e SIMPLÍCIO, 2002).



Figura 1: Laparotomia em fêmea, ovina, adulta, para eternização do trato reprodutivo interno, incluindo o ovário (seta), para aspiração folicular. Fonte: Centro de Pesquisa de Caprinos e Ovinos do Estado do Pará, 2006, arquivo pessoal.

A laparoscopia se destaca por ser uma técnica menos invasiva, proporcionando recuperação dos animais mais rápida, sendo a abordagem videocirúrgica realizada por meio de um endoscópio introduzido transabdominalmente, de modo a serem observados os órgãos no interior das cavidades abdominal e pélvica, podendo ser realizada diversas vezes, se necessário (BALDASSARRE, 2012; TEIXEIRA et al., 2011). Assim, diferentes técnicas de videolaparoscopia estão sendo aplicadas em animais de produção, para biópsias hepáticas, cistotomias, ruminoscopias, ovariectomias e aspirações foliculares (TEIXEIRA et al., 2011b).

#### **4.4. Estimulação hormonal para punção folicular**

Os oócitos utilizados para a PIV de embriões ovinos podem ser obtidos de fêmeas submetidas ou não a tratamento hormonal prévio (BERRNARDI, 2005), sendo que em animais não estimulados o número de oócitos recuperados é de

quatro a seis por fêmea, sendo considerado um valor baixo, o que torna indispensável à estimulação ovariana para melhores índices reprodutivos (BERLINGUER et al., 2004).

Para a sincronização de estro das fêmeas, os progestágenos (acetato de medroprogesterona, acetato de flurogestona, entre outros) são amplamente utilizados, a fim de se obter melhor qualidade folicular. Os protocolos curtos estão sendo propostos para pequenos ruminantes, fundamentados na hipótese de que os tratamentos longos resultariam em concentrações sub-luteais de progesterona, favorecendo a persistência e o crescimento excessivo do folículo dominante (TEIXEIRA et al., 2011; BALDASSARRE e KARATZAS 2004).

A estimulação ovariana pode ser realizada por FSH em únicas ou múltiplas aplicações de 24 à 72 horas, em intervalo médio de 12 horas, antes das aspirações, por diferentes vias de aplicação (PTAK et al., 1999), em doses únicas de eCG (ANEL et al., 1997), ou até com aplicação de FSH e LH combinados ou não ao uso de eCG. O uso do FSH (80mg) e eCG (300UI) é o protocolo de estimulação ovariana mais utilizado, obtendo-se boa taxa de recuperação e maturação oocitária em ovelhas adultas (BALDASSARRE, 2012; TEIXEIRA et al., 2011).

Alguns protocolos incluem o uso de agonistas ou antagonistas de GnRH, associados ao tratamento com progestágenos, com a finalidade de suprimir a produção de gonadotrofinas e impedir o crescimento de folículos acima de 1 a 2mm. Como o pré-tratamento com agonista, a busserelina, ou antagonista com antarelix por 10 dias (0,5mg/dia), comprovaram a supressão dos folículos ovarianos maiores e a duplicação do número de folículos pequenos, aumentando em 50% a resposta dos ovários ao FSH (COGNIÉ et al., 2004).

Apesar da maior praticidade dos protocolos de dose única, foi descrito que a aspiração folicular realizada após tratamento com dose única de 150UI de eCG, proporcionou um menor número de oócitos, comparado com fêmeas não tratadas, com diferenças na qualidade dos complexos de oócitos e células granulosas. Foi constatado também, em programas de inseminação artificial e aspiração folicular, que o uso repetido de estimulações com eCG e FSH favorecem o desenvolvimento de anticorpos anti-eCG e anti-FSH, devido à resposta imunológica do animal aos primeiros tratamentos, resultando na redução da taxa de fertilidade (CORDEIRO,

2006; RUBIANES et al., 2003). No entanto, estudos mais recentes verificaram que isso não ocorre em repetidas sessões em animais estimulados na espécie ovina (TEIXEIRA et al. 2011).

A taxa de recuperação (número de oócitos obtidos/ número de folículos aspirados) situa-se entre 40 a 90%. Dos oócitos obtidos, 60 a 80% são selecionados para os procedimentos de maturação e fecundação *in vitro*. O número de oócitos obtidos por aspiração via videolaparoscopia é em média 14 oócitos/ovelhas, sendo que a taxa de aspiração de oócitos obtidos de ovários de matadouro é semelhante à observada com oócitos aspirados por laparoscopia em fêmeas estimuladas (BALDASSARRE, 2012; PTAK et al. 1999). As variações dessas taxas podem ser justificadas por vários fatores, como calibre da agulha, pressão e calibre do sistema de aspiração e tamanho de folículos aspirados (RODRÍGUEZ, 2006).

Em ovelhas pré-púberes, verificou-se que a aspiração não causou influência no ganho de peso e no início da puberdade (VALASI et al., 2009), além de apresentar resultados significativos em relação ao número de oócitos obtidos em cada sessão, porém com resultados desfavoráveis na MIV. Em caprinos pré-púberes, verificou-se um número de oócito recuperados é praticamente duas vezes maior que em animais adultos, demonstrando percentual de MIV's semelhantes entre ambas às faixas etárias (KOEMAN et al., 2003).

#### **4.5. Aspiração folicular em ovinos e caprinos**

Para a realização da aspiração folicular por videolaparoscopia os animais devem inicialmente ser submetidos a um jejum de 36 horas de sólido e líquido, e em casos de animais com maior porte até 48 horas. Mesmo que o intervalo seja consideravelmente longo, a aplicação do jejum é indispensável na tentativa de diminuir o volume de conteúdo ruminal, melhorar a visão dentro da cavidade abdominal, bem como evitar problemas de timpanismo e refluxo gástrico. Associado ao jejum, realiza-se a intubação endotraqueal com sondas (de 8 mm), com balonete insuflável, evitando a aspiração do conteúdo ruminal em caso de regurgitação, a fim

de permitir o fornecimento de oxigênio medicinal umidificado, sob ventilação assistida, quando possível (TEIXEIRA et al., 2011; CORDEIRO, 2006).

Os animais sujeitos à foliculocentese devem ser submetidos à anestesia geral, tendo como opção de medicação pré-anestésica o cloridrato de xilazina 0,05 mg/Kg (IM), acepromazina isolada ou em conjunto com midazolam, 0,05 mg/Kg e 0,1 mg/kg (IV), clorpromazina 1,0 mg/kg (IM), tramadol 2mg/kg (EURIDES et al., 2002, TEIXEIRA et al., 2011). Para indução, pode-se utilizar cloridrato de cetamina na dose de 2mg/Kg (IV), propofol na dose de 3 a 6 mg/kg (IV, dose resposta) ou tiopental 5 –10 mg/kg (IV). Para manutenção anestésica, utiliza-se anestesia inalatória com halotano ou isofluorano (TEIXEIRA et al., 2012), ou infusão contínua a base de propofol, na dose de 0,5mg/kg/min. (IV) mais bolus, e infusão de cloridrato de lidocaína 1mg/kg/min (IV) (TEIXEIRA et al., 2011) éter gliceril guaiacol (EGG) na dose de 50mg/mL (5%), 0,1mg/mL de cloridrato de xilazina 1mg/mL de cloridrato de cetamina a 10%, diluídos em 500 mL de solução glicofisiológica e infundidos a 2 mL/Kg/h, cerca de 10 a 15 gotas/min, de acordo com o plano anestésico (CORDEIRO, 2006).

Após indução anestésica, os animais são contidos e posicionados em *Trendelenburg*, forma convencional para o procedimento, inclinando a maca em ângulo aproximado de 45°, condição que facilita a visualização do sistema geniturinário, por deslocar os órgãos gastrointestinais no sentido cranial. Esse posicionamento pode, em alguns casos, promover a depressão respiratória dos animais, por pressão dos órgãos abdominais ao diafragma, e por isso há necessidade de maior atenção ao monitoramento cardiorrespiratório ou reverter o procedimento sem *Trendelenburg*, caso necessário (TEIXEIRA et al., 2011; WIECZOREK et al., 2010).

Na técnica descrita por TEIXEIRA et al., (2011), após obtida a manutenção anestésica, analgesia local e realizado o posicionamento em *Trendelenburg*, é procedida incisão cutânea com o auxílio de um bisturi, seguido da introdução dos trocâteres (de 5 ou 10 mm), usando três portais para o procedimento, estabelecendo a triangulação necessária. O pneumoperitônio com CO<sub>2</sub> deve obter pressão intrabdominal (PIA) de 5 mmHg e velocidade de insuflação de 5 L/min, permitindo a manipulação do útero, tubas e bursas ováricas e individualização dos ovários,

fixando o órgão pelo mesovário e de maneira a evitar lesar qualquer estrutura da cavidade abdominal e destas estruturas (Figura 2).

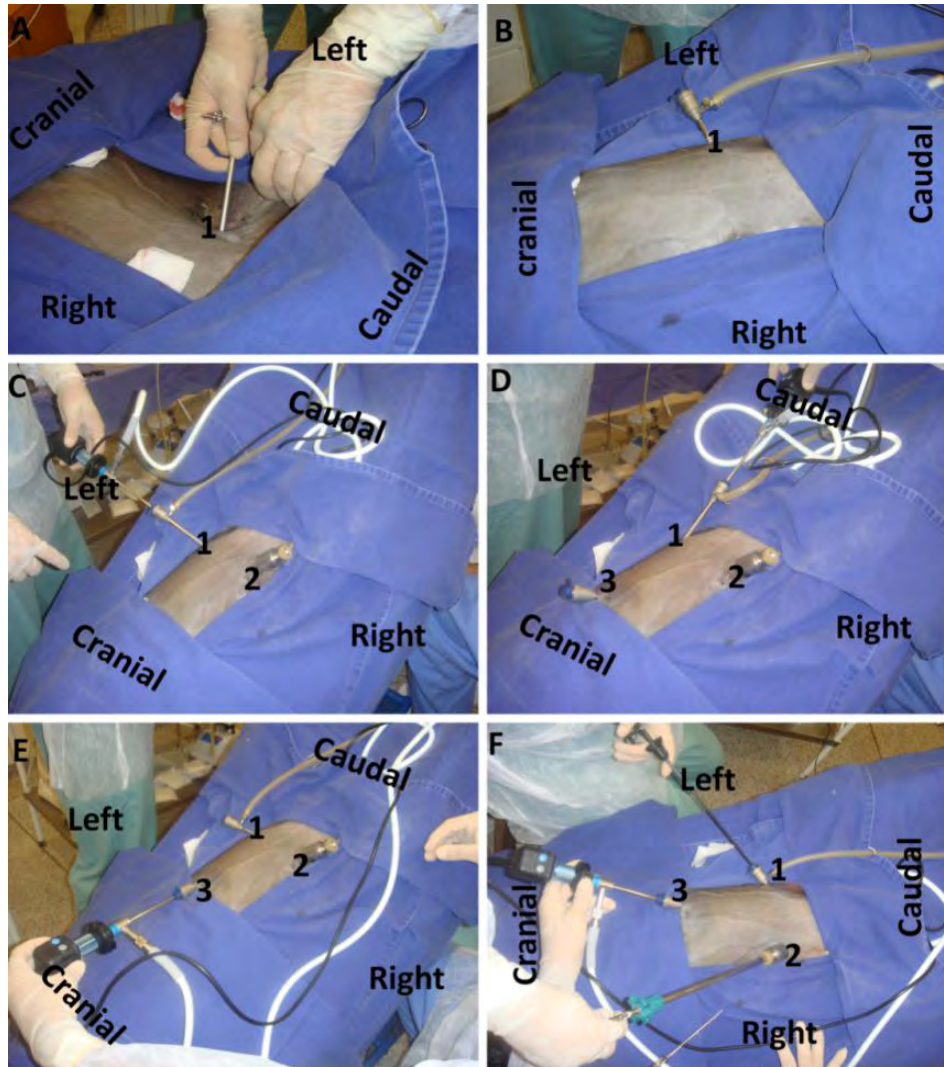


Figura 2: Imagens fotográficas representando as etapas da aspiração folicular por videolaparoscopia (LOPU) em ovelha. (A) Colocação pela técnica fechada do primeiro trocáter com válvula de insuflação (1). (B) Estabelecimento do pneumoperitônio, insuflando pelo primeiro trocáter (1). (C) Posicionamento videoassistido do segundo trocáter (2). (D) Posicionamento videoassistido do terceiro trocáter (3). (E) Posicionamento do endoscópio para o terceiro trocáter (3). (F) Posicionamento final dos portais laparoscópicos, sendo a câmera no terceiro trocáter (3) e pinças atraumáticas no primeiro e segundo trocáter (1 e 2). Fonte: TEIXEIRA et al. 2011c.

Previamente à aspiração folicular, os ovários devem ser examinados e o número de folículos com dimensões entre 2 - 8 mm contabilizados. Em seguida, a agulha de aspiração é introduzida de forma percutânea na cavidade próxima ao local onde se encontra o ovário. A punção é realizada movimentando os ovários em diferentes posições, com auxílio da pinça de manipulação atraumática. A agulha é colocada em posição paralela à superfície ovariana, o que permite as perfurações dos folículos nas suas extremidades. Uma vez inserida no folículo, a agulha é cuidadosamente movida para garantir que todo o seu conteúdo seja aspirado, como observado na Figura 3 (BALDASSARRE, 2012; TEIXEIRA et al., 2011).

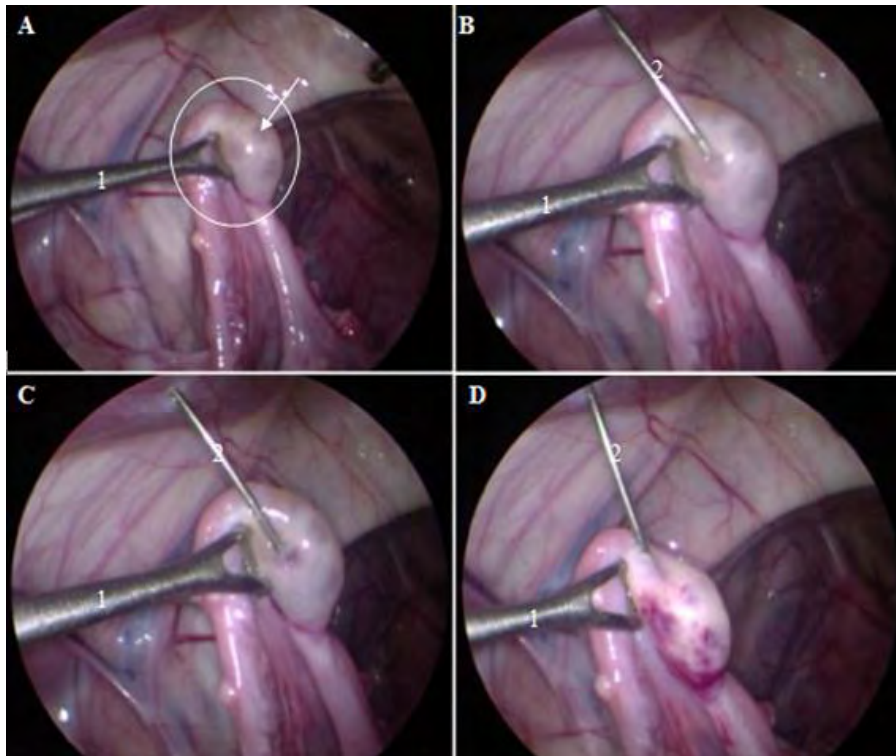


Figura 3: Imagens videolaparoscópicas da cavidade abdominal de uma ovelha em aumento aproximado de 10X, notando a fixação do ovário (Circulo) pela pinça de apreensão atraumática (1), e presença de folículos na superfície ovariana (seta) (A); posicionamento da agulha (2) para aspiração(B), e a aspiração dos folículos (C e D). Fonte: TEIXEIRA et al., 2011.

É citado o uso de agulhas 20G ou 22G com haste de aspiração longa, frequentemente usada comercialmente, porém pode ser utilizado um sistema de



aspiração com lúmen simples, composto de uma agulha de 16G ou 18G com bisel curto, que apresenta maior rendimento e promove menor lesão aos oócitos aspirados. Para estabelecer a pressão de aspiração existem vários modelos de bomba para OPU. O ideal é que o equipamento possua o esfigmomanômetro calibrado a uma pressão de vácuo, no máximo 50 mmHg, assegurando a qualidade desta etapa do procedimento. Previamente à aspiração dos oócitos, é ideal realizar uma lavagem do sistema com o meio de coleta (PBS com heparina), deixando ao final deste procedimento aproximadamente 2 mL de meio para receber os oócitos (BALDASSARRE, 2012; WIECZOREK et al., 2010; RODRÍGUEZ et al., 2006).

Ao término das aspirações, recomenda-se a lavagem dos ovários, visando evitar a formação de aderências nos órgãos reprodutivos entre si e com trato gastrointestinal, observadas por CORDEIRO (2006) e STANGL et al., (1999). Para remoção de coágulos de superfície e lavagem dos tecidos envolvidos, podem ser utilizadas substâncias como soluções heparinizadas, carboximetilcelulose, solução de NaCl 0,9% (TEIXEIRA et al., 2011; BALDASSARRE e KARATZAS, 2004; EWOLDT et al., 2004).

A dermorráfia deve ser realizada com pontos tipo Wolff e fios não absorvidos, podendo ser nylon 2-0 ou até mesmo nylon 0,30 de pesca, autoclavado, como uma opção alternativa na falta de um material mais adequado. Em sequência procede-se a limpeza das feridas cirúrgicas com solução antisséptica (Clorexidine, polivinilpolvidona Iodo) e utilização de pomada repelente/cicatrizante ao redor da ferida cirúrgica. Após serem retiradas da maca cirúrgica, as fêmeas devem ser colocadas em local limpo e tranquilo, sendo observadas até ficarem em posição quadrupedal (BALDASSARRE, 2012; TEIXEIRA et al., 2011; WIECZOREK et al., 2010).

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. Animais e tratamentos

O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Câmpus Jaboticabal - São Paulo – Brasil (protocolo nº 002478/11).

Foram utilizadas 36 ovelhas da raça Santa Inês, com idade entre quatro a oito semanas, escore de condição corporal médio de 3,0 (JEFFERIES, 1961), peso médio de  $12,3 \pm 3,4$  kg, consideradas híginas após realização de exame físico geral e do sistema reprodutivo.

Para eliminar as variáveis de “momento da LOPU”, realizou-se uma avaliação prévia com a utilização de dois grupos de quatro animais, também recém-desmamados de mesma idade, submetidos ao procedimento LOPU e ultrassonografia modo-B, 48 horas após o início da estimulação ovariana e 60 horas após o início deste protocolo.

Previamente à estimulação, exceto para os animais do GCN, foi realizada a indução de onda folicular com o uso implante intravaginal impregnado com 60mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP, Progespon®, Schering-Plough, Brasil) em um dia aleatório do ciclo estral (Dia 0), permanecendo com o progestágeno por um período de seis dias. No D5 foram aplicados 300UI de eCG (Novormon®, Schering-Plough, Brasil) via intramuscular. Esse protocolo teve a finalidade de induzir uma onda folicular após 36 horas da retirada dos progestágenos, iniciando o recrutamento de uma nova onda folicular após 12 horas (TEIXEIRA et al, 2011), realizando a estimulação ovariana passadas 48 horas da retirada do progestágeno, para a estimulação de uma nova onda folicular (Anexo 1).

A estimulação ovariana foi realizada com a administração de 300 UI de eCG (Novormon®, Schering-Plough, Brasil) mais FSHp administrado, junto ou iniciado com a administração do eCG, de acordo com o grupo experimental.

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos, de acordo como tratamento empregado (t=6), tendo como variáveis a dose e a forma de

administração de FSH (Folltropin®, Schering-Plough, Brasil), utilizando 80 e 160mg, aplicações únicas ou múltiplas, respectivamente. Os grupos experimentais foram separados da seguinte forma: dois grupos de 80 mg de FSH, um com dose única (G80U); e outro com múltiplas aplicações constantes de 20 mg, com intervalo de 12h entre as aplicações (G80M); outros dois grupos de 160 mg, da mesma forma dos grupos de 80mg, também com dose única (G160U); e com múltiplas aplicações constantes de 40 mg (G160M).

Além dos grupos tratados, a fim de avaliar a variável do protocolo de indução de onda folicular, foram estabelecidos dois grupos controles: o primeiro com nenhum tratamento hormonal, nem para indução de onda folicular, nem para estimulação ovariana (GCN); o segundo com indução da onda folicular, porém sem estimulação ovariana (GCI) – (Anexo 1).

## **5.2. Videolaparoscopia para aspiração folicular**

Após jejum hídrico e alimentar de 36 horas, os animais foram submetidos à anestesia, com administração pré-anestésica (MPA) de tramadol 2mg/kg (Tramal® Cristalia. Brasil, IM) e, após 15 minutos, indução com 6mg/kg de propofol (IV - Propofol® Cristalia. Brasil), mantida com anestesia inalatória a base de isofluorano (Isofluorano® Cristalia. Brasil, 2 CAM).

Após a indução anestésica, os animais foram intubados utilizando sondas endotraqueais de 6 mm, com balonete insuflável. Em seguida, procedeu-se a tricotomia e o preparo asséptico do campo cirúrgico, seguido de bloqueio anestésico local infiltrativo com 0,4 mL de cloridrato de lidocaína (Lidovet®, Bravet, Brasil), sendo 0,2 mL utilizados para infiltração no subcutâneo e 0,2 mL intramuscular.

Depois de alcançada a manutenção anestésica e anestesia local, as fêmeas foram posicionadas em decúbito dorsal com posterior inclinação em 45° (*Trendelenburg*). Com o auxílio de um bisturi, fez-se pequena incisão cutânea, 10 a 15 cm cranial ao úbere e 5 cm à direita da linha média, para facilitar a introdução as cegas do primeiro trocáter de 5 mm, com válvulas para insuflação (Endoscopy

Surgery, Rio de Janeiro, Brasil), estabelecendo o pneumoperitônio com CO<sub>2</sub>, utilizando pressão intrabdominal (PIA) de 5 mmHg e velocidade de insuflação de 5 L/min. Por esse trocáter foi introduzido o laparoscópio de 5 mm, conectado a uma câmera e cabo de fibra ótica, fornecendo luz para o interior da cavidade, com imagem visualizada em monitor. Seguiu-se a introdução videoassistida do segundo trocáter de 5 mm em posição antimérica ao primeiro e terceiro de 5 mm na linha média 20 cm cranial ao úbere.

Ato contínuo, o endoscópio foi transferido para o terceiro trocáter obtendo-se campo visual. Sequencialmente, introduziram-se pelo primeiro e segundo trocáteres as pinças atraumáticas (Babcock), que permitiram a manipulação do útero, tubas e bursas ováricas e individualização dos ovários, que eram fixados com estes instrumentos, pelo mesovário, para evitar lesões nas estruturas.

Previamente à aspiração dos folículos, os ovários foram avaliados e o número dessas estruturas com dimensões entre 2-8 mm foram contabilizadas. Em seguida, introduziu-se a agulha de aspiração na cavidade próxima ao local onde se encontrava o ovário e a punção folicular foi realizada movimentando os ovários em diferentes posições, com a pinça de manipulação atraumática. Inicialmente, a agulha foi colocada em posição paralela à superfície ovariana, o que permitiu as perfurações dos folículos em suas extremidades. Uma vez inserida no folículo, a agulha foi cuidadosamente movida para garantir que todo o seu conteúdo fosse aspirado. A pressão do vácuo foi ajustada para no máximo 50 mmHg.

Utilizou-se um sistema de aspiração com lúmen simples, composto de uma agulha de 18G com bisel curto (Cateter 18G - Angiocath, BD, Brasil), conectada a uma cânula de teflon de 50 cm de comprimento e conectada a uma rolha de silicone, a qual foi acoplada ao tubo de colheita (50 mL). O vácuo foi produzido por uma bomba de aspiração (500 BRS, Nevoni, Brasil) adaptada com esfigmomanômetro, segundo utilizado por Teixeira et al. (2011). Previamente à aspiração dos oócitos, realizou-se lavagem do sistema com o meio de coleta (PBS com heparina), proporcionando ao final deste procedimento aproximadamente 2 mL do referido meio para receber os oócitos.

Ao término das aspirações, os ovários foram lavados com 10 mL de solução de NaCl 0,9% para remoção de coágulos da superfície, minimizando a formação de

aderências. As dermorráfias foram realizadas por pontos tipo Wolff, com nylon 2-0, sem necessidade de sutura da camada muscular e redução de espaço subcutâneo. Ato contínuo, procedeu-se a limpeza da ferida cirúrgica com polivinilpirrolidona-iodo e utilização de unguento (Unguento Plus, Pearson, Brasil) ao redor da ferida cirúrgica.

### **5.3. Avaliações intraoperatória**

O transcirúrgico foi dividido em cinco etapas: início de cirurgia (IC); entrada do primeiro portal laparoscópico (P1); entrada do segundo e terceiro portal (P23); manipulação e aspiração do primeiro ovário (MA1); manipulação e aspiração do segundo ovário (MA2); e inspeção da cavidade, retirada do pneumoperitônio e dermorráfia (D). Em cada etapa foram registradas possíveis intercorrências, particularidades e tempo cirúrgico, também cronometrado o tempo cirúrgico total.

### **5.4. Avaliação pós-cirúrgica**

Após serem retiradas da maca cirúrgica, as fêmeas foram colocadas em local limpo e tranquilo, sendo observadas até ficarem em posição quadrupedal. Em seguida, os animais foram avaliados nas primeiras 6 horas de acordo com o comportamento doloroso (TEIXEIRA et al., 2011b adaptado de MELLOR e STAFFORD, 2004). Esta avaliação consistiu em uma pontuação para cifose, dificuldade de movimentos e procura de alimento. A pontuação foi de 0 (nenhum desconforto), 1 (pequena manifestação dolorosa) e 2 (acentuada manifestação dolorosa) para cada variável avaliada e o resultado final foi a soma dos escores de cada, variando de 0 a 6 na pontuação final.

Realizou-se também a avaliação do processo inflamatório e cicatricial durante um período do pós-cirúrgico, no qual foram coletadas amostras sanguíneas, coletando-se por meio de punção da veia jugular durante no pré, pós-cirúrgico

imediatos, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 e 16 dias após as videolaparoscopias, objetivando-se mensurar os níveis séricos de fibrinogênio, analisado por precipitação pelo calor (56 °C) e leitura do plasma em refratômetro manual, com valores expressos em mg/dL.

Ademais, uma amostra de 25% (n=9) desses animais fora submetida a uma segunda videolaparoscopia exploratória, a fim de analisar macroscopicamente as possíveis lesões secundárias no trato genital interno e formações de aderências.

### **5.5. Análises dos oócitos recuperados e maturação *in vitro***

O número de folículos visualizados (FV), aspirados (FA) e oócitos recuperados (OR), foi contabilizado, sendo as médias desses valores e a taxa de recuperação (percentual de OR/FA - TRO), analisados comparativamente entre os grupos.

Os oócitos recuperados foram colocados em meio de coleta, composto por PBS suplementado com 10 UI/mL de heparina e aquecido em banho-maria a 36°C. Em laboratório, o líquido aspirado foi cuidadosamente depositado em placas de Petri e levado à observação em estereomicroscópio em aumento de 40X. Uma vez localizados, os oócitos foram transferidos para outra placa contendo 300 a 500 µL de meio de lavagem (TCM 199, antibiotico, piruvato, soro fetal bovino, hepes sodico e hepes acido) e então classificados em graus I, II, III e degenerados, de acordo com sua qualidade (PADILHA, 2012), adaptado de LEIBFRIED e FIRST (1979), sendo tidos como viáveis de graus I a III, apresentando citoplasma com coloração brilhante e aspecto uniforme.

Em seguida, os oócitos foram passados em três gotas de 100 a 200 µL de meio de lavagem e levados para cultivo em placas contendo gotas de 100 µL de meio de maturação sob óleo mineral, onde permaneceram durante 24 horas em estufa a 39°C, com 5,0% de CO<sub>2</sub> em ar e atmosfera úmida, seguindo o processo de maturação *in vitro* (CHERR et al. 1988). Os oócitos foram transferidos para uma gota do corante Hoechst 33342 diluído em glicerol, fixados entre lâmina e lamínula, vedados com esmalte, e levados à microscopia confocal para observação do estágio

de maturação nuclear e citoplasmática, comparando as MIV's para cada sessão de aspiração.

A classificação dos estádios de maturação nuclear foi realizada segundo Wang et al. (1998) adaptada, baseada na morfologia do DNA, por graus variados de condensação dos cromossomos: (1) oócitos maturados (MII), em que era possível observar a formação de um eixo em metáfase na periferia do ooplasma, com expulsão do primeiro corpúsculo polar; (2) oócitos imaturos (MI), os quais a placa metafásica não era observada; e (3) oócitos degenerados/não passíveis de determinação (D/NI), cujo estágio de desenvolvimento nuclear não era passível de determinação ou não apresentavam cromatina evidente (Anexo 1).

A classificação da maturação citoplasmática foi avaliada de acordo com a distribuição dos grânulos corticais no citoplasma do oócito (APPARÍCIO-FERREIRA, 2006; PIRES-BUTTLER, 2010): imaturo (I): grânulos corticais distribuídos uniformemente por todo o citoplasma; maturação citoplasmática incompleta (MCI), mas em estágio transicional de maturação – grânulos corticais dispersos no citoplasma e também na região periférica do oócito, próximos à membrana plasmática; maturação citoplasmática completa (MCC): grânulos corticais dispersos somente na periferia do oócito, próximos à membrana plasmática.

## 5.6. Análise estatística

Todos os dados foram submetidos a teste de normalidade e expressos em médias  $\pm$  desvio padrão. Os dados sobre: momentos das etapas intraoperatórias, folículos visualizados, folículos aspirados e oócitos recuperados foram submetidos à análise de variância One Way ANOVA (para médias não repetidas) e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Os dados de quantidade e a qualidade dos oócitos, taxa de recuperação oocitária, dados da maturação *in vitro*, foram expressos em valores absolutos e relativos (porcentagem), e submetidos à análise de variância para médias não repetidas (GLM) e teste de Tukey ( $p < 0,05$ ), utilizando o programa estatístico SAS<sup>®</sup>.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Videolaparoscopia para aspiração folicular e avaliações intraoperatória

A realização de jejum hídrico e alimentar de 36 horas, possibilitou uma adequada manipulação e visualização da cavidade abdominal, além de prevenir o refluxo de conteúdo ruminal, que ocorreu em três ovinos (8,3%), dos quais dois animais (5,5%) apresentaram distensão do rúmen em sentido craniocaudal, causando dificuldade para visualização da cavidade abdominal, condição que não impossibilitou a realização do procedimento. Observou-se depressão respiratória em 33,33% dos procedimentos, resultante do posicionamento de *Trendelenburg* empregado no presente estudo.

A duração média dos procedimentos cirúrgicos foi de  $24,3 \pm 5,2$  min., com o tempo de cada etapa descrito na Figura 4. Observou-se diferença significativa entre o tempo dos momentos cirúrgicos realizados ( $p < 0,05$ ), sendo que a manipulação dos ovários e as aspirações dos folículos ovarianos (MO1 e MO2) foram as etapas mais longas.

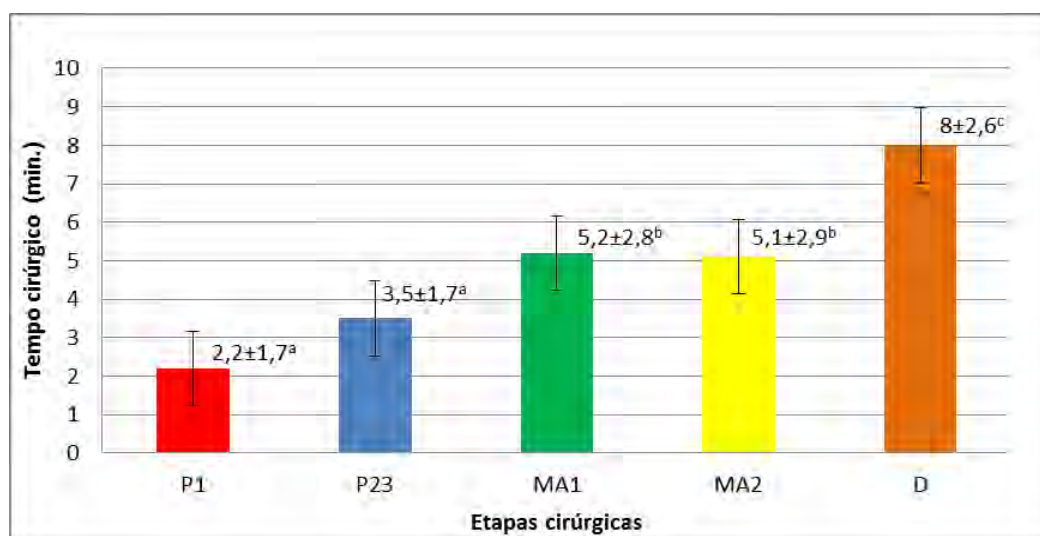


Figura 4: Representação do tempo cirúrgico em cada etapa do procedimento de LOPU. Letras iguais não demonstram diferenças



significativas ( $p>0,05$ ) e letras diferentes demonstram tais diferenças ( $p<0,05$ ). P1 – Entrada do primeiro portal laparoscópico; P23 – Entrada do segundo e terceiro portais laparoscópicos; MA1 – Manipulação e apreensão do primeiro ovário; MA2 – Manipulação e apreensão do segundo ovário; D – Inspeção final e dermorrafia.

O conjunto agulha 18G com bisel curto, sistema de aspiração lúmen simples, bomba de aspiração adaptada com esfigmomanômetro e pressão de 50 mmHg foram eficientes para recuperação de oócitos. Observou-se discreto sangramento pelas punções foliculares e a lavagem dos ovários promoveu a remoção de coágulos, evitando a formação de aderências, na amostra avaliada.

## **6.2. Avaliação pós-cirúrgica**

Todas as ovelhas apresentaram boa recuperação pós-anestésica, mantendo-se em posição quadrupedal sem dificuldades logo após os procedimentos e não apresentando qualquer desconforto doloroso aparente, sendo verificado escore médio para desconforto doloroso de  $0\pm 0,5$ .

Os níveis séricos de fibrinogênio plasmático apresentaram-se dentro dos valores de normalidade estabelecida por JAIN (1993) para a espécie ovina (100 a 500 mg/dL), não havendo diferença estatística entre os momentos avaliados ( $p>0,05$ ), como observado na Figura 5.

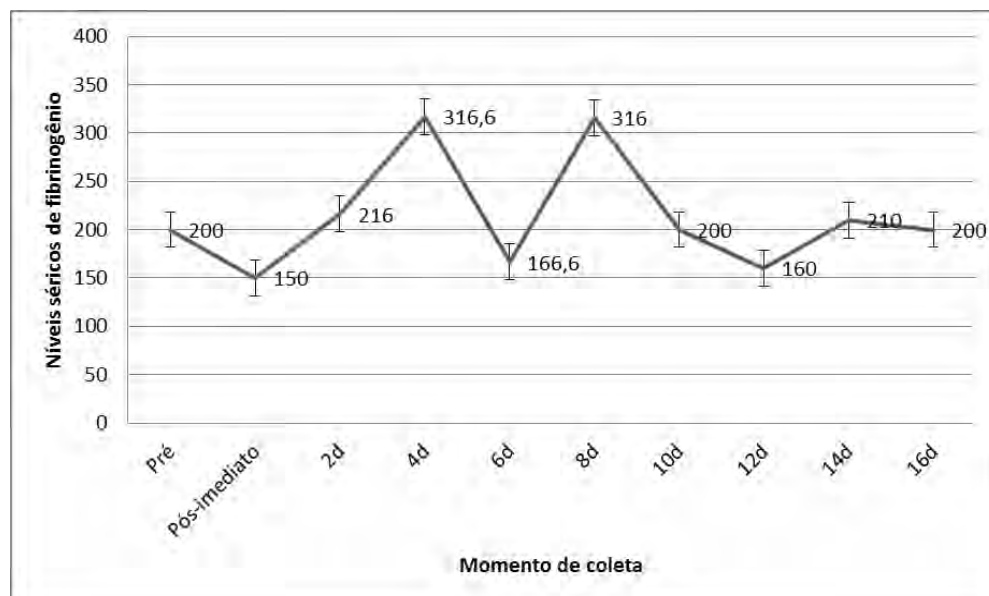


Figura 5: Níveis séricos de fibrinogênio em ovinos recém-desmamados submetidos a aspiração folicular, não demonstrando alterações em relação aos valores basais para a espécie ovina (100 a 500 mg/dL - JAIN, 1993).

### 6.3. Análises dos oócitos recuperados e maturação in vitro

Na avaliação do melhor “momento da LOPU”, constatou-se que 48 horas era o momento em que haviam mais folículos aspiráveis (2 a 8 mm). Sendo assim, aspirações foram realizadas 48 horas após o início das estimulações, de acordo com o grupo em questão.

As médias do número de folículos visualizados, aspirados e oócitos recuperados e a taxa de recuperação estão demonstradas na tabela 1.

Tabela 1: Resultados relacionados à média, mais desvio padrão de folículos visualizados (FV), folículos aspirados (FA), oócitos recuperados (OR) e taxa de recuperação (TR) por grupo experimental.

	GCN	GCI	G80U	G80M	G160U	G160M
FV	10,5±4,2 <sup>a</sup>	8,1±5,4 <sup>a</sup>	11,4±3,3 <sup>a</sup>	10,8±5,1 <sup>a</sup>	10,8±5,2 <sup>a</sup>	9,4±5,3 <sup>a</sup>
FA	5,6±1,9 <sup>a</sup>	7,3±4,5 <sup>b</sup>	9,4±1,6 <sup>b</sup>	7,8±2,4 <sup>b</sup>	8,1±3,4 <sup>b</sup>	9,0±2,6 <sup>b</sup>
OR	1,1±1,6 <sup>a</sup>	1,1±1,8 <sup>a</sup>	4,6±3,2 <sup>b</sup>	2,2±0,8 <sup>a</sup>	5,8±3,1 <sup>c</sup>	3,0±2,0 <sup>a</sup>
TR(%)	19,60 <sup>a</sup>	15,05 <sup>a</sup>	48,9 <sup>c</sup>	37,5 <sup>b</sup>	71,6 <sup>d</sup>	33,3 <sup>b</sup>

Letras iguais não demonstram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) e letras diferentes demonstram tais diferenças ( $p < 0,05$ ).

FV – Folículos visualizados.

FA – Folículos aspirados.

OR – Oócitos recuperados.

Também houve diferença nos oócitos classificados como viáveis para o G80U e G160U ( $p>0,05$ ), sendo a distribuição de frequência dos graus de classificação de oócitos observado Tabela 2.

Tabela 2: Resultados relacionados à média de qualidade oocitária, total de oócitos viáveis e valores totais por grupo experimental, observando os valores em percentuais e absolutos.

	<b>GCN</b>	<b>GCI</b>	<b>G80U</b>	<b>G80M</b>	<b>G160U</b>	<b>G160M</b>
GI	28,5(2) <sup>a</sup>	14,2(1) <sup>a</sup>	34,4(7) <sup>b</sup>	9,0(1) <sup>a</sup>	54,0(20) <sup>c</sup>	20(3) <sup>a</sup>
GII	28,5(2) <sup>a</sup>	0(0) <sup>a</sup>	17,3(4) <sup>b</sup>	9,0(1) <sup>a</sup>	16,2(6) <sup>c</sup>	13,3(2) <sup>a</sup>
GIII	14,2(1) <sup>a</sup>	14,2(1) <sup>a</sup>	34,4(7) <sup>b</sup>	36,3(4) <sup>a</sup>	18,9(7) <sup>c</sup>	46,6(7) <sup>a</sup>
Deg	28,5(2) <sup>a</sup>	71,4(5) <sup>a</sup>	17,3(4) <sup>b</sup>	45,4(5) <sup>a</sup>	10,8(4) <sup>c</sup>	20(3) <sup>a</sup>
Total de OV	61,2(5) <sup>a</sup>	28,4(2) <sup>a</sup>	86,1(18) <sup>b</sup>	54,3(6) <sup>a</sup>	89,1(33) <sup>c</sup>	79,9(12) <sup>a</sup>
Total geral	7 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	22 <sup>b</sup>	11 <sup>a</sup>	37 <sup>c</sup>	15 <sup>a</sup>

Letras iguais não demonstram diferenças significativas ( $p>0,05$ ) e letras diferentes demonstram tais diferenças ( $p<0,05$ ).

GI – oócitos classificados como grau I.

GII – oócitos classificados como grau II.

GIII – oócitos classificados como degenerados.

Deg – oócitos classificados como degenerados.

OV – Oócitos Viáveis, números em percentual e absolutos.

Observou-se maior quantidade de oócitos recuperados para o G80U e G160U em relação aos demais grupos ( $p>0,05$ ). Quanto à maturação oocitária, verificou-se que o G160U apresentou melhor qualidade na maturação nuclear e citoplasmática ( $p>0,05$ ) do que os outros tratamentos, observado na Tabela 3 e Anexo 1.

Tabela 3: Resultados relacionados à maturação nuclear em relação a cada grupo experimental, observando os valores em percentuais e absolutos.

	<b>GCN</b>	<b>GCI</b>	<b>G80U</b>	<b>G80M</b>	<b>G160U</b>	<b>G160M</b>
<b>Maturação Nuclear</b>						
MII	0(0) <sup>a</sup>	0(0) <sup>a</sup>	16,6(3) <sup>a</sup>	33,3(2) <sup>b</sup>	63,6(21) <sup>c</sup>	46,1(6) <sup>b</sup>
MI	0(0) <sup>a</sup>	0(0) <sup>a</sup>	27,7(5) <sup>b</sup>	33,3(2) <sup>b</sup>	18,1(6) <sup>a</sup>	30,7(4) <sup>b</sup>
D/NI	100(5) <sup>a</sup>	100(2) <sup>a</sup>	55,5(10) <sup>c</sup>	33,3(2) <sup>b</sup>	18,1(6) <sup>a</sup>	23,0(3) <sup>a</sup>
<b>Maturação Citoplasmática</b>						
MCC	0(0) <sup>a</sup>	0(0) <sup>a</sup>	11,1(2) <sup>a</sup>	33,3(2) <sup>b</sup>	69,6(23) <sup>c</sup>	46,1(6) <sup>b</sup>
MCI	20(1) <sup>a</sup>	0(0) <sup>a</sup>	38,8(7) <sup>b</sup>	16,6(1) <sup>a</sup>	15,1(5) <sup>a</sup>	23,0(3) <sup>a</sup>
I	80(4) <sup>a</sup>	100(2) <sup>a</sup>	50(9) <sup>c</sup>	50(3) <sup>c</sup>	15,1(5) <sup>a</sup>	30,7(4) <sup>b</sup>

Letras iguais não demonstram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) e letras diferentes demonstram tais diferenças ( $p < 0,05$ ).

MII – oócitos maturados.

MI – oócitos imaturos.

D/NI – oócitos degenerados/não passíveis de determinação.

MCC – maturação citoplasmática completa.

MCI – maturação citoplasmática incompleta.

I – imaturos.

## 7. DISCUSSÃO

O refluxo ruminal observado no estudo fora relatado como complicação comum em ovinos submetidos à laparoscopia, mesmo após jejum alimentar de 72 horas e hídrico de 24 horas, atribuindo-se sua ocorrência ao pneumoperitônio e a casos de anestesia intravenosa com cetamina e acepromazina (BITTENCOURT et al., 2004). Mesmo com o protocolo anestésico diferente em relação ao dos autores supracitados, observou-se nos animais a regurgitação e distensão caudal do rúmen, porém essa complicação não foi relevante devido à sua baixa ocorrência e por não cursar com malefícios nem durante o trans e o pós-cirúrgico.

Alterações fisiológicas como a redução dos volumes pulmonares, hipóxia, aumento da pressão intratorácica, pressão vascular e aumento do débito cardíaco são relatadas como transtornos decorrentes do posicionamento utilizado na técnica cirúrgica proposta e pelo pneumoperitônio induzido (DENNIS, 2006, CHANG e

REGE, 2004; LÜTKE, 2001). Neste estudo, essas complicações foram facilmente controladas mediante ventilação assistida, não causando alterações clínicas visíveis, porém essas intercorrências desfavorecem o uso desta técnica com segurança em locais sem a possibilidade de uma ventilação controlada ou procedimentos mais longos.

O tempo cirúrgico médio obtido no presente estudo, mesmo em ovelhas de pequeno porte, foi similar aos descritos por Cordeiro (2006) de 35 min. e Wieczorek et al. (2010) de 18 a 20 min., para aspirações foliculares em caprinos e ovinos, respectivamente. Foi obtido por Duarte et al. (2009), 23 min. e Silva et al. (2002) de 21 min. de cirurgias de biópsias hepáticas em carneiros e equinos respectivamente, e Bleul et al. (2005), 120 – 150 min. em ovariectomias de bovinos. Dessa forma, pode-se considerar que a técnica videolaparoscopia favoreceu a execução de diferentes procedimentos em um tempo reduzido, em pequenos ruminantes, contudo, é conveniente destacar que é necessário que o cirurgião desenvolva habilidade específica para se alcançar este resultado.

Tabet et al. (2005) relataram possíveis acidentes transoperatórios, em especial laceração de vísceras pela colocação do trocáter, promovendo o aumento do tempo cirúrgico e complicações para os animais. Com a realização dos procedimentos por uma equipe proficiente nesta técnica videocirúrgica, não houve nenhum acidente no presente estudo, inexistindo aumento do tempo de cirurgia.

Verificou-se um menor tempo para a colocação dos portais (etapas P1 e P2/3) do que para a manipulação dos ovários e aspirações dos folículos (MA1 e MA2), os quais se apresentaram menores que a etapa final (D). Essas variações observadas são decorrentes das dificuldades no procedimento videolaparoscópico de movimentação espacial e apreensão e manipulação das estruturas, já descritas por Teixeira et al. (2011), observada durante a realização de MA1 e MA2. Porém, a distensão da cavidade abdominal, decorrente do pneumoperitônio eleito, além da imagem transmitida ao vídeo ampliada, facilitou esses procedimentos e resultou na rápida execução das cirurgias.

Cordeiro (2006) e Stangl et al. (1999) relataram a ocorrência de aderências em órgãos reprodutivos em pequenos ruminantes em aspirações foliculares subsequentes. Tais ocorrências não foram observadas neste estudo, principalmente

por ter sido realizada somente uma sessão de aspiração por animal, concordando com Teixeira et al. (2011), no fato de que não verificou-se essa problemática em nove repetições semanais deste procedimento, podendo ser justificado pelo cuidado na manipulação do trato genital e retirada dos coágulos da superfície ovariana com solução de NaCl a 0,9%.

A boa recuperação ao procedimento e a não manifestação de desconforto doloroso observada pelo método de avaliação empregado, conferiu-se pela natureza minimamente invasiva do procedimento videolaparoscópico, conforme já anteriormente observado em ovelhas adultas como citado por Teixeira et al. (2011b).

Os níveis séricos de fibrinogênio plasmático apresentaram-se dentro da normalidade, diferindo do encontrado por Fatoretto (2009) em orquiectomia de ovinos, por Pang et al. (2006) e Earley e Crowe (2002) em orquiectomia de bovinos que demonstraram aumento desta variável em 48 a 72 horas, e por Morgado et al. (2008), em técnicas de colheita de suco ruminal por punção de trocáter em ovinos Santa Inês as 96 horas do procedimento. Assim, pela não elevação dos valores basais acima dos valores fisiológicos, sugere-se que a técnica de LOPU apresenta pouca reação inflamatória de fase aguda.

A técnica de LOPU empregada em conjunto com o sistema de aspiração foi favorável para recuperação oocitária. A média de folículos ovarianos visualizados, aspirados, oócitos recuperados e taxa de recuperação oocitária para o G80U e G160U foram semelhantes a estudos em ovelhas adultas, corroborando com Teixeira et al. (2011) que obtiveram  $13,24 \pm 2,0$ ,  $11,27 \pm 3,03$ ,  $5,79 \pm 2,3$  e  $51,69\%$  em FV, FA, OR e TR, respectivamente. Baldassarre (2012) descreve que agulhas de baixo calibre (21G e 22G) podem desnudar os oócitos no momento da foliculocentese, o que não ocorreu pelo sistema de aspiração utilizado no presente estudo, que foi composto por agulha calibre 18G, a qual não causou lesões na estrutura do complexo *cumulus-oophorus*.

Os resultados também foram semelhantes aos encontrados por Baldassarre e Karatzas (2004), 13,4 folículos/ovelha, e Basso et al. (2008), 14,3 folículos/ovelha e a taxa de recuperação de oócitos está no intervalo de 40 a 90% citado pela literatura (RODRIGUEZ et al., 2006; GIBBONS et al., 2007).

Mesmo que alguns grupos deste estudo tenham apresentado um número de folículos visualizados estatisticamente iguais ao G80U e G160U no momento da aspiração, esses apresentaram variações no diâmetro dos folículos aspirados (menores que 2 mm), com o diâmetro muito próximos ao limite mínimo de aspiração, justificando a baixa taxa de recuperação oocitária em alguns grupos, conforme descrito por Teixeira et al. (2011).

Em estudos anteriores com ovelhas jovens, verificou-se que a aspiração não promoveu influência no ganho de peso e no início da puberdade, sendo que os melhores resultados, em relação ao número de folículos aspirados em cada sessão, foi de 9 à 15 por ovelhas (VALASI et al. 2006; VALASI et al. 2009). Já caprinos pré-púberes apresentam um número de oócito recuperados praticamente duas vezes maior do que em adultos, demonstrando um número de MIV's semelhantes entre ambas faixas etárias (KOEMAN, et al. 2003).

Diferente disso, relatou-se que em ovinos ocorre um número baixíssimo para MIV's (VALASI et al. 2007). Neste estudo, o uso de 160 mg de FSH em aplicação única (G160U), obteve resultados semelhantes ao observado em ovelhas adultas (TEIXEIRA et al., 2011; BALDASSARRE e KARATZAS 2004), apresentando-se também da mesma forma em relação à maturação citoplasmática e nuclear. Acredita-se que ovelhas recém-desmamadas necessitem de maiores concentrações de FSH exógeno para apresentar superior número de folículos, de melhor qualidade, além de resultados superiores em relação à maturação *in vitro*. Assim, os grupos que tiveram a administração de 80 mg de FSH ou forma de administração fracionada, possivelmente não atingiram níveis séricos suficientes para um esperado desenvolvimento folicular.

## 8. CONCLUSÕES

Concluiu-se que a técnica videolaparoscópica é viável para ovelhas recém-desmamadas, apresentando-se de rápida execução por um cirurgião experiente com o método, sem intercorrências significativas nos momentos cirúrgicos e com boa recuperação dos animais, baixa resposta inflamatória, ressaltando sua natureza minimamente invasiva.

O protocolo de estimulação ovariana com o uso de 160 mg de FSH em aplicação única, com o protocolo de indução de onda folicular prévio, associado com ao uso de eCG, foi considerado um protocolo eficiente com resultados favoráveis nos oócitos recuperados e na MIV, demonstrando sua eficácia em ovelhas recém-desmamadas.

Ressalta-se que a aspiração folicular por videocirurgia para produção *in vitro* de embriões ainda necessita de vários estudos, no entanto os resultados tanto na avaliação da técnica cirúrgica quanto à protocolos de estimulação ovariana demonstram uma grande evolução nesta biotécnica reprodutiva.



## 9. REFERÊNCIAS

ANEL, L.; SEVILLANO, C.; ALVAREZ, M.; ALEGRE, B.; ANEL, E.; DOMÍNGUEZ, J.C.; CARBAJO, M.T.; DE LA FUENTE, J. Repeated laparoscopic follicular aspiration in lambs. **Theriogenology**, v.47, p.150-152, 1997.

APPARICIO-FERREIRA, M. **Efeito da suplementação de hCG, progesterona e estradiol na maturação nuclear e citoplasmática *in vitro* de oócitos de cadelas (*canis familiaris*) obtidos por ovariosalpingo-histerectomia**. 65 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2006.

ARMSTRONG, D.T.; KOTARAS, P.J.; EARL, C.R. Advances in production of embryos *in vitro* from juvenile and prepubertal oocytes from the calf and lamb. **Reprod Fertil Dev**, v.9, n.3, p.333-339, 1997.

BALDASSARRE, H. Practical aspects for implementing *in vitro* embryo production and cloning programs in sheep and goats. **Anim Reprod**, v.9, n.3, p.188-194, 2012.

BALDASSARE, H.; KARATZAS, C.N. Advances assisted reproduction technologies (ART) in goats. **Anim Reprod Sci**, v.82, n.82, p.255-266. 2004.

BASSO, A.C.; MARTINS, J.F.P.; FERREIRA, C.R.; ERENO, A.; TANNURA, J.; TABET, A.; FIGUEIREDO, C. L.; DE OLIVEIRA, P.C.; PONTES, J.H.F. Produção *in vitro* de Embriões Ovinos: Aspectos da Técnica de Aspiração Folicular e do Tratamento Hormonal de Doadoras. In: Biotecnologia da Reprodução na Espécie Ovina. **O Embrião**, v. 38, p.08-11, 2008.

BERLINGUER, F.; LEONI, G.; BOGLIOLO, L.; PINTUS, P.P.; ROSATI, I.; LEDDA, S.; NAITANA, S. FSH different regimes affect the developmental capacity and cryotolerance of embryos derived from oocytes collected by ovum pick-up in donor sheep. **Theriogenology**, n.61, p.1477-1486, 2004.

BERNARDI, M.L. *In vitro* production of ovine embryos, **Acta Sci Vet**, v.33 n.1, p.1-16, 2005.

- BITTENCOURT, R.H.F.P.M.; SILVA, M.C.; MOREIRA, V.M.S. Observações sobre o uso de cetamina, acepromazina e halotano em ovelhas submetidas a procedimentos laparoscópicos. **Rev Bras Med Vet**, v.26, p.150-154, 2004.
- BLASH, S.; SCHOFIELD, M.; ECHELARD, Y.; GAVIN, W. Update on the first cloned goats. **Nat Biotechnol**, v.30, p.,229-230, 2012.
- BLEUL U.; HOLLENSTEIN K.; K"AHN W. Laparoscopic ovariectomy in standing cows. **Anim Reprod Sci**, v.90, p.193–200, 2005.
- BRACKETT, B.G.; BOUSQUET D.; BOICE, M.L.; DONA, VICK W.J.; EV ANS, J.F.; DRESSEL, M.A. Normal development following in vitro fertilizations in the cow. **Biology Repr**, v.27, p.147-158, 1982.
- CARVALHO, A.A.; FAUSTINO, L.R.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; COSTA, A.P.R. Vitriificação: uma alternativa para a preservação de embriões e material genético de fêmeas mamíferas em criobancos. **Acta Vet Bras**, v.5, n.3, p.236-248, 2011.
- CHANG, C.; REGE, R.V. Minimally invasive surgery. In: TOWNSEND Jr., C. M. et al. (ed.) **Sabiston Textbook of Surgery**. 17 ed. Philadelphia: W. B. Saunders. 2004.
- CHERR, G.; DROBNIS, E.; KATZ, D. Localization of cortical granule constituents before and after exocytosis in hamster eggs. **J Experimental Zoo**, v.246, p.81–93, 1988.
- COGNIÉ, Y.; POULIN, N.; LOCATELLI, Y.; MERMILLOD, P. State-of-the-art production, conservation and transfer of in vitro produced embryos in small ruminants. **Reprod Fertil Dev**, v.16, p.437-445, 2004.
- CORDEIRO, M.F. **Avaliação da laparoscopia na aspiração folicular em fêmeas caprinas pré-púberes e adultas com ou sem estimulação ovariana hormonal**. 59f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2006.
- CROCOMO, L.F.; MARQUES FILHO, W.C.; LANDIM ALVARENGA, F.C.; BICUDO S.D. Peculiaridades da coleta de oócitos para produção *in vitro* de embriões ovinos. **Rev Bras Reprod Anim**, v.36, n.1, p.25-31, 2012.

CROZET N.; HUNEAU D.; DE SMEDT V.; THÉRON M-C.; SZÖLLÖSI D.; TORRÈS S.; SÉVELLEC C. *In vitro* fertilization with normal development in the sheep. **Gamete Res**, v.16, p. 159-170, 1987.

CZLONKOWSKA, M.; EYSYMONT, U.; GUSZKIEWICZ, A.; KOSSAKOWSKI, M.; DZIAK, J. Birth of lamb after in vitro maturation, fertilization and co-culture with oviductal cells. **Mol Repro Dev**, v.30, p.34-38, 1991.

DEMINICIS, B.B.; LIMA, L.C.O.; ARAÚJO, S.A.C.; LUNGA, L.; BLUME, M.C. Avaliação de modelos simulados de sistemas de produção de cordeiros para abate em pequenas propriedades. **Pubvet**, v.2, p.1-19, 2008.

DENNIS, V. Complications of laparoscopic surgery: preventing accidents. **Periop Nurs Clin**, v.1, p.319-328, 2006.

DEMINICIS, B.B.; LIMA, L.C.O.; ARAÚJO, S.A.C.; LUNGA, L.; BLUME, M.C. Avaliação de modelos simulados de sistemas de produção de cordeiros para abate em pequenas propriedades. **Pubvet**, v.2, p.1-19, 2008.

DUARTE, A.L.L.; CATTELAN J.W.; BEZERRA, M.B.; VICENTE W.R.R.; CORDEIRO, M.F. Biópsia hepática com agulha tru-cut guiada por videolaparoscopia em caprinos. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.61, n.1, p.12-19. 2009.

EARLEY, B.; CROWE, M.A. Effects of ketoprofen alone or in combination with local anesthesia during the castration of bull calves on plasma cortisol, immunological, and inflammatory responses. **J Anim Sci**, v.80, p.1044 -1052, 2002.

EURIDES, D.; SILVA, L.A. **Métodos de preparo de rufiões bovinos e equinos**, v.1. Talento, Goiânia, 2002.

EWOLDT, J. M.; ANDERSON, D. E.; HARDY, J.; WEISBRODE, S. E. Evaluation of a sheep laparoscopic uterine trauma model and repeat laparoscopy for evaluation of adhesion formation and prevention with sodium carboxymethylcellulose. **Vet Surgery** v.33, p.668-672, 2004.

FATORETTO, B. Perfil inflamatório e cicatricial em ovinos submetidos à orquiectomia. In: Congresso Nacional de Iniciação Científica, 9. 2009, **Anuário da produção de iniciação científica discente**, São Paulo: Anhanguera Educacional S. A., v.12, n.13, p.43 – 55, 2009.

GIBBONS, A.; BONNET, F.P.; CUETO, M.I.; SALAMONE, D.; CATALA, M. Colheita de oócitos guiada por laparoscopia em caprinos e ovinos. **Acta Scie Vet**, v.36, supl. 2, p.223-230, 2008.

JAIN, N.C. **Essentials of veterinary hematology**. Philadelphia: Lea & Febiger, 417 p. 1993.

JEFFERIES, B. C. Body condition scoring and its use in management. **Tasmanian J Agricult**, v.32, p.19-21. 1961.

KOEMAN, J.; KEEFER, C.L.; BALDASSARRE, H.; DOWNEY, B.R. Developmental competence of prepubertal and adult goat oocytes cultured in semi-defined media following laparoscopic recovery. **Theriogenology**, v.60, p.879-889, 2003.

LI, J.J.; FU, X.W.; MO, X.H.; YUE, M.X.; JIA, B.Y.; ZHU, S.E. Vitrification alters acH4K12 and acH4K16 levels in sheep oocytes at various developmental stages, **Small Rum Res**, (Article in Press) 2013.

LEIBFRIED, L.; FIRST, N. L.; Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. **J Anim Scie**, v. 48, p. 76-86, 1979.

LÜTKE, C. Hipóxia/hipoxemia transoperatória. Faça o diagnóstico, localize a causa e trate. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ANESTESIOLOGIA, 48. **Anais...** Recife: Sociedade de Anestesiologia do Estado de São Paulo. 2001.

MARTINO, A.; MOGAS, T.; PALOMO, M.J.; PARAMIO, M.T. Meiotic competence of prepubertal goats. **Theriogenology**, v.41, n.4, p.969-980, 1994.

MELLOR, D.J.; STAFFORD, K.J. Physiological and Behavioural Assessment of Pain in Ruminants: Principles and Caveats. **Fourth World Congress**, ATLA, v.32, Sup. 1, p.267 – 271, 2004.

MORGADO, A.A.; SUCUPIRA, M.C.A.; MORI C.S.; MIYASHIRO S.I. Avaliação da segurança da punção por trocater como técnica de colheita do suco ruminal de ovinos da raça Santa Inês. In: **Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, n.35, 2008, Gramado, Anais do 35º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária. 2008.

MORTON, K.M.; DE GRAAF, S.P.; CAMPBELL, A.; TOMKINS, L.M.; MAXWELL, W.M.; EVANS G. Repeat Ovum Pick-up and In Vitro Embryo Production from Adult Ewes with and without FSH Treatment. **Reprod Dom Anim**, v.40, p.422-428, 2005.

PADILHA, L.C. **Maturação *in vitro* de oócitos de ovelhas santa inês submetidas a sucessivas sessões de aspiração folicular por videolaparoscopia.** 38f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2012.

PANG, W.Y.; EARLEY, B.; SWEENEY T.; CROWE M.A. Effect of carprofen administration during banding or burdizzo castration of bulls on plasma cortisol, *in vitro* interferon-g production, acute-phase proteins, feed intake, and growth. **J Anim Sci**, v.84, p.351-359, 2006.

PTAK, G.; DATTENA, M.; LOI, P.; TISCHNER, M.; CAPPAL, P. Ovum pick-up in sheep: efficiency of *in vitro* embryo production, vitrification and birth of offspring. **Theriogenology**, v.52, p.1105-1114, 1999.

PIRES-BUTTLER, E. A. **Efeito do estágio do ciclo estral e adição de hormônios ao meio de cultivo *in vitro* sobre a morfologia do complexo cumulus-oócito canino.** 2010. 160f. Tese (Doutorado) – Programa de Medicina Veterinária, Reprodução Animal. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

RENESTO, A. **Associação das Biotécnicas: Aspiração Folicular Guiada por Ultra-Sonografia e Superovulação na Produção *in vitro* e *in vivo* de Embriões Bovinos.** Dissertação (Mestrado) – Programa de Medicina Veterinária, Reprodução Animal, Universidade Estadual de São Paulo - UNESP, Jaboticabal, 59f. 2004.

RODRÍGUEZ, C.; ANEL, L.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; BOIXO, J.C.; CHAMORRO, C.A.; 67 PAZ, P. Ovum Pick-up in Sheep: a Comparison between Different Aspiration Devices for 68 Optimal Oocyte Retrieval. **Reprod Dom Anim**, v.41, p.106–113, 2006.

RODRIGUES, J.L. Transferencia de Embriões Bovinos - Histórico e Perspectivas Atuais. **Rev Bras Reprod Anim**, v.25, n.2, p.102-107, 2001.

RUBIANES, E.; MENCHACA, A.; CARBAJAL, B. The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats. **Anim Reprod Sci**, v.78, p.271-287, 2003.

SENEDA, M.M.; RUBIN, K.C.P; BLASCHI, W; LISBOA, L.A.; PONTES, J.H.F. Utilização de uma bomba de infusão contínua como geradora de vácuo para a

aspiração folicular transvaginal guiada pela ultra-sonografia. **Revista do CRMV-SP**, v.8, n.2, p.168-175, 2005.

SIMPLÍCIO, A.A.V.; FREITAS, V.J.F.; FONSECA, J.F. Biotechniques of reproduction as techniques of reproductive management in sheep. **Rev Bras Repro Anim**, v.31, n.2, p.234-246, 2007.

STANGL M.; KÜHHOLZER B.; BESENFELDER U.; BREM G. Repeated endoscopic ovum pick-up in sheep. **Theriogenology**, v.52, p.709-716, 1999.

STEPTOE, P.C.; EDWARDS, R.G. Birth after the pre implantation of a human embryo. **Lancet** v.2, p.366, 1978.

RUSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca Anatomica** v.24, p.77-92, 1983.

SILVA L.C.L.C.; STOPIGLIA A.J.; FANTONI, D.T. Técnica de biópsia hepática em eqüino por laparoscopia. **C Rural**, v.32, n.3, 2002.

TABET, A.F.; SILVA, L.C.; SHINHORINI, I.L. Comparisson between two techniques of laparoscopic-assisted renal biopsy in equines. **Braz J Vet Res Anim Sci**, v.42, p.150-156, 2005.

TEIXEIRA, P.P.M.; PADILHA, L.C.; OLIVEIRA, M.E.F.; MOTHEO, T.F.; DA SILVA, A.S.L.; BARROS, F.F.P.C.; COUTINHO, L.N.; FLÔRES, F.N.; LOPES, M.C.S.; BANDARRA, M.B.; SILVA, M.A.M.; VASCONCELOS, R.O.; RODRIGUES, L.F.S.; VICENTE, W.R.R. Laparoscopic ovum collection in sheep: Gross and microscopic evaluation of the ovary and influence on oocyte production. **Anim Repro Scien**, v.127, p.169-175, 2011.

TEIXEIRA, P.P.M.; PADILHA, L.C.; MOTHEO, T.F.; SILVA, MAM, OLIVEIRA, MEF, DA SILVA ASL, BARROSA F.F.P.C., COUTINHO L.N., FLÔRES F.N., LOPES M.C.S., RODRIGUES L.F.S., VICENTE W.R.R. Ovariectomy by laparotomy, a video-assisted approach or a complete laparoscopic technique in Santa Ines sheep. **Small Rum Res**, n.99, p.199– 202. 2011b.

TEIXEIRA, P.P.M.; PADILHA, L.C.; OLIVEIRA, M.E.F.; MOTHEO, T.F.; DA SILVA, A.S.L.; BARROS, F.F.P.C.; COUTINHO, L.N.; FLÔRES, F.N.; LOPES, M.C.S.; BANDARRA, M.B.; RODRIGUES, L.F.S.; VICENTE, W.R.R.

VIDEOLAPAROSCOPYC OVUM PICK-UP IN SANTA INÊS EWES: TECHNIQUE PRACTICE DESCRIPTION. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.9, n.16, p. 1-13, 2011c.

THIBIER, M. The IETS statistics of embryo transfers in livestock in the world for the year 1999: A new record for bovine in vivo-derived embryos transferred. **Embryo Transfer Newsletter**, v.18, p.24-28, 2000.

TRALDI A. S. **Biotécnicas aplicadas em reprodução de pequenos ruminantes**. In: III FEINCO , 2006.

VALASI, I.; FTHENAKISA, G.C.; PRASSINOSA, N.N.; MENEGATOSB, I.; GRIGOROPOULOUA, V.; DELIGIANNISC, C.; VAINASD, E.; AMIRIDISA, G.S. The effect of repeated follicular aspiration on the onset of puberty and growth rate of winter- or autumn-born lambs. **Small Rumin Res**, v.84, p.35-40, 2009.

VALASI, I.; LEONTIDES, L.; PAPANIKOLAOU, TH.; AMIRIDIS, G.S. Age, FSH Dose and Follicular Aspiration Frequency Affect Oocyte Yield from Juvenile Donor Lambs. **Reprod Dom Anim**, v.42, p.230-237, 2007.

VALASI, I.; MENEGATOS, I.; PAPANIKOLAOU, T.H.; GOULAS, P.; AMIRIDIS, G.S., Oocyte pick-up in juvenile lambs affects neither onset of puberty nor their future fertility. **Theriogenology**, v.66, p.2144-2151, 2006.

WANI, N.A. In vitro maturation and in vitro fertilization of sheep oocytes. **Small Rum Res**, v.44, n.2, p.89-95, 2002.

WANG, S.; LIU, Y.; HOLYOAK, G.R.; EVANS, R.C.; BUNCH, T.D. A protocol for *in vitro* maturation and fertilization of sheep oocytes. **Small Rum Res**, v. 29, p.83-88, 1998.

WHEELER MB. Agricultural applications for transgenic livestock. **Trends Biotechnol**, v.25, p.204-210, 2007.

WIECZOREK, J.; KOSENYUK, Y.; CEGŁA, M.; RYŃSKA, B. A new concept n laparoscopic ovum pick-up (OPU) in sheep – efficiency of method and morphology of recovered oocytes. **Ann Anim Sci**, v.10, n.1, p.39–48, 2010.

## ANEXO 1 - Gráficos e tabelas complementares.

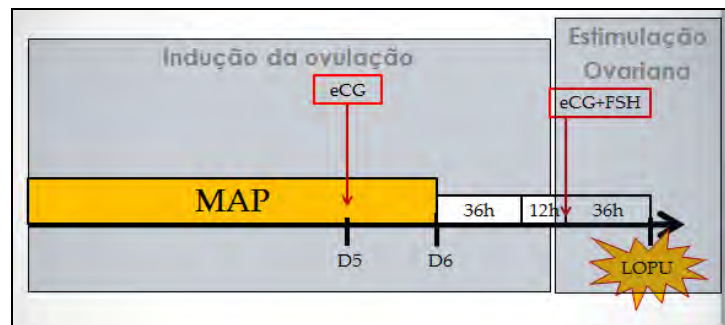


Figura 6: Ilustração esquemática do protocolo hormonal de indução de onda folicular e estimulação ovariana a qual foram submetidos os animais experimentais. Uso de progestágeno a base de medroxiprogesterona (MAP) colocado no início do protocolo e retirado no sexto dia (D6), mais aplicação de eCG no quinto dia do protocolo (D5). Nova aplicação de eCG agora somada ao FSH 36 horas antes da aspirações foliculares (LOPU).

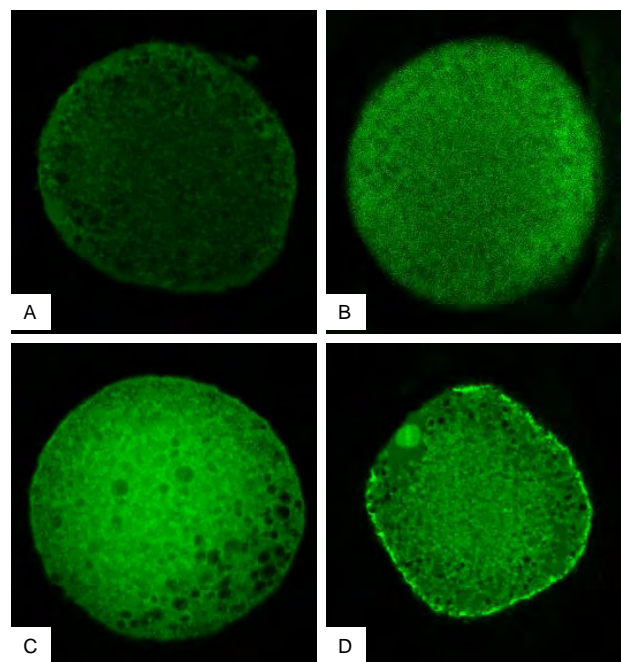


Figura 7: Fotomicrografia em microscopia confocal de oócitos de ovelhas corados para avaliação da distribuição dos GC pela técnica de fluorescência (*Lens culinaris*, FITC conjugada). A: agregados de GC distribuídos pelo citoplasma; B: GC distribuídos uniformemente pelo citoplasma, sem presença de agregados. C e D: GC migrando para córtex do oócito formando um halo fluorescente ao redor da membrana plasmática. Escala de 20  $\mu\text{m}$ , aumento de 40x.



Tabela 4: Grupos e tratamentos experimentais preconizados para ovelhas recém-desmamadas submetidas à aspiração folicular.

Dose de FSH	Forma de administração	Hora da LOPU	Grupos
Grupo controle, sem indução da ovulação e sem estimulação ovariana			GCE
Grupo controle, com indução da ovulação e sem estimulação ovariana			GCI
80 mg	Única		G80U
	Múltipla constante (4 doses de 20mg)		G80M
160 mg	Única		G160U
	Múltipla constante (4 doses de 40mg)		G160M

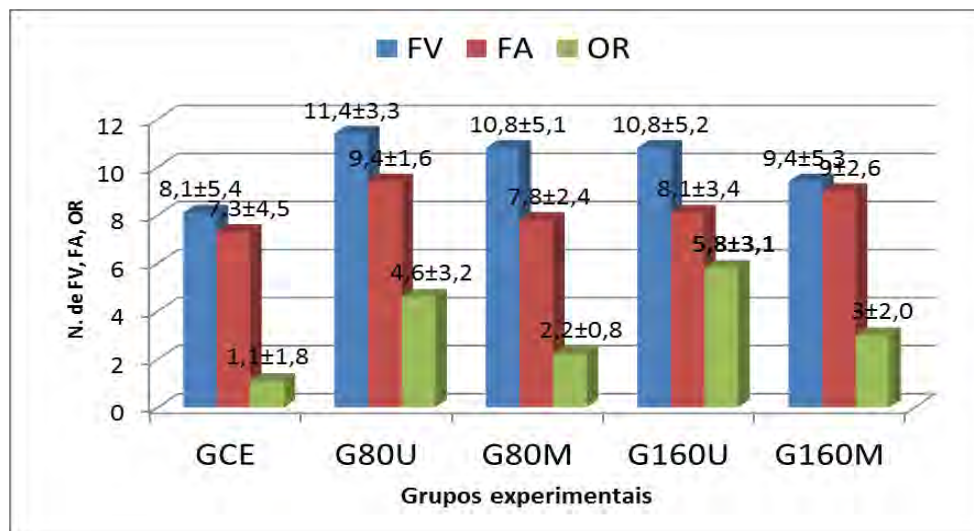


Figura 8: Resultados relacionados à média de folículos visualizados (FV), folículos aspirados (FA) e oócitos recuperados (OR) por grupo experimental em ovelhas recém-desmamadas.

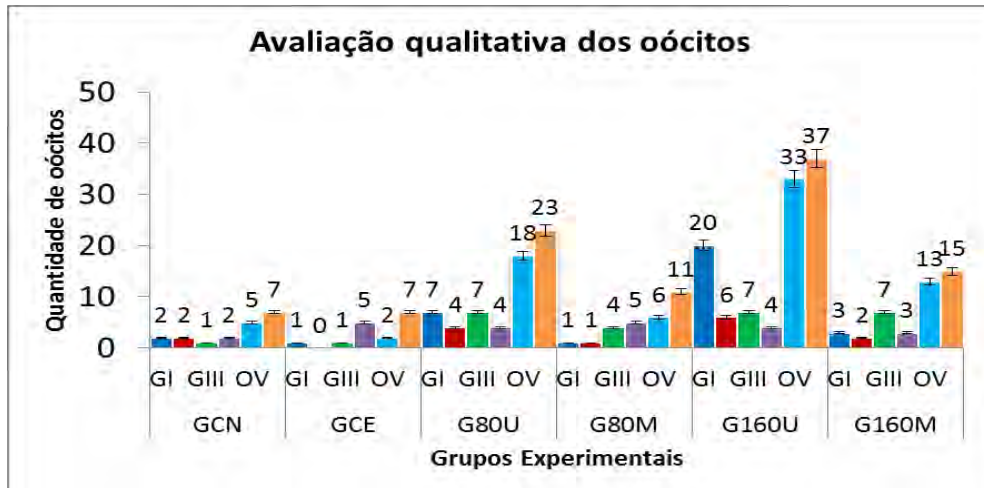


Figura 9: Resultados relacionados à média de qualidade oocitária, total de oócitos viáveis e valores totais por grupo experimental. (GI – oócitos classificados como grau I; GII – oócitos classificados como grau II; GIII – oócitos classificados como degenerados; Deg – oócitos classificados como degenerados; OV – Oócitos Viáveis).

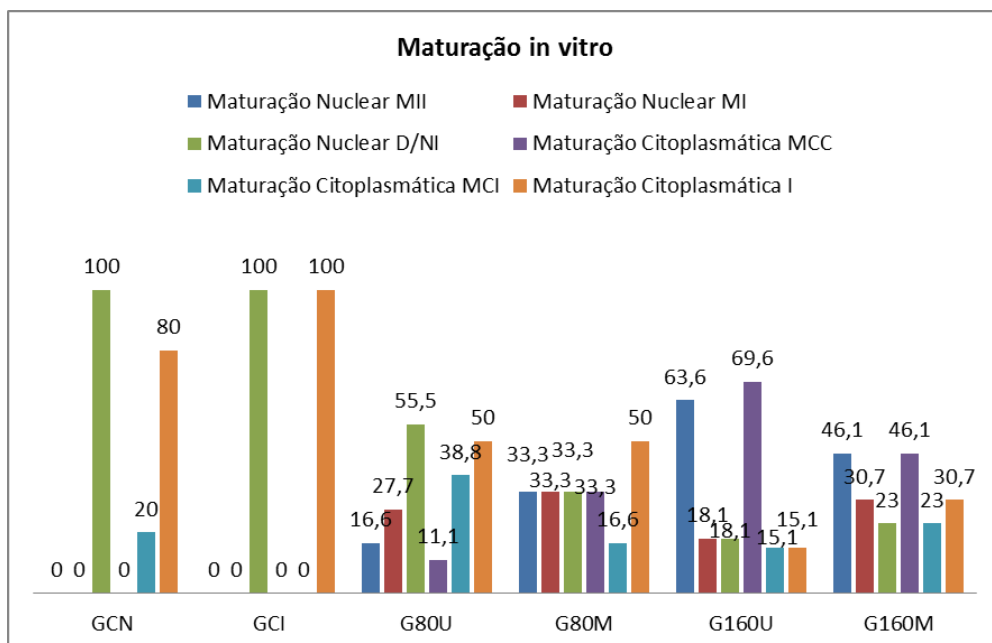


Figura 10: Resultados relacionados à maturação nuclear em relação a cada grupo experimental, observando os valores em percentuais e absolutos. (MII – oócitos maturados; MI – oócitos imaturos; D/NI – oócitos degenerados/não passíveis de determinação; MCC – maturação citoplasmática completa; MCI – maturação citoplasmática incompleta; I – imaturos).