

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

**AVALIAÇÃO DA LAPAROSCOPIA NA ASPIRAÇÃO  
FOLICULAR EM FÊMEAS CAPRINAS PRÉ-PÚBERES E  
ADULTAS COM OU SEM ESTIMULAÇÃO OVARIANA  
HORMONAL**

**Mabel Freitas Cordeiro**

**Orientador: Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente**

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 Cirurgia Veterinária – área de concentração: Cirurgia Veterinária.

Jaboticabal – SP

Dezembro de 2006

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**MABEL FREITAS CORDEIRO** – nascida em 05 de julho de 1973, em Salvador – BA. Médica Veterinária formada pela Universidade Federal da Bahia – UFBA, Salvador, Bahia, em 06 de fevereiro de 1998. Em março de 1999, iniciou curso de Especialização em Produção Animal pela Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB, Vitória da Conquista, Bahia. No ano seguinte, ingressou no Mestrado pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará – UECE – Área de concentração: Reprodução Animal, concluindo-o em dezembro de 2001. Em março de 2003, iniciou o curso de Doutorado junto ao Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV – UNESP – *Campus* de Jaboticabal – SP, área de concentração: Cirurgia Veterinária.

**Dedico,**

Aos meus pais e irmãos que sempre me esperam de braços abertos, ouvidos atentos e sorriso no rosto.

“Confia, segue, trabalha e constrói para o bem. E guarda a certeza de que, para alcançar a felicidade, se fazes teu dever, Deus faz o resto.

Pelos Espíritos Emmanuel e André Luiz, psicografada  
por Francisco Cândido Xavier e Waldo Vieira.  
Livro “Estude e Viva”

## AGRADECIMENTOS

A Deus.

À minha família que sempre me apoiou em tudo que pretendi fazer na minha vida. Ao meu pai, Clovis Benedito Santos Cordeiro que sempre me esperou com os braços abertos e sorriso largo e, que sempre disse ter orgulho de mim, mesmo que eu tenha feito, até hoje, nada mais do que a minha obrigação de filha. À minha dedicada mãe Maria José Freitas Cordeiro que, pra mim, é um exemplo de força e tolerância. Aos meus irmãos, Patrícia Freitas Cordeiro e Marco Aurélio Freitas Cordeiro pela cumplicidade, dedicação e amor incondicional.

Às cabras, animais maravilhosos, dóceis, inteligentes, curiosos. Aos quais pretendo dedicar a minha vida de estudos e todo meu carinho.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP – através da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias e ao programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária pela oportunidade de realizar um doutorado de nível reconhecido em todo o país.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pela concessão da bolsa de doutorado e do auxílio-pesquisa, sem os quais este trabalho não poderia ser realizado.

Ao Professor Wilter Ricardo Russiano Vicente que, além de ser um orientador maravilhoso, é um amigo sincero e atencioso. Não tenho palavras para descrever a grandeza desta pessoa e de como seu coração é grande. Pessoas assim são como um presente na nossa vida. Obrigada por existir!

A Ana Karina da Silva Cavalcante pela amizade, companheirismo, conselhos e orientação. *Kari* para mim é um exemplo de pessoa inteligente, competente, perseverante, e espirituosa e a quem tenho orgulho de ser amiga e maior fã.

A Tânia Vasconcelos Cavalcante, a quem considero uma irmã. Sou muito grata pela amizade, pelo companheirismo, pelos conselhos, apoio psicológico, ensinamentos e todos os cuidados dispensados a mim durante todo o tempo em que estivemos juntas. Mesmo distante somos unidas. Amigas para sempre!

Ao amigo Gerson Azeredo, que me apresentou à Unesp e à Jaboticabal. Pelos momentos de alegria e pelo apoio.

Ao amigo e irmão Alex Altair Costa Machado, uma pessoa com um coração enorme e de caráter e simplicidade ímpares, e que, mesmo de longe, sempre me deu força e me apoiou em todos os momentos. Sou muito grata pelo seu carinho, sua amizade e seu exemplo.

Ao amigo Paulo Sérgio da Silva que muito colaborou neste trabalho, se dedicando às cabrinhas como se fossem dele. Agradeço muito pelos conselhos e sugestões durante toda a fase experimental e pela amizade sincera.

À amiga querida Christina Ramires Ferreira que conheço desde 1997 quando do estágio curricular na EMBRAPA Caprinos. *Chris* para mim é, com toda certeza, e também para todos que tiveram o prazer de conhecê-la, um anjo na Terra que veio para enriquecer as nossas vidas e preencher nossos corações. Sua bondade e sua delicadeza são imensas! Deus a abençoe.

Ao casal de amigos Marcelo Barbosa Bezerra e Michelly Fernandes de Macedo que apesar do pouco tempo que nos conhecemos, dedicaram muito de sua atenção para comigo, além do enorme carinho e consideração que fizeram de nossa amizade recente algo verdadeiro e sincero. Deu-me a impressão de conhecê-los há muito tempo. Quem sabe de outras vidas!

À amiga Maria Emília Franco Oliveira que me mostrou que a vida é um eterno aprendizado. Elegância, bom gosto e diplomacia são características desta pessoa a quem admiro muito. Obrigada pela sua amizade e sua alegria.

A Roberta Machado Ferreira pela amizade, apoio e atenção na fase final deste trabalho. Agradeço pelo jeito meigo, sincero e carinhoso como sempre me tratou.

Ao Sr. Rodrigo Grassano, proprietário da Fazenda Onça e Capril Onça, localizados em Monte Santo de Minas – MG, pelo fornecimento de praticamente todos os animais utilizados no experimento e pela atenção e acolhida com que fomos tratados quando visitamos sua propriedade.

Ao “Quarteto Fantástico”, responsável pela anestesia, sem o qual não seria possível a realização deste experimento: Paula Alessandra Di Filippo, Renata Gebara Sampaio Dória, Deborah Penteado Martins Dias e Gesiane Ribeiro que mais tarde foi substituída por Erica Cristina Bueno do Prado Guirro. Agradeço de coração o cuidado e dedicação dispensados a mim e às “bitas”. Agradeço também pela amizade e consideração.

À amiga Amélia Lizziane Leite Duarte que, desde o começo me ajudou e aprendeu junto comigo a arte da laparoscopia. Pela sua amizade, alegria e consideração: muito obrigada!

À Carla Andrade Grillo Beretta pela dedicação, preocupação e empenho com os quais se dedicou a este trabalho e pela sua amizade e simpatia.

Aos amigos do Departamento de Reprodução Animal: Roberta Vantini, Ivo Luiz de Almeida, Isabel Aparecida Penharol Natarelli, Felipe Percin, Max Vitoria Resende, Simone Cristina Niciura, Andréa Cristina Basso, Giovana D’Andréa

Pavão, Felipe Perecin, Naiara Zoccal, Clara Slade, Rubia Bueno da Silva, Tatiane Almeida Drummond Tetzner, Juliana Corrêa Borges, Márcio Ribeiro Silva, Ana Paula Perini, Eliana Cristina Gazoto, Lourival Paz Landim, Júnior, Danilas Salinet de Melo, Edson Lo Turco, Letícia Siqueira de Sá Barreto, Viviane Sgobbi Dias, Eric Laurentz Caiado Castro, Kleber Ancioto, Aline Costa de Lúcio, Kellen de Sousa Oliveira, Clara Slade Oliveira, Erlon Gomes de Oliveira Júnior, Frederico Ozanam Barros Monteiro, Cassiana Ometo de Abreu, Antonio Martinez, Sandra Gabaldi, Alexandre Wolf, Karina Beloti Avelino, Gabriel Ferreira Soria, Eveline Zanetti, Gláucia Guerra Alonso, Sara Tomita, Walt Yamazaki, Erica da Silva Carvalho Morani e Marcelo Roncoletta pela amizade, alegria, colaboração, simpatia, coleguismo e principalmente pela experiência de conhecê-los. Sou muito grata pelo tempo de convivência pois todos no DRA foram, de uma certa forma, como uma segunda família para mim.

Aos Professores do Departamento de Reprodução Animal: César Roberto Esper, Francisco Guilherme Leite, Joaquim Mansano Garcia, Vera Fernanda Martins Houssepian de Lima e Gilson Hélio Toniollo que sempre me atenderam e me auxiliaram desde a minha chegada nesta universidade e pela acolhida neste departamento, onde sempre fui tratada com muito respeito, profissionalismo e simpatia.

Ao Professor Paulo Henrique Franceschini, nosso querido “Cocão”, em especial, e através dele às obras do Prof. Augusto Cury por me terem feito pensar de modo diferente e melhor.

Aos amigos do Nordeste pela amizade, atenção, apoio e solidariedade: Katyane de Sousa Almeida, Fagner Luiz da Costa Freitas, Wagner Freitas, Maria de Jesus Veloso Soares, Hebelys Ibiapina, Isolda Márcia, Gilvaneide Azeredo e Auricléia Lopes de Oliveira.

À amiga Valéria Queiroz pela amizade sincera, pela alegria e pelo apoio. Sempre vou lembrar do seu sorriso iluminado e sua voz carinhosa.

Aos queridos amigos, funcionários do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” pela ajuda, carinho, amizade e dedicação: Roberto Bertanha, Carlos Roberto Januário, José Raimundo dos Santos, Arildo Pereira dos Santos, Laerte Sant’anna de Oliveira, José Eduardo Miguel, Isaías Pereira, Maria Luisa Alves de Oliveira, Flavia Regina de Souza Soldi, Roberto Aparecido Pereira, Narciso Batista Tel, Edson Giangrecco, Jose Carlos Busoli, Arnildo César de Faria, Anésia Alves de Oliveira, Lauro Cesar Alves, Celina Cavichioli Laroza, Sonia Fernandes Brito, Tarciso Philadelpho Carneiro, Eugênio de Campos Filho, Aloisio Miranda Castro, Matheus Yamazaki Andrade, Izabel Gerbasi Beraldo, Dalva Aparecida Pedro Barbosa, Cirlene Cristina Ferraresi, Lidiane Cristina Cardoso, Izilda Maria P. de Oliveira, Sonia Fernandes Britto. Sou muito grata a todos!

Aos residentes Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”: Rodrigo Norberto Pereira, Paulo Alescio Canola, Larissa Gabriela Ávila, João Henrique Perotta, Luciane Maria Laskovski, Armando Carvalho, André Escobar, Roberto Thiesen e Tathiana Ferguson Motheo, que sempre estiveram dispostos a ajudar demonstrando muita dedicação, paciência e profissionalismo.

Aos alunos do Colégio Técnico Agrícola “José Bonifácio”: Ricardo de Jesus Queiroz, Edivan Alex Ulian e em especial a Edilson Gabriel da Silva Júnior, que considero um amigo verdadeiro.

A todos os estagiários que passaram pelo DRA e que auxiliaram em muito no meu trabalho, em especial a Maisa Fernanda Campos Minosso, Lourival Souza Silva Júnior, Rodrigo Faria Sousa Pereira, Ricardo Watzel, Danilo Bacelar, Rosiara Maziero, Gisele de Brito Lima, Juliana Cassiano, Patrícia Massuda, Monique Guardieiro, Fabiana Lucena, Ana Augusta Pagnano Derussi, Clarissa Mascaro, Camila Bonagamba, Denise Tavares, Lívia Vasconcelos, Dina Souza e Danilo Pereira.

Aos amigos da Obstetrícia pela simpatia, amizade e auxílio durante este trabalho: Aracéle Elisane Alves, Maricy Apparicio Ferreira, Ana Paula Coelho Ribeiro, Valeska Rodrigues, Eliandra Antonia Pires, Carla Renata Figueiredo Gadelha, Giuliano Queiroz Mostachio, Karen Vicente Diagone, Diogo Jose Cardilli e Gabriela Covizzi.

Aos professores José Wanderley Catelan, Áureo Evangelista Santana, Carlos Augusto Valadão, José Jurandir Fagliari, Luis Fernando de Oliveira Silva Carvalho, Júlio Carlos Canola, João Guilherme Padilha Filho, Cíntia Lucia Maniscalco, Adjair Antonio do Nascimento, Sandra Aidar de Queiróz, Kleber Tomas de Resende, Izabelle Auxiliadora Molina de Almeida Teixeira, Américo Garcia da Silva Sobrinho, Gener Tadeu Pereira, Carlos Roberto Daleck, Gisele Zoccal Mingoti, Márcia Rita Pacheco e José Luiz Laus pela cordialidade, simpatia e atenção. Agradeço pelo apoio e pelo auxílio durante a realização deste trabalho.

À Profa. Lia de Alencar Coelho pela atenção, cordialidade e pela concessão do equipamento de videolaparoscopia, sem o qual este trabalho sequer teria começado.

À Profa. Luciana Keiko Hatamoto pela colaboração, amizade e consideração.

Aos amigos da Associação de Pós-graduandos da UNESP–FCAV, Ariel David Freitas Al Gazi, Maria Andréia Nunes, Denise Lachat, Márcio Aquio Hoshiba, Marcelo Laia, Fernanda da Silva Gonçalves, Camila Castro Neves, Caramo Có Júnior, Eduardo Deberaldini e Eduardo Rossini pela amizade e pelos momentos de alegria.

Aos amigos Patrícia Tholon, Nadia Ferreira Dibíase, Letícia Ribeiro, Carolina Buzzulini, Expedita Maria de Oliveira Pereira, Flora de Freitas D'Angelis, Carla Braga Martins, Raquel Mincarelli Albernaz, Leonardo de Oliveira Seno, André Gustavo Leão, Samuel Figueiredo de Souza e Rodrigo Vidal Oliveira pela amizade, simpatia e pelos momentos de alegria e de aprendizado que vivemos durante este período.

A todos os amigos do Centro Espírita Universal – CEU pela amizade e pelo apoio moral e espiritual, além dos bons momentos. Em especial a Nercy Regina Voltarel Ferroni, Luiz Carlos Ferroni, Rosa Melo, Clorivaldo de Oliveira Júnior, Luís Lacerda, Aparecido José Merlino Júnior, Angela Coelho da Silva, Alessandra Steckelberg, Lúcia Helena Sipaúba Tavares, Fernando A. Arrobas Martins, Maria Áurea Garcia, Flávia Carvalho e Felipe Ferroni.

Aos amigos da academia Cardiofísico aqui representados pelo professor Paulo Faccini e aos seus funcionários pelo carinho e atenção. A atividade física foi uma das coisas que me motivou e por muitas vezes ajudou a manter além da saúde do corpo, a saúde mental.

Aos funcionários da Biblioteca, nas pessoas de Mabel Custódio, Fábio Pinho, Tiekó Takamiya Sugahara, Ana Sílvia Mariana, Adriana Damato pela atenção e presteza.

Tatiane Pirani e família pela acolhida na sua casa em Orindiuva e pelos bons momentos na ocasião do seu estágio no Hospital Veterinário.

Aos colegas de faculdade e de pós Arianne Pontes Oriá e Francisco de Assis Dória Neto pela amizade.

Ao amigo Rodrigo Mantovani, da empresa Pratices Gases, por sua presteza e cordialidade.

A Antonio Geraldo Zampola, da empresa AZ Labor pela atenção, simpatia e eficiência em nos atender sempre que precisamos.

A Celso Galatti, da empresa Rações Nutremax pela simpatia e consideração.

A Alexandre Mazzei, da empresa Nacional Hospitalar pela atenção e pelo profissionalismo.

E a todos que eu esqueci de mencionar (me perdoem!) e que participaram de forma direta ou indiretamente deste trabalho e que também ajudaram a construir a minha história em Jaboticabal. SOU MUITO GRATA! DEUS OS ABENÇOE.

## SUMÁRIO

	Página
LISTA DE TABELAS.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
RESUMO.....	viii
SUMMARY.....	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1. Técnicas para a colheita de oócitos em animais domésticos.....	2
2.2. A videolaparoscopia na Medicina Veterinária. Histórico.....	4
2.3. A estimulação ovariana para a obtenção de oócitos <i>in vivo</i> .....	6
2.4. Fatores que interferem na qualidade do oócito obtido por LAF.....	7
2.5. O uso da LAF em animais jovens.....	8
3. OBJETIVOS.....	10
3.1. Geral.....	10
3.2. Específicos.....	10
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
4.1. Local do experimento.....	11
4.2. Animais e tratamento.....	11
4.3. Pesagem dos animais.....	13
4.4. Protocolo anestésico.....	13
4.5. Laparoscopia para aspiração folicular (LAF).....	14
4.6. Exame clínico e avaliação da analgesia.....	19
4.7. Avaliação das funções hepática e renal.....	19
4.8. Maturação <i>invitro</i> .....	20
4.9. Avaliação da capacidade reprodutiva.....	21
4.10. Análise estatística.....	21
5. RESULTADOS.....	22
5.1. Avaliação da técnica de laparoscopia para aspiração folicular.....	22

	Página
5.2. Efeito da anestesia sobre os parâmetros fisiológicos.....	23
5.3. Resposta ovariana e colheita de oócitos.....	25
5.4. Acompanhamento do peso corporal.....	30
5.5. Efeito sobre a capacidade reprodutiva das fêmeas.....	31
6. DISCUSSÃO.....	31
7. CONCLUSÕES.....	42
8. REFERÊNCIAS.....	43
9. ANEXOS.....	57

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos complexos <i>cumulus</i> -oócitos obtidos por laparoscopia.....	21
Tabela 2. Média $\pm$ desvio-padrão e valores máximo e mínimo da frequência cardíaca e frequência respiratória antes ( $T_0$ ) e durante a aplicação da anestesia ( $T_{10-50}$ ) para a realização das laparoscopias em fêmeas caprinas jovens e adultas. Jaboticabal/SP – 2006.....	23
Tabela 3. Média e erro-padrão das variáveis aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP) e gama glutamiltransferase (GGT) de fêmeas caprinas jovens e adultas submetidas à laparoscopia para aspiração folicular. Jaboticabal/SP – 2006 .....	24
Tabela 4. Média e erro-padrão das variáveis uréia e creatinina de fêmeas caprinas submetidas laparoscopia para aspiração folicular. Jaboticabal/SP – 2006.....	24
Tabela 5. Taxa de aproveitamento e taxa de colheita de oócitos de fêmeas caprinas adultas e pré-púberes, com ou sem estímulo hormonal. Jaboticabal/SP – 2006.....	25
Tabela 6. Média e erro-padrão de folículos visualizados e puncionados nos ovários esquerdo e direito e de oócitos encontrados. Jaboticabal/SP – 2006.....	27
Tabela 7. Número de oócitos encontrados, percentual de oócitos viáveis e taxa de maturação de fêmeas caprinas adultas e pré-púberes, com ou sem estímulo hormonal. Jaboticabal/SP – 2006 .....	28
Tabela 8. Média e erro-padrão de oócitos encontrados, viáveis e maturados nos quatro grupos experimentais, bem como a média geral dentro dos grupos. Jaboticabal/SP - 2006.....	29
Tabela 9. Percentual de cabras prenhes aos 45 dias, após serem submetidas a seis sessões de laparoscopia para aspiração folicular. Jaboticabal/SP – 2006.....	31

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Tratamento hormonal destinado às fêmeas caprinas dos grupos G1 (adultas estimuladas) e G3 (jovens estimuladas), durante o período experimental..... 12
- Figura 2. Campo cirúrgico. a – úbere (círculo). b – pontos de inserção da agulha de aspiração. c – linha alba. d – ponto de inserção do trocarte para introdução da pinça de manipulação atraumática. e - ponto de inserção do trocarte para introdução do laparoscópio. f – umbigo..... 16
- Figura 3. Posicionamento em *Trendelenburg* da fêmea caprina (cefalodeclive em 30 graus) ..... 16
- Figura 4. Instalação do pneumoperitônio com CO<sub>2</sub>. 1 –agulha de Veress. 2 – cabo para a passagem do gás..... 16
- Figura 5. Inserção do trocarte de 7 mm para introdução do laparoscópio... 16
- Figura 6. Bainha inserida no abdome para introdução do laparoscópio. 1 – bainha de 7 mm com entrada para o CO<sub>2</sub>. 2 – cabo para a passagem do gás..... 17
- Figura 7. Montagem do laparoscópio. A – laparoscópio. B – cabo da câmera (imagem). C – cabo de fibra ótica (luz)..... 17
- Figura 8. Inserção do trocarte para introdução da pinça de manipulação atraumática. a - trocarte de 10 mm com bainha rosquiável. b – bainha de 7 mm com endoscópio inserido e iluminando a região da punção de “a”..... 17
- Figura 9. Posicionamento dos instrumentais cirúrgicos utilizados na laparoscopia para aspiração folicular. A – agulha de aspiração. B – pinça de manipulação atraumática. C – bainha rosquiável de 10 mm. D – bainha de 7 mm com laparoscópio inserido..... 17
- Figura 10. Sistema de aspiração folicular. 1 – mangueira do vácuo. 2 – linha de aspiração. 3 – rolha de silicone. 4 – tubo de colheita. 5 – agulha de aspiração com bainha plástica. 6 – campo cirúrgico. 18

- Figura 11. Apreensão do ovário. a – pinça de manipulação atraumática. b – ovário esquerdo. c – tuba uterina esquerda. d – ligamento ovariano. e – pedículo..... 18
- Figura 12. Punção do folículo com agulha envolta em bainha plástica. a – bainha plástica. b – ponta da agulha de aspiração. c – ovário esquerdo..... 18
- Figura 13. Lavagem dos ovários, ao final da sessão de aspiração, com solução de PBS heparinizado. a – sugador-irrigador. b – bexiga. c – ovário. d – corno uterino esquerdo. e – corno uterino direito.. 18
- Figura 14. Gráfico ilustrando o número total de folículos visualizados em cada grupo ao longo de seis sessões de laparoscopia para aspiração folicular (LAF). Jaboticabal/SP – 2006..... 26
- Figura 15. Valores médios dos pesos corporais de fêmeas caprinas adultas estimuladas (G1) e não estimuladas (G2) hormonalmente ao longo de seis sessões de laparoscopia para aspiração folicular... 30
- Figura 16. Valores médios dos pesos corporais de fêmeas caprinas pré-púberes estimuladas (G3) e não estimuladas (G4) hormonalmente ao longo de seis sessões de laparoscopia para aspiração folicular..... 30

**LISTA DE ABREVIATURAS**

μL	Microlitro
ANOVA	Análise de variância
ALT	Fosfatase alcalina
AST	Aspartato aminotransferase
cm	Centímetros
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
COC	Complexo <i>cumulus</i> -oócito
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
EGG	Éter gliceril guaiacol ou Guaifenesina
FC	Freqüência cardíaca
FPOD	Folículos puncionados no ovário direito
FPOE	Folículos puncionados no ovário esquerdo
FR	Freqüência respiratória
FSHp	Hormônio folículo-estimulante de origem suína
FVOD	Folículos visualizados no ovário direito
FVOE	Folículos visualizados no ovário esquerdo
G	Gauge (medida de diâmetro de uma agulha)
GGT	Gama glutamiltransferase
H	Hora
Kg	Quilograma
L	Litro
LAF	Laparoscopia para aspiração folicular
MAP	Acetato de medroxiprogesterona
Mg	miligramas
mg/dL	Miligrama por decilitro
Min	Minuto
ML	Mililitros

Mm	milímetros
mmHg	Milímetros de mercúrio (medida de pressão)
MOTE	Múltipla ovulação e transferência de embriões
N	Número
nm	Nanômetros
OPU	Ovum pick-up (colheita de oócitos <i>in vivo</i> )
PIA	Pressão intra-abdominal
PIV	Produção in vitro de embriões
Rpm	Rotações por minuto
SAS®	Statistical Analyses System
T	Tempo (momento)
TIVA	Total intravenous anaesthesia (Anestesia total intravenosa)
U/L	Unidade por litro
UI	Unidade internacional

## AVALIAÇÃO DA LAPAROSCOPIA NA ASPIRAÇÃO FOLICULAR EM FÊMEAS CAPRINAS PRÉ-PÚBERES E ADULTAS COM OU SEM ESTIMULAÇÃO OVARIANA HORMONAL

**RESUMO** – O uso repetido da laparoscopia para aspiração folicular (LAF) associado ou não à estimulação hormonal foi avaliado. Para tanto foram utilizadas 40 fêmeas caprinas sem-raça-definida, divididas aleatoriamente em 4 grupos com 10 animais cada, sendo: Grupo 1 – adultas estimuladas com 80 mg de FSHp e 300 UI de eCG; Grupo 2 – adultas não estimuladas (controle); Grupo 3 – pré-púberes estimuladas com metade das doses preconizadas para o G1 e Grupo 4 – pré-púberes não estimuladas. Cada fêmea foi submetida a seis sessões de colheita com intervalo de uma semana entre as intervenções. A estimulação hormonal foi feita em dose única, 36 horas antes do ato operatório. A técnica consistiu do uso de duas punções para a introdução do endoscópio e da pinça de manipulação atraumática. Após a visualização dos ovários, os folículos visíveis na sua superfície foram puncionados com auxílio de agulha de aspiração acoplada a um sistema de vácuo. Os oócitos encontrados foram classificados de acordo com a qualidade, submetidos à maturação *in vitro* por 27 horas, e posteriormente fixados e corados para avaliação do estágio de maturação. A técnica utilizada, embora tenha apresentado redução da qualidade dos oócitos, não interferiu na taxa de maturação ao longo das seis intervenções. A resposta ovariana diminuiu com o uso repetido da estimulação com FSH exógeno. Não houve comprometimento da condição corporal e da fertilidade dos animais. A avaliação das funções hepática e renal e da analgesia, indica que o protocolo anestésico utilizado é seguro e eficiente para este tipo de procedimento cirúrgico. Diante dos resultados obtidos pode-se concluir que a técnica de laparoscopia para aspiração folicular é adequada para a obtenção de oócitos de fêmeas caprinas pré-púberes e adultas.

**Palavras-chave:** laparoscopia, aspiração folicular, caprino, oócito, folículo, FSH.

## EVALUATION OF THE LAPAROSCOPY TO FOLLICULAR ASPIRATION IN GOAT FEMALES PREPUBERTAL AND ADULTS WITH OR WITHOUT HORMONAL OVARIAN STIMULATION

**SUMMARY** - The repeated use of the laparoscopy to follicular aspiration (LFA) associated or not the hormonal stimulation was evaluated. Forty crossbred goat females were used, divided randomly in 4 groups with 10 animals each, being: Group 1 - adult stimulated with 80 mg of FSHp and 300 UI of eCG; Group 2 - adult not stimulated (control); Group 3 - pre-pubertal stimulated with half of the dose praised for the G1 and Group 4 - prepubertal not stimulated. Each female was submitted the six sessions of harvest with interval of one week between the interventions. The hormonal stimulation was made in only dose, 36 hours before the surgery. The technique consisted of the use of two punctions for the introduction of the endoscopy and the clamp atraumatic manipulation. After the visualization of the ovaries, the visible follicles in its surface were punched with aid of needle of aspiration connected to a vacuum system. The recovery oocytes were classified in accordance with the quality, submitted to *in vitro* maturation for 27 hours, and later fixed and stained for evaluation of maturation state. The used technique does not interfered in the maturation rate although oocytes quality has reduced. However the ovulatory response diminished with the repeated use of exogenous FSH stimulation. Damage was not observed in corporal condition nor fertility. The evaluation of the hepatic function, renal and pain analysis, showed that the anaesthetic protocol used is safe and efficient for this type of surgery. In conclusion, the technique of laparoscopy to follicular aspiration is adjusted for the attainment of oocytes in goat females adult and prepubertal.

**Keywords:** laparoscopy, follicular aspiration, goat, oocyte, follicle, FSH.

## 1. INTRODUÇÃO

Notáveis progressos foram realizados nas últimas décadas no refinamento e inovação de técnicas cirúrgicas aplicadas em diversos propósitos de pesquisa, fins terapêuticos, ou mesmo para uso em locais equipados ou a campo. Estas técnicas têm contribuído de forma significativa na reprodução de animais domésticos, principalmente aqueles de interesse zootécnico, sendo utilizadas em inúmeros procedimentos, tais como inseminação artificial intra-uterina, recuperação e transferência de embriões em diversos estádios de desenvolvimento e verificação da taxa de ovulação em fêmeas doadoras e receptoras (ARMSTRONG & EVANS, 1983; BARIL *et al.*, 1993).

Em pequenos ruminantes, onde não é possível, ou fácil, manipular o trato reprodutivo pelo reto como ocorre em bovinos e eqüinos (TERVIT, 1996), opta-se por intervenções cirúrgicas para facilitar o diagnóstico e manejo da reprodução. Na laparotomia, a exteriorização do trato reprodutivo inevitavelmente leva a algum grau de trauma cirúrgico e quase sempre à formação de aderências pós-operatórias envolvendo útero, tubas e ovários (ISHWAR & MEMON, 1996). Esta situação torna a laparotomia imprópria como método de obtenção de oócitos, a médio e longo prazo, em especial em fêmeas de alto valor genético (FREITAS & SIMPLÍCIO, 2002). A laparoscopia se destaca por ser menos invasiva, proporcionando recuperação mais rápida e podendo ser realizada diversas vezes na mesma fêmea. Mais recentemente esta técnica tem sido utilizada para a obtenção de oócitos *in vivo* para uso na pesquisa fundamental e na produção *in vitro* de embriões (PIV) em caprinos (GRAFF *et al.*, 1999; BALDASSARRE *et al.*, 2002).

Por ser pouco realizada em caprinos, ainda não é possível prever o efeito de repetidas colheitas de oócitos através da laparoscopia para aspiração folicular (LAF), bem como o efeito da estimulação hormonal na fertilidade de doadoras caprinas adultas e pré-púberes.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Técnicas para a colheita de oócitos em animais domésticos

É sabido que a maioria dos oócitos presentes nos ovários ao nascimento não atingem a ovulação (HAFEZ, 1995). Portanto, técnicas de reprodução assistida como a múltipla ovulação e transferência de embriões (MOTE) e a PIV vêm sendo constantemente desenvolvidas e aperfeiçoadas com o objetivo de maximizar o potencial reprodutivo de animais ou mesmo de preservar espécies e raças ameaçadas de extinção.

A obtenção dos oócitos é etapa fundamental para a realização da biotécnica de PIV em animais domésticos e estes podem ser colhidos *in vitro* de ovários obtidos em abatedouros ou por ovariectomia, ou *in vivo* por aspiração de folículos utilizando-se métodos de laparotomia, laparoscopia ou via transvaginal guiada por ultra-som (ARMSTRONG *et al.*, 1997).

Ovários de abatedouros são uma fonte de oócitos de menor custo e mais abundante para a produção de embriões em larga escala (MARTINO *et al.*, 1994b; WANI, 2002). Além disso, oócitos de animais abatidos têm sido importante na obtenção de embriões para uma variedade de propósitos de pesquisa, mas são de limitado valor em programas de melhoramento genético visto que o histórico e estado sanitário são, na maioria das vezes, desconhecidos (ARMSTRONG *et al.*, 1997). Vale ressaltar ainda que, em caprinos, a disponibilidade de ovários é escassa, visto que o abate de fêmeas é limitado. Estas possuem apenas a função de reprodução para manter ou aumentar o número de animais que compõe o rebanho e somente são descartadas quando já apresentam idade avançada.

A recuperação de oócitos de fêmeas vivas, “ovum pick-up” (OPU), é largamente realizada em diversas espécies, com maior destaque para bovinos, contudo sua exploração em pequenos ruminantes é ainda bastante limitada (BALDASSARRE *et al.*, 1994 e 1996; GRAFF *et al.*, 1999). O uso desta técnica

depende do número de embriões produzidos por doadora, o qual está relacionado em parte com a quantidade de oócitos obtidos por colheita (ANEL *et al.*, 1997).

A maturação, fecundação e cultivo *in vitro* de oócitos possuem maior potencial para elevar a produção de animais geneticamente superiores em relação aos métodos tradicionais de MOTE (TERVIT, 1996). No entanto, técnicas para a obtenção destes oócitos não têm se desenvolvido com a mesma velocidade que a PIV e constitui-se de extrema importância para a maximização desta biotécnica (GRAFF *et al.*, 1999).

Em caprinos e ovinos, a laparotomia ainda é bastante utilizada para a colheita de embriões (CORDEIRO, 2001) e oócitos (PTAK *et al.*, 1999). A princípio, é uma das técnicas que oferece maior taxa de colheita, 10 a 15%, se comparada às outras, no entanto com o uso freqüente, o rendimento cai devido à formação de aderências no trato reprodutivo da doadora e deste com tecidos e órgãos circunvizinhos (VALLET *et al.*, 1987).

A “ovum pick-up” via transvaginal guiada por ultra-som é feita predominantemente em bovinos, cujo uso repetido a intervalos curtos de tempo, não apresenta efeitos colaterais sobre a vida reprodutiva das doadoras (GALLI *et al.*, 2001). Em fêmeas caprinas, esta técnica foi desenvolvida por GRAFF *et al.* (1995), porém com algumas limitações. Os autores verificaram que nas fêmeas acima de 30 kg de peso corpóreo, este procedimento torna-se de difícil execução, além de exigir muita habilidade do operador (GRAFF *et al.*, 1999). O rendimento da colheita de oócitos em cabras pela ultra-sonografia não é maior que outras técnicas de OPU. Além disto, é importante notar que a LAF é menos traumática ao ovário porque apenas o córtex é perfurado durante a aspiração, enquanto que durante a colheita por ultra-som, a agulha usualmente alcança o folículo mediante perfuração do estroma ovariano (PIERSON *et al.*, 2004).

Por ser procedimento menos invasivo que a laparotomia, a LAF pode ser repetida diversas vezes na mesma fêmea, reduzindo o estresse sofrido pelo animal, em virtude do reduzido tempo de execução, (KÜHHOLZER *et al.*, 1997). Além disso, possui rendimento maior em comparação à colheita de oócitos

realizada por ultra-som. Na medicina humana, esta técnica tem substituído a laparotomia em pequenas intervenções, reduzindo o tempo cirúrgico, propiciando recuperação mais rápida do paciente, redução dos custos e menor incidência de formação de aderências (MUZII *et al.*, 2002). O uso da LAF aliada a biotécnica de PIV, pode ser alternativa interessante para a superação de problemas de regressão precoce de corpo lúteo, que é a causa da falha de aproximadamente 30% das doadoras caprinas submetidas a MOTE (COGNIÉ, 1999). Devido à crescente importância da caprinocultura, esta técnica poderá ainda contribuir para o melhoramento da produção de embriões nesta espécie, maximizando o seu uso repetido em doadoras de alto valor genético. Os caprinos estão entre as espécies de interesse zootécnico, e certamente, entre os ruminantes mais versáteis em adaptabilidade aos diversos ambientes de produção (KEISLER, 1999). A demanda por produtos e subprodutos desta espécie é bastante alta, porém a oferta insuficiente (SILVA, 2002).

Por ser menos invasiva e provocar o mínimo trauma cirúrgico, a LAF pode vir a substituir a laparotomia, tradicionalmente usada para a colheita de embriões em pequenos ruminantes (COGNIÉ, 1999; STANGL *et al.*, 1999). A possibilidade de realizar colheitas repetidas de oócitos em intervalos reduzidos compensa a produção relativamente baixa a cada sessão de aspiração (ARMSTRONG *et al.*, 1997). Além disso, permite estabelecer a possibilidade da produção de descendentes em situações onde a MOTE não é aplicável, tais como em animais pré-púberes, gestantes, púberes e com idade avançada (BALDASSARRE *et al.*, 2002).

## **2.2. A videolaparoscopia na Medicina Veterinária. Histórico**

O termo laparoscopia origina-se do grego *láparo* e *scopia* que significam abdome e examinar, respectivamente.

Na Medicina, procedimentos minimamente invasivos, como a laparoscopia, são empregados na rotina com intuito de diminuir alguns inconvenientes causados

pela cirurgia convencional (WICKHAN, 1994), como permitir melhor aparência estética, reduzir custos hospitalares, abrandar dor pós-operatória, reduzir o tempo de recuperação pós-operatória e de internação hospitalar (AZZIZ *et al.*, 1989; FILMAR *et al.*, 1987).

Ainda no século XIX, surgiu o precursor do endoscópio moderno. O título de “pai da endoscopia”, segundo HARRINSON (1976), citado por BRUN & BECK (1999), foi atribuído a Philipp Bozzini, que desenvolveu seu primeiro endoscópio no início deste século. No entanto, relatava-se, entre as dificuldades encontradas, a impossibilidade de transmitir iluminação suficiente para o local a ser examinado e o restrito campo de visão. Estas foram minimizadas com a criação do citoscópio de Nitze que possuía lentes ópticas e luz na extremidade distal.

Em 1860, Friedrich Trendelenburg popularizou o posicionamento que levaria seu nome. Empregado para procedimentos pélvicos (ginecológico, urológico, entre outros), é obtido pela colocação do paciente em cefalodeclive de 10 a 30° (LEME *et al.*, 2002).

Em 1901, George Kelling, usou uma agulha para insuflar a cavidade peritoneal de um cão vivo com ar filtrado, possibilitando a primeira exploração da cavidade abdominal. Em 1924 surgiu a agulha de Veress que reduziu o risco de lesão visceral no momento da realização do pneumoperitônio, anterior à introdução dos trocartes (WILDT & LAWLER, 1985).

A Medicina vem desenvolvendo em diversas espécies animais novas técnicas de cirurgia laparoscópica a serem aplicadas posteriormente em pacientes humanos. Na Medicina Veterinária, a videolaparoscopia vem sendo cada vez mais empregada como opção para diagnóstico e tratamento cirúrgico das afecções abdominais (LEMOS *et al.*, 2003).

O campo da cirurgia ginecológica foi uns dos pioneiros a por em prática as técnicas terapêuticas laparoscópicas. A espécie canina é uma das mais estudadas (BRUN & BECK, 1999). Em grandes animais, a videolaparoscopia é bastante utilizada na espécie eqüina, na reprodução assistida, apresentando excelentes resultados (FIALHO *et al.*, 2001). Em porcas e cadelas, a laparoscopia também é

aplicada com sucesso e mínimo trauma (BESENFELDER *et al.*, 1997; SILVA *et al.*, 1995). HAZELEGER & KEMP (2001) apontaram como vantagens da laparoscopia na reprodução de suínos, o fato de ser minimamente invasiva, necessitando de poucas e pequenas incisões para a realização do procedimento e como desvantagens, as mesmas para qualquer outra técnica cirúrgica.

Em pequenos ruminantes, a espécie ovina é a mais usada na pesquisa científica, tanto no campo da Medicina, como modelo animal (HUNTER *et al.*, 1995; CURET *et al.*, 1996; DREYFUS *et al.*, 1996), quanto na Veterinária. A laparoscopia vem sendo aplicada nesta espécie em diversos trabalhos como: inseminação artificial (IA) intrauterina (MCKELVEY *et al.*, 1985b; NEVES & LUZ, 1994), colheita (MCKELVEY & ROBINSON, 1984; MCKELVEY *et al.*, 1986) e transferência de embriões (SCHIEWE *et al.*, 1984; MCKELVEY *et al.*, 1985a; BESENFELDER *et al.*, 1994). A LAF, no entanto, desde a primeira colheita de oócitos em ovelhas (SNYDER & DUKELOW, 1974), não foi completamente desenvolvida até os anos recentes, em conjunto com a biotécnica de PIV (BALDASSARRE *et al.*, 1994 e 1996; ANEL *et al.*, 1997; KÜHHOLZER *et al.*, 1997; ALVAREZ *et al.*, 1999; STANGL *et al.*, 1999; ALBERIO *et al.*, 2002; RODRÍGUEZ *et al.*, 2006). Em caprinos, os relatos são mais limitados, uma vez que a IA e a TE são feitas predominantemente pela via transcervical. Porém, com o advento da transgenia, os caprinos têm participado bastante desta área da pesquisa tornando a laparoscopia uma ferramenta essencial (BALDASSARRE *et al.*, 2002; 2003; 2003a e 2004a). Atualmente, o principal foco desta biotécnica está em produzir cabras transgênicas que sintetizem e secretem em larga escala no leite, proteínas recombinantes de interesse na indústria farmacêutica (WANG *et al.*, 2002; BALDASSARRE *et al.*, 2004, MAGA *et al.*, 2006).

### **2.3. A estimulação ovariana para a obtenção de oócitos *in vivo***

Para a colheita de oócitos *in vivo*, apenas folículos antrais são acessíveis (dois a oito milímetros de diâmetro), e sua eficiência é maior pela estimulação

ovariana com hormônios gonadotróficos com objetivo de aumentar o tamanho do antro (ARMSTRONG *et al.*, 1997).

O hormônio folículo-estimulante (FSH), quando usado para a indução de múltiplas ovulações em cabras, é geralmente administrado em doses fracionadas, duas vezes ao dia, durante os últimos três ou quatro dias do tratamento progestágeno, que é em torno de 9 a 11 dias (BARIL *et al.*, 1993). Isto é necessário por causa da meia-vida curta do FSH. Os protocolos superovulatórios que combinam alta dose (80-140 mg) de FSH acompanhada por baixa dose (200-300 UI) de gonadotrofina coriônica eqüina (eCG), administradas num mesmo momento, proporcionam desenvolvimento folicular e quantidade de oócitos colhidos similar àqueles obtidos em resposta a múltiplas injeções de FSH isoladamente (BATT *et al.*, 1993; ARMSTRONG *et al.*, 1994). A alta dose de FSH é hábil para recrutar, mas não para sustentar o desenvolvimento de um grupo de folículos FSH-responsivos (STUBBINGS *et al.*, 1993). A longa meia-vida do eCG (HAFEZ, 1995) possibilita a continuação do crescimento folicular iniciado pela alta dose de FSH. A aplicação única ao invés de múltiplas é preferível pela praticidade uma vez que o resultado final é semelhante.

Doadoras jovens, em geral, precisam de uma dose de hormônios menor que as fêmeas adultas, devido, em parte, ao seu menor peso corporal mas, talvez também por causa da responsividade folicular ser alta antes de serem estabelecidos os mecanismos regulatórios intraovarianos designados para limitar a taxa de ovulação (ARMSTRONG *et al.*, 1997).

#### **2.4. Fatores que interferem na qualidade do oócito obtido por LAF**

O número de oócitos colhidos de alta qualidade é uma importante meta na produção de embriões *in vitro* (WANI, 2002).

A qualidade do oócito recuperado é determinada, entre outras características, pela presença ou ausência de células do *cumulus*. O papel destas células no desenvolvimento completo da competência dos oócitos é investigado há bastante

tempo (LEIBFRIED & FIRST, 1979). Os estudos mostram que não há maturação ou esta ocorre em menor escala, quando as células do *cumulus* são removidas antes dos oócitos serem maturados *in vitro* (GONÇALVES *et al.*, 2002).

Para realizar a aspiração com sucesso é preciso também verificar o tipo de agulha e a pressão de vácuo a serem empregados, pois disto depende a qualidade do oócito a ser obtido. Como observado no homem, agulhas finas podem dificultar a passagem da massa pré-ovulatória de células do *cumulus* (LENZ & LAURITSEN, 1982), diminuindo assim a taxa de obtenção. O mesmo acontece com agulhas mais largas, devido à redução da velocidade de trânsito e a maior turbulência entre as conexões do sistema de aspiração (RENOU *et al.*, 1981). Com relação à pressão do vácuo, esta não só afeta a quantidade, mas também a qualidade dos oócitos obtidos. FRY *et al.* (1997) verificaram que o aumento da pressão pode levar à maior taxa de obtenção, porém há redução no número de oócitos viáveis. A perda de células do *cumulus* (desnudamento) pode ocorrer durante o trânsito dos oócitos do folículo ao tubo de colheita. Segundo BALDASSARRE *et al.* (1994), estas podem ser preservadas ajustando-se adequadamente a pressão do vácuo ou trabalhando com estádios foliculares mais precoces para a obtenção de um *cumulus* mais compacto.

## **2.5. O uso da LAF em animais jovens**

Do ponto de vista econômico, o maior atrativo desta técnica deve ser a PIV a partir de oócitos recuperados em caprinos pré-púberes. Um alto número de oócitos obtidos de animais jovens, aliada a capacidade de desenvolvimento aceitável, tem o potencial de encurtar significativamente o intervalo entre gerações, acelerando, portanto o ganho genético (PTAK *et al.*, 1999). Visto que a OPU nestes animais permite ter acesso mais precocemente a um grande número de oócitos presentes em cada doadora, técnicas adequadamente repetíveis poderiam beneficiar programas para multiplicar rapidamente raças ou animais valiosos e maximizar o número de embriões produzidos *in vitro* (TERVIT, 1996).

ARMSTRONG *et al.* (1994) comentaram que as respostas foliculares de ovários de novilhas à estimulação com FSH aumentaram progressivamente de três a nove semanas de idade. Os oócitos obtidos por laparoscopia destes folículos são capazes, após serem submetidos a FIV, de desenvolverem-se, em cultivo, até o estágio de blastocisto, apresentando taxas similares àqueles oriundos de ovários de vacas adultas colhidos em abatedouro. Estudos com bovinos comprovaram que novilhas podem ser estimuladas com FSH para repetidas aspirações foliculares por laparoscopia a intervalos curtos sem danos evidentes aos ovários ou interferência com a subsequente capacidade de procriar (STUBBINGS *et al.*, 1993). Foram observados ainda, em outros relatos, que a frequência da aspiração folicular não afeta a posterior resposta superovulatória em vacas (BROADBENT *et al.*, 1997) e a fertilidade em ovelhas (STANGL *et al.*, 1999).

Em programas tradicionais de criação, apenas reprodutores e matrizes de mérito genético provado são selecionados para procriar. Contudo, esta informação não é comumente disponível em animais pré-púberes. A técnica de LAF, aliada à PIV, pode acelerar o processo de expansão de um limitado número de animais geneticamente valiosos quando introduzidos em nova região. Por reduzir muito o intervalo entre gerações, constitui-se forma mais eficaz que o tradicional teste de progênie para a avaliação da condição genética da fêmea (BALDASSARE *et al.*, 2002).

A cabra possui uma população folicular estimada ao nascimento de aproximadamente 37.000 por ovário (BEZERRA *et al.*, 1998) e um padrão predominante de quatro ondas foliculares com ovulação na quarta onda (GINTHER & KOT, 1994). Todavia, durante a vida útil de uma fêmea altamente produtiva, menos de 0,05% dos oócitos irão se desenvolver até gerar um descendente vivo (KEISLER, 1999). Isto significa que este animal, através do uso de técnicas para a máxima obtenção de oócitos e de embriões, pode produzir um número muito maior de descendentes, durante a sua vida reprodutiva, do que de forma natural.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Geral**

- Avaliar a viabilidade da laparoscopia na aspiração folicular (LAF), com sete dias de intervalo entre as intervenções, em fêmeas caprinas pré-púberes e adultas.

#### **3.2. Específicos**

- Verificar se a estimulação hormonal ovariana melhora a colheita de oócitos por LAF;
- Pesquisar se a quantidade e qualidade dos oócitos obtidos, e o número de maturados sofrem alguma influência do uso da LAF semanalmente;
- Investigar se a utilização semanal da LAF interfere na capacidade gestacional destes animais;
- Analisar se a repetibilidade deste procedimento operatório, no período próprio de observação, causa complicações para a obtenção de oócitos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Local do experimento

Os animais foram mantidos no setor de Reprodução Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP - *Campus* de Jaboticabal, em sistema intensivo de criação, onde tiveram acesso a água, sal mineral e feno de Tifton e silagem de milho *ad libitum*, além de ração balanceada no cocho fornecida uma vez ao dia (250g/animal). Neste mesmo local, em um galpão anexo, foram realizadas as intervenções cirúrgicas. A avaliação e a maturação dos oócitos foram realizadas no Laboratório de Fecundação *In Vitro* pertencente ao mesmo setor. A análise das amostras de sangue para avaliação dos parâmetros bioquímicos foi realizada no Laboratório de Patologia Clínica “Prof. Dr. Joaquim Martins Ferreira Neto” do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, ambos pertencentes à referida instituição.

### 4.2. Animais e tratamentos

Foram utilizadas 40 fêmeas caprinas mestiças consideradas híginas com base nas avaliações clínica e parasitológica, sendo 20 pré-púberes e 20 adultas pluríparas, com idades variando, ao início do experimento, de três a cinco e de 12 a 36 meses, respectivamente. Os animais foram randomicamente distribuídos nos seguintes grupos experimentais:

- G1 – adultas estimuladas hormonalmente, n=10;
- G2 – adultas não estimuladas (controle), n=10;
- G3 – pré-púberes estimuladas hormonalmente, n=10;
- G4 – pré-púberes não estimuladas (controle), n=10.

As fêmeas adultas (G1) foram sincronizadas com o uso de esponjas intravaginais impregnadas com 60 mg de acetato de medroxiprogesterona<sup>1</sup> por um período de 11 dias, sendo que no nono dia foi administrado pela via intramuscular, 75 µg de d-cloprostenol<sup>2</sup>. A estimulação ovariana consistiu na administração de 80 mg de FSHp<sup>3</sup> e 300 UI de eCG<sup>4</sup>, ambas em aplicação única, pela via intramuscular, feita 36 horas anterior às intervenções (Figura 1). As fêmeas pré-púberes (G3) receberam metade das doses preconizadas para a estimulação ovariana nas adultas (G1). A retirada das esponjas foi feita imediatamente antes da primeira laparoscopia. Em cada animal, as colheitas de oócitos foram realizadas uma vez por semana, durante seis semanas consecutivas.

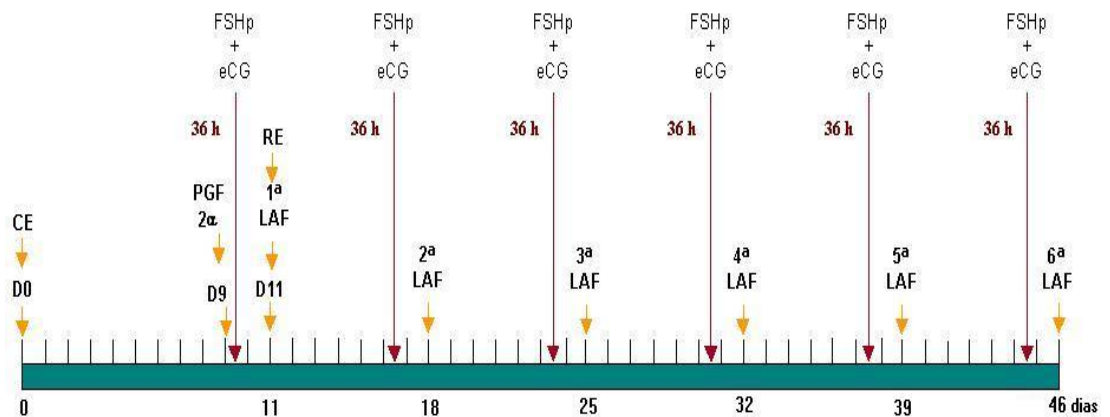


Figura 1 – Esquema do tratamento hormonal destinado às fêmeas caprinas adultas (G1) e pré-púberes (G3), durante o período experimental.

**Legenda:**

**D0** - dia zero (início do tratamento progestágeno)

**CE** - colocação das esponjas

**D9** - nono dia do tratamento progestágeno

**PGF2α** - aplicação de 75 µg de cloprostenol, um análogo da prostaglandina F2α, via intramuscular

**FSHp + eCG** - aplicação de 80 mg de FSHp e de 300 UI de eCG, correspondente à estimulação ovariana, realizada 36 horas antes das laparoscopias (LAF)

**D11** - décimo primeiro dia (final do tratamento progestágeno)

**RE** - retirada das esponjas

<sup>1</sup> MAP, Progespon®, Tecnopec, Syntex S.A., Argentina

<sup>2</sup> Prolise®, Tecnopec, ARSA S.R.L., Argentina

<sup>3</sup> Folltropin®, Tecnopec, Vetrepharm Inc., Canadá

<sup>4</sup> Novormon®, Tecnopec, Syntex S.A., Argentina

### 4.3. Pesagem dos animais

Antes de cada intervenção cirúrgica, as fêmeas tiveram seus pesos corpóreos aferidos em balança digital para permitir o cálculo da dosagem anestésica e avaliação da condição corporal ao longo do experimento.

### 4.4. Protocolo anestésico

Após jejum alimentar de 36 h e líquido de 24 h, os animais receberam, como medicação pré-anestésica, 0,05mg/Kg/IM de cloridrato de xilazina a 2%<sup>5</sup> e, transcorridos 10 minutos, foi aplicado cloridrato de cetamina a 10%<sup>6</sup>, para indução, na dose de 2mg/Kg/IV. Em seguida a fêmea foi colocada em maca cirúrgica apropriada, onde foi realizada a canulação de uma das veias jugulares com auxílio de um catéter 20G para administração da Anestesia Total Intravenosa (TIVA), necessária para manutenção anestésica dos animais durante o procedimento cirúrgico (RIEBOLD, 1996). A TIVA era composta de éter gliceril guaiacol (EGG)<sup>7</sup> na dose de 50mg/mL (5%), 0,1mg/mL de cloridrato de xilazina a 2% e 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. Ato contínuo ao início da TIVA procedeu-se a intubação endotraqueal, com o auxílio de um laringoscópio de lâmina reta, evitando a aspiração do conteúdo ruminal, em caso de regurgitação, e permitindo o fornecimento de oxigênio medicinal umidificado, sob ventilação assistida, facilitando a troca gasosa. No campo cirúrgico, região do abdome cranial ao úbere (Figura 2), foi feita a tricotomia e anti-sepsia com tintura de iodo, e em seguida, a anestesia local infiltrativa com 2 mL de cloridrato de lidocaína<sup>8</sup>, em cada ponto onde foram introduzidos os trocartes.

---

<sup>5</sup> Dorcipec, Vallée – Montes Claros-MG

<sup>6</sup> Dopalen, Vetbrands – Jacareí-SP

<sup>7</sup> Guaifenesina, Henrifarma – São Paulo-SP.

<sup>8</sup> Lidovet®, Bravet, Brasil.

#### 4.5. Laparoscopia para aspiração folicular (LAF)

Depois de executadas a TIVA e analgesia local, a fêmea foi posicionada em *Trendelenburg* (Figura 3), e a agulha de Veress<sup>9</sup> introduzida cerca de 10 a 15 cm cranial ao úbere e cinco centímetros à direita da linha média, para o estabelecimento do pneumoperitônio com CO<sub>2</sub> (Figura 4), utilizando pressão intra-abdominal (PIA) calculada de acordo com o peso da fêmea, variando de 5 a 8 mmHg, e velocidade de insuflação de 2,5 L/min. No mesmo local, com o auxílio de um bisturi, o orifício de introdução da agulha foi ampliado até o máximo um centímetro e em seguida inserido o trocarte de 7 mm (Figura 5) para a colocação de uma bainha pela qual seria introduzido o laparoscópio. Esta bainha era munida de entrada para o CO<sub>2</sub>, o qual manteve a PIA estabelecida a princípio (Figura 6). O endoscópio foi conectado a uma câmera e a um cabo de fibra ótica<sup>10</sup> (Figura 7), fornecendo assim luz para o interior da cavidade e a imagem resultante foi vista em um monitor. A manipulação do laparoscópio ficou a cargo de um assistente. Uma vez obtida a visão interna da cavidade, foi feita, lateralmente a primeira punção, uma pequena incisão na pele para a introdução do trocarte de 10 mm com bainha rosqueável (Figura 8), para a passagem da pinça atraumática modelo Babcock<sup>9</sup>. Com o auxílio deste instrumento, útero, tubas e bursas ováricas foram manipulados para permitir a visualização dos ovários. Antes de iniciar a aspiração, os ovários foram examinados e o número de folículos visíveis (três a oito mm) na superfície de cada um foi registrado. O ovário foi imobilizado pela apreensão próxima ao seu ligamento (Figura 11), evitando ao máximo danificar as estruturas das tubas e do pedículo. Em seguida, a agulha de aspiração foi introduzida na cavidade, com sua ponta protegida por uma bainha plástica, próximo ao local onde se encontrava o ovário (Figura 9). Os folículos foram puncionados pela movimentação dos ovários em diferentes posições com a pinça de manipulação atraumática. A agulha era inicialmente colocada em posição paralela à base do

---

<sup>9</sup> EDLO, Canoas-RS, Brasil

<sup>10</sup> Karl Storz, Alemanha

folículo de modo a penetrá-lo lateralmente (Figura 12). Não sendo possível realizar esta manobra, a punção era perpendicular. Uma vez inserida no folículo, a agulha era cuidadosamente movida para garantir que todo o seu conteúdo fosse aspirado. A pressão do vácuo foi ajustada para no máximo 50 mmHg.

Neste trabalho utilizou-se um sistema de aspiração com lume simples (mesmo diâmetro interno, desde a agulha até a saída no tubo de colheita) composto de uma agulha de 17G envolta em uma bainha plástica<sup>11</sup>, com bisel curto, conectada a uma cânula de teflon de 50 cm de comprimento<sup>12</sup>, a qual terminava no tubo de colheita (50 mL) presa a uma rolha de silicone (Figura 10). O vácuo era produzido por uma bomba de aspiração<sup>13</sup>, através de outra cânula também presa à rolha, que ia do tubo de colheita. No interior do sistema de aspiração por onde passaram os oócitos foi feita uma lavagem prévia com o meio de colheita deixando aproximadamente 2 mL deste líquido, no fundo do tubo, para receber os oócitos.

A fim de minimizar a formação de possíveis aderências, os ovários, ao final da laparoscopia, foram banhados (Figura 13) com 20 mL do meio de colheita aquecido a 37°C e, logo após, o líquido da lavagem foi aspirado da cavidade. Ao final da laparoscopia, foi colocado antibiótico tópico “spray”<sup>14</sup> sobre cada incisão na pele e em seguida estas foram fechadas com o auxílio de agrafes. Ao redor das feridas cirúrgicas foi utilizada pomada repelente/cicatrizante<sup>15</sup>. Nas intervenções subseqüentes, as incisões foram feitas lateralmente a um centímetro, cranial ou caudal à incisão anterior. Após serem retiradas da maca cirúrgica as fêmeas foram colocadas em local limpo e tranqüilo e observadas até o seu completo restabelecimento.

---

<sup>11</sup> Angiocath, 16G, BD®

<sup>12</sup> Handle Cook®, Ribeirão Preto-SP, Brasil

<sup>13</sup> Nevoni

<sup>14</sup> Terra Cortril Spray, Pfizer Ltda.

<sup>15</sup> Ungüento Pearson, Pearson Saúde Animal Ltda.

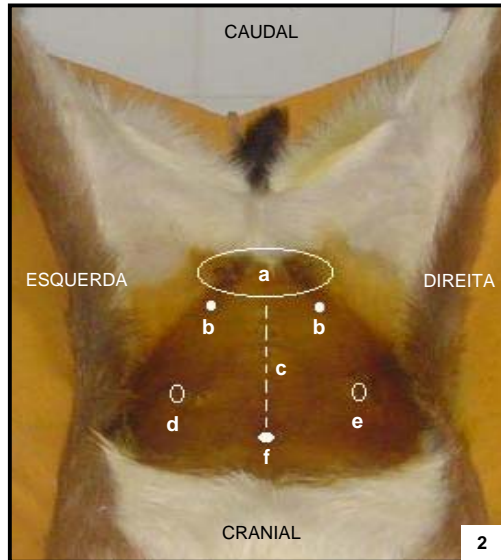


Figura 2 – Fotografia ilustrando o campo cirúrgico de fêmeas caprinas para a LAF. a – úbere (círculo). b – pontos de inserção da agulha de aspiração. c – linha alba. d – ponto de inserção do trocarte para introdução da pinça de manipulação atraumática. e - ponto de inserção do trocarte para introdução do laparoscópio. f – umbigo.



Figura 3 – Fotografia ilustrando o posicionamento em Trendelenburg de fêmea caprina (cefalodeclive em 30 graus).

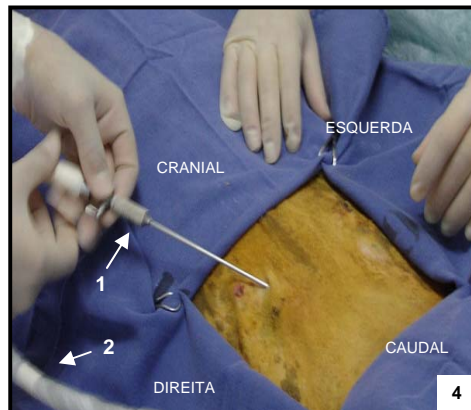


Figura 4 – Fotografia ilustrando a agulha de Veress (1) para instalação do pneumoperitônio com CO<sub>2</sub>. 2 – cabo para a passagem do gás.



Figura 5 – Fotografia ilustrando a inserção do trocarte de 7 mm para introdução do laparoscópio.

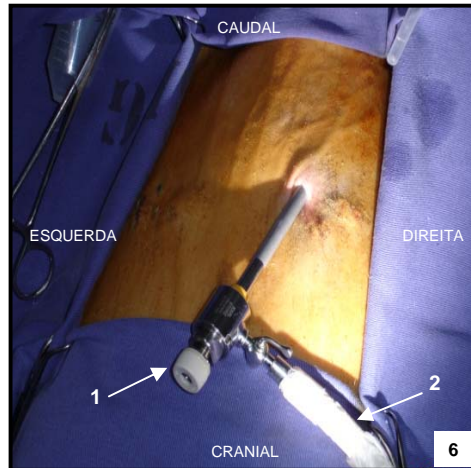


Figura 6 – Fotografia ilustrando a bainha inserida no abdome para introdução do laparoscópio. 1 – bainha de 7 mm com entrada para o CO<sub>2</sub>. 2 – cabo para a passagem do gás.

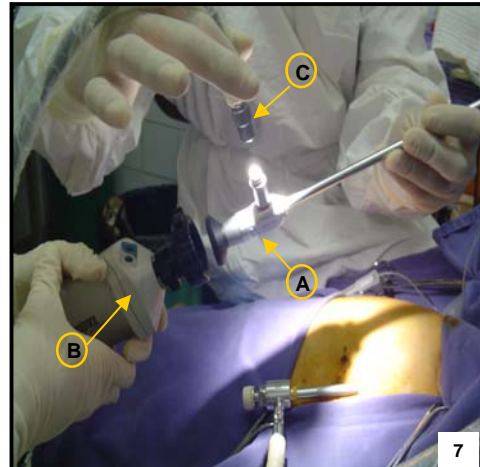


Figura 7 – Fotografia ilustrando a montagem do laparoscópio. A – laparoscópio. B – cabo da câmera (imagem). C – cabo de fibra ótica (luz).

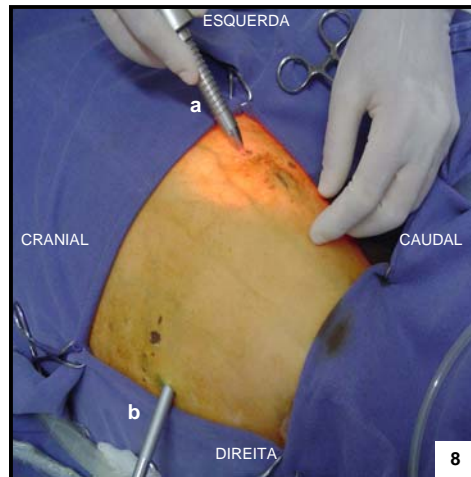


Figura 8 – Fotografia ilustrando a inserção do trocarte para introdução da pinça de manipulação atraumática. a - trocarte de 10 mm com bainha rosquiável. b – bainha de 7 mm com endoscópio inserido e iluminando a região da punção de "a".

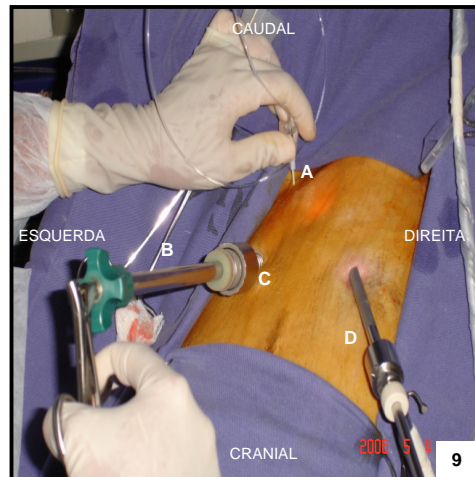


Figura 9 – Fotografia ilustrando o posicionamento dos instrumentais cirúrgicos utilizados na laparoscopia para aspiração folicular. A – agulha de aspiração. B – pinça de manipulação atraumática. C – bainha rosquiável de 10 mm. D – bainha de 7 mm com laparoscópio inserido.

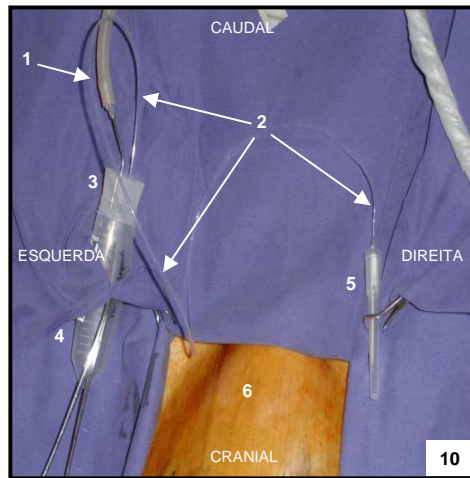


Figura 10 – Fotografia ilustrando o sistema de aspiração folicular. 1 – mangueira do vácuo. 2 – linha de aspiração. 3 – rolha de silicone. 4 – tubo de coleta. 5 – agulha de aspiração com bainha plástica. 6 – campo cirúrgico.

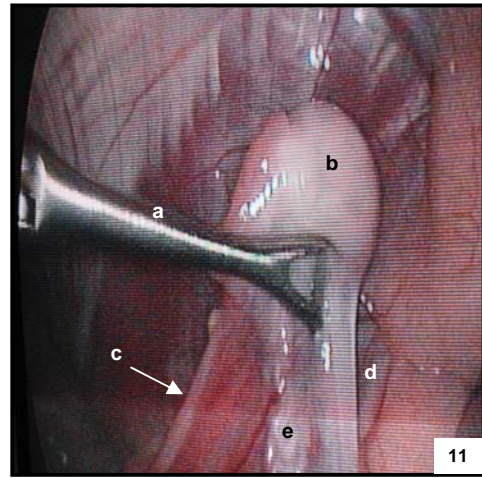


Figura 11 – Fotografia ilustrando a apreensão do ovário. a – pinça de manipulação atraumática. b – ovário esquerdo. c – tuba uterina esquerda. d – ligamento ovariano. e – pedículo.

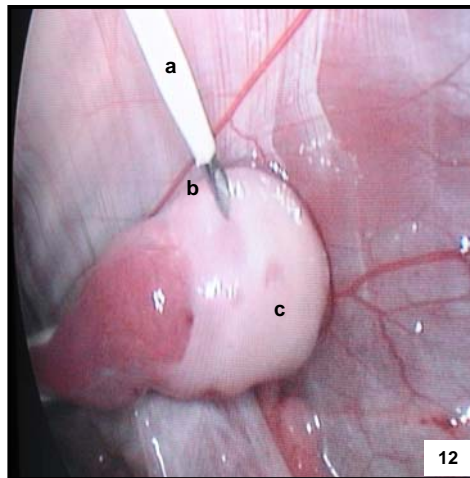


Figura 12 – Fotografia ilustrando a punção do folículo com agulha envolta em bainha plástica. a – bainha plástica. b – ponta da agulha de aspiração. c – ovário esquerdo.

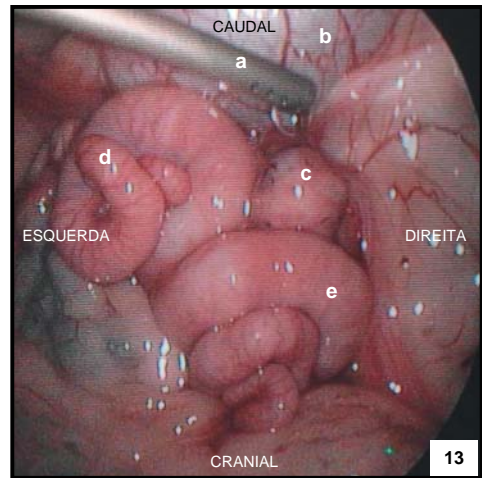


Figura 13 – Fotografia ilustrando o procedimento de lavagem dos ovários, ao final da sessão de aspiração, com solução de PBS heparinizado. a – sugador-irrigador. b – bexiga. c – ovário. d – corno uterino esquerdo. e – corno uterino direito.

#### **4.6. Exame clínico e avaliação da analgesia**

Foram avaliadas as frequências cardíaca (FC) e respiratória (FR), bem como a analgesia nos tempos 0 (antes da medicação anestésica), 10, 20, 30, 40 e 50 minutos durante a administração da TIVA. Os parâmetros FC e FR foram aferidos com estetoscópio colocado na região costal e para a avaliação da analgesia levou-se em consideração os estímulos dolorosos decorrentes da LAF e, os resultados, foram colocados na seguinte escala: 1 – sensação normal ao estímulo doloroso; 2 – analgesia leve; 3 – analgesia moderada; 4 – analgesia completa.

#### **4.7. Avaliação das funções hepática e renal**

Com intuito de avaliar e monitorar as funções hepática e renal, 35% dos animais (n=14), tiveram amostras de sangue (3 mL) colhidas através de venipunção da jugular externa, as quais foram acondicionadas em tubos de ensaio sem anticoagulante, levadas ao laboratório e centrifugadas a 2000 rpm por 5 min, após sinérese, o soro obtido foi acondicionado em tubos próprios, identificados e armazenados (-20°C) adequadamente até o momento das determinações.

As colheitas de sangue foram realizadas antes de cada procedimento cirúrgico, previamente à administração da anestesia. A primeira colheita (T<sub>0</sub>) representou os valores basais, uma vez que os animais ainda não haviam sido submetidos a qualquer procedimento experimental, e foi executada na ocasião da primeira laparoscopia. A última colheita (T<sub>6</sub>) foi feita uma semana após a sexta e última laparoscopia, totalizando sete avaliações.

Os parâmetros bioquímicos avaliados foram: aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP) e gama-glutamilttransferase (GGT), para avaliação da função hepática e uréia e creatinina para avaliação da função renal (Anexo 2).

#### 4.8. Maturação *in vitro*

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  $\mu\text{L}$  de meio de lavagem (Anexo 1), e então classificados de acordo com sua qualidade (Tabela 1). Em seguida, foram passados em três gotas de 100 a 200  $\mu\text{L}$  de meio de lavagem e levados para cultivo em placas contendo gotas de 100  $\mu\text{L}$  de meio de maturação (Anexo 1) sob óleo mineral, onde permaneceram durante 27 horas, em estufa a 39°C, com 5,0% de  $\text{CO}_2$  em ar e atmosfera úmida. Ao final do cultivo, todos os oócitos foram desnudados sob estereomicroscópio (50-80X), em meio de lavagem, com pipeta automática de 100  $\mu\text{L}$ , à temperatura ambiente (28°C). Posteriormente, foram fixados por 5 min com formamida a 4% em PBS e permeabilizados com Triton a 1% em PBS por 10 min. Posteriormente foram corados com gel Mowiol incluído com corante Hoechst 33342, fixados entre lâmina e lamínula, vedados com esmalte, e levados ao microscópio de epifluorescência<sup>16</sup>, após o tempo mínimo de 24 horas, para observação do estágio de maturação nuclear.

Os oócitos examinados foram classificados da seguinte forma (WANG *et al.*, 1998): (1) oócitos maturados, onde é possível observar a formação de um eixo em metáfase com expulsão do primeiro corpúsculo polar; e (2) oócitos imaturos, nos quais a placa metafásica não é observada.

---

<sup>16</sup> Microscópio Olympus IX70; comprimento de onda 460 a 490 nm

Tabela 1 – Classificação dos complexos *cumulus*-oócitos obtidos por laparoscopia.

<b>Grau</b>	<b>Aspecto</b>	<b>Classificação</b>
<b>I</b>	Complexo <i>cumulus</i> completo	Excelente
<b>II</b>	Mais que duas camadas de células do <i>cumulus</i>	Bom
<b>III</b>	Uma camada de células do <i>cumulus</i> ou <i>cumulus</i> incompleto	Regular
<b>IV</b>	Oócito desnudo e/ou degenerado	Ruim

LEIBFRIED & FIRST (1979) adaptado por CORDEIRO (2006).

Foram classificados como viáveis, os oócitos de graus I a III e, em todos eles o citoplasma deveria apresentar-se com coloração brilhante e aspecto uniforme.

#### **4.9. Avaliação da capacidade gestacional**

Cerca de uma semana após a última laparoscopia, as fêmeas adultas tiveram o estro sincronizado e, logo após a retirada das esponjas, foram deixadas com um macho caprino, de fertilidade comprovada por descendentes, até que não manifestassem mais sinais de estro, garantindo-se pelo menos duas coberturas por fêmea. O diagnóstico de gestação foi realizado 45 dias após a cobertura por ultra-sonografia transretal.

As fêmeas pré-púberes precisaram aguardar até que atingissem 10 a 12 meses de idade antes de serem colocadas para reprodução.

#### **4.10. Análise estatística**

Os dados obtidos sobre a quantidade e a qualidade dos oócitos colhidos, bem como o número de maturados nos grupos experimentais foram submetidos à análise de variância (ANOVA), de medidas repetidas, com quatro níveis entre os

animais (grupos) e um fator (tratamento hormonal) com dois níveis dentro dos animais com 6 repetições em cada grupo. Os dados foram analisados pelo programa estatístico SAS® (User's Guide: Statistics, 1985). Na comparação das médias, inclusive aquelas relacionadas às funções hepática e renal, utilizou-se o Teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

A avaliação da fertilidade foi feita pelo teste de Qui-quadrado.

A transformação utilizada nas variáveis foi a *raiz quadrada da observação + 1* com o intuito de diminuir o coeficiente de variação. Isto indica que a variação individual é muito alta.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Avaliação da LAF**

O tempo médio das intervenções cirúrgicas foi de 35 minutos.

O sangramento no ovário, causado pela punção, foi mínimo. A imagem observada no monitor foi pelo menos 10 vezes maior que a real, por isto, parecia que o sangramento causado pela perfuração da agulha na superfície ovariana era muito grande. Além da lavagem dos ovários, a remoção de coágulos grandes foi feita, com o auxílio da pinça atraumática, ao final das aspirações a fim de prevenir aderências. Apenas 15% das fêmeas ( $n=6$ ) apresentaram algum grau de aderência entre o ovário e estruturas adjacentes, predominantemente a partir da quarta intervenção e, somente 10% ( $n=4$ ) desenvolveram aderências entre o omento e o local da inserção dos trocartes.

Já no terceiro dia pós-cirúrgico, as feridas de pele, na maioria das fêmeas, apresentavam um bom grau de cicatrização. Em apenas 10% dos casos ( $n=4$ ) houve inflamação local.

## 5.2. Efeito da anestesia sobre parâmetros fisiológicos

Os dados das freqüências cardíaca (FC) e respiratória (FR) encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2 – Média  $\pm$  desvio-padrão e valores máximo e mínimo das freqüências cardíaca e respiratória antes ( $T_0$ ) e durante a aplicação da anestesia ( $T_{10-50}$ ) para a realização das laparoscopias em fêmeas caprinas pré-púberes e adultas. Jaboticabal/SP – 2006.

Parâmetros		Tempo (minutos)					
		$T_0$	$T_{10}$	$T_{20}$	$T_{30}$	$T_{40}$	$T_{50}$
Freqüência cardíaca (batimentos/minuto)	média $\pm$ d.p.	61 $\pm$ 13	68 $\pm$ 18	73 $\pm$ 24	75 $\pm$ 19	71 $\pm$ 19	73 $\pm$ 18
	máximo – mínimo	92 – 44	100 – 34	154 – 40	120 – 36	104 – 40	120 – 48
Freqüência respiratória (movimentos/minuto)	média $\pm$ d.p.	21 $\pm$ 11	40 $\pm$ 24	50 $\pm$ 23	59 $\pm$ 25	60 $\pm$ 26	55 $\pm$ 23
	máximo – mínimo	60 – 6	96 – 12	100 – 8	100 – 16	120 – 14	112 – 12

Observou-se aumento das freqüências cardíaca (FC) e respiratória (FR) ao longo da intervenção cirúrgica. O aumento da FR foi acompanhado da diminuição da amplitude respiratória. Algumas fêmeas apresentaram apnéia transitória, observada geralmente nos primeiros minutos da TIVA, necessitando assim de respiração controlada. A velocidade de infusão do anestésico administrado foi suficiente para a manutenção do plano cirúrgico, contudo, baseado na monitoração dos reflexos oculares e das FC e FR, em alguns animais, o volume infundido foi reajustado. Apesar do rigoroso jejum, alguns animais apresentaram refluxo gástrico durante o procedimento.

Todos os animais receberam o conceito 4, considerado analgesia completa, isto é, possibilidade de realização do procedimento cirúrgico.

Na avaliação dos parâmetros relacionadas à função hepática (Tabela 3) não foram observadas diferenças ( $P>0,05$ ) em relação ao  $T_0$  (valores basais).

Quanto à função renal (Tabela 4), pôde-se observar que os valores médios obtidos para a variável creatinina diferiram ( $P < 0,05$ ) do controle ( $T_0$ ). Já os valores médios obtidos para a variável uréia não diferiram do controle.

Tabela 3 – Média e erro-padrão dos valores da aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP) e gama-glutamilttransferase (GGT) de fêmeas caprinas jovens e adultas submetidas a seis sessões de laparoscopia para aspiração folicular. Jaboticabal/SP – 2006.

MOMENTO	VARIÁVEIS DETERMINADAS		
	AST (U/L)	ALP (U/L)	GGT (U/L)
$T_0$	75,61±4,76	240,45±37,63	44,78±2,84
$T_1$	81,49±4,76	177,90±37,63	52,57±2,84
$T_2$	60,34±4,76	132,05±37,63	47,71±2,84
$T_3$	71,85±4,76	100,71±37,63	51,64±2,84
$T_4$	67,49±4,76	216,91±37,63	53,97±2,84
$T_5$	62,54±4,76	171,99±37,63	53,42±2,84
$T_6$	60,70±4,76	312,34±37,63	48,21±2,84

$T_0$ =basal ou controle;  $T_1$  a  $T_6$  =1<sup>a</sup> a 6<sup>a</sup> semana.

Tabela 4 – Média e erro-padrão dos valores de uréia e creatinina de fêmeas caprinas submetidas a seis sessões de laparoscopia para aspiração folicular. Jaboticabal/SP – 2006.

MOMENTO	VARIÁVEIS DETERMINADAS	
	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)
$T_0$	48,88±5,29	1,16±0,04
$T_1$	41,23±5,29	1,25±0,04
$T_2$	32,10±5,29	1,04±0,04
$T_3$	49,06±5,29	1,07±0,04
$T_4$	60,49±5,29	1,15±0,04
$T_5$	56,58±5,29	1,05±0,04
$T_6$	45,38±5,29	0,93±0,04*

$T_0$ =basal ou controle;  $T_1$  a  $T_6$  =1<sup>a</sup> a 6<sup>a</sup> semana.

\* Diferem do controle ( $T_0$ ) pelo Teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

### 5.3. Resposta ovariana e colheita de oócitos

O número total de folículos visualizados e puncionados de cada grupo, e as taxas de aproveitamento e de colheita, ao longo das seis semanas, estão ilustrados na Tabela 5.

Tabela 5 – Taxa de aproveitamento e de colheita de oócitos de fêmeas caprinas adultas e pré-púberes, com ou sem estímulo hormonal. Jaboticabal/SP – 2006.

LAF	Grupo	n	Folículos visualizados (n)	Folículos puncionados (n)	Taxa de aproveitamento (%)	Taxa de colheita (%)
1 <sup>a</sup>	1	10	220	150	68,18	52,00
	2	10	154	116	75,32	93,94
	3	10	196	137	69,89	38,68
	4	10	137	105	76,64	40,00
2 <sup>a</sup>	1	10	194	147	75,77	86,48
	2	10	144	93	64,58	53,76
	3	10	178	116	65,16	42,24
	4	10	123	86	69,91	32,55
3 <sup>a</sup>	1	10	174	141	81,03	48,93
	2	10	127	90	70,86	64,44
	3	10	141	101	71,63	54,45
	4	10	89	60	67,41	50,00
4 <sup>a</sup>	1	10	174	116	66,66	47,41
	2	9	107	73	68,22	58,90
	3	10	139	98	70,50	56,12
	4	9	110	82	74,54	31,70
5 <sup>a</sup>	1	10	135	97	71,85	61,85
	2	9	116	83	71,55	46,98
	3	10	114	85	74,56	48,23
	4	8	94	64	68,08	42,18
6 <sup>a</sup>	1	10	108	70	64,81	51,42
	2	9	117	80	68,37	47,50
	3	10	123	83	67,47	55,42
	4	8	95	69	72,63	46,37

Legenda:

Grupos: 1 = adultas com estimulação hormonal; 2 = adultas sem estimulação hormonal;

3 = pré-púberes com estimulação hormonal; 4 = pré-púberes sem estimulação hormonal.

Taxa de aproveitamento = n° de folículos puncionados / n° folículos visualizados

Taxa de colheita = n° de oócitos obtidos / n° folículos puncionados

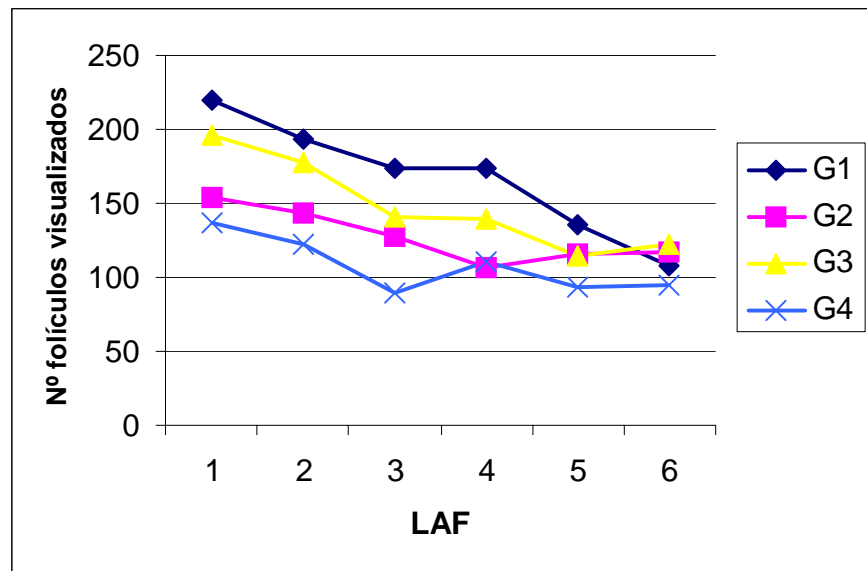


Figura 14 – Gráfico ilustrando o número total de folículos visualizados em cada grupo ao longo de seis sessões de laparoscopia para aspiração folicular (LAF). Jaboticabal/SP – 2006.

O número de folículos visualizados diminuiu em todos os grupos ao longo das semanas como ilustrado na Figura 14, destacando-se uma redução mais acentuada entre as fêmeas submetidas à estimulação ovariana hormonal (G1 e G3).

Os valores médios de folículos visualizados (FVOE e FVOD) e puncionados (FPOE e FPOD) em ambos os ovários, bem como no número de oócitos encontrados (Tabela 6) apresentaram diferença ( $P < 0,05$ ) entre a primeira e última semana apenas no grupo de fêmeas adultas com estimulação hormonal (G1). Nos demais grupos, os valores não diferiram entre a primeira e última semana e entre si com relação às variáveis avaliadas.

Tabela 6 – Média e erro-padrão de folículos visualizados e puncionados nos ovários esquerdo e direito e de oócitos encontrados. Jaboticabal/SP – 2006.

Variáveis	Grupos	Laparoscopias					
		1	2	3	4	5	6
FVOE	1	11,20±0,73 <sup>a</sup> n=10	9,90±0,73 n=10	8,90±0,73 n=10	8,70±0,73 n=10	6,50±0,73 n=10	5,40±0,73 <sup>b</sup> n=10
	2	6,90±0,73 n=10	7,60±0,73 n=10	6,80±0,73 n=10	5,65±0,78 n=9	6,21±0,78 n=9	6,21±0,78 n=9
	3	10,20±0,73 n=10	9,50±0,73 n=10	7,70±0,73 n=10	7,80±0,73 n=10	5,40±0,73 n=10	6,40±0,73 n=10
	4	6,90±0,73 n=10	6,80±0,73 n=10	5,10±0,73 n=10	5,48±0,78 n=9	6,63±0,84 n=8	5,25±0,84 n=8
FVOD	1	10,80±0,74 <sup>a</sup> n=10	9,50±0,74 n=10	8,50±0,74 n=10	8,70±0,74 n=10	7,00±0,74 n=10	5,40±0,74 <sup>b</sup> n=10
	2	8,50±0,74 n=10	6,80±0,74 n=10	5,90±0,74 n=10	5,62±0,79 n=9	6,06±0,79 n=9	6,17±0,79 n=9
	3	9,40±0,74 n=10	8,30±0,74 n=10	6,40±0,74 n=10	6,10±0,74 n=10	6,00±0,74 n=10	5,90±0,74 n=10
	4	6,80±0,74 n=10	5,50±0,74 n=10	3,80±0,74 n=10	6,66±0,79 n=9	5,31±0,85 n=8	6,81±0,85 n=8
FPOE	1	8,20±0,60 <sup>a</sup> n=10	7,30±0,60 n=10	7,40±0,60 n=10	5,80±0,60 n=10	4,80±0,60 n=10	3,60±0,60 <sup>b</sup> n=10
	2	5,00±0,60 n=10	4,70±0,60 n=10	4,70±0,60 n=10	3,57±0,64 n=9	4,35±0,64 n=9	4,13±0,64 n=9
	3	6,90±0,60 n=10	6,30±0,60 n=10	5,70±0,60 n=10	5,50±0,60 n=10	4,10±0,60 n=10	4,20±0,60 n=10
	4	5,50±0,60 n=10	5,20±0,60 n=10	3,10±0,60 n=10	4,37±0,64 n=9	3,91±0,69 n=8	3,66±0,69 n=8
FPOD	1	6,80±0,58 <sup>a</sup> n=10	7,40±0,58 n=10	6,70±0,58 n=10	5,80±0,58 n=10	4,90±0,58 n=10	3,40±0,58 <sup>b</sup> n=10
	2	6,60±0,58 n=10	4,60±0,58 n=10	4,30±0,58 n=10	4,24±0,62 n=9	4,57±0,62 n=9	4,46±0,62 n=9
	3	6,80±0,58 n=10	5,30±0,58 n=10	4,40±0,58 n=10	4,30±0,58 n=10	4,40±0,58 n=10	4,10±0,58 n=10
	4	5,00±0,58 n=10	3,40±0,58 n=10	2,90±0,58 n=10	4,58±0,62 n=9	4,15±0,67 n=8	5,03±0,67 n=8
Oócitos encontrados	1	7,80±0,83 <sup>a</sup> n=10	6,40±0,83 n=10	6,90±0,83 n=10	5,50±0,83 n=10	6,00±0,83 n=10	3,60±0,83 <sup>b</sup> n=10
	2	6,20±0,83 n=10	5,00±0,83 n=10	5,80±0,83 n=10	4,37±0,89 n=9	3,92±0,89 n=9	3,81±0,89 n=9
	3	5,30±0,83 n=10	4,90±0,83 n=10	5,50±0,83 n=10	5,50±0,83 n=10	4,10±0,83 n=10	4,60±0,83 n=10
	4	4,20±0,83 n=10	2,80±0,83 n=10	3,00±0,83 n=10	2,66±0,89 n=9	3,07±0,96 n=8	3,69±0,96 n=8

Legenda:

a, b: valores significativamente diferentes pelo Teste de Tukey (P<0,05).

Grupos: 1 = adultas com estimulação hormonal; 2 = adultas sem estimulação hormonal;

3 = pré-púberes com estimulação hormonal; 4 = pré-púberes sem estimulação hormonal.

FVOE: folículos visualizados no ovário esquerdo

FVOD: folículos visualizados no ovário direito

FPOE: folículos puncionados no ovário esquerdo

FPOD: folículos puncionados no ovário direito

Tabela 7 – Número de oócitos encontrados, percentual de oócitos viáveis e taxa de maturação de fêmeas caprinas adultas e pré-púberes, com ou sem estímulo hormonal. Jaboticabal/SP – 2006.

LAF	Grupo	n	Oócitos (n)	Viáveis (%)	Taxa de maturação (%)
1 <sup>a</sup>	1	10	78	94,87	63,51
	2	10	62	70,97	68,18
	3	10	53	86,79	60,86
	4	10	42	59,52	64,00
2 <sup>a</sup>	1	10	64	90,62	63,79
	2	10	50	62,00	74,19
	3	10	49	71,42	60,00
	4	10	28	75,00	52,38
3 <sup>a</sup>	1	10	69	89,85	69,35
	2	10	58	81,03	78,72
	3	10	55	72,72	75,00
	4	10	30	66,66	70,00
4 <sup>a</sup>	1	10	55	72,72	62,50
	2	9	43	81,39	74,28
	3	10	55	89,09	65,30
	4	9	26	69,23	77,77
5 <sup>a</sup>	1	10	60	75,00	77,77
	2	9	39	79,48	64,51
	3	10	41	78,04	87,50
	4	8	27	88,88	62,50
6 <sup>a</sup>	1	10	36	72,22	73,07
	2	9	38	57,89	86,36
	3	10	46	82,60	71,05
	4	8	32	71,87	52,17

Legenda:

Grupos: 1 = adultas com estimulação hormonal; 2 = adultas sem estimulação hormonal;

3 = pré-púberes com estimulação hormonal; 4 = pré-púberes sem estimulação hormonal.

Viáveis = oócitos de Graus I, II e III

Taxa de maturação = n° de oócitos maturados / n° oócitos viáveis

Na Tabela 7 mostra o número total de oócitos colhidos por semana e a taxa de maturação em cada grupo, bem como o percentual de oócitos viáveis (Graus I, II e III) .

Devido a não ocorrência de interação entre os grupos, as médias relativas ao número de oócitos encontrados, viáveis e maturados foram agrupadas dentro dos grupos e das semanas (Tabela 8). A qualidade dos oócitos apresentou redução

significativa entre a primeira e a última semana. As fêmeas jovens não estimuladas tiveram um rendimento significativamente menor comparado às adultas estimuladas.

Tabela 8 – Média e erro-padrão de oócitos encontrados, viáveis e maturados nos grupos experimentais, bem como a média geral dentro os grupos e das semanas. Jaboticabal/SP – 2006.

Variáveis	Grupos	Laparoscopias						Média geral
		1	2	3	4	5	6	
Oócitos encontrados	1	7,80±0,83 n=10	6,40±0,83 n=10	6,90±0,83 n=10	5,50±0,83 n=10	6,00±0,83 n=10	3,60±0,83 n=10	<b>6,03±0,54<sup>a</sup></b>
	2	6,20±0,83 n=10	5,00±0,83 n=10	5,80±0,83 n=10	4,37±0,89 n=9	3,92±0,89 n=9	3,81±0,89 n=9	<b>4,85±0,57<sup>ab</sup></b>
	3	5,30±0,83 n=10	4,90±0,83 n=10	5,50±0,83 n=10	5,50±0,83 n=10	4,10±0,83 n=10	4,60±0,83 n=10	<b>4,98±0,54<sup>ab</sup></b>
	4	4,20±0,83 n=10	2,80±0,83 n=10	3,00±0,83 n=10	2,66±0,89 n=9	3,07±0,96 n=8	3,69±0,96 n=8	<b>3,23±0,59<sup>b</sup></b>
	<b>Média geral</b>	<b>5,87±0,41<sub>A</sub></b>	<b>4,77±0,41<sub>A</sub></b>	<b>5,30±0,41<sub>A</sub></b>	<b>4,50±0,43<sub>A</sub></b>	<b>4,27±0,44<sub>A</sub></b>	<b>3,92±0,44<sub>A</sub></b>	
Oócitos viáveis	1	7,40±0,72 n=10	5,80±0,72 n=10	6,20±0,72 n=10	4,00±0,72 n=10	4,50±0,72 n=10	2,60±0,72 n=10	<b>5,08±0,44<sup>a</sup></b>
	2	4,40±0,72 n=10	3,10±0,72 n=10	4,70±0,72 n=10	3,58±0,77 n=9	3,14±0,77 n=9	2,14±0,77 n=9	<b>3,51±0,46<sup>ab</sup></b>
	3	4,60±0,72 n=10	3,50±0,72 n=10	4,00±0,72 n=10	4,90±0,72 n=10	3,20±0,72 n=10	3,80±0,72 n=10	<b>4,00±0,44<sup>a</sup></b>
	4	2,50±0,72 n=10	2,10±0,72 n=10	2,00±0,72 n=10	1,90±0,77 n=9	2,87±0,83 n=8	2,75±0,83 n=8	<b>2,35±0,48<sup>b</sup></b>
	<b>Média geral</b>	<b>4,72±0,36<sub>A</sub></b>	<b>3,62±0,36<sub>AB</sub></b>	<b>4,22±0,36<sub>AB</sub></b>	<b>3,59±0,37<sub>AB</sub></b>	<b>3,42±0,38<sub>AB</sub></b>	<b>2,82±0,38<sub>B</sub></b>	
Oócitos maturados	1	4,70±0,54 n=10	3,70±0,54 n=10	4,30±0,54 n=10	2,50±0,54 n=10	3,50±0,54 n=10	1,90±0,54 n=10	<b>3,43±0,34<sup>a</sup></b>
	2	3,00±0,54 n=10	2,30±0,54 n=10	3,70±0,54 n=10	2,62±0,58 n=9	1,96±0,58 n=9	1,85±0,58 n=9	<b>2,57±0,36<sup>a</sup></b>
	3	2,80±0,54 n=10	2,10±0,54 n=10	3,00±0,54 n=10	3,20±0,54 n=10	2,80±0,54 n=10	2,70±0,54 n=10	<b>2,76±0,34<sup>a</sup></b>
	4	1,60±0,54 n=10	1,10±0,54 n=10	1,40±0,54 n=10	1,55±0,58 n=9	1,85±0,62 n=8	1,47±0,62 n=8	<b>1,49±0,37<sup>b</sup></b>
	<b>Média geral</b>	<b>3,02±0,27<sub>A</sub></b>	<b>2,30±0,27<sub>A</sub></b>	<b>3,10±0,27<sub>A</sub></b>	<b>2,47±0,28<sub>A</sub></b>	<b>2,52±0,28<sub>A</sub></b>	<b>1,98±0,28<sub>A</sub></b>	

Legenda:

Grupos: 1 = adultas com estimulação hormonal; 2 = adultas sem estimulação hormonal;

3 = pré-púberes com estimulação hormonal; 4 = pré-púberes sem estimulação hormonal.

#### 5.4. Acompanhamento do peso corporal

Apesar do intervalo de uma semana entre as intervenções e do período destinado ao jejum sólido (36 horas), as fêmeas não apresentaram redução no peso corporal ao longo das seis sessões (Figuras 15 e 16). Pelo contrário, houve aumento destes valores em ambos os grupos ao final do experimento.

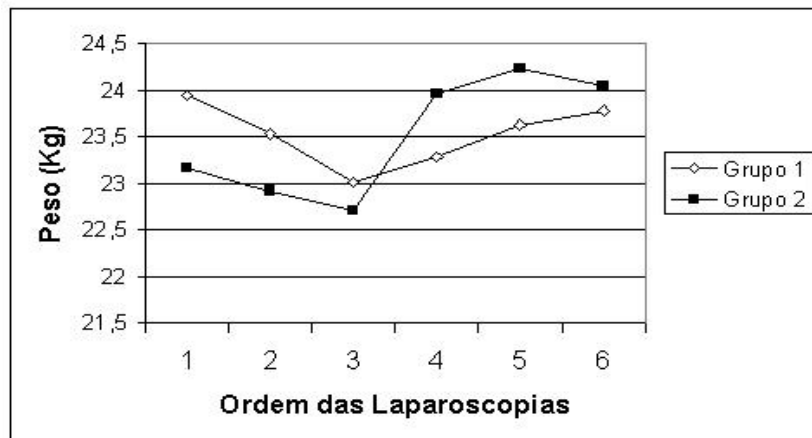


Figura 15 – Valores médios dos pesos corporais de fêmeas caprinas adultas estimuladas (Grupo 1) e não estimuladas (Grupo 2) hormonalmente ao longo de seis sessões de laparoscopia para aspiração folicular. Jaboticabal/SP – 2006.

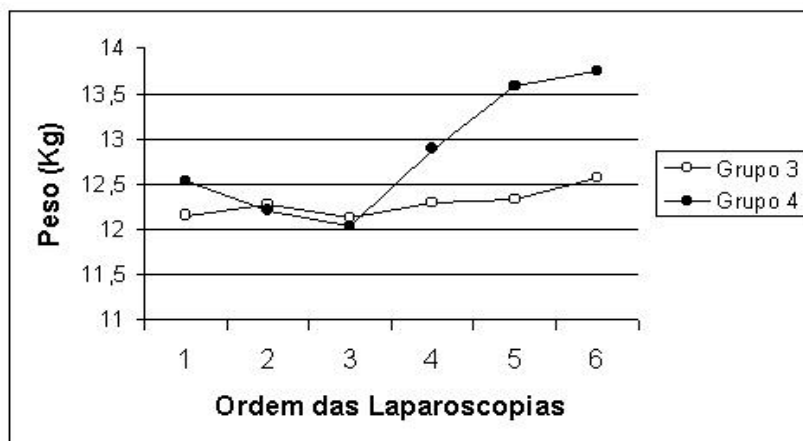


Figura 16 – Valores médios dos pesos corporais de fêmeas caprinas pré-púberes estimuladas (Grupo 3) e não estimuladas (Grupo 4) hormonalmente ao longo de seis sessões de laparoscopia para aspiração folicular. Jaboticabal/SP – 2006.

### 5.5. Efeito sobre a capacidade gestacional das fêmeas

A Tabela 9 reúne o percentual de cabras prenhes nos quatro grupos experimentais.

Tabela 9 – Percentual de cabras prenhes aos 45 dias, após serem submetidas a seis sessões de laparoscopia para aspiração folicular. Jaboticabal/SP – 2006.

<b>Grupos</b>	<b>n</b>	<b>% prenhez</b>
1	9	44,44 (4/9)
2	9	66,66 (6/9)
3	10	60,00 (6/10)
4	7	71,42 (5/7)
<b>Total</b>	<b>35</b>	<b>60,00 (21/35)</b>

n = número de animais expostos à cobertura por monta natural.

Do total de fêmeas expostas à cobertura por monta natural nos quatro grupos experimentais, 60% encontravam-se prenhes aos 45 dias após exame por ultrasonografia transretal. A diferença no número de animais expostos à cobertura foi decorrente de óbito ou da impossibilidade de realização da cobertura.

## 6. DISCUSSÃO

As técnicas utilizadas para a obtenção de oócitos em fêmeas caprinas não têm sido desenvolvidas na mesma proporção que a biotécnica de PIV. O aperfeiçoamento destas técnicas é, portanto, de fundamental importância, principalmente ao tratar-se de fêmeas geneticamente superiores, que podem ser utilizadas como doadoras por período de tempo prolongado.

Foi verificado que com o avanço do experimento, o tempo gasto com cada intervenção foi diminuído. Isto provavelmente deveu-se à prática e ao

entrosamento da equipe. Assim como no trabalho realizado por GINTHER & KOT (1994) onde foram feitas ultra-sonografias diárias para avaliar a dinâmica folicular em cabras, a habilidade do operador e, no nosso caso, também da equipe, melhorou com a experiência.

As fêmeas apresentaram boa cicatrização nos locais de punção dos trocartes, uma vez que as feridas cirúrgicas apresentavam-se, já no terceiro dia pós-cirúrgico, sem sinais de inflamação nem de deiscência de sutura.

O estabelecimento do pneumoperitônio, na Medicina Humana, é considerado a manobra mais crítica da videolaparoscopia e a técnica fechada mediante punção com agulha de Veress é a mais freqüentemente utilizada (WILDT & LAWLER, 1985). Apesar de possuir uma ponta protegida, pois há o recolhimento do bisel ao atingir o interior da cavidade, sempre existe o risco de lesão de órgãos ou de insuflação equivocada (AZEVEDO *et al.*, 2004). Contudo, o posicionamento em *Trendelenburg* (LEME *et al.*, 2002) permitiu a introdução da agulha de Veress sem causar qualquer lesão. É sabido que o peritônio, apesar de muito delgado, também é bastante resistente e um dos meios de saber se a ponta da agulha estava dentro da cavidade era ouvindo dois “cliques” ao final, ou seja, o cirurgião deve sentir a resistência de duas camadas e então irá entrar na cavidade abdominal (SAVARIS, 2005).

A técnica utilizada neste trabalho consistiu em se fazer duas punções com auxílio de trocartes para a introdução do endoscópio e da pinça de manipulação. A agulha de aspiração foi inserida na cavidade diretamente através da pele, sem a necessidade de um terceiro trocar. ALVAREZ *et al.* (1999) avaliaram o uso de duas (apenas um operador usando laparoscópio com visão direta e canal para a agulha mais a pinça de manipulação), três (operador com a pinça e a agulha, assistente com o laparoscópio mais a câmera) e quatro punções (operador com a pinça e a agulha, assistente com outra pinça mais o laparoscópio com a câmera). A máxima eficiência ( $n^{\circ}$  oócitos colhidos x  $n^{\circ}$  folículos observados) foi conseguida com a técnica de três punções. Os autores sugerem ainda considerar o uso de duas punções por ser menos onerosa (não necessita da câmera nem do monitor)

e por causar menos injúrias. Neste trabalho uniu-se as vantagens das duas técnicas citadas acima: menor tempo de execução e melhor resultado daquela de três punções, com a segurança da de duas, uma vez que dispensa a colocação do terceiro trocarre.

O risco da laparoscopia está, como em muitas outras técnicas cirúrgicas, na anestesia, a qual é imprescindível para a realização da intervenção e deve ser a mais prática e eficiente possível. Os princípios gerais para sua escolha na cirurgia tradicional são aplicáveis à laparoscopia (MARCELINO & PENICHE, 2002). O protocolo anestésico usado neste trabalho foi resultado de uma série de tentativas a fim de se conseguir algo que fosse seguro, não causasse dor visceral e não fosse danosa à saúde dos animais. O uso do oxigênio contribuiu para melhorar o trabalho respiratório dos animais. O aumento das FC e FR foram atribuídos ao posicionamento (*Trendelenburg*) e à distensão abdominal causada pelo gás (pneumoperitônio) os quais causam entre outros efeitos, grande compressão diafragmática. Esta foi compensada pela diminuição da amplitude respiratória. Estes achados, associado ao bom grau de analgesia sugerem que o protocolo anestésico aplicado neste trabalho é adequado e eficiente para este tipo de procedimento cirúrgico em caprinos.

O período de 36 horas destinado ao jejum foi estabelecido pela observação dos animais sob efeito anestésico, uma vez que um tempo menor de restrição alimentar, principalmente de alimentos sólidos, predisponha o animal com mais freqüência à regurgitação do conteúdo ruminal, que eram favorecidos pela posição em *Trendelenburg*. Desta forma, o risco de pneumonia por aspiração é alto, podendo leva-los a óbito.

Banhar o ovário puncionado com o líquido de colheita (PBS acrescido de heparina) foi eficaz para prevenir a formação de aderências deste com outras estruturas como útero, tuba uterina e bursa ovárica. Entretanto, uma fêmea apresentou aderência entre o ovário direito e a bexiga após a segunda laparoscopia. Algumas fêmeas jovens apresentaram em mais de uma intervenção, bexiga muito repleta, dificultando bastante a visualização e a apreensão dos

ovários. Segundo PUGH (2005), o cloridrato de xilazina pode causar o aumento da produção de urina em caprinos, sendo comum notar-se o aumento de até seis vezes no volume de urina excretado.

Foi observado que quanto maior a PIA, maior o efeito sobre a frequência respiratória dos animais experimentais, em virtude do desconforto gerado tanto pela posição na maca, quanto pela instalação do pneumoperitônio. No entanto, quando o valor deste se encontrava menor que o estabelecido à princípio, prejudicava bastante a visualização das estruturas na cavidade pélvica. Um pneumoperitônio acima do indicado pode levar a complicações cardíacas e respiratórias, principalmente se o paciente exprimir algum tipo de injúria diafragmática (WIEDEMAN *et al.*, 1998). A velocidade de insuflação utilizada foi baixa porque, à medida que o pneumoperitônio ia sendo estabelecido, o anestesista verificava as frequências cardíaca e respiratória. Em alguns momentos foi necessário diminuir a PIA pois algumas fêmeas apresentaram redução na frequência respiratória. No entanto, apesar de baixa, a PIA empregada foi suficiente para a realização das manobras cirúrgicas.

A ausência de alterações dos parâmetros AST, FA e GGT, usados para avaliar a função hepática, deve-se ao fato de que o fígado, diferentemente dos rins, ser órgão com reconhecida habilidade compensatória e regenerativa, e esta pode retardar o aparecimento de alterações clínicas e laboratoriais até que 80 a 90% do parênquima hepático esteja comprometido (COLES, 1984).

A função renal dos animais experimentais também não foi afetada pelo uso repetido da TIVA, nem pelo período de jejum a que foram submetidos. Os valores de uréia não apresentaram diferença ( $P > 0,05$ ) quando comparados ao controle ( $T_0$ ) estando dentro do limite normal para a espécie caprina que é de 21 a 60 mg/dL (PUGH, 2005). Já a creatinina apresentou diferença ( $P < 0,05$ ) na última semana quando comparada com o valor basal. Esta é produzida no organismo a partir da metabolização da creatina em um processo não enzimático e irreversível que ocorre na musculatura esquelética, sendo excretada pela filtração glomerular, e qualquer anormalidade que diminua a velocidade do fluxo urinário resultará na

elevação da concentração sérica deste metabólito (COLES, 1984), ou seja, a elevação no nível de creatinina no sangue indica distúrbio renal. Neste caso, pode-se inferir que não houve dano renal uma vez que os valores de creatinina não aumentaram ao longo do experimento, pelo contrário, ocorreu uma redução significativa destes. Apesar deste resultado, os valores médios desta variável também encontravam-se dentro dos parâmetros normais (0,9 a 1,8 mg/dL) para a espécie (PUGH, 2005).

As taxas de colheitas apresentadas neste trabalho, considerando o período de apenas uma semana entre as laparoscopias, podem ser consideradas aceitáveis. Certamente um intervalo mais longo poderia proporcionar melhores resultados. Em programas de produção onde um grande número de animais está disponível, pode-se aplicar um tempo maior entre as LAFs, porém, em situações onde as fontes doadoras são limitadas, um período mais curto entre as colheitas pode ser vantajoso (PIERSON *et al.*, 2004).

Particularmente, o grupo de fêmeas adultas estimuladas apresentou diminuição significativa, entre a primeira e a última laparoscopia, no número de folículos visualizados e puncionados em ambos os ovários, bem como no número de oócitos colhidos após repetidas LAFs. Contudo, embora os demais resultados não tenham sido significativos, houve redução destes valores ao longo das seis semanas de laparoscopias (Tabela 6), independente do grupo experimental, o que coincide com os resultados obtidos por outros autores (ANEL *et al.*, 1998 e PTAK *et al.*, 1998, citados por MORTON *et al.*, 2005b). KÜHHOLZER *et al.* (1997) observaram que o número de oócitos e folículos manteve-se constante depois de repetidas LAFs, com intervalo de uma semana, em ovelhas sem tratamento hormonal. Neste trabalho, as taxas de colheita foram superiores aos resultados do nosso estudo, mesmo em relação às fêmeas estimuladas. Porém, essa diferença de resultados provavelmente deve ser relativa ao uso de técnicas e equipamentos distintos, não sendo possível, portanto, se fazer uma comparação fiel entre as taxas obtidas em ambos os experimentos.

Uma das hipóteses que explicariam a redução dos índices avaliados ao longo das sucessivas LAFs seria o uso freqüente de hormônio exógeno, o qual poderia estar induzindo a formação de anticorpos anti-FSH (BODIN, *et al.*, 1997; DE RUIGH *et al.*, 2000). Em caprinos tratados com FSH de origem porcina, existe a possibilidade de indução da formação de anticorpos para esse hormônio, diminuindo assim a resposta ovariana após a terceira aplicação (REMY *et al.*, 1991), o que causaria, desta forma, a refratariedade das fêmeas ao tratamento. Outra hipótese seria o fato de cerca de 10% das fêmeas caprinas não serem responsivas ao tratamento de superovulação (BREBION *et al.*, 1992). Embora técnicas alternativas existam, tais como a “ovum pick-up” combinada com a produção *in vitro* de embriões, a superovulação ainda é um procedimento eficiente e barato na maximização do número de descendentes oriundos de fêmeas geneticamente superiores (DRIANCOURT, 2001).

Quando gonadotrofinas exógenas são administradas, o recrutamento de folículos pode ser aumentado ou prolongado, além da seleção ser bloqueada. O número médio de folículos geralmente aumenta proporcionalmente à quantidade de gonadotrofina injetada, até alcançar um máximo, o qual está intimamente relacionado ao número de folículos gonadotrofina-responsivos presentes nos ovários das fêmeas tratadas (MONNIAUX *et al.*, 1983). Como a resposta ovariana às gonadotrofinas é dose-dependente e altamente variável, é difícil predizer se um tratamento é superior a outro (DRIANCOURT, 2001).

Em um experimento com ovelhas adultas, foi avaliado o efeito de repetidas aspirações foliculares com e sem o uso de FSH (neste caso, foram realizadas três LAFs, com intervalo de duas semanas entre as intervenções) sobre a resposta ovariana, número e qualidade dos oócitos, bem como sobre o desenvolvimento *in vitro* (MORTON *et al.*, 2005b). Assim como no presente trabalho, foi verificado um número maior de folículos e de oócitos recuperados nas fêmeas tratadas, no entanto, as taxas de colheita foram similares ( $P > 0,05$ ) entre as fêmeas pré-púberes e adultas de ambos os tratamentos. Resultados similares foram observados em outros estudos (STANGL *et al.*, 1999; MORTON *et al.*, 2005). A

colheita de oócitos *in vivo* e a produção de embriões *in vitro* poderá aumentar o número de embriões produzidos em um tempo disponível se puderem ser realizadas freqüentemente e de forma bem-sucedida (BROADBENT *et al.*, 1997).

O número de folículos visualizados denota a atividade ovariana (MORTON *et al.*, 2005). Como pode ser visto na Figura 14, houve redução da resposta folicular em todos os grupos avaliados. Pode-se inferir a este achado a possibilidade das lesões causadas ao ovário, decorrentes das sucessivas aspirações, terem provocado uma inflamação local que, por sua vez, tenha comprometido o processo de recrutamento folicular. Outros fatores como o estresse causado pelo jejum ou pela manipulação e contenção dos animais no momento da aplicação dos hormônios e da anestesia, além da própria técnica operatória e seus elementos, também podem estar envolvidos. É pertinente considerar que estes fatores, separados ou agregados, agindo de forma direta ou indireta, podem ter colaborado para estes resultados.

Dois aspectos importantes a serem considerados na variabilidade da taxa de ovulação, induzida por gonadotrofinas, são a diversidade entre fêmeas de uma mesma espécie ou raça e em cada fêmea individualmente. Enquanto o primeiro pode ser detectado assim que a estimulação hormonal é feita, o segundo requer sucessivas tentativas em superestimular o mesmo animal, na maioria dos casos, de elite (DRIANCOURT, 2001). No presente trabalho, as fêmeas adultas tiveram o estro sincronizado então, acredita-se que a maioria delas deveria possuir um padrão folicular semelhante ao início das LAFs. Com relação às pré-púberes, a informação é menos precisa. Sabe-se que a estimulação ovariana por gonadotrofinas exógenas pode afetar profundamente o ambiente fisiológico interno do folículo (O'CALLAGHAN *et al.*, 2000). Oócitos de animais superovulados freqüentemente exibem reduzida capacidade de desenvolvimento comparados aos daqueles não estimulados. O uso de hormônios aumenta a taxa de crescimento folicular a qual resulta em uma assincronia na maturação entre o folículo e o oócito (FOOTE & ELLINGTON, 1988; COMBELLES & ALBERTINI, 2003).

Em estudos realizados com cabritas verificou-se que o número total de folículos aumenta aos dois e diminui aos cinco meses de idade (RAWLINGS *et al.*, 2003). Em fêmeas ovinas pré-púberes foi encontrado que a PIV aumentada com a estimulação hormonal e com a idade, contudo, observou-se que uma resposta alta à estimulação não afeta a produção de embriões em fêmeas de três a quatro meses e de seis a sete meses de idade (MORTON *et al.*, 2005a).

As laparoscopias concentraram-se entre os anos de 2004 e 2005 e foram realizadas durante todo o ano. Nesta pesquisa, provavelmente não houve influência das estações do ano sobre a resposta ovariana, visto que não foram observadas discrepâncias entre as colheitas ao longo do ano. Estes dados estão de acordo com outros autores onde não foram observadas diferenças no número de folículos entre estes períodos, em estudos conduzidos em ambientes de médias latitudes (40-45°N) tanto em caprinos (PINTADO *et al.*, 1998) quanto em ovinos (GONZALES-BULNES *et al.*, 2003; PIERSON *et al.*, 2004). No presente estudo, a localização geográfica, 21°15'17"S, propiciou uma influência ainda menor do fotoperíodo.

A taxa de aproveitamento (n° de folículos puncionados / n° folículos visualizados) foi satisfatória pois, embora a visualização de mais folículos tenha sido feita no momento da colheita, não foi possível realizar a aspiração de todos em decorrência do sangramento de alguns folículos, principalmente os maiores, sobre os menores, impedindo a sua localização posterior. Além disto, dependendo da posição em que o folículo se encontrava, o acesso a este ficava bastante difícil, já que a pinça atraumática usada para segurar ovário encobria parte deste. Ainda, a luz do endoscópio, por vezes, refletia na superfície ovariana camuflando a presença de alguns folículos, especialmente os menores.

Há suspeita de que, caso a agulha utilizada fosse mais fina, as taxas de aproveitamento e de colheita poderiam ter sido melhores, principalmente devido à punção de folículos menores (3-5 mm). Estudos com aspiração de oócitos humanos mostraram que o uso de agulhas mais finas gerou um marcado aumento na taxa de colheita (RENOU *et al.*, 1981). Este aumento foi atribuído ao aumento

na velocidade do fluxo do líquido, um menor “espaço morto” no interior da linha de aspiração e menor turbulência nos encaixes dos instrumentos. No entanto, estas tendem a obstruir mais facilmente com coágulos de sangue e para a desobstrução destas faz-se necessário aumentar o vácuo, o que traria, portanto, prejuízo à qualidade dos oócitos colhidos.

Foi observado que a agulha utilizada no presente trabalho possuía calibre adequado para a aspiração de folículos maiores. No entanto, quando se tratava de folículos menores (abaixo de 5 mm) a aspiração tornava-se um pouco prejudicada. FRY *et al.* (1997) observaram que agulhas maiores que 17G não são práticas para o uso em pequenos folículos, os quais correspondem a mais de 90% dos folículos aspirados na superfície dos ovários.

O uso da bainha plástica nos permitiu trabalhar com mais segurança permitindo a proteção da ponta da agulha de aspiração ao atingir o interior da cavidade abdominal, expondo-a somente ao aproximar-se do folículo a ser puncionado.

Neste estudo, o sistema de aspiração foi composto de uma agulha curta com bisel também curto e uma linha de menor comprimento. Verificou-se que, apesar dos esforços para diminuir as perdas durante a aspiração, como o desnudamento e o rompimento de oócitos, através da redução da pressão do vácuo e o encurtamento da linha de aspiração, a maioria dos oócitos viáveis foi classificada como de grau III e, os de grau IV, foram em grande parte de oócitos desnudos.

A qualidade dos oócitos (percentual de oócitos viáveis) apresentou diminuição significativa da média geral entre os grupos na última semana comparada a primeira, estando de acordo com os achados de outros autores (KÜHHOLZER *et al.*, 1997; PTAK *et al.*, 1998 citado por MORTON *et al.*, 2005). Sabe-se que a maioria dos oócitos perde parte das células do *cumulus* no trânsito do folículo até o tubo de colheita. Estas podem ser preservadas por meio do refinamento do vácuo trabalhando com folículos em estágio mais precoce que por sua vez têm complexos *cumulus*-oócito mais compactos (BALDASSARRE *et al.*, 1994). O oócito caprino pareceu demonstrar uma certa fragilidade à pressão do

vácuo. Um leve aumento na pressão no momento da desobstrução das agulhas com coágulos de sangue, levava ao aparecimento de oócitos desnudos. O fato de o vácuo não afetar apenas a taxa de colheita de oócitos, mas também à sua qualidade, também foi demonstrado por FRY *et al.* (1997). Esses autores verificaram que, aumentando a pressão do vácuo, o número de oócitos colhidos podia ser maior, no entanto, quando esta era superior a 50 mmHg, havia redução no número de oócitos viáveis, provavelmente devido à remoção da cobertura de células do *cumulus* em torno do oócito.

Estudos de oócitos em cultivo indicaram que a cooperação das células da granulosa associadas a estes é essencial para o seu crescimento (KESKINTEPE *et al.*, 1994). Estas células participam da nutrição, do metabolismo e da regulação da maturação oocitária (EPPIG, 1992). O aumento no número total de oócitos com o aumento da pressão do vácuo não compensa a diminuição na qualidade dos oócitos pela perda de células do *cumulus*. Apenas 44% dos oócitos desnudos maturam *in vitro*, comparados aos 71% dos oócitos com revestimento de *cumulus* (LEIBFRIED & FIRST, 1979).

A taxa de maturação não apresentou alterações significativas nos grupos estudados ao longo das semanas. No entanto, quando os dados foram agrupados, houve uma diminuição na taxa de maturação das fêmeas pré-púberes não estimuladas (G4). Além da redução no número de oócitos colhidos, houve queda também na qualidade destes, o que reflete necessariamente no número de oócitos maturados.

Visto que todos os oócitos viáveis colhidos foram submetidos à maturação *in vitro*, não foi possível determinar se parte deles já havia maturado *in vivo*, devido ao uso da eCG na estimulação ovariana. Para tanto, seria necessário fazer a fixação imediata destes oócitos, o que prejudicaria a realização da MIV.

Aliado ao aumento no tamanho do folículo para permitir maior eficiência na colheita, os protocolos de estimulação ovariana são projetados para elevar a competência de desenvolvimento dos oócitos, através do realce da maturação citoplasmática, bem como permitir o controle do sincronismo da maturação

meiótica (ARMSTRONG *et al.*, 1997). Estudos têm mostrado uma relação positiva do diâmetro do folículo com o do oócito e a sua competência para se desenvolver. Oócitos de folículos maiores (>5 mm) apresentam taxa de maturação maior que aqueles de folículos menores (CROZET *et al.*, 1995). Em bovinos e ovinos, oócitos de animais pré-púberes têm apresentado diâmetro menor que em fêmeas adultas (GANDOLFI *et al.*, 1998; LEDDA *et al.*, 1999). Em cabras, estudos têm mostrado que o diâmetro médio dos oócitos aumenta com o tamanho do folículo (CROZET *et al.*, 2000) e também que tanto em fêmeas adultas (DE SMEDT *et al.*, 1994) quanto em pré-púberes (MARTINO *et al.*, 1994a), oócitos menores (110  $\mu\text{m}$ ) são incompetentes meioticamente, aqueles com diâmetro entre 110 e 125  $\mu\text{m}$  são parcialmente competentes e oócitos com mais de 125  $\mu\text{m}$  de diâmetro possuem competência meiótica completa. Além disto, foi provado que oócitos de fêmeas caprinas pré-púberes menores que 125  $\mu\text{m}$  são incapazes de desenvolver-se até o estágio de blastocisto (JIMÉNEZ-MACEDO *et al.*, 2006). Ainda, estudos confirmam a reduzida capacidade de desenvolvimento embrionário de oócitos oriundos de fêmeas pré-púberes (revisado por ARMSTRONG, 2001; COGNIÉ *et al.*, 2003).

Um dado interessante neste trabalho foi o fato dos valores médios de peso corporal das fêmeas, de ambas faixas etárias, terem aumentado ao final das sessões de laparoscopia, apesar do intervalo de apenas sete dias entre elas. Não houve qualquer tipo de melhoria na alimentação fornecida durante este período, portanto, o ganho de peso pode ser atribuído à adaptação dos animais às condições experimentais, ou seja, as possíveis situações de estresse a que estas fêmeas foram expostas não afetaram negativamente o consumo alimentar.

Pode-se dizer que a diminuição da resposta ovariana poderia ter sido mais pronunciada caso as fêmeas tivessem apresentado redução do peso corporal ao longo das seis semanas pois, sabe-se que a nutrição pode alterar o nível e a duração da exposição de folículos gonadotrofina-dependentes de FSH (ROBINSON, 1996; BOLAND *et al.*, 2001). A relação entre nutrição e reprodução

em ruminantes é complexa e as respostas são freqüentemente variáveis e inconsistentes (O'CALLAGHAN *et al.*, 2000).

Os dados de diagnóstico de gestação corroboram outros estudos, os quais mostraram não haver prejuízo na fertilidade (nº de fêmeas prenhes x nº de fêmeas submetidas à cobertura) das doadoras após passarem por repetidas sessões de LAF (STANGL *et al.*, 1999; BERLINGUER *et al.*, 2004).

## 7. CONCLUSÕES

1. O protocolo anestésico utilizado foi seguro e eficiente, não tendo causado comprometimento das funções hepática e renal.
2. Não houve diminuição do escore corporal das fêmeas, observando-se, inclusive, ganho de peso corpóreo nos animais não estimulados.
3. Verificou-se ao longo do experimento, em todos os animais, redução do número de oócitos obtidos, particularmente nas fêmeas estimuladas, ainda que não tenha ocorrido diferença estatística.
4. Durante o experimento foi constatada diminuição do número de oócitos de boa qualidade, contudo sem alterar as taxas de maturação.
5. Averiguou-se que este procedimento cirúrgico causou aderências de significado irrelevante.
6. A seqüência de laparoscopias para obtenção de oócitos nesta experimentação não comprometeu o desenvolvimento da gestação na maioria dos animais acasalados.
7. Nesta espécie, a laparoscopia para aspiração folicular, utilizada a intervalos tão curtos quanto de uma semana, na mesma fêmea, jovem ou adulta, é uma biotécnica segura e eficiente que otimiza a reprodução animal.

## 8. REFERÊNCIAS\*

ALBERIO, R.; OLIVEIRA, J.; ROCHE, A.; ALABART, J.; FOLCH, J. Performance of a modified ovum pick-up system using three different FSH stimulation protocols in ewes. **Small Rumin. Res.**, Amsterdam, v.46, p.81-87, 2002.

ALVAREZ, M.; ANEL, L.; ANEL, E.; RODRÍGUEZ, C.; KAABI, M.; BOIXO, J.C.; PAZ, P.; OLMEDO, J. Efficiency of laparoscopic follicular aspiration in sheep. **Theriogenology**, Los Altos, v.51, n.1, p.432, 1999.

ANEL, L.; SEVILLANO, C.; ALVAREZ, M.; ALEGRE, B.; ANEL, E.; DOMÍNGUEZ, C.; CARBAJO, M.; DE LA FUENTE, J. Repeated laparoscopic follicular aspiration in lambs. **Theriogenology**, Los Altos, v. 47, n.1, p.152, 1997, Abstract.

ARMSTRONG, D.T.; EVANS, G. Factors influencing success of embryo transfer in goats. **Theriogenology**, Los Altos, v.19, n.1, p.31-42, 1983.

ARMSTRONG, D.T.; IRVINE, B.J.; EARL, C.R.; McLEAN, D.; SEAMARK, R.F. Gonadotropin stimulation regimens for follicular aspiration and in vitro embryo production from calf oocytes. **Theriogenology**, Los Altos, v.42, n.7, p.1227-1236, 1994.

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.**, East Melbourne, v.9, n.3, p.333-339, 1997.

ARMSTRONG, D.T. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. **Theriogenology**, Los Altos, v.55, n.6, p.1303-1322, 2001.

---

\* Segundo a ABNT NRB 6023 – Agosto 2002.

AZEVEDO, J.L.M.; GUINDALINI, R.S.C.; AZEVEDO, O.C.; PAIVA, V.C.; DELORENZO, A.; MOREIRA, M.B. Avaliação do posicionamento da agulha de Veress durante o estabelecimento do pneumoperitônio pela técnica fechada, em porcos. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 31, n.5, p. 318-323, 2004.

AZZIZ, R.; STEINKAMPF, M.P.; MURPHY, A. Postoperative recuperation: relation to the extent of endoscopic surgery. **Fertil. Steril.**, v.15, p.1061-1064, 1989.

BALDASSARRE, H.; DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C.; CASTRO, T.E.; CABRERA FISCHER, E.I. Technique for efficient recovery of sheep oocytes by laparoscopic folliculocentesis. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.35, n.1-2, p.145-150, 1994.

BALDASSARRE, H.; FURNUS, C.C.; DE MATOS, D.G.; PESSI, H. *In vitro* production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis: alternative gonadotrophin treatments for stimulation of oocytes donors. **Theriogenology**, Los Altos, v.45, n.3, p.707-717, 1996.

BALDASSARRE, H.; WANG, B.; KAFIDI, N.; KEEFER, C.L.; LAZARIS, A.; KARATZAS, C.N. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and *in vitro* embryo production technologies. **Theriogenology**, Los Altos, v.57, n.1, p.275-284, 2002.

BALDASSARRE, H.; KEEFER, C.L.; WANG, B.; LAZARIS, A.; KARATZAS, C.N. Nuclear transfer in goats using *in vitro* matured oocytes recovered by laparoscopic ovum pick-up. **Clon. Stem Cells**, v.5, p.279-285, 2003.

BALDASSARRE, H.; WANG, B.; KAFIDI, N.; GAUTHIER, M.; NEVEU, N.; LAPOINTE, J.; SNEEK, L.; LEDUC, M.; DUGUAY, F.; ZHOU, J.F.; LAZARIS, A.; KARATZAS, C.N. Production of transgenic goats by pronuclear microinjection of

in vitro produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy. **Theriogenology**, Los Altos, v.59, n.3-4, p.831-839, 2003a.

BALDASSARRE, H.; WANG, B.; KEEFER, C.L.; LAZARIS, A.; KARATZAS, C.N. State of the art in the production of transgenic goats. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.16, p.465-470, 2004.

BALDASSARRE, H.; WANG, B.; PIERSON, J.; NEVEU, N.; SNEEK, L.; LAPOINTE, J.; COTE, F.; KAFIDI, N.; KEEFER, C.L.; LAZARIS, A.; KARATZAS, C.N. Prepubertal propagation of transgenic cloned goats by laparoscopic ovum pick-up and in vitro embryo production. **Clon. Stem Cells**, v.6, n.1, p.25-29, 2004a.

BARIL, G.; BREBION, P.; CHESNÉ, P. **Manuel de formation pratique pour la transplantation embryonnaire chez la brebis et la chèvre**. Rome: FAO, 1993. 183 p.

BATT, P.A.; KILLEEN, I.D.; CAMERON, A.W.N. Use of single or multiple injections of FSH in embryo collection programmes in goats. **Reprod. Fertil. Dev.**, East Melbourne, v.5, n.1, p.49-56, 1993.

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 from ovum pick-up in donor sheep. **Theriogenology**, Los Altos, v.61, n.7-8, p.1477-1486, 2004.

BESENFELDER, U.; HAZAS, G.; GYÖKER, E.; GERATZ, E.; BREM, G. Laparoscopic embryo transfer into the Fallopian tube in sheep. **Theriogenology**, Los Altos, v.41, p.162, 1994.

BESENFELDER, U.; MÖDL, J.; MÜLLER, M.; BREM, G. Endoscopic embryo collection and embryo transfer into the oviduct and the uterus of pigs. **Theriogenology**, Los Altos, v.47, n.5, p.1051-1060, 1997.

BEZERRA, M.B.; RONDINA, D.; LIMA, A.K.F.; OLIVEIRA, L.C.; CECCHI, R.; LUCCI, C.M.; GIORGETTI, A.; FIGUEIREDO, J.R. Aspectos quantitativos e qualitativos da foliculogênese pré-natal na espécie caprina. **Ciênc. Anim.**, Fortaleza, v.8, n.2, p.47-56, 1998.

BODIN, L.; DRION, P.V.; REMY, B.; BRICE, G.; COGNIE, Y.; BECKERA, J.F. Anti-PMSG antibody levels in sheep subjected annually to oestrus synchronization. **Reprod. Nutr. Dev.**, v.37, p.651-660, 1997.

BOLAND, M.P.; LONERGAN, P.; O'CALLAGHAN, D. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. **Theriogenology**, Los Altos, v.55, n.6, p.1323-1340, 2001.

BREBION P.; BARIL, G.; COGNIÉ, Y.; VALLET, J.C. embryo transfer in sheep and goat. **Ann.Zoot.**, v.41, p.331-339, 1992.

BROADBENT, P.J. *et al.* Effect of frequency of follicle aspiration on oocyte yield and subsequent superovulatory response in cattle. **Theriogenology**, Los Altos, v.47, n.5, p.1027-1040, 1997.

BRUN, M.V.; BECK, C.A.C. Aplicações clínicas e experimentais da laparoscopia em cães – Artigo de revisão. **Rev. Fac. Zootec. Vet. Agro.**, Uruguiana, v.5/6, n.1, p.5-11, 1998/99.

COMBELLES, C.M.H.; ALBERTINI, D.F. Assessment of oocyte quality following repeated gonadotropin stimulation in the mouse. **Biol. Reprod.**, v.68, p.812-821, 2003.

COGNIÉ, Y.; BARIL, G.; POULIN, N.; MERMILLOD, P. Current status of embryo technologies in sheep and goat. **Theriogenology**, Los Altos, v.59, n.1, p.171-188, 2003.

COGNIÉ, Y. State of the art in sheep-goat embryo transfer. **Theriogenology**, Los Altos, v.51, n.1, p.105-116, 1999.

COLES, E.H. **Patologia clínica veterinária**. 3.ed. São Paulo: Manole, 1984. 565p.

CORDEIRO, M.F. **Produção e criopreservação de embriões ovinos da raça Santa Inês**. 2001. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2001.

CROZET, N.; AHMAD ALI, M.; DUBOS, M.P. Developmental competence of goats oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture *in vitro*. **J. Reprod. Fertil.**, v.103, n.2, p.293-298, 1995.

CROZET, N.; DAHIREL, M.; GALL, L. Meiotic competence of in vitro grown goat oocytes. **J. Reprod. Fertil.**, v.118, p.367-373, 2000.

CURET, M.J.; VOGT, D.A.; SCHOB, O.; QUALLS, C.; IZQUIERDO, L.A.; ZUCKER, K.A. Effects of CO<sub>2</sub> pneumoperitoneum in pregnant ewes. **J. Surg. Res.**, v.63, p.339-344, 1996.

DE RUIGH, L.; MULLAART, E.; VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A.M. The effect of FSH stimulation prior to ovum pick-up on oocyte and embryo yield. **Theriogenology**, Los Altos, v.53, n.1, p. 429, 2000.

DE SMEDT, V.; CROZET, N.; GALL, L. Morphological and functional changes ovarian goat oocyte. **J. Exp. Zool.**, v.269, p.128-139, 1994.

DREYFUS, M.; BECMEUR, F.; SCHWAAB, C.; BALDAUF, J.; PHILIPPE, L.; RITTER, J. The pregnant ewe: an animal model for fetoscopic surgery. **Eur. J. Obst. Gynec. Reprod. Biol.**, v. 71, p. 9-94, 1996.

DRIANCOURT, M.A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, Los Altos, v.55, n.6, p.1211-1239, 2001.

EPPIG, J.J. Growth and development of mammalian oocytes *in vitro*. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v.116, p.379-382, 1992.

FIALHO, S.S.; FIGUEIRÓ, G.M.; LEHMKÜHL, R.C.; PASIN, M.; RUBIN, M.I.B.; SILVA, C.A.M. Abordagem laparoscópica na égua como meio auxiliary nas técnicas de reprodução assistida. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v.38, n.5, p.229-232, 2001.

FILMAR, S.; GOMEL, V.; MCCOMB, P.F. Operative laparoscopy versus open abdominal surgery: a comparative study on postoperative adhesion formation in the rat model. **Fertil. Steril.**, v.48, n.3, p.486-489, 1987.

FOOTE, R.H.; ELLINGTON, J.E. Is a superovulated oocyte normal? **Theriogenology**, Los Altos, v.29, n.1, p.111-123, 1988.

FREITAS, V.J.F.; SIMPLÍCIO, A.A. Transferência de embriões em caprinos. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Livraria Varela, 2002. p. 179-194.

FRY, R.C.; NIALL, E.M.; SIMPSON, T.L.; SQUIRES, T.J.; REYNOLDS, J. The collection of oocytes from bovine ovaries. **Theriogenology**, Los Altos, v.47, n.5, p.977-987, 1997.

GALLI, C.; CROTTI, G.; NOTARI, C.; TURINI, P.; DUCHI, R.; LAZZARI, G. Embryo production by ovum pick-up from live donors. **Theriogenology**, Los Altos, v.55, n.6, p.1341-1357, 2001.

GANDOLFI, F.; MILANESI, E.; POCAR, P.; LUCIANO, A.M.; BREVINI, T.A.; ACOCELLA, F. Comparative analyses of calf and cow oocytes during *in vitro* maturation. **Mol. Reprod. Dev.**, v.49, p.168-175, 1998.

GINTHER, O.J.; KOT, K. Follicular dynamics during the ovulatory season in goats. **Theriogenology**, Los Altos, v.42, n.6, p.987-1001, 1994.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Livraria Varela, 2002. p.198-199.

GONZALEZ-BULNES, A.; GARCIA-GARCIA, R.M.; SANTIAGO-MORENO, J.; DOMINGUEZ, V.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; COCERO, M.J. Reproductive season affects inhibitory effects from large follicles on the response to superovulatory FSH treatments in ewes. **Theriogenology**, Los Altos, v.60, p.281-288, 2003.

GRAFF, K.J.; MEINTJES, M.; DYER, V.W.; PAUL, J.B.; DENNISTON, R.S.; ZIOMEK, C.A.; GODKE, R.A. Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval

following FSH simulation of domestic goats. **Theriogenology**, Los Altos, v.51, n.6, p.1099-1119, 1999.

GRAFF, K.J.; MEINTJES, M.; PAUL, J.B.; DYER, V.W.; DENNISTON, R.S.; ZIOMEK, C.A.; GODKE, R.A. Ultrasound-guided oocyte recovery from FSH-treated gotas for IVF. **Theriogenology**, Los Altos, v.43, p.223, 1995.

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução animal**. 6. ed. São Paulo: Manole, 1995. 582p.

HARRINSON, R.M. The development of modern endoscopy. **J. Med. Primat.**, v.5, n.2, p.73-81, 1976.

HAZELEGER, W.; KEMP, B. Recent developments in pig embryo transfer. **Theriogenology**, Los Altos, v.56, n.8, p.1321-1331, 2001.

HUNTER, J.G.; SWANSTROM, L.; THORNBURG, K. Carbon dioxide pneumoperitoneum induces fetal acidosis in a pregnant ewe model. **Surg. Endosc.**, v.9, p.272-279, 1995.

ISHWAR, A. K.; MEMON, M. A. Embryo transfer in sheep and goats: a review. **Small Rumin. Res.**, Amsterdam, v.19, n.1, p.35-43, 1996.

JIMÉNEZ-MACEDO, A.R.; ANGUITA, B.; IZQUIERDO, D.; MOGAS, T.; PARAMIO, M.T. Embryo development of prepubertal goat oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection (ICSI) according to oocyte diameter. **Theriogenology**, Los Altos, v.66, p.1065-1072, 2006.

KEISLER, D.H. Sheep and goats. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. **Encyclopedia of reproduction**, v.4, p.479-492, San Diego: Academic Press, 1999.

KESKINTEPE, L.; DARWISH, G.M.; KENIMER, A.T.; BRACKETT, B.G. Term development of caprine embryos derived from immature oocytes *in vitro*. **Theriogenology**, Los Altos, v.42, n.3, p.527-535, 1994.

KÜHHOLZER, B.; MÜLLER, S.; TREUER, A.; SEREGI, J.; BESENFELDER, U.; BREM, G. Repeated endoscopic ovum pick-up in hormonally untreated ewes: a new technique. **Theriogenology**, Los Altos, v.48, n.4, p.545-550, 1997.

LEDDA, S.; BOGLIOLO, L.; LEONI, G.; NAITANA, S. Follicular size affects the meiotic competence of *in vitro* matured prepubertal and adult oocytes in sheep. **Reprod. Nutr. Dev.**, v.39, p.503-508, 1999.

LEIBFRIED, L.; FIRST, N. L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. **J. Anim. Sci.**, Savoy, v.48, n.1, p.76-86, 1979.

LEME, M.C.; NATALINI, C.C.; BECK, C.A.C.; BRUN, M.V.; CONTESINI, E.A.; LIMA, S.D.A.; STEDILE, R. Pneumoperitônio com dióxido de carbono associado a três posições para laparoscopia em cães. **Ciênc. Rur.**, Santa Maria, v.32, n.2, p.281-287, 2002.

LEMOS, S.L.S.; VINHA, J.M.; SILVA, I.S.; NOVAES, P.A.C.; OLIVEIRA, M.F.; PAULA, G.B.; REBELO, C.C.; MARINHO, M.L. Efeitos do pneumoperitônio com ar e CO<sub>2</sub> na gasometria de suínos. **Acta Cirúrg. Bras.**, v.18, n.5, p.445-451, 2003.

LENZ, S.; LAURITSEN, J. G. Ultrasonically guided percutaneous aspiration of human follicles under local anaesthesia: a new method of collecting oocytes for *in vitro* fertilization. **Fertil Steril.**, Birmingham, v.38, n.6, p.673-677, 1982.

MAGA, E.A.; WALKER, R.L.; ANDERSON, G.B.; MURRAY, J.D. Consumption of milk from transgenic goats expressing human lysozyme in the mammary gland results in the modulation of intestinal microflora. **Transgenic Res.**, v.15, n.4, p.515-519, 2006.

MARCELINO, A.A.; PENICHE, A.C.G. Complicações no período pós-operatório de cirurgia videolaparoscópica. **Rev. Paul. Enf.**, v.21, n.3, p.280-286, 2002.

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

MARTINO, A.; PALOMO, M.J.; MOGAS, T.; PARAMIO, M.T. Influence of the collection technique of prepubertal goat oocytes on in vitro maturation and fertilization. **Theriogenology**, Los Altos, v.42, n.5, p.859-873, 1994a.

MCKELVEY, W.A.C.; ROBINSON, J.J. Collection of embryos from ewes by laparoscopy. **Vet. Rec.**, v.115, n.7, p.158, 1984.

MCKELVEY, W.A.C.; ROBINSON, J.J.; AITKEN, R.P. A simplified technique for the transfer of ovine embryo by laparoscopy. **Vet. Rec.**, v.117, p.492-494, 1985.

MCKELVEY, W.A.C.; ROBINSON, J.J.; AITKEN, R.P. The evaluation of a laparoscopic insemination technique in ewes. **Theriogenology**, Los Altos, v.24, p.519-535, 1985a.

MCKELVEY, W.A.C.; ROBINSON, J.J.; AITKEN, R.P.; ROBERTSON, I.S. Repeated recoveries of embryos from ewes by laparoscopy. **Theriogenology**, Los Altos, v.25, p.855-865, 1986.

MONNIAUX, D.; CHUPIN, D.; SAUMANDE, J. Superovulatory responses in cattle. **Theriogenology**, Los Altos, v.19, n.1, p.55-81, 1983.

MORTON, K.M.; CATT, S.L.; CHIS MAXWELL, W.M.; EVANS, G. Effects of lamb age, hormone stimulation and response to hormone stimulation on the yield and *in vitro* developmental competence of prepubertal lamb oocytes. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.17, n. 6, p.593-601, 2005a.

MORTON, K.M.; GRAAF, S.P.; CAMPBELL, A.; TOMKINS, L.M.; CHIS 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, 2005b.

MUZII, L.; BIANCHI, A.; CROCE, C.; MANCI, N.; PACINI, P.B. Laparoscopic excision of ovarian cysts: is the stripping technique a tissue-sparing procedure? **Fertil. Steril.**, Birmingham, v.77, n.3, p.604-614, 2002.

NEVES, J.P.; LUZ, S.L.N. Inseminação laparoscópica em ovelhas com cio natural induzido e sincronizado antes e durante a estação reprodutiva. **Ciênc. Rur.**, Santa Maria, v.24, n.1, p.133-137, 1994.

O'CALLAGHAN, D.; YAAKUB, H.; HYTTEL, P.; SPICER, L.J.; BOLAND, M.P. Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. **J. Reprod. Fertil.**, v.118, p.303-313, 2000.

PIERSON, J.; WANG, B.; NEVEU, N.; SNEEK, L.; CÔTÉ, F.; KARATZAS, C.N.; BALDASSARRE, H. Effects of repetition, intervals between treatments and season on the results from laparoscopic ovum pick-up in goats. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.16, p.795-799, 2004.

PINTADO, B.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ LLANO, B. Superovulatory response of Murciana gotas to treatments based on PMSG/antiPMSG or combined FSH/PMSG administration. **Theriogenology**, Los Altos, v.50, p.357-364, 1998.

PTAK, G.; LOI, P.; DATTENA, M.; TISCHNER, M.; CAPPAL, P. Offspring from one-month-old lambs: studies on the developmental capability. **Biol. Reprod.**, Wisconsin, v.61, n.6, p.1568-1574, 1999.

PUGH, D.G. **Clínica de ovinos e caprinos**. São Paulo: Roca, 2005. 513 p.

RAWLINGS, N.C.; EVANS, A.C.O.; HONARAMOOZ, A.; BARTLEWSKI, P.M. Antral follicle growth and endocrine changes in prepubertal cattle, sheep and goats. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.78, n.3-4, p.259-270, 2003.

REMY, B.; BARIL, G.; VALLET, J.C.; DUFOR, R.; CHOUVET, C.; SAUMANDE, J.; CHUPIN, D.; BECKERS, J.F. Are antibodies responsible for a decreased superovulatory response in goat which have been treated repeatedly with pFSH? **Theriogenology**, Los Altos, v. 36, n.3, p. 389-399, 1991.

RENOU, P.; TROUNSON, A.O.; WOOD, C.; LEETON, J.F. The collection of human oocytes for in vitro fertilization. I. An instrument for maximizing oocyte recovery rate. **Fertil. Steril.**, Birmingham, v.35, n.4, p.409-412, 1981.

RIEBOLD, T.W. Ruminants. In: THURMON, J.C.; TRANQUILLI, W.J.; BENSON, G.J. **Lumb & Jones' veterinary anesthesia**. 3. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1996. p.613-614.

RODRÍGUEZ, C.; ANEL, L.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; BOIXO, J.C.; CHAMORRO, C.A.; PAZ, P. Ovum pick-up in sheep: a comparison between different aspiration devices for optimal oocyte retrieval. **Reprod. Dom. Anim.**, v.41, p.106-113, 2006.

ROBINSON, J.J. Nutrition and reproduction. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.42, p.25-34, 1996.

SAS, **User's Guide: Statistics**, Cary, NC, 1985. v.5.

SAVARIS, R.F. Procedimentos médicos. **Rev. da AMRIGS**, Porto Alegre, v.49, n.4, p. 274-276, 2005.

SCHIEWE, M.C.; BUSH, M.; STUART, L.S.; WILDT, D.E. Laparoscopic embryo transfer in domestic sheep: a preliminary study. **Theriogenology**, Los Altos, v. 22, p.675-682, 1984.

SILVA, L.D.M.; ONCLIN, K.; SNAPS, F.; VERSTEGEN, J. Laparoscopic intrauterine insemination in the bitch. **Theriogenology**, Los Altos, v.43, n.3, p.615-623, 1995.

SILVA, R.R. **O agronegócio brasileiro da carne caprina e ovina**. Salvador: R.R. da Silva, 2002. 111p.

SNYDER, D.A.; DUKELOW, R. Laparoscopic studies of ovulation, pregnancy diagnoses, and follicle aspiration in sheep. **Theriogenology**, Los Altos, v.2, p.143-148, 1974.

STANGL, M.; KUHHLER, B.; BESENFELDER, U.; BREM, G. Repeated endoscopic ovum pick-up in sheep. **Theriogenology**, Los Altos, v.52, n.4, p.709-716, 1999.

STUBBINGS, R.B.; WOSIK, C.; ARMSTRONG, D.T. Ovarian response in calves to multiple versus a single subcutaneous injection of Folltropin. **Theriogenology**, Los Altos, v.39, n.1, p.321, 1993, Abstract.

TERVIT, H.R. Laparoscopy / laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding. **Anim. Reprod. Sci.**, Amsterdam, v.42, n.1-4, p.227-238, 1996.

VALLET, J. C. *et al.* Feasibility and repeatability of embryo recoveries from dairy goats under laparoscopy. In: SCIENTIFIC MEETING OF EUROPEAN EMBRYO TRANSFER ASSOCIATION, 3., 1987, Lyon. **Proceedings...**Lyon: AETE, 1987. p.60, Abstract.

WANG, B.; BALDASSARRE, H.; TAO, T.; GAUTHIER, , M.; NEVEU, N.; ZHOU, J.F.; LEDUC, M.; DUGUAY, F.; BILODEAU, A.S.; LAZARIS, A.; KEEFER, C.; KARATZAS, C.N. Transgenic goats produced by DNA pronuclear microinjection of *in vitro* derived zygotes. **Mol. Reprod. Dev.**, v.63, n.4, p.437-443, 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.**, Amsterdam, v.29, n.1, p.83-88, 1998.

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

WICKHAM, J.E.A. The development of concept of minimally invasive therapy. In: GOMELLA, L.G.; KOZMINSKI, M.; WINFIELD, H.N. **Laparoscopic urologic surgery**. New York: Raven Press, 1994. p.3-8.

WIEDEMAN, J.E.; KNOLMAYER, T.J.; BOWYER, M.W. Is tension pneumothorax a threat in trauma laparoscopy? **J. Trauma-injury Infec. Crit. Care**, v.45, n.4, p.677-683, 1998.

WILDT, D.E.; LAWLER, D.F. Laparoscopic sterilization of the bitch and queen by uterine horn occlusion. **Am. J. Vet. Res.**, v.46, n.4, p.864-869, 1985.

**ANEXO 1**

Meios para colheita, lavagem e maturação dos oócitos.

**Meio de Colheita****Solução PBS (Phosphate Buffered Saline) completo:**

Água Milli-Q q.s.p.	1 L
NaCl	08 g
KCl	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -Anidro	1,15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
CaCl <sub>2</sub> -2H <sub>2</sub> O	0,1 g
MgCl <sub>2</sub> -6H <sub>2</sub> O	0,1 g
DL-Glucose	1,0 g
Antibiótico (50µL/10mL)	5,0 mL
Acrescentar 0,25 mg de heparina sódica.	

**Meio de Lavagem****Solução Mãe TCM 199 Hepes:**

Água Milli-Q	10 mL
TCM 199	0,095 g
Bicarbonato	0,0042 g
Hepes Sódico	0,026 g
Hepes Ácido	0,024 g

**Meio de Lavagem**

Solução Mãe TCM 199 Hepes	9 mL
Soro de cabra em estro (inativado a 56°C por 30 min)	1 mL
Piruvato	20 µL
Antibiótico (50µL/10mL)	50 µL

**Meio de maturação****Solução Mãe TCM 199 Bicarbonato**

Água Milli-Q	10 mL
TCM 199	0,095 g
Bicarbonato	0,022 g

**Meio de maturação**

Solução Mãe TCM 199 Bicarbonato	9 mL
Soro de cabra em estro (inativado a 56°C por 30 min)	1 mL
Piruvato	20 µL
Antibiótico (50µL/10mL)	50 µL
FSH	10 µL
LH	100 µL
Estradiol	10 µL

## **ANEXO 2**

Métodos de análise dos parâmetros bioquímico-séricos:

- ✓ **Aspartato aminotransferase** → método cinético UV;
- ✓ **Fosfatase alcalina PNP cinética** → método de Roy modificado, 1970;
- ✓ **Gama-glutamilttransferase** → método de Szasz modificado, 1969;
- ✓ **Uréia UV cinética** → método do Diacetil monoxiona;
- ✓ **Creatinina colorimétrica** → método de Lustosa–Basques.

Estes parâmetros foram analisados com o auxílio de um conjunto de reagentes para diagnósticos (Labtest<sup>17</sup>) e posterior leitura espectrofotométrica (Labquest<sup>18</sup>).

---

<sup>17</sup>Labtest – Labtest Diagnóstica S.A., Lagoa Santana – MG.

<sup>18</sup>CELM, modelo E-225-D.