

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

**ASPIRAÇÃO FOLICULAR VIDEOLAPAROSCÓPICA EM OVINOS: AVALIAÇÃO
OVARIANA MACRO E MICROSCÓPICA.**

Pedro Paulo Maia Teixeira

Médico Veterinário

Jaboticabal - São Paulo - Brasil
Outubro – 2010

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

**ASPIRAÇÃO FOLICULAR VIDEOLAPAROSCÓPICA EM OVINOS: AVALIAÇÃO
OVARIANA MACRO E MICROSCÓPICA.**

Pedro Paulo Maia Teixeira

Orientador: Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do *Campus* de Jaboticabal – UNESP, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Cirurgia Veterinária.

Jaboticabal - São Paulo - Brasil
Outubro – 2010

D
I
S
S.
/
T
E
I
X
E
I
R
A

P.
P.
M.

2
0
1
0

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**

**Título: ASPIRAÇÃO FOLICULAR VIDEOLAPAROSCÓPICA EM OVINOS:
AVALIAÇÃO OVARIANA MACRO E MICROSCÓPICA.**

Autor: Pedro Paulo Maia Teixeira

Orientador: Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente

Orientador
Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente

Banca Examinadora

01 de outubro de 2010.

Presidente da Comissão Examinadora
Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

PEDRO PAULO MAIA TEIXEIRA - nascido em 13 de junho de 1984, em Belém – PA. Médico Veterinário formado pela Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA, Belém, Pará, em abril de 2008. Realizou aprimoramento em Reprodução de Caprinos e Ovinos de 2007 à 2008 no Centro de Pesquisa em Caprinos e Ovinos do Pará (CPCOP) do Instituto da saúde e Produção Animal (ISPA) da Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA). Em agosto de 2008 ingressou no Mestrado pelo Programa de Pós-graduação em Cirurgia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV – UNESP – *Campus* de Jaboticabal – SP, onde atua no Setor de Obstetrícia e Reprodução.

Dedico

Aos meus pais, minha irmã, minha
vó e minha namorada, por todo
carinho, incentivo e força que muito
precisei.

Eu cresci com o passado, desse tempo tão
ligeiro. Rápido como um piscar.

Ontem eu era um menino iniciante, um
capoeira errante, mas nunca deixei de
treinar.

Eu caí sim, eu caí me levantei, tropecei caí
de novo, consegui me afirmar.

A vaidade é ruim para o capoeira. Faz ele se
achar o bom, não escapa da rasteira.

Na vida se cai se leva rasteira. Quem nunca
caiu não é capoeira.

“Sapeba”

AGRADECIMENTOS

Minha Família, sem nenhuma dúvida, foi a principal responsável por eu concluir essa fase de minha vida, na qual a única dificuldade real foi ficar longe deles. Ao Professor Dr. Pedro Emerson Gazel Teixeira, meu paizão, um exemplo que sigo na minha vida profissional e pessoal, por todo companheirismo e amizade. À minha mãezona, Helieci Oeiras Maia Teixeira, pessoa que sempre me deu sua dedicação e amor infinito, em quem também sempre me espelho para enfrentar todas as dificuldades com força e perseverança. À Juliana Maia Teixeira, minha maninha por todo carinho, zelo, companheirismo e apoio desde sempre. À minha avó, Judith Oeiras Maia, minha segunda mãe, um exemplo de vida, com uma alegria contagiante que ensina a viver. À Hedy Ribeiro, “minha Bebê”, companheira de todas as horas, que superou as dificuldades de um namoro a distância sendo a melhor namorada que existe, e por fazer parte da minha vida.

Também agradeço especialmente ao Professor Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente, por ser um excelente orientador e por ter me aceitado como orientado, sempre dando liberdade, espaço, incentivo e confiança para trabalhar e, por nas horas de dificuldades, estar presente.

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

Aos colegas de trabalho e amigos, equipe fundamental em todas as fases deste trabalho e de todo meu mestrado.

À Maria Emília Oliveira, Luciana Padilha, Alana Silva, Tatitana “Bituca” Motheo, Felipe Barros, Tati Póló. As estagiárias Marieli, Dayane e Cláudia. À minha dupla dinâmica da anestesia Maristela e Fabiola.

A todos meus amigos, em especial aos “Antronianos”, por esse período de ótima convivência. Aos meus amigos Marcio Bandarra, colaborador deste trabalho e parceiro de todas as horas, Leandro “Paquito” Coutinho, amigão de desde a graduação e também colaborador deste trabalho, Alexandre “Dedo” Ribeiro por todos os auxílios e infinitos momentos de risos, Daniel “Cardio-Bozo”, Evandro “Cardio-Black” Zacher, Beto Thiesen, Miguel Ladino, Andre Galvão, Leandro “Gordinho” Zaine, André “Lingua” Escobar, Leonardo “Gordinho Viçosa”, Luis Guilherme, Marcus “Psico” Feliciano, Guida Masson, João Paulo Pascon. Além da responsável em por ordem nessa turma, nossa governanta Cida Mara Catrina.

Agradeço em especial à Professora Dra. Rosemeri de Oliveira Vasconcelos, pelo auxílio fundamental nas análises histopatológicas e toda a imensa colaboração neste trabalho.

Ao Professor Dr. Luiz Fernando de Souza Rodrigues por todas as orientações e colaborações do trabalho.

Ao Professor Dr. Cesar Roberto Esper por toda colaboração no trabalho.

Agradecer a Universidade Estadual Paulista e a todos os responsáveis do Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” – FCAV/Unesp Jaboticabal, em especial ao Professor Dr. Luiz Marques, pela liberação das estruturas utilizadas e todos os funcionários deste em especial ao Edson “600”, Roberto, Juliana, Isaias, José.

Ao Prof. Dr. Áureo Evangelista Santana e aos funcionários Eugênio de Campos Filho, Matheus A. S. Nogueira, às pós-graduandas Andressa Nogueira pela colaboração na realização dos exames laboratoriais realizados no Laboratório de Análises Clínicas.

A todos os funcionários da FCAV/UNESP, em especial ao Sr. Edson, um exemplo de trabalho e colaboração.

E a todos os meus filhotes pelo carinho e companheirismo incondicional, sempre trazem força e alegria quando volto em casa, e ao Francisco e à Carla, meus novos filhos, que aqui me trazem companheirismo e carinho sempre.

A todos meu infinito obrigado!

SUMÁRIO

	Paginas
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS	ii
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Aspiração folicular para produção <i>in vitro</i> de embriões em ovinos	3
2.2. Métodos de obtenção de oócitos em ovinos	3
2.3. Estimulação hormonal para aspiração folicular	5
2.4. Alterações macro e microscópicas do sistema reprodutor.....	7
3. OBJETIVOS	9
3.1. Geral	9
3.2. Específicos	9
4. MATERIAL E MÉTODOS	10
4.1. Localização e Caracterização da Área	10
4.2. Animais e tratamentos	10
4.3. Preparo dos animais e protocolo anestésico	11
4.4. Videolaparoscopia para aspiração folicular	12
4.5. Avaliação no pós-operatório	16
4.6. Análise dos folículos visibilizados, aspirados e oócitos recuperados	16
4.7. Avaliações macroscópicas dos ovários e em outras porções do reprodutor interno	16

4.8. Processamento e avaliação histológica dos ovários	17
4.9. Análise estatística	17
5. RESULTADOS	18
5.1. Avaliações no trans e pós-cirúrgico	18
5.2. Estimulação ovariana e produção oocitária	18
5.3. Avaliação do macro e microscópicas dos ovários	22
6. DISCUSSÃO	24
6.1. Avaliações no trans e pós-cirúrgico	24
6.2. Estimulação ovariana e produção oocitária	25
6.3. Avaliação do macro e microscópicas dos ovários	26
7. CONCLUSÕES	28
8. REFERÊNCIAS	29
9. ANEXO I	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Escala para avaliação da consistência dos ovários, realizada macroscopicamente, adaptada de VIANA et al. (2003).	17
-----------	---	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Posicionamento do animal em *Trendelenburg* (A). Localização dos canais de trabalho (B), endoscópio na terceira porta (1) e pinças na primeira (2) e segunda (3)..... 12
- Figura 2: Imagem da cavidade abdominal de ovelha em aumento de 10x, onde observa-se em destaque: fixação do ovário (circulo) com pinça atraumática (1), e presença de folículos (seta) (A); posicionamento da agulha (2) para a punção folicular (B); e aspiração dos folículos (C e D). 14
- Figura 3: Material utilizado nas aspirações foliculares. A – Mesa cirúrgica: câmera laparoscópica (1), endoscópio (2), pinças laparoscópicas atraumáticas (3), trocáteres (4), cabo de luz (5), mangueira e sistema de aspiração (6), mangueira de insuflação (7), seringas com lidocaína e solução de NaCl 0,9% (8), material cirúrgico convencional (9). B – Equipamento de videocirurgia: Monitor (10), insuflador (11), câmera (12), fonte de luz (13). 15
- Figura 4: Representação gráfica da distribuição das freqüências de estro nas ovelhas após a sincronização, 36 horas após a retirada das esponjas de MAP. 19
- Figura 5: Representação gráfica do número de folículos visibilizados (FV), folículos aspirados (FA) e oócitos recuperados (OR) pelo tempo em semanas. Não houve diferenças significativas entre as sessões ($p>0,05$). 20
- Figura 6: Representação gráfica da classificação qualitativa dos oócitos durante

as nove semanas de experimento. Não houve diferença significativa entre as sessões ($p > 0,05$). 21

Figura 7: Fotomicrografia de cortes de ovários de ovelhas submetidos à aspirações foliculares, corados em hematoxilina-eosina (HE) e tricrômio de masson (TM). Em todas as imagens verifica-se a integridade do tecido. As imagens A, B, C e D, correspondem ao G1, de E, F, G, e H ao G9. Observado na região cortical o epitélio germinativo inalterado (setas) e folículos ovarianos em vários estágios de desenvolvimento, folículos primordiais (1), primários (2), secundários (3) e terciários pré-ovulatórios (4). 23

LISTA DE ABREVIATURAS

µg – microgramas;
µL – microlitros;
µm – micrômetros;
% - percentagem;
CL – corpo lúteo;
cm – centímetros;
D0 – dia zero do protocolo;
D5 – quinto dia do protocolo;
DIV- cultivo *in vitro*;
eCG – gonadotrofina coriônica equina;
FIV – fecundação *in vitro*;
FSHp – Hormônio folículo estimulante sintético;
G0 – Grupo de zero aspirações;
G1 – Grupo de uma aspiração;
G9 – Grupo de nove aspirações;
HE – hematoxilina-eosina;
IFN-γ - interferon gama;
ILβ-1 - interleucina- β;
IM – Intramuscular;
IV – intravenoso;
Kg – kilograma;
L – litros;
LH –hormônio luteinizante;
LOPU – aspiração folicular por videolaparoscopia (laparoscopic ovum pick-up);
MAP – acetato de medroxiprogesterona;
MIV – maturação *in vitro*;
mg – miligramas;
min. – minutos;
mL – mililitros;

mmHg – milímetros de mercúrio;

mm – milímetros;

MPA – medicação pré-anestésica;

OPU – aspiração folicular (ovum pick-up);

PIV – Produção *in vitro*;

S1, S2, S3... - semana 1, semana 2, semana 3, respectivamente;

T0 – tempo zero da coleta;

T7 – sétimo dia da coleta;

TM – Tricromo de masson;

TNF- α fator de necrose tumoral;

UI – Unidades internacionais;

ASPIRAÇÃO FOLICULAR VIDEOLAPAROSCÓPICA EM OVINOS: AVALIAÇÃO OVARIANA MACRO E MICROSCÓPICA.

RESUMO

Avaliou-se macro e microscopicamente os ovários de ovelhas submetidas a sucessivas aspirações foliculares, com o objetivo de se verificar se houve ou não interferência na produção oocitária e morfologia das gônadas; além da avaliação macroscópica do trato genital interno. Dezoito ovelhas da raça Santa Inês, distribuídas aleatoriamente compuseram três grupos experimentais de igual número (n=6). G0, G1, G9 com 0, 1 e 9 repetições, respectivamente. A sincronização do estro foi feita utilizando-se protocolo curto com MAP, seguindo-se estimulação, em dose única, com 80mg de FSHp e 300 UI de eCG (IM) e após 36 horas realizavam-se as aspirações foliculares por vídeolaparoscopia, com intervalo de 7 dias. Os folículos visibilizados, os aspirados e os oócitos recuperados foram contabilizados. Após a última intervenção foi realizada ovariectomia para avaliar os macro e microscopicamente, a existência ou não de lesões causadas pelas punções foliculares, classificando a intensidade do processo em ausente (0), leve (1), moderada (2) e severa (3). Os dados foram expressos em média e desvio padrão, comparados pelo teste one-way ANOVA e teste de Tukey. Os números de folículos visibilizados, aspirados e oócitos recuperados foram de $13,24 \pm 2,0$, $11,27 \pm 3,03$ e $5,79 \pm 2,3$ respectivamente, com taxa de recuperação de 51,69%, não havendo diferenças entre as nove sessões ($p > 0,05$). Também não se verificou, macroscopicamente, lesões no trato genital interno, nem alterações consideráveis nas análises histológicas, sendo o escore 0 ± 0 para o G0, $0,1 \pm 0,4$ para o G1 e 0 ± 0 para o G9 ($p > 0,05$). Conclui-se que as nove sessões de superovulação e aspiração folicular não causam lesões ovarianas e não interferiram na produção de folículos em ovelhas da raça Santa Inês.

Palavras-chave: Punção folicular, histologia, ovário, ovelha, videolaparoscopia.

FOLLICULAR ASPIRATION BY VIDEOLAPAROSCOPY IN SHEEP: MACRO AND MICROSCOPICALLY OVARIAN EVALUATION

ABSTRACT

We evaluated macroscopically and microscopically the ovaries of ewes to repeated follicular aspiration, in order to verify whether or not there was interference with the production oocyte and gonad morphology, besides the macroscopic evaluation of internal genital tract. Eighteen sheep Santa Ines, randomly distributed three groups composed of equal numbers ($n = 6$). G0, G1, G9 with 0, 1 and 9 replicates, respectively. Synchronization of estrus was performed using short protocol with MAP, followed by stimulation in a single dose of 80mg FSHp and 300 IU of eCG (IM) and after 36 hours was held at the follicular aspiration by laparoscopy with interval 7 days. The follicles visualized, aspirated and the oocytes recovered were counted. After the last intervention was performed ovariectomy was performed to assess the macro and microscopically, the presence or absence of lesions caused by follicular puncture, classifying the intensity of the process as absent (0), mild (1), moderate (2) and severe (3) . Data were expressed as mean and standard deviation and compared by using one-way ANOVA and Tukey test. The numbers of follicles visualized, aspirated and oocytes recovered were 13.24 ± 2.0 , 11.27 ± 3.03 and 5.79 ± 2.3 respectively, with a recovery rate of 51.69%, with no differences among the nine sessions ($p > 0.05$). Nor is there, macroscopicamnte, internal genital tract injury, or significant changes in histological evaluations, with a score of 0 ± 0 for G0, 0.1 ± 0.4 for G1 and 0 ± 0 for the G9 ($p > 0.05$). We conclude the nine sessions of superovulation and ovum do not cause ovarian lesions and did not interfere in the production of follicles in Santa Ines sheep.

Keywords: follicular puncture, histology, ovary, sheep, laparoscopy.

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da ovinocultura vem apresentando um ciclo de crescimento mundial, sobretudo nos países em desenvolvimento, que são detentores dos maiores rebanhos. Projeta-se um crescimento da ordem de cinco vezes o rebanho atual nos próximos 20 anos, o que totalizaria mais de 100 milhões de cabeças (FONSECA, 2005). No Brasil, observou-se a expansão desta atividade para regiões em que não havia tradição na exploração econômica, e desse modo, tende a aumentar sua importância e sua efetiva participação PIB do agronegócio brasileiro (MARTINS, 2007; SIMPLÍCIO et al. 2007).

Neste contexto, as biotécnicas da reprodução ganham destaque por serem fortes aliadas na melhoria da eficiência reprodutiva e produtividade dos rebanhos, assegurando viabilidade econômica cada vez mais atraente (TRALDI, 2006).

A aspiração folicular associada à produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma das biotécnicas, que indubitavelmente apresenta grande relevância. Inicialmente foi utilizada na produção de descendentes com alto valor genético, mas com problemas adquiridos na capacidade reprodutiva (BOLS et al., 1996; SCHERNTHANER et al., 1999) ou que não respondiam aos tratamentos superovulatórios convencionais (LOONEY et al., 1994). Entretanto, a punção folicular apresenta um potencial de produção de embriões e gestações em um determinado período de tempo inferior ao obtido por outras técnicas e que podem ser aproveitado em animais com condições reprodutivas normais (BOUSQUET et al., 1999). Desse modo, sua aplicação estende-se a fêmeas pré-púberes (FRY et al., 1998, MAJERUS et al., 1999), acíclicas ou em anestro estacional, gestantes e ainda, submetidas ou não a tratamentos superestimulatórios prévio (BERRNARDI, 2005), além de animais com infertilidade temporária ou irreversível (BALDASSARE et al., 1996; KÜHHOLZER et al., 1997). Ademais, faz-se prudente destacar o bom potencial da aspiração folicular associada à produção *in vitro* para a aplicação na difusão do patrimônio genético de animais superiores nos rebanhos ovinos, bem como para o desenvolvimento de outras biotécnicas como a clonagem e a transgenia.

A alta eficiência dessa técnica está relacionada à sua utilização associada a tratamentos de estimulação folicular, bem como a possibilidade de emprego repetido destas em intervalos

curtos. Cumpre ressaltar que a maioria dos estudos visando identificar até que ponto a repetição da aspiração folicular é viável, pela relação entre número de oócitos colhidos e lesões ovarianas promovidas pela técnica, têm se restringido a bovinos (VIANA et al., 2003; PIETERSE et al., 1991; BECKER et al., 1996 e SANTL et al., 1998). Assim, devemos considerar como hipótese se sucessivas aspirações foliculares por videolaparoscopia podem causar alterações nos ovários e comprometer a produção de oócitos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspiração folicular para produção *in vitro* de embriões em ovinos

A indústria da tecnologia de embriões sofreu uma importante mudança nos últimos anos com o advento da produção *in vitro* de embriões (PIV), ocupando o Brasil lugar de destaque no ranking mundial em número de embriões produzidos *in vitro* (SENEDA, 2005). Diferentes técnicas de maturação *in vitro* de oócitos imaturos (MIV), sua fertilização por espermatozoides igualmente capacitados *in vitro* (FIV) e cultivo (DIV) em meio celular (monocamadas) ou definido (SOF, TCM 199) evoluíram nas últimas duas décadas. Essa biotécnica permite a produção de animais transgênicos, de extremo interesse para a medicina humana, bem como estudos de clonagem e da preservação de animais de excelente nível genético, permitindo a estocagem de oócitos para fertilização e produção de animais no futuro (TRALDI, 2006).

Assim como na espécie bovina, os procedimentos de aspiração folicular, maturação *in vitro* (MIV) e fertilização *in vitro* (FIV) de oócitos permitem a exploração do potencial reprodutivo das fêmeas ovinas de maneira revolucionária. A produção *in vitro* (PIV) de embriões oferece ainda a possibilidade de aceleração do ganho genético por meio da redução do intervalo entre gerações e da maximização do número de nascimentos a partir de fêmeas de alto valor genético (LOHUIS *et al.*, 1995), principalmente quando doadoras pré-puberes são utilizadas (EARL *et al.*, 1995; BALDASSARE *et al.*, 1996; TERVIT *et al.*, 1996). O rendimento dessas técnicas pode ainda ser potencializado com o uso de protocolos de superovulação (DRION, 2001; BERLINGUER *et al.*, 2004; COGNIÉ *et al.*, 2004) e criopreservação (MARTINEZ *et al.*, 1998; COGNIÉ *et al.*, 2004).

Contudo, a possibilidade do uso repetido da técnica e em intervalos tão curtos (BONI *et al.*, 1997) requer uma melhor avaliação dos riscos para os animais utilizados como doadores de oócitos (VIANA *et al.* 2003).

2.2. Métodos de obtenção de oócitos em ovinos

A obtenção dos oócitos é etapa fundamental para a realização da biotécnica de PIV em animais domésticos e esses 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 ultrassom (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., 1994; WANI, 2002). Além disso, oócitos de animais abatidos têm sido importantes 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. Nesse caso, os ovários devem ser transportados, do abatedouro até o laboratório, em solução de cloreto de sódio tamponada fosfatada (PBS) ou em solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9% entre 35 e 37°C, na presença de antimicrobianos (ARMSTRONG et al., 1997).

Em ovinos não é fácil manipular os órgão do sistema reprodutivo pelo reto, como ocorre em bovinos, bubalinos e eqüinos, optando-se por intervenções cirúrgicas para facilitar o diagnóstico e manejo reprodutivo (TERVIT, 1996). Mesmo que a recuperação de oócitos de fêmeas vivas via transvaginal guiada por ultrassom, “ovum pick-up” (OPU), seja largamente realizada em bovinos, em pequenos ruminantes, é ainda bastante limitada, principalmente em fêmeas pequenas, tornando-se de difícil execução até para operadores com habilidade (BALDASSARE et al., 1994 e 1996; GRAFF et al., 1999).

Ademais, o rendimento da colheita de oócitos em cabras pela ultrassonografia não é maior do que outras técnicas de OPU, como a laparotomia ou a laparoscopia, além disto, é importante notar, ao compará-las, que a estas técnicas são menos traumáticas ao ovário porque apenas o córtex é perfurado durante a aspiração, enquanto que durante a colheita por ultrassom a agulha usualmente alcança o folículo mediante perfuração do estroma ovariano (PIERSON et al., 2004).

A laparotomia, uma das técnicas utilizadas, realiza a exteriorização do trato reprodutivo, o que inevitavelmente acarreta em algum grau de trauma cirúrgico, necessitando-se de extremo cuidado para não formação de aderências pós-operatórias envolvendo útero, tubas e ovários (ISHWAR e MEMON, 1996). Durante o procedimento de aspiração, os ovários expostos e eventualmente porções uterinas devem ser constantemente umedecidos com solução de cloreto de sódio 0,9% e lavados ao término da aspiração com a

solução de cloreto de sódio com 0,9% de DMSO e 0,2% de Heparina (BASSO et al., 2008). Tais conseqüências tornam 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).

Por outro lado, 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 em pequenos ruminantes (GRAFF et al., 1999; BALDASSARE et al., 2002; MORTON et al. 2005; CORDEIRO, 2006).

2.3. Estimulação hormonal para aspiração folicular

Os oócitos utilizados para a PIV de embriões ovinos podem ser obtidos de fêmeas submetidas ou não a tratamento hormonal prévio (BERRNARDI, 2005). Em ovelhas não estimuladas o número de oócitos recuperados é de quatro a seis por fêmea, um valor baixo, tornando indispensável a estimulação ovariana para melhoria dos índices de produção embrionária na espécie (KUNHHOLZER, 1997; BALDASSARE et al., 1996; BERLINGUER et al., 2004). O tratamento hormonal é indicado principalmente para fêmeas pré-púberes, em anestro estacional ou as geneticamente superiores.

Os protocolos hormonais para aspiração folicular em fêmeas ovinas podem ser efetuados de várias maneiras, em regra através da utilização de hormônios para superovulação como FSH e eCG, podendo ser utilizados sozinhos ou em associação, juntamente com o uso de hormônios para sincronização do estro (BALDASSARE e KARATZAS 2004).

Uso de progestágenos (acetato de medróprogesterona, acetato de flurogestona, entre outros) é amplamente utilizado para sincronização do estro, a fim de obter melhor qualidade folicular (GONZALES-BULNES et al., 2003). Protocolos curtos estão sendo propostos para pequenos ruminantes, fundamentados na hipótese de que os tratamentos longos resultariam em concentrações sub-luteais de progesterona, favorecendo a persistência e o crescimento excessivo do folículo dominante (RUBIANES et al., 2003).

A estimulação ovariana pode ser realizada por FSH em múltiplas aplicações de 36 a 48 horas, em intervalo médio de 12 horas, antes das aspirações, por várias vias de aplicação

(intramuscular ou endovenosa) (PTAK et al., 1999; ALBERIO et al. 2002), em doses únicas de eCG 48 horas dos procedimentos (ANEL et al., 1997; SEVILLANO et al, 1997), ou até com FSH e LH, combinado ou não ao uso de eCG, 24 à 48h antes da aspiração (BALDASSARE et al., 1996). O uso do FSH (80mg) e eCG (300UI) é o protocolo de estimulação ovariana mais utilizado, obtendo boa taxa de recuperação e maturação (BALDASSARE e KARATZAS 2004).

Alguns protocolos incluem ainda o uso de agonistas ou antagonistas de GnRH associados ao tratamento com progestágenos, com o fim de suprimir a produção de gonadotrofinas e impedir o crescimento de folículos acima de 1 a 2 mm. Os resultados utilizando-se como pré-tratamento agonista a buserelina por duas semanas (40µg/dia), ou antagonista com antarelix por 10 dias (0,5 mg/dia), comprovaram a supressão dos grandes folículos ovarianos e a duplicação do número de pequenos folículos, aumentando em 50% a resposta dos ovários ao FSH (BREBION et al., 1992; COGNIÉ, 1999).

Apesar da maior praticidade dos protocolos de dose única, a aspiração folicular realizada após tratamento com dose única de 150UI de eCG, proporcionou menor número de oócitos comparado com fêmeas não tratadas, mas houve diferenças na qualidade dos complexos de oócitos e células granulosas obtidos (STANGL et al., 1999). Além disso, foi constatado em programas de inseminação artificial, que o uso repetido de estimulações com eCG favorece o desenvolvimento de anticorpos anti-eCG devido à resposta imunológica do animal aos primeiros tratamentos, resultando na redução da taxa de fertilidade (ROY et al., 1999; DRION et al., 2001).

A taxa de recuperação (número de oócitos obtidos/ número de folículos aspirados) situa-se entre 55 e 80%. Dos oócitos obtidos, 60 a 80% são selecionados para os procedimentos de maturação e fecundação *in vitro* (BALDASSARE et al., 1994; KÜHHOLZER et al., 1997, PTAK et al. 1999;, STANGL et al., 1999). O número de oócitos obtidos por aspiração por vídeolaparoscopia em fêmeas estimuladas é em média 14 oócitos/ovelas, 13,4 encontrado por BALDASSARE e KARATZAS (2004) e 14,3 por BASSO et al. (2008), sendo esta taxa o observado na aspiração de oócitos obtidos de ovários de matadouro (BALDASSARE et al., 1994). As variações dessas taxas podem ser justificadas por vários fatores, como calibre da agulha, pressão e calibre do sistema de aspiração e tamanho de folículos aspirados (RODRÍGUEZ, 2006).

2.4. Alterações macro e microscópicas do sistema reprodutor

A alta eficiência da técnica de aspiração folicular por videolaparoscopia está relacionada à sua utilização associada a tratamentos de estimulação folicular, bem como à possibilidade de utilização repetida em intervalos curtos. (PIETERSE et al., 1991; BECKER et al., 1996 e SANTL et al., 1998). Assim, somente em bovinos existem estudos visando identificar até que ponto a repetição da aspiração folicular é viável, pela relação entre número de oócitos colhidos e lesões ovarianas promovidas pela técnica (VIANA et al., 2003). Contudo, faz-se basilar, em pequenos ruminantes, obter-se informações sobre a ocorrência de alterações histológicas ovarianas e a taxa de recuperação de oócitos causadas por sucessivos procedimentos de aspiração folicular por laparoscopia.

De maneira geral, parece existir uma associação do risco da ocorrência de lesões decorrentes de punções foliculares com a frequência ou intensidade em que os animais são puncionados. Porém, a comparação de resultados relativos a lesões não são bem esclarecida, necessitando de avaliações histológicas minuciosas, principalmente pela diversidade dos critérios de avaliação utilizados nos diferentes trabalhos (PIETERSE et al., 1991).

VIANA et al. (2003), em estudos com vacas da raça Gir verificaram uma relação entre o número de aspirações foliculares e a ocorrência de aderências no ovário, porém, não houve uma diminuição do número de oócitos recuperados. No entanto, verificaram uma correlação positiva entre a ocorrência de fibrose ovariana com o número de oócitos recuperados, além de demonstrar na avaliação histopatológica a presença de tecido cicatricial, infiltrados de células inflamatórias e presença de tecido luteal disperso no estroma ovariano. Já PIETERSE et al. (1991) não observaram aderências ou lesões graves em vacas da raça Holandesa submetidas a um número reduzido de sessões (entre 9 e 18), ou quando o número médio de oócitos recuperados por vaca foi pequeno (entre 3,5 a 5,1), possivelmente pelo menor número de movimentos de perfuração com a agulha.

Para animais puncionados por longos períodos de tempo, contudo, são relatadas diferentes alterações nos ovários, incluindo a formação de uma rede fibrosa em torno do órgão e a presença de folículos hemorrágicos ou parcialmente luteinizados (GIBBONS et al., 1994).

Estudos realizados por BECKER et al. (1996) e SANTL et al. (1998) indicaram que o maior risco da utilização da punção em grandes ruminantes, orientada por ultrassom, era acarretar lesões ao estroma ovariano, particularmente quando são aspirados folículos de menor diâmetro, e que constituem a maior fração da população folicular total. Já em animais com menores médias de produção de folículos, o risco estaria mais associado à formação de aderências pela possibilidade, a cada sessão de punção, da ocorrência de traumas pela passagem da agulha em estruturas adjacentes, como na tuba e nos ligamentos.

Em pequenos ruminantes há pouquíssimas informações sobre lesões ovarianas causadas por sucessivas aspirações foliculares. Contudo, CORDEIRO (2006) relatou que o número de folículos visualizados diminuiu em todos os grupos ao longo das semanas, destacando-se uma redução mais acentuada entre as fêmeas submetidas à estimulação ovariana hormonal, o que possivelmente é indício de lesões ovarianas. Já STANGL et al. (1999) relatou aderências uni e bilaterais nos ovários de ovelhas submetidas a dez seções semanais de aspiração folicular.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Avaliar macro e microscopicamente os ovários de ovelhas submetidas a sucessivas aspirações foliculares, e verificar se houve ou não interferência na produção oocitária e morfologia das gônadas; além da observação macroscópica do trato genital interno.

3.2. Específicos

- Verificar se o procedimento de aspiração folicular por videolaparoscopia causa algum desconforto doloroso nos animais que possa comprometer a utilização deste procedimento de modo repetitivo;
- Avaliar se o intervalo entre os procedimentos permite adequada recuperação dos animais;
- Analisar se a repetição das sessões de aspiração folicular interfere quanti e qualitativamente nos folículos visibilizados, aspirados e oócitos recuperados;
- Identificar possíveis alterações macroscópicas no trato genital interno submetidos a sucessivas sessões de aspiração.
- Pesquisar possíveis alterações microscópicas nos ovários submetidos a sucessivas sessões de aspiração.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Localização e Caracterização da Área

O experimento foi desenvolvido na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, localizada no Município de Jaboticabal (latitude 21°15'17"S e longitude 48°19'20" W de greenwich, estando a uma altitude de 605 metros) Estado de São Paulo - Brasil. O Município apresenta um clima tipo subtropical-mesotérmico (verão úmido e inverno seco), a temperatura média é de 22°C. Entre os meses de outubro e março ocorrem muitas chuvas e também, altas temperaturas, sendo o período seco de maio a agosto.

Os animais foram mantidos em piquete no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, sendo no laboratório de PIV do mesmo, realizadas as análises dos folículos aspirados. Os processos de aspiração folicular por vídeolaparoscopia foram realizados no centro cirúrgico de grandes animais do Hospital Veterinário e os processamentos histológicos foram realizados Departamento de Patologia Animal.

4.2. Animais e tratamentos

Foram selecionadas 18 fêmeas ovinas da raça Santa Inês, adultas, pluríparas, com idade média de 2 anos, com escore de condição corporal médio 3,0 (escala de 1-5, de JEFFERIES, 1961) e consideradas aptas após realização de exame clínico (hemograma proteínas totais, fibrinogênio e controle de parasitário) e ultrassonográfico dos órgãos do sistema reprodutivo. Foram mantidas em regime intensivo, recebendo silagem de milho e ração balanceada duas vezes ao dia, mais acesso *ad libitum* à água e sal mineral.

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em três grupos experimentais (n=6) a saber: controle (G0), não submetido a processo de aspiração; grupo 1 (G1), uma sessão de aspiração; grupo 9 (G9), nove sessões de aspiração folicular com intervalo de 7 dias.

Para a sincronização de estro se utilizou esponja intravaginal impregnada com 60mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP)¹ em um dia aleatório do ciclo estral (Dia 0), permanecendo por um período de seis dias. No D5 foram aplicados 37,5 µg de D-

¹ Progespon®, Schering-Plough. Brasil.

cloprostenol² e 300UI de eCG³ via IM. A maioria dos animais manifestou estro, confirmando com auxílio de rufiões, após 36 horas da retirada dos progestágenos.

A estimulação ovariana foi realizada 12 horas depois de detectado o estro e consistiu da administração de 80mg de FSHp⁴ e 300 UI de eCG³, e após 36 horas realizavam-se as aspirações foliculares por vídeolaparoscopia. Para as aspirações subseqüentes, as fêmeas foram somente estimuladas.

4.3. Preparo dos animais e protocolo anestésico

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.

Após jejum hídrico e alimentar de 36 horas, os animais foram submetidos ao processo de anestesia, a qual foi obtida através da administração de 0,5 mg/kg de diazepam (IM)⁵ e 2 mg/kg de tramadol (IM)⁶ como medicação pré-anestésica (MPA) e posteriormente, indução com propofol (IV)⁷ na dose de 6 mg/kg, mantendo com infusão contínua de propofol na dose de 0,5mg/kg/min. (IV) mais bôlus e infusão de cloridrato de lidocaína⁸ 1mg/kg (IV) e 1mg/kg/min. IV.

Após a indução, os animais foram entubados utilizando sondas endotraqueais de 8 mm com balonete insuflável, as quais foram fixadas ao chanfro com tiras de gaze. Este procedimento teve como intuito evitar a aspiração do conteúdo ruminal em caso de regurgitação e permitir o fornecimento de oxigênio medicinal umidificado, sob ventilação assistida, facilitando a troca gasosa.

No campo cirúrgico, na região do abdome cranial ao úbere se fez a tricotomia e antisepsia do com tintura de iodo, e em seguida, a anestesia local infiltrativa com 0,4 mL de cloridrato de lidocaína⁸, sendo 0,2 mL para um botão no tecido sub-cutâneo e 0,2 mL intramuscular.

² Sincrocio® Orofino S.A, Brasil.

³ Novormon®, Schering-Plough, Brasil.

⁴ Folltropin®, Schering-Plough, Brasil.

⁵ diazepam® Cristalia., Brasil

⁶ Tramal® Cristalia. Brasil.

⁷ Propofol® Cristalia. Brasil.

⁸ Lidovet®, Bravet, Brasil.

4.4. Videolaparoscopia para aspiração folicular

Depois de estabelecida a manutenção anestésica e analgesia local, as fêmeas foram posicionadas em *Trendelenburg* (figura 1B), e com o auxílio de um bisturi, fez-se incisão cutânea, 10 a 15 cm cranial ao úbere e 5cm à direita da linha média, para facilitar a introdução de trocater com válvulas para insuflação (5 mm), estabelecendo o pneumoperitônio com CO₂, utilizando pressão intrabdominal (PIA) variando de 5 a 8 mmHg, e velocidade de insuflação de 5 L/min. Por este trocater foi introduzido o laparoscópio conectado a uma câmera e a um cabo de fibra ótica, fornecendo luz para o interior da cavidade, sendo a imagem visualizada no monitor; seguindo-se a introdução video-assistida do segundo trocater de 10 mm em posição antimérica ao primeiro e terceiro de 5 mm na linha média 20 cm cranial ao úbere.

Ato contínuo o endoscópio foi transferido para o terceiro trocater obtendo-se campo visual. Seqüencialmente introduziram-se as pelos primeiro e segundo trocáteres as pinças atraumáticas (Babcock) que permitiram a manipulação do útero, tubas e bursas ováricas e individualização dos ovários, que eram fixados, com destes instrumentos, pelo mesovário, evitando sempre lesar qualquer estrutura.

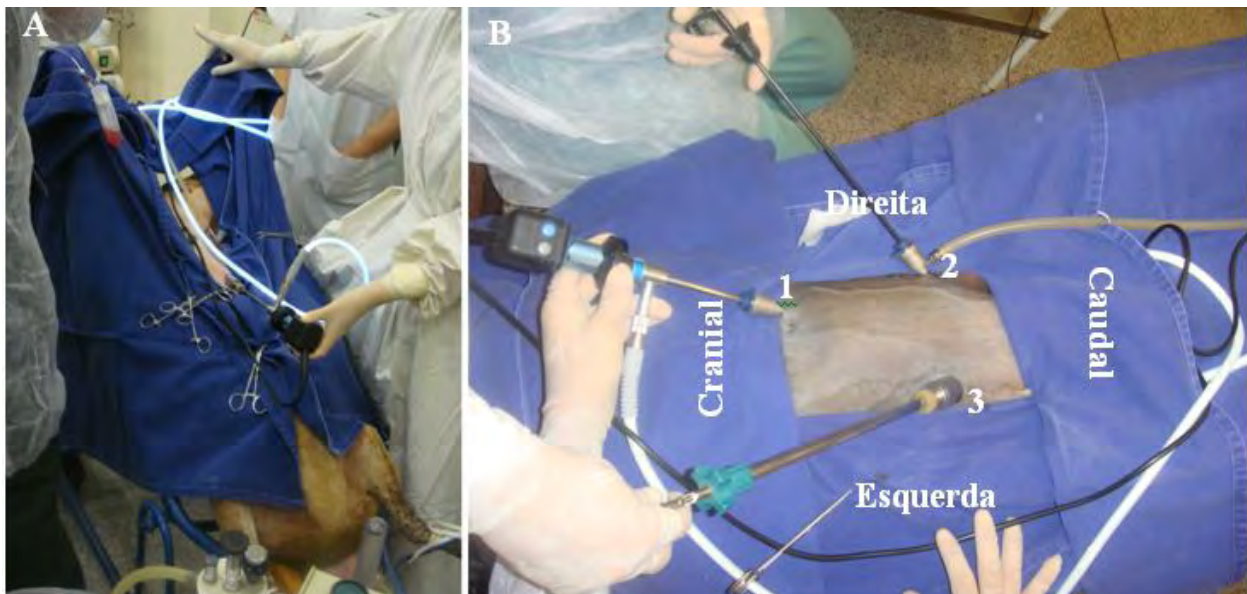


Figura 1: Posicionamento do animal em *Trendelenburg* (A). Localização dos canais de trabalho (B), endoscópio na terceira porta (1) e pinças na primeira (2) e segunda (3).

Previamente a aspiração dos folículos, os ovários foram examinados e o número de dessas estruturas, com dimensões entre 3 - 8 mm, foi contabilizado. Em seguida, a agulha de aspiração foi introduzida na cavidade próxima ao local onde se encontrava o ovário. A punção foi realizada movimentando os ovários em diferentes posições com a pinça de manipulação atraumática. A agulha foi inicialmente colocada em posição paralela à superfície ovariana, o que permitiu as perfurações dos folículos nas suas extremidades e na impossibilidade, a punção foi feita perpendicularmente (figura 2).

Uma vez inserida no folículo, a agulha foi cuidadosamente movida para garantir que todo o seu conteúdo fosse aspirado. A pressão do vácuo foi ajustada para no máximo 50 mmHg.

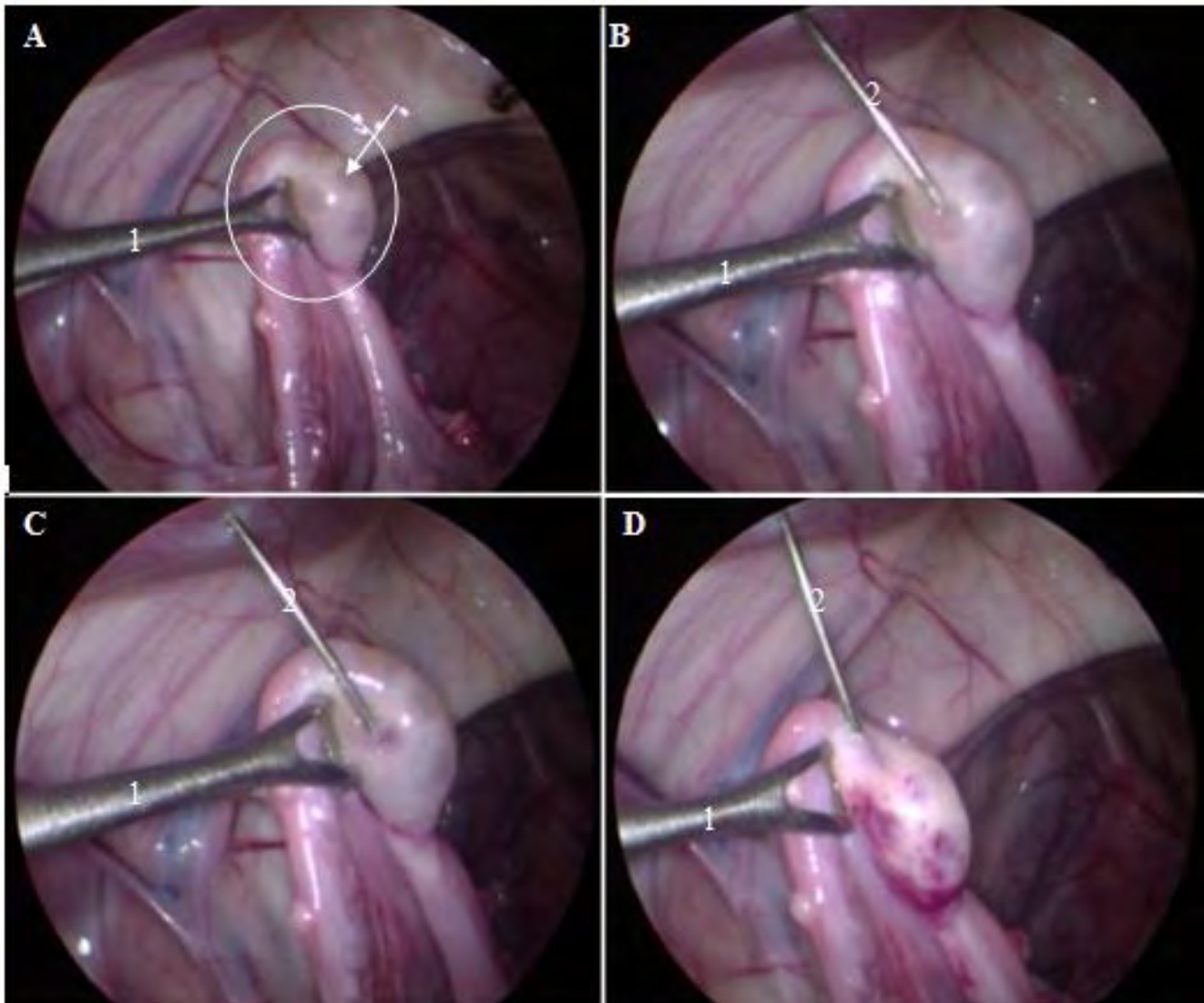


Figura 2: Imagem da cavidade abdominal de ovelha em aumento de 10x, onde observa-se em destaque: fixação do ovário (circulo) com pinça atraumática (1), e presença de folículos (seta) (A); posicionamento da agulha (2) para a punção folicular (B); e aspiração dos folículos (C e D).

Utilizou-se um sistema de aspiração com lume simples (mesmo diâmetro interno), composto de uma agulha de 16G com bisel curto, conectada a uma cânula de teflon de 50 cm de comprimento conectada a uma rolha de silicone⁹, a qual foi acoplada ao tubo de colheita (50 mL). O vácuo foi produzido por uma bomba de aspiração¹⁰ conectada a

⁹ Handle Cook®, Ribeirão Preto-SP, Brasil

¹⁰ Nevoni. Brasil

mangueira de silicone também ligada ao tubo de colheita. Previamente à aspiração dos oócitos realizou-se uma lavagem com o meio de colheita, deixando ao final deste procedimento aproximadamente 2 mL deste meio para receber os oócitos.

Ao termino das aspirações os ovários foram lavados com 10 mL de solução de NaCl 0,9%, para remover coágulos da superfície, minimizando a formação de aderências. As dermorráfias foram realizadas com pontos tipo Wolf. Ato contínuo, se procedeu a limpeza da ferida cirúrgica com iodo povidona e utilização de pomada repelente/cicatrizante¹¹ ao redor da ferida cirúrgica.

Após serem retiradas da maca cirúrgica as fêmeas foram colocadas em local limpo e tranqüilo e observadas até ficarem em posição quadrupedal. Nas intervenções subseqüentes, as incisões foram feitas lateralmente a anterior.

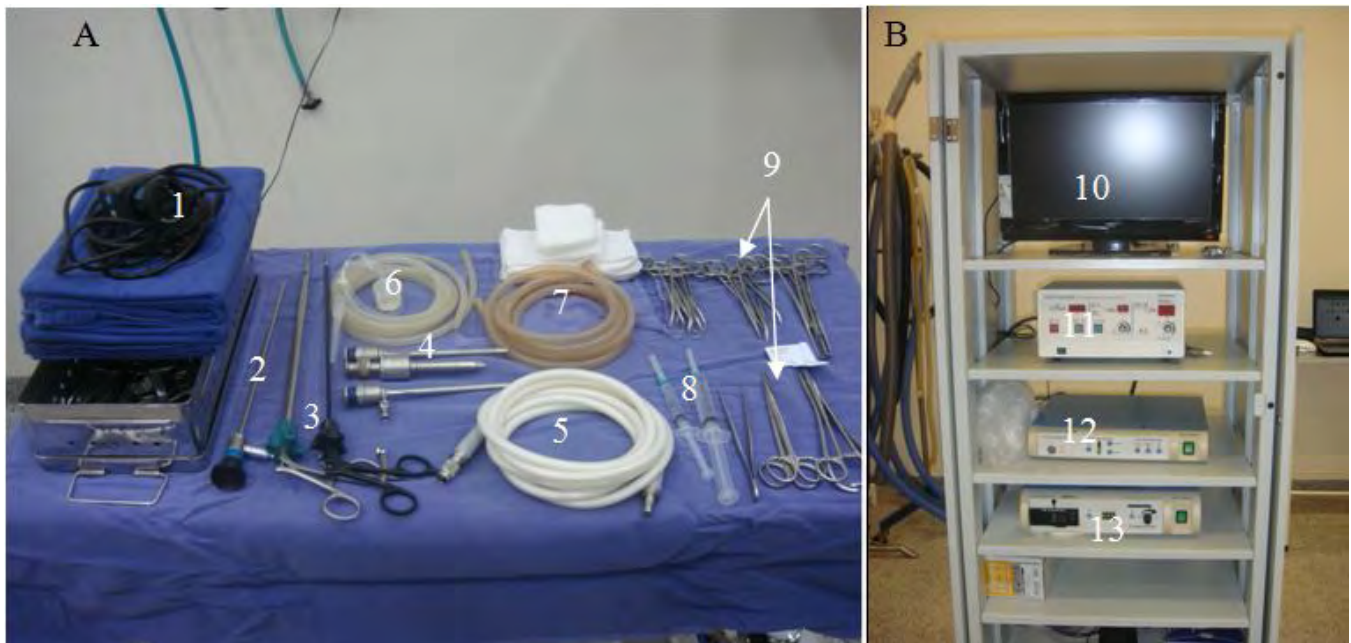


Figura 3: Material utilizado nas aspirações foliculares. A – Mesa cirúrgica: câmera laparoscópica (1), endoscópio (2), pinças laparoscópicas atraumáticas (3), trocáteres (4), cabo de luz (5), mangueira e sistema de aspiração (6), mangueira de insuflação (7), seringas com lidocaína e solução de NaCl 0,9% (8), material cirúrgico convencional (9). B – Equipamento de videocirurgia: Monitor (10), insuflador (11), câmera (12), fonte de luz (13).

¹¹ Ungüento Pearson, Pearson Saúde Animal Ltda.

4.5. Avaliação no pós-operatório

Todos os animais foram pesados semanalmente, e após as punções foram avaliados, nas primeiras 24h, em relação a manifestação de dor, tomando-se por base, curvatura do dorso, deslocamento com dificuldade e diminuição do apetite (MELLOR & STAFFORD, 2004). Assim, com estes parâmetros estabeleceu-se escala que nos permitiu classificar este sintoma e para cada um destes determinou-se um escore de 0 a 2 (0 – ausente; 1 – moderado; 2 – intenso) caracterizando a intensidade do desconforto doloroso. A soma dos valores referentes a cada um dos parâmetros foi utilizada como indicativo de manifestação de dor, podendo chegar ao grau máximo de 6 (0 à 2 – de ausente a discreto; 2 à 4 – de discreto à moderado e de 4 à 6 – de moderado a intenso).

4.6. Análise dos folículos visibilizados, aspirados e oócitos recuperados

O número de folículos visibilizados, aspirados e oócitos recuperados foi contabilizado, e as médias desses valores analisadas comparativamente entre as sessões.

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 μ L de meio de lavagem e então classificados de acordo com sua qualidade segundo HEWITT e ENGLAND (1997).

4.7. Avaliações macroscópicas dos ovários, tubas e útero

Estas estruturas foram observadas por vídeolaparoscopia e avaliadas macroscopicamente para verificar a presença ou não de aderências, fibrose especialmente nos ovário e demais estruturas cavitárias.

Sete dias após a última aspiração, foram realizadas ovariectomias por videolaparoscopias, para análises macro e microscópicas dos ovários. Macroscopicamente foi verificada presença de lesões cicatriciais e consistência das gônadas, que foi quantificada por uma escala de 0 a 2 (0 – consistência característica; 1 – enrijecimento moderado e 2 consistência de tecido fibroso), tabela 1.

Tabela 1. Escala para avaliação da consistência dos ovários adaptada de VIANA et al. (2003).

Grau	Descrição
0	Consistência característica
1	Enrijecimento moderado
2	Consistência de tecido fibroso

4.8. Processamento e avaliação histológica dos ovários

Após as análises macroscópicas, os ovários foram fixados em formol por 24 horas, desidratados em séries crescentes de etanol, diafanizados e incluídos em parafina para a obtenção de cortes histológicos à espessura de 7 μm , coletando-se quatro fragmentos por ovário. As lâminas foram montadas e coradas com hematoxilina-eosina e tricrômico de Masson.

As lâminas foram analisadas por campos, estabelecendo um escore do processo inflamatório classificando em negativo (0) no caso de ausência à baixa ocorrência (1), média ocorrência (2) e alta ocorrência (3).

4.9. Análise estatística

Os dados obtidos sobre folículos visibilizados, aspirados, quantidade e a qualidade dos oócitos colhidos por sessão, dados referentes às análises macroscópicas, dados da análise histológica, dados da escala de dor, e peso corpóreo semanal foram expressos em médias $\pm$ desvio padrão e submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($P < 0,05$) utilizando o programa estatístico GraphPad Prisma 4.

5. RESULTADOS

5.1. Avaliações no trans e pós-cirúrgico

O jejum de 36h, além de evitar refluxo do conteúdo ruminal, facilitou, em conjunto com o pneumoperitônio de 5 mmHg e 5L/min., uma adequada visibilização da cavidade abdominal que teve a imagem transmitida ao vídeo aumentada em 10 vezes, permitindo um tempo de cirurgia de $26,75 \pm 9,6$ min.

O sangramento observado pelas punções foliculares foi incipiente e a lavagem dos ovários promoveu a remoção de coágulos evitando a formação de aderências em todos os animais.

O peso dos animais não teve variação durante as avaliações ($p > 0,05$), as ovelhas tiveram boa recuperação anestésica e a posição quadrupedal ocorria, sem dificuldades, em média com 20 min. Na avaliação de desconforto doloroso não foi observado sintomatologia característica, pontuando na escala $0 \pm 0,5$.

5.2. Estimulação ovariana e produção oocitária

A maioria das ovelhas (72%) apresentou estros às 36 horas após a retirada dos progestágenos (figura 4).

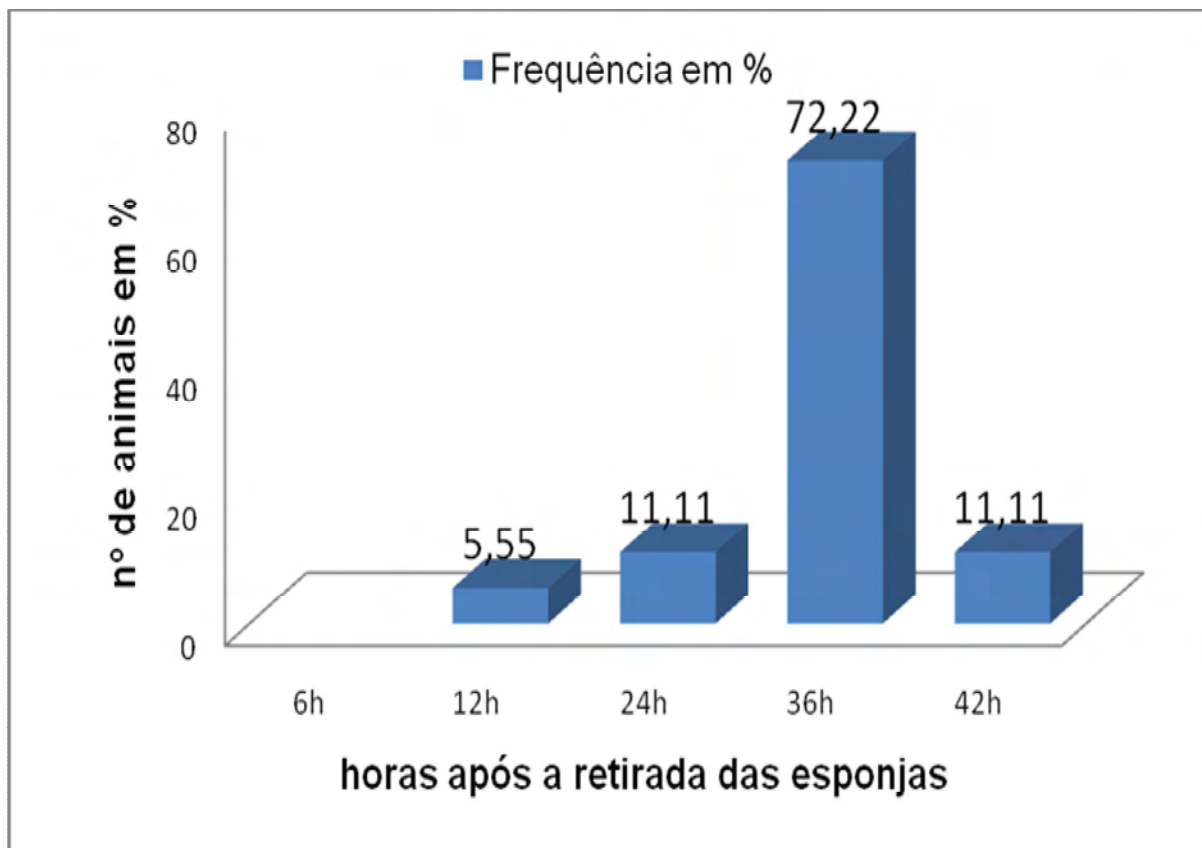


Figura 4: Representação gráfica da distribuição das frequências de estro nas ovelhas após a sincronização, 36 horas após a retirada das esponjas de MAP.

As médias do número de folículos visibilizados, aspirados e oócitos recuperados foram de $13,24 \pm 2,0$, $11,27 \pm 3,03$ e $5,79 \pm 2,3$ respectivamente, com uma taxa de recuperação de 51,69% (folículos aspirados/oócitos recuperados), observando-se ausência de variação entre as sessões ($p > 0,05$), como observado na figura 5. Em algumas sessões os animais apresentaram corpos lúteos (CL), tendo $0,46 \pm 0,84$ CL/animal/sessão.

Também não houve diferença na qualidade oocitária ao longo das observações ($p > 0,05$), sendo a distribuição de frequência dos graus de classificação de oócitos observado na figura 6.

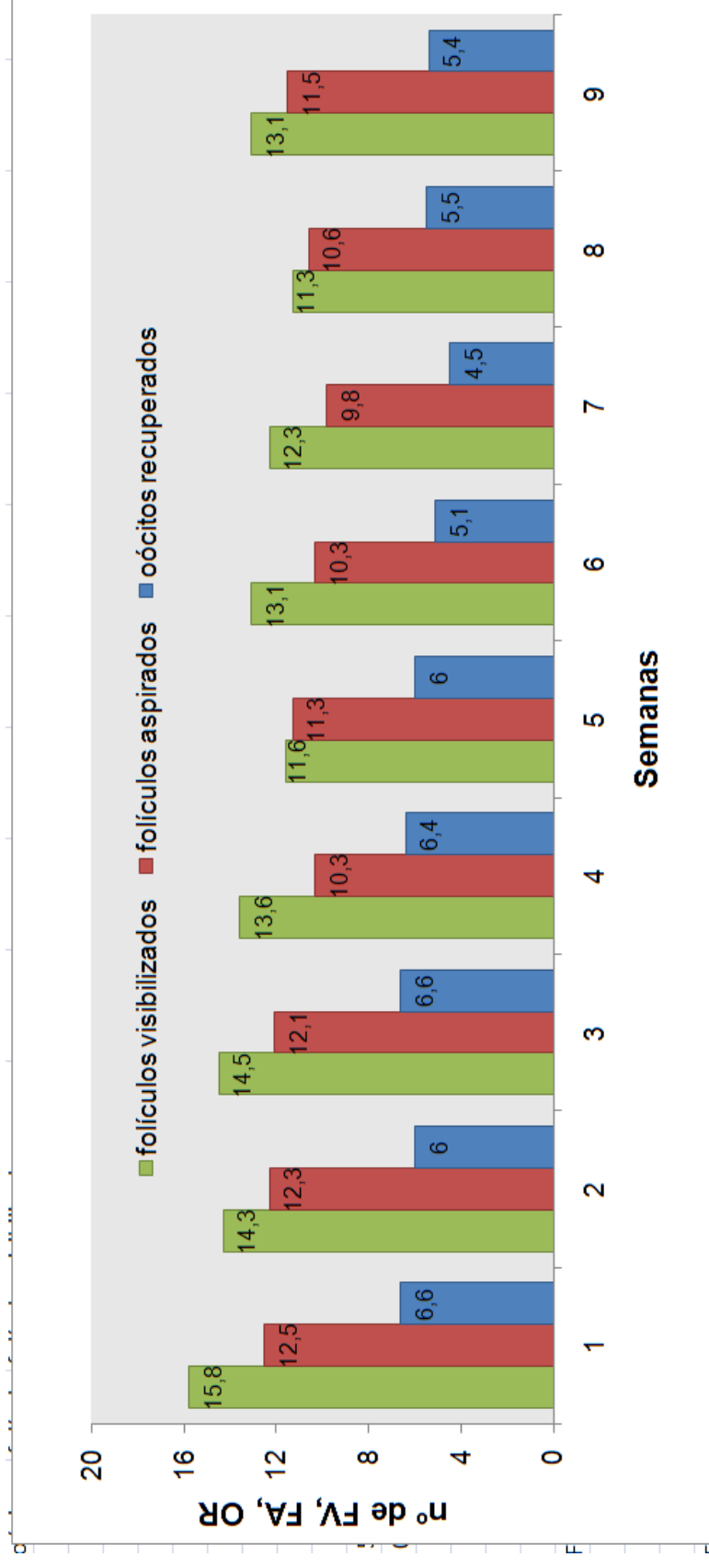


Figura 5: Representação gráfica do número de folículos visibilizados (FV), folículos aspirados (FA) e óocitos recuperados (OR) pelo tempo em semanas. Não houve diferenças significativas entre as sessões ($p>0,05$).

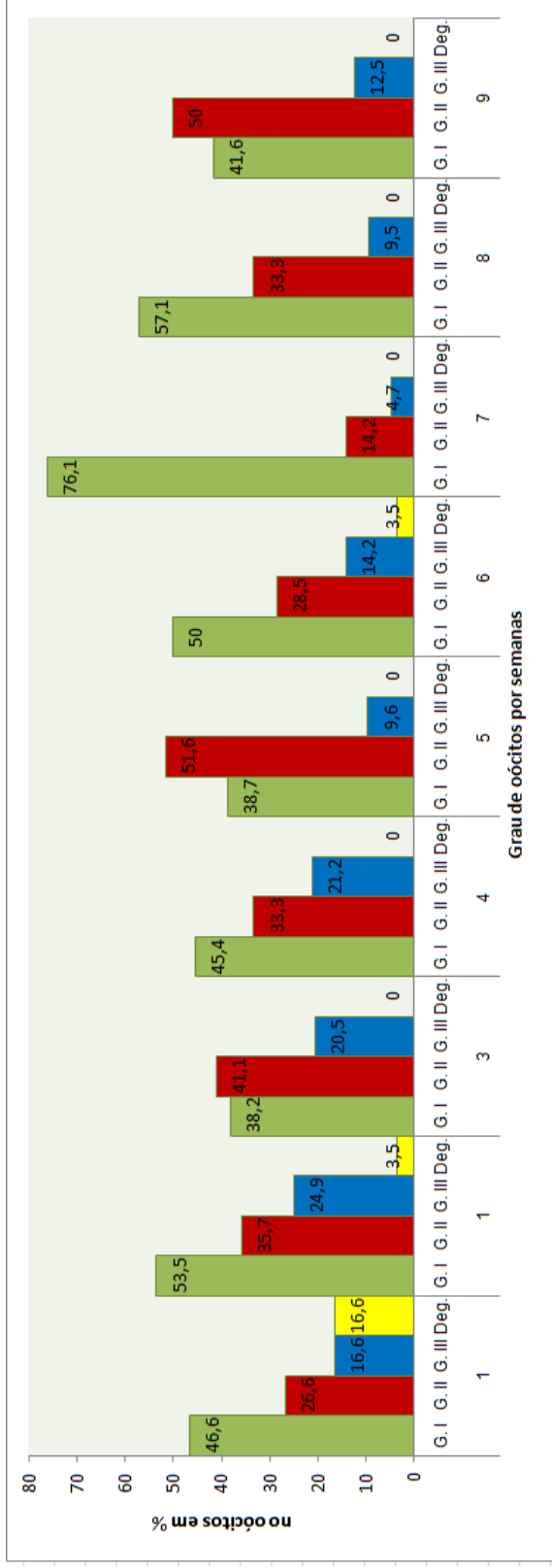


Figura 6: Representação gráfica da classificação qualitativa dos oócitos durante as nove semanas de experimento. Não houve diferença significativa entre as sessões ($p>0,05$).

5.3. Avaliação do macro e microscópicas dos ovários

Pela videolaparoscopia não se visualizou lesões no sistema reprodutor interno (corpo, cornos e tuba uterina) e similarmente nos ovários durante os procedimentos cirúrgicos e após ovariectomias (escore zero).

Na avaliação histopatológica não se observou lesões significativas nos G1 e G9 em comparação com o G0 ($p > 0,05$). Apenas em dois animais do G1 detectou-se presença de pequenas áreas de tecido cicatricial e infiltrados mononucleares, possivelmente nos locais das punções foliculares (escore zero para o G0 (controle), $0,1 \pm 0,4$ para o G1 e zero para o G9).

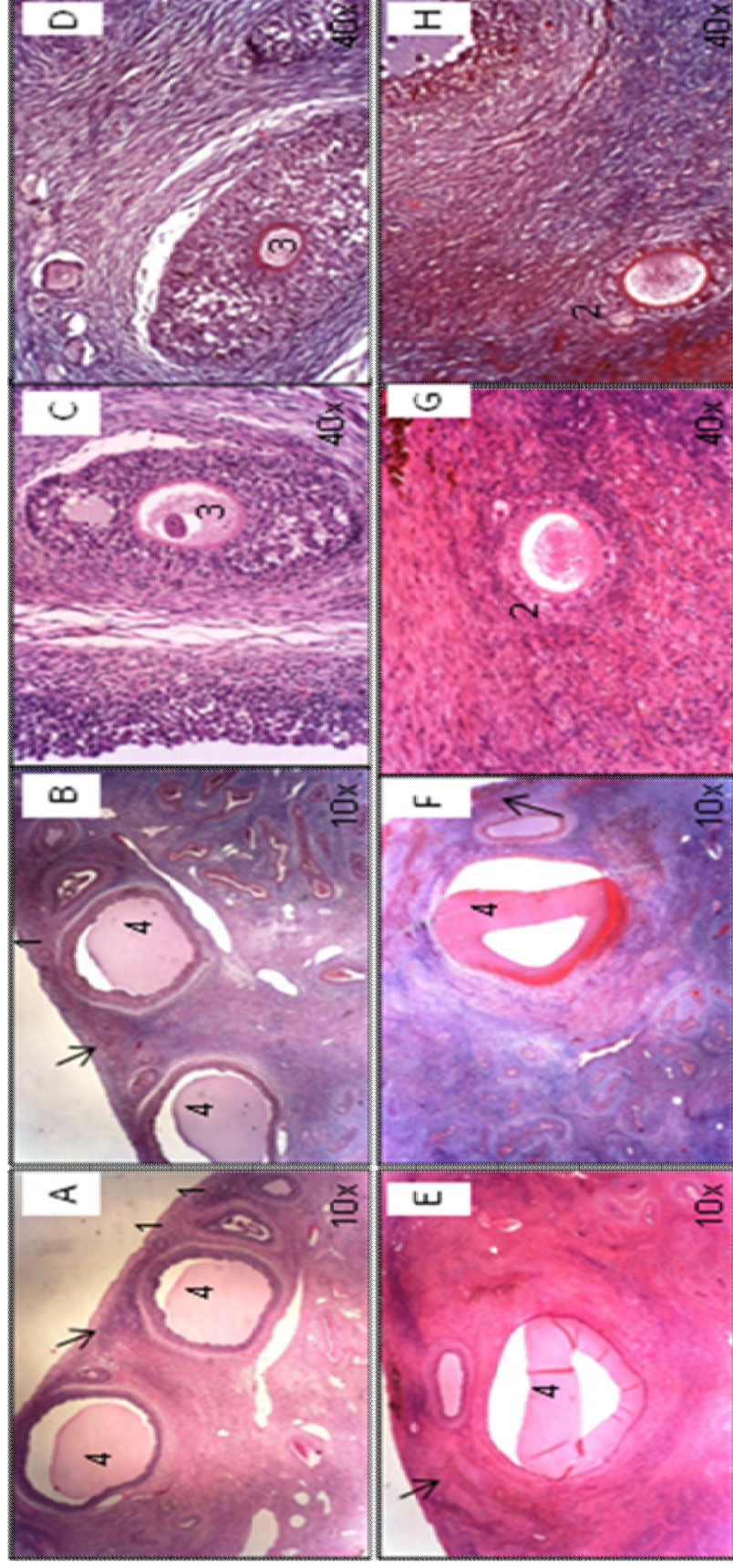


Figura 7: Fotomicrografia de cortes de ovários de ovelhas submetidos à aspirações foliculares, corados em hematoxilina-eosina (HE) e tricrômo de masson (TM). Em todas as imagens verifica-se a integridade do tecido; as imagens A, B, C e D, correspondem ao G1, de E, F, G, e H ao G9. Observado na região cortical o epitélio germinativo inalterado (setas) e folículos ovarianos em vários estágios de desenvolvimento, folículos primordiais (1), primários (2), secundários (3) e terciários pré-ovulatórios (4).

6. DISCUSSÃO

6.1. Avaliações no trans e pós-cirúrgico

Obteve-se um tempo cirúrgico de $26,75 \pm 9,6$ min., que foi similar aos descritos por CORDEIRO (2006), de 35 min. e WIECZOREK et al. (2010) de 18 a 20 min. em aspirações foliculares em caprinos e ovinos respectivamente. DUARTE et al. (2009), 23 min. em biópsias hepáticas em carneiros e BLEUL et al. (2005), 120 – 150 min. em ovariectomias de bovinos. Com estas citações se permite considerar que a técnica videolaparoscopia favoreceu a execução de diferentes procedimentos em um tempo bastante conveniente, particularmente para pequenos ruminantes. Contudo, é conveniente destacar que habilidade do operador é importante para se obter este resultado, fato também descrito por estes autores.

A técnica operatória utilizada permitiu que houvesse excelente recuperação dos animais no pós-cirúrgico, o que corroborou o fato de não se ter observado manifestação de desconforto doloroso, fenômeno que se tentou identificar pelas avaliações de perda de apetite, locomoção com dificuldade e curvatura do dorso, descritas por MELLOR & STAFFORD (2004). Curiosamente, este tipo de observação o qual se entende como importante, não foi mencionado, com critério específico, por nenhum dos autores cotejados; provavelmente em decorrência da recuperação favorável que obtiveram. Assim, esta condição permite que se infira sobre a superioridade deste procedimento operatório em relação ao convencional para aspirações foliculares.

O intervalo de sete dias utilizado entre as intervenções operatórias nos animais do G9 foi adequado e suficiente, permitindo a obtenção de oócitos sem que tenha havido comprometimento da condição clínica dos animais; aspecto que evidenciou pela manutenção do escore corporal e comportamental dos animais. STANGL et al. (1999) não realizou observações clínicas e comportamentais, no entanto verificou que o intervalo semanal foi suficiente para não alterar a produção oocitária em 10 repetições de LOPU em ovinos.

6.2. Estimulação ovariana e produção oocitária

Os protocolos de sincronização e estimulação ovariana foram corretos, pois a maioria dos animais entrou em estro às 36h após a retirada dos implantes de MAP, assim, estimulação ovariana com aplicação do eCG mais FSHp recrutou uma nova onda folicular, apresentando um número satisfatório de folículos/ovelha na LOPU. Mesmo que em alguns casos tenham sido encontrados corpos lúteos resultantes de folículos ovulados antes das aspirações, estas perdas não foram significativas ($P>0,05$).

A média encontrada neste experimento foi aproximada ao descrito por BALDASSARE e KARATZAS (2004), 13,4 folículos/ovelha, e BASSO et al. (2008), 14,3 folículos/ovelha. E a taxa de recuperação de oócitos está no intervalo de 40 a 90% (COGNIÉ et al., 2004; MORTON et al., 2005; RODRIGUEZ et al., 2006; COX & ALFARO, 2007; GIBBONS et al., 2007).

No entanto ABDULLAH et al. (2008), em cabras, comparando a melhor hora para a estimulação ovariana, observou que estimulações com FSH mais hCG 60h e 72h antes da aspirações foliculares apresentaram resultados superiores às estimulações feitas 36h antes, tanto na quantidade e tanto na qualidade dos oócitos recrutados. No presente estudo, em muitas sessões os folículos estavam muito próximos do tamanho mínimo aspiráveis (2 mm), assim, pôde-se estabelecer a hipótese em que tais perdas podem ser otimizadas estudando outros protocolos hormonais, a fim de promover melhor estimulação ovariana, tendo folículos mais viáveis (de 2 mm à 8 mm) no momento da aspiração folicular.

A ausência de variação na quantidade e qualidade dos oócitos aspirados no decorrer das sucessivas sessões de aspiração folicular é um fator favorável para produção animal, pois os animais podem ter um maior aproveitamento reprodutivo na LOPU para a PIV. CORDEIRO (2006) em estudos de LOPU em caprinos constatou que houve diminuição na produção de oócitos tanto quantitativamente quanto qualitativamente no decorrer de sessões consecutivas. Ainda que não tenha sido objeto desta pesquisa autores como ROY et al. (1999), DRION et al. (2001) e DE RUIGH et al. (2000) mencionam a hipótese da ocorrência de anticorpos formados com o uso prolongado de hormônios exógenos, como anti-eCG e anti-FSH, o que comprometeria a obtenção de oócitos. No entanto os resultados obtidos se contrapõem ao mencionado por estes autores, fato que faculta se questionar estes relatos e se propõe o desenvolvimento de pesquisas para esclarecer estes fenômenos

6.3. Avaliação do macro e microscópicas dos ovários

A ausência de lesões macroscópicas (aderências, fibroses, entre outras) se deveu, provavelmente, ao fato de a videolaparoscopia ser um procedimento minimamente invasivo, sendo a manipulação do trato genital interno realizada cuidadosamente e as punções serem somente na superfície dos ovários, não atravessando os demais órgãos do sistema reprodutor, a exemplo do que pelo uso de ultrassom para este fim em bovinos (VIANA et al., 2003). A avaliação histológica também não revelou presença de lesões nos ovários e considera-se que isto se deveu ao fato das punções serem em locais específicos, já que os folículos ovarianos localizam-se na superfície do ovário, na região cortical.

Na OPU por ultrassonografia existe uma relação entre o número de aspirações foliculares e a ocorrência de aderências no ovário, porém, não houve uma diminuição do número de oócitos recuperados, existindo uma correlação positiva entre a ocorrência de fibrose ovariana com o número de oócitos recuperados (VIANA et al., 2003). Não houve também formações de redes fibrosas em torno do órgão, nem a presença de folículos hemorrágicos ou parcialmente luteinizados como observado em vacas aspiradas por OPU por ultrassom (GIBBONS et al., 1994).

Nenhum desses achados foi observado no presente estudo, isso se justifica pelo fato de que a OPU realizada por ultrassonografia é um procedimento mais traumático, pois não há como puncionar somente superfície do folículo ovariano, além da manipulação manual dos ovários, além da manipulação manual do ovário que pode causar a lesões na superfície da gônada.

Em pequenos ruminantes não há informações sobre lesões ovarianas causadas por aspirações foliculares. No entanto, CORDEIRO (2006) relatou a ocorrência de aderências no órgão reprodutivos 15% das cabras aspiradas, mesmo com o uso de solução heparinizada, e STANGL et al. (1999) relatou aderências uni e bilaterais nos ovários de ovelhas submetidas a dez sessões de aspiração folicular com intervalo semanal.

Tais conseqüências não ocorreram neste estudo mesmo sem o uso de substâncias como soluções heparinizadas, usadas por CORDEIRO (2006) e BALDASSARE e KARATZAS (2004) e Carboxymetilcellulose usada por EWOLDT et al. (2004), podendo ser justificado pelo cuidado na manipulação do trato genital e retirada dos coágulos da superfície ovariana com solução de NaCl a 0,9%.

Conjectura-se que ausência de alterações histopatológicas nos ovários advém do fato das punções serem somente na superfície do folículo ovariano, além da capacidade fisiológica de recuperação do ovário. Fisiologicamente o corpo hemorrágico, posterior corpo lúteo, proveniente do folículo que ovulou é totalmente eliminado por apoptose (SILVA et al., 2010). O mecanismo ocorre pela ação das células imunológicas (macrófagos e linfócitos T) que produzem citocinas como o interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina- β (IL β -1), que podem modificar a síntese de progesterona e prostaglandinas pelas células luteais, ocasionando também efeitos citotóxicos diretos, em que as células luteais mortas são fagocitadas pelos macrófagos (MIYAMOTO, 1996; PATE, 1996). Este fenômeno também é possível de ocorrer nos folículos puncionados, assim, não há tecido cicatricial após sete dias do processo de aspiração folicular.

7. CONCLUSÕES

- A repetição do procedimento de aspiração folicular não causou de desconforto doloroso nos animais que pudesse limitar a técnica;
- O Intervalo entre as sessões de aspiração folicular permitiu a adequada recuperação dos animais;
- A repetição das sessões de aspiração folicular não alterou o número de folículos visibilizados e aspirados, nem na quantidade e qualidade dos oócitos recuperados;
- A seqüência operatória para a realização das aspirações foliculares não causou lesões macro e microscópicas em nenhuma das estruturas avaliadas, particularmente nos ovários;
- Procedimentos de aspiração folicular consecutivos, em nove sessões semanais, apresentaram-se viáveis, mostrando que a técnica apresenta um enorme potencial para otimização da reprodução assistida nesta espécie animal.

8. REFERÊNCIAS

ABDULLAH R.B., LIOW S.L.; RAHMAN A.N.M.A., CHAN W.K.; WAN-KHADIJAH W.E.S.C. N.G. 2008. Prolonging the interval from ovarian hyperstimulation to laparoscopic ovum pick-up improves oocyte yield, quality, and developmental competence in goats. **Theriogenology**, 70 765–771.

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

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

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

BALDASSARE H., CASTRO T.E., FURNUS C.C. & DE MATOS D.G. 1994. *In vitro* maturation and fertilization of sheep oocytes collected by laparoscopic folliculocentesis. **Theriogenology**, 41 159.

BALDASSARE H., FURNUS C.C., DE MATOS D.G., PESSI H. 1996. *In vitro* production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis: alternative gonadotrophin treatments for stimulation of oocyte donors. **Theriogenology**, 45 707-717.

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

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

BASSO A.C., MARTINS J.F.P., FERREIRA, C.R., ERENO A., TANNURA, J., TABET A., FIGUEIREDO C.L., DE OLIVEIRA P.C., PONTES J.H.F. 2008. Biotecnologia da Reprodução na Espécie Ovina: Produção *in vitro* de Embriões Ovinos: Aspectos da Técnica de Aspiração Folicular e do Tratamento Hormonal de Doadoras. **O Embrião**, 38 (10) 8-11.

BERLINGUER P.M., BEARD A.P., COOK S.J., CHANDOLIA R.K., HONAMOOZ A., RAWLINGS N.C. 2004. Ovarian antral follicular dynamics and their relationships with endocrine variables through out the oestrous cycle in breeds of sheep differing in prolificacy. **J Reprod Fertil**, 61 1477-1486.

BECKER F., KANITZ W., NÜRNBERG G., KURTH J., SPITSCHAK M. 1996. Comparison of repeated transvaginal ovum pick up in heifers by ultrasonographic and endoscopic instruments. **Theriogenology**, 46 999-1007.

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

BLEUL U., HOLLENSTEIN K., KÄHN W. 2005. Laparoscopic ovariectomy in standing cows. **Anim Reprod Scie**, 90 193–200.

BOLS P.E.J., VAN SOOM A., VANROOSE G., DE KRUIF A. 1996. Transvaginal ovum pick-up in infertile Belgian Blue donor cows: preliminary results. **Theriogenology**, 45 359.

BONI R., ROELOFSEN M.W.M., PIETERSE M.C., KOGUT J., KRUIP T.A.M. 1997. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. **Theriogenology**, 48 277- 289.

BOUSQUET D., TWAGIRAMUNGU H., MORIN N., BRISSON C., CARBONEAU G., DUROCHER J. 1999. In vitro embryo production in the cow: an effective alternative to the convencional embryo production approach. **Theriogenology**, 51 59-70.

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

CORDEIRO M.F. **Avaliação da laparoscopia na aspiração folicular em fêmeas caprinas pré-púberes e adultas com ou sem estimulação ovariana hormonal**. 59f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2006.

COGNIÉ Y., POULIN N., LOCATELLI Y. 2004. State of the art production, conservation and transfer of in vitro produced embryos in small ruminants. **Reprod Fert Develop**, 16, 437-445.

COX J.F., ALFARO V. 2007. *In vitro* fertilization and development of OPU derived goat and sheep oocytes. **Reprod Domes Anim**, 42 83-87.

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

DRION P.V., FURTOSS V., BARIL G., MANFREDI E., BOUVIER F., POUGNARD J.L., BERNELAS D., CAUGNON P., MACNAMARA E.M., REMY B., SULON J., BECKERS J.F., BODIN L., LEBOUEF B. 2001. Four year of induction/synchronization of estrus in dairy goats: effect on the evolution of eCG bidding rate in relation with parameters of reproduction. **Reprod Nutr Dev**, 41 401-412.

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

EARL C.R., IRVINE B.J., KELLY J.M., ROWE J.P., ARMSTRONG D.T. 1995. Ovarian stimulation protocols for oocyte collection and in vitro embryo production from 8 to 9 week old lambs. **Theriogenology**, 43, 203-208.

EWOLDT J.M., ANDERSON D.E., HARDY J., WEISBRODE S.E. 2004. Evaluation of a Sheep Laparoscopic Uterine Trauma Model and Repeat Laparoscopy for Evaluation of Adhesion Formation and Prevention with Sodium Carboxymethylcellulose. **Vet Surg**, 33 668-672.

FONSECA JF. 2005. **Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos**. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2005, *Anais...* CBRA.

FREITAS V.J.F., SIMPLÍCIO A.A. 2002. 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, 179-194.

FRY R.C., SIMPSON T.L., SQUIRES T.J. 1998. Ultrasonically guided transvaginal oocyte recovery from calves treated with or without GnRH. **Theriogenology**, 49 1077-1082.

GIBBONS J.R., BEAL W.E., KRISHER R.L., FABER E.G., PEARSON R.E., GWAZDAUSKAS F.C. 1994. Effect of once versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. **Theriogenology**, 42 405-419.

GIBBONS A., PEREYRA BONNET F., CUETO M. 2007. A procedure for maximizing oocyte harvest for *in vitro* embryo production in small ruminants. **Reprod Dom Anim**, 42 423-426.

GONZALES-BULNES A., GARCIA-GARCIA R.M., CASTELLANOS V., SANTIAGO-MORENO J., DOMINGUEZ V., LOPEZ-SEBASTIAN A., TREGUERRES J.A.F., COCERO

M.J. 2003. Influence of maternal environment on the number of transferable embryos obtained in response superovulatory FSH treatments in ewes. **Reprod Nutr Dev**, 43 17-28.

GRAFF K.J., MEINTJES M., DYER V.W., PAUL J.B., DENNISTON R.S., ZIOMEK C.A., GODKE R.A. 1999. Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval 50 following FSH simulation of domestic goats. **Theriogenology**, 51 (6) 1099-1119.

HEWITT D. A., ENGLAND G. C. W. 1997. Effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of domestic bitches. **J Reprod Fert**, 83-91. Supplement 51.

ISHWAR A. K., MEMON M.A. 1996. Embryo transfer in sheep and goats: a review. **Small Rumin Res**, 19 (1) 35-43.

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

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

LOONEY C.R., LINDSEY B.R., GONSETH C.L., JOHNSON D.L. 1994. Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. **Theriogenology**, 41 67-72.

LOHUIS M.M. 1995. Potential benefits of bovine embryo-manipulation technologies to genetic improvement programs. **Theriogenology**, 43 51-80.

MAJERUS V., DE ROOVE R., ETIENNE D., KAIDI S., MASSIP A., DESSY F., DONNAY I. 1999. Embryo production by ovum pick up in unstimulated calves before and after puberty. **Theriogenology**, 52 1169-1179.

MARTINO A., PALOMO M.J., MOGAS T., PARAMIO M.T. 1994. Influence of the collection technique of prepubertal goat oocytes on *in vitro* maturation and fertilization. **Theriogenology**, 42 (5) 859-873.

MARTINS, E. C. **Ovinocultura no Brasil: Novas Fronteiras**. 2007. Disponível em: <<http://www.ambienteemfoco.com.br/?p=2478>>. Acessado em: maio de 2008.

MARTÍNEZ A.G., MATKOVIC M. 1998. Cryopreservation of ovine embryos: slow freezing and vitrification. **Theriogenology**, 49 (5), 1039-1049.

MELLOR D.J. & STAFFORD K.J. 2004. Physiological and Behavioural Assessment of Pain in Ruminants: Principles and Caveats. 32 (1) 267–271.

MIYAMOTO A. 1996. Intraluteal mechanisms involved in prostaglandin F2a induced luteolysis in Ewe. **J Reprod Develop**, 49 61-63.

MORTON K.M., DE GRAAF S.P., CAMPBELL A. 2005. Repeated ovum pick-up and *in vitro* embryo production from adult ewes with and without FSH treatment. **Reprod Dom Anim** 40 422-428.

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

PATE, J.L. 1996. Intercellular communication in the bovine corpus luteum. **Theriogenology**, 45 1381–1397.

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

PIETERSE M.C., VOS P.L.A.M., KRUIP T.A.M., WURTH Y.A., BENEDEN TH. H., WILLEMSE A.H., TAVERNE M.A.M. 1991. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. **Theriogenology**, 35 19-24.

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

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

ROY F., MAUREL M.C., COMBES B., VAIMAN D., CRIBIU E.P., LANTIER I., POBEL T., DELETANG F., COMBARNOUS Y., GUILLOU F. 1999. The negative effect of repeated equine chorionic gonadotropin treatment on subsequent fertility in Alpine goats is due to a humoral immune response involving the major histocompatibility complexes. **Biol Reprod**, 60 805-813.

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

SANTL B., WENIGERKIND H., SCHERNTHANER W., MÖDL J., STOJKOVIC M., PRELLE K., HOLTZ W., BREM G., WOLF E. 1998. Comparison of ultrasound-guided vs laparoscopic transvaginal ovum pick-up (OPU) in Simmental heifers. **Theriogenology**, 50 89-100.

SCHERNTHANER W., WENIGERKIND H., STOJKOVIC M., PALMA G.A., MODL J., WOLF E., BREM G. 1999. Pregnancy rate after ultrasound-guided follicle aspiration in nonlactating cows from different breeds. **J Vet Med**, 46 33-37.

SENEDA M.M. 2005. Aspiração bem feita. **Revista Cultivar Bovinos**. nº 17, de abril de 2005.

SEVILLANO C., ANEL L., DE LA FUENTE J., ALVAREZ M., CELORRIO I., DE PAZ P., BOIXO J.C. & OLMEDO J.A. 1997. *In vitro* development of sheep embryos derived or repeated laparoscopic folliculoaspiration. **Theriogenology**, 47 298.

SILVA A.S.L., TEIXEIRA P.P.M., VICENTE W.R.R. 2010. Mecanismos fisiológicos e bioquímicos da luteólise: revisão de literatura. **Rev Cien Eletr Med Vet**. 8 (15).

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

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

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

TRALDI A.S. 2006. **Biotecnicas aplicadas em reprodução de pequenos ruminantes**. III Feinco.

VIANA J.H.M., NASCIMENTO A.A., PINHEIRO N.N.L., FERREIRA A.M., CAMARGO L.S.A., SÁ W.F., MARQUES JÚNIOR A.P. 2003. Caracterização de seqüelas subseqüentes à punção folicular em bovinos. **Pesq Vet Bras** 23 (3)119-124.

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

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

ANEXO I

Tabela. Grupos e tratamentos experimentais preconizados para ovelhas submetidas à aspiração folicular.

Grupos	Tratamentos	n da amostra
G0	Não submetido a sessões de aspiração	6
G1	Submetido a 1 sessão de aspiração	6
G9	Submetido a 9 sessões de aspiração	6

Tabela. Classificação dos complexos *cumulus*-oócitos obtidos por laparotomia (HEWITT e ENGLAND, 1997)

<i>Grau</i>	Aspecto	Classificação
I	Complexo <i>cumulus</i> completo, ooplasma homogêneo, escuro e rodeado completamente por uma ou mais camadas de células do cumulus.	Excelente
II	COC com o ooplasma levemente pigmentado com camadas de células do cumulus incompletas.	Bom
III	COC com o ooplasma pálido, requentemente disformes e sem células do cumulus.	Regular
IV	Oócito desnudo e/ou degenerado; citoplasma desuniforme.	Degenerado

Tabela. Número de FV, FA e OR por semanas.

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	Média
FV	15,8	14,3	14,5	13,6	11,6	13,1	12,3	11,3	13,1	13,2
	±2,3	±3,0	±3,5	±1,7	±3,9	±1,9	±2,4	±2,8	±4,0	±2,0
FA	12,5	12,3	12,1	10,3	11,3	10,3	9,8	10,6	11,5	11,2
	±2,4	±3,3	±1,9	±3,4	±1,9	±2,8	±3,0	±1,5	±4,5	±3,0
OR	6,6	6±	6,6	6,4	6	5,1	4,5	5,5	5,4	5,1
	±1,5	1,6	±1,3	±2,0	±1,0	±2,1	±1,7	±1,7	±2,2	±2,3

Não houve variação durante todas as semanas ($p>0,05$).

FV – Folículos Visibilizados, FA – Folículos Aspirados, OR – Oócitos Recuperados.

Tabela. Classificação da qualidade dos oócitos durante as nove semanas.

Grau	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9
I	46,6	53,57	38,2	45,4	38,7	50	76,1	57,1	41,6
II	26,6	35,7	41,1	33,3	51,6	28,5	14,2	33,3	50
III	16,6	24,9	20,5	21,2	9,6	14,2	4,7	9,5	12,5
IV	16,6	3,5	0	0	0	3,5	0	0	0

Número de oócitos em %, $p>0,05$.