

ASPIRAÇÃO FOLICULAR POR VIDEOLAPAROSCOPIA EM OVELHAS SANTA INÊS: DESCRIÇÕES DA TÉCNICA

**VIDEOLAPAROSCOPYC OVUM PICK-UP IN SANTA INÊS EWES:
TECHNIQUE PRACTICE DESCRIPTION**

TEIXEIRA, Pedro Paulo Maia

PADILHA, Luciana Cristina

OLIVEIRA, Maria Emília Franco

MOTHEO, Tathiana Ferguson

SILVA, Alanna do Socorro Lima da

BARROS, Felipe Farias Pereira da Câmara

COUTINHO, Leandro Nassar

FLÔRES, Fabíola Niederauer

LOPES, Maristela de Cassia Seudo

BANDARRA, Márcio de Barros

VICENTE, Wilter Ricardo Russiano

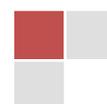
Setor de Obstetrícia e Reprodução Animal, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. FCAV/UNESP.

Jaboticabal – São Paulo – Brasil.

e-mail: p_paulomt@yahoo.com.br

RODRIGUES, Luiz Fernando Souza

Centro de Pesquisa em Caprinos e Ovinos do Pará CPCOP, Instituto de Saúde e Produção Animal ISPA, Universidade Federal Rural da Amazônia, UFRA, Belém – Pará – Brasil.



RESUMO

O objetivo deste trabalho foi descrever a técnica de aspiração folicular por videolaparoscopia (LOPU), mostrando detalhes práticos deste procedimento. Realizaram-se 60 sessões de aspirações foliculares em ovelhas da raça Santa Inês, submetidas à sincronização do estro seguindo-se estimulação. O procedimento foi realizado por três portais laparoscópicos sendo a pressão intrabdominal de 5 mmHg, e velocidade de insuflação de 5 L/min. e as punções executadas por uma agulhas 16G acoplado a um sistema de aspiração. O número de folículos visibilizados, aspirados e oócitos recuperados foram de $13,32 \pm 2,8$, $11,37 \pm 2,8$ e $6,36 \pm 2,0$ respectivamente. O procedimento mostrou-se eficiente, porém há necessidade de avaliação de adaptações adicionais com intuito de obter melhor resultado.

Palavras-chave: Punção Folicular, ovariana, ovino.

ABSTRACT

The aim of this study was to describe the technique of laparoscopy ovum pick-up (LOPU), showing practical details of this procedure. Sixty sessions of follicular aspiration were performed in Santa Ines ewes subjected estrus synchronization and stimulation. The procedure was performed to three laparoscopic portals and intrabdominal pressure of 5 mmHg, and the inflation rate of 5 L / min. and the punctures performed by a 16G needle attached to a vacuum system. The number of follicles visualized, aspirated and oocytes recovered were 13.32 ± 2.8 , $11.37 \pm 6.36 \pm 2.8$ and 2.0 respectively. The procedure was efficient, although it needs further adaptation assessment with a view to obtaining better results.

Keywords: Follicular Puncture, ovarian, sheep.

INTRODUÇÃO

A obtenção dos oócitos é etapa fundamental para a realização da biotécnica de produção *in vitro* (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 através da via transvaginal guiada por ultrassom, laparotomia ou laparoscopia (WANI, 2002).

Para recuperação de oócitos de fêmeas vivas via transvaginal guiada por ultrassom, “ovum pick-up” (OPU), largamente realizada em bovinos, em pequenos ruminantes a técnica é ainda bastante limitada, principalmente em fêmeas pequenas, tornando-se de difícil execução até para operadores com habilidade, além de ser mais traumática que por laparotomia ou a laparoscopia. Já a laparotomia inevitavelmente acarreta em algum grau de trauma cirúrgico, necessitando-se de extremo cuidado para não formação de aderências pós-operatórias (BASSO et al., 2008). Tais conseqüências tornam-na imprópria a médio e longo prazo, em especial em fêmeas de alto valor genético (FREITAS e 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 (BALDASSARRE et al., 2002; CORDEIRO, 2006).

Deste modo, o objetivo deste trabalho foi descrever a técnica de aspiração folicular por videolaparoscopia (LOPU) em ovelhas Santa Inês, mostrando detalhes deste procedimento.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e tratamentos

Foram realizadas 60 sessões de LOPU, sendo os procedimentos realizados em ovelhas da raça Santa Inês, adultas, pluríparas, com escore de condição corporal médio e 3,0 (de 1,0 – 5,0) e consideradas híginas após realização de exame clínico e ultrassonográfico dos órgãos do sistema reprodutivo.

Anterior as LOPU's as ovelhas foram submetidas à sincronização de estro, utilizando esponjas intravaginais impregnadas com 60mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP)^a em um dia aleatório do ciclo estral (Dia 0), permanecendo por um período de seis dias. No quinto dia do protocolo foram aplicados 37,5 µg de D-cloprostenol^b e 300UI de eCG^c via IM. A maioria dos



animais manifestou estro, confirmando com auxílio de rufiões, após 36 horas da retirada dos progestágenos.

Seguidamente realizou-se a estimulação ovariana feita 12 horas depois de detectado o estro e consistiu da administração de 80mg de FSHp^d e 300 UI de eCG^c, e após 36 horas realizavam-se as aspirações foliculares por vídeolaparoscopia. Para as aspirações subseqüentes, as fêmeas foram somente estimuladas.

Preparo dos animais e protocolo anestésico

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)^e e 2 mg/kg de tramadol (IM)^f como medicação pré-anestésica (MPA) e posteriormente, indução com propofol (IV)^g 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 lidocaína^h 1mg/kg (IV) e 1mg/kg/min. IV.

Após a indução, os animais foram entubados utilizando sondas endotraqueais de 8 mm com balonete insuflável, 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.

Procede-se o preparo asséptico, seguido da anestesia local infiltrativa com 0,4 mL de cloridrato de lidocaína^h, sendo 0,2 mL para um botão no tecido subcutâneo e 0,2 mL intramuscular.

Videolaparoscopia para aspiração folicular

Depois de estabelecida a manutenção anestésica e analgesia local, as fêmeas foram posicionadas em *Trendelenburg*, e com o auxílio de um bisturi, fez-se incisão cutânea, 10 a 15 cm cranial ao úbere e 5 cm à direita da linha média, para facilitar a introdução de trocáter de 5 mm com válvulas para insuflação, estabelecendo o pneumoperitônio com CO₂, utilizando pressão intrabdominal (PIA) de 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 trocáter 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 e 2).

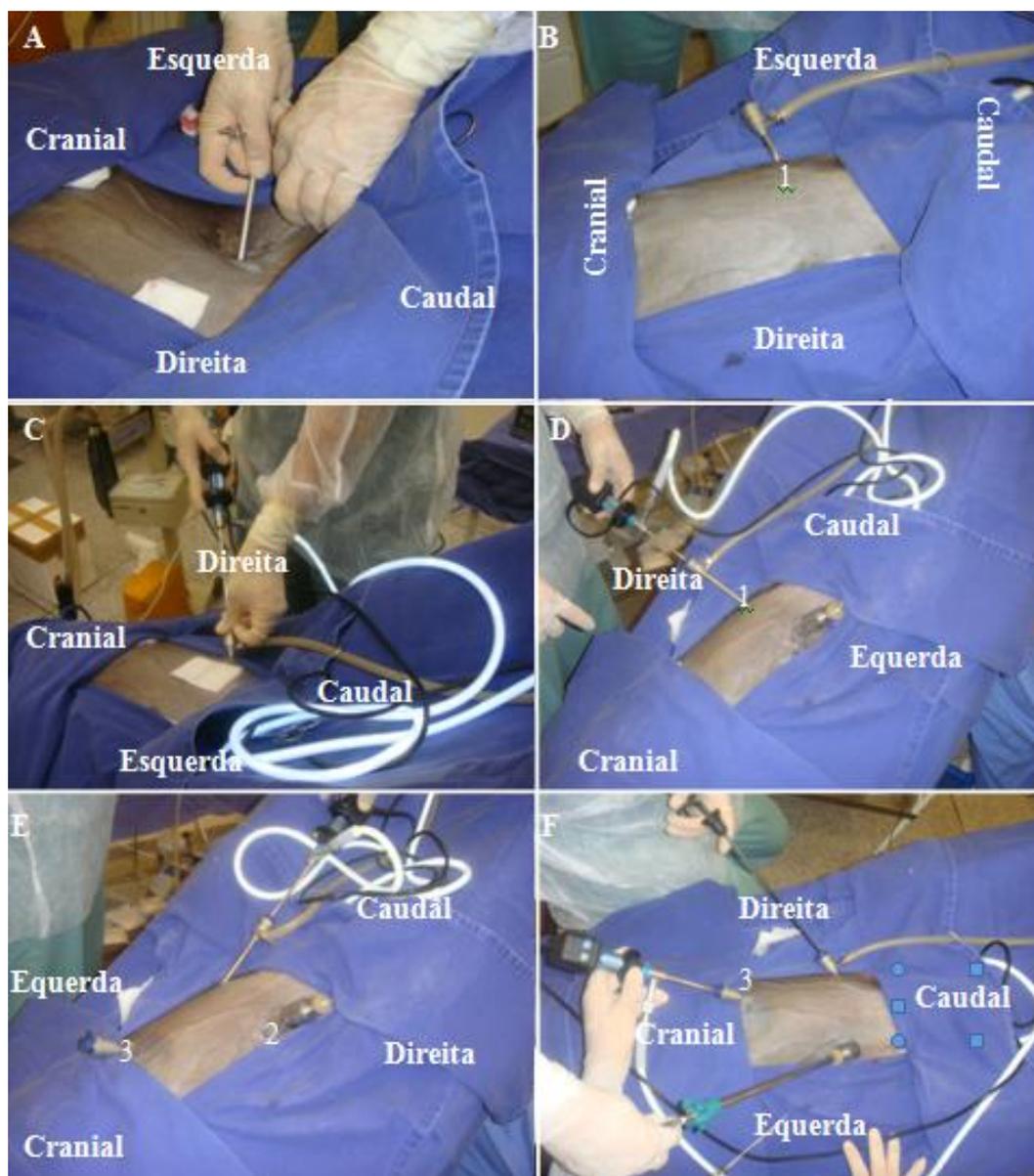


Figura 1: (A) Incisão na pele para facilitar a entrada dos trocáteres, (B e C) entrada do primeiro trocater para a insuflação (1), (D) colocação da câmera

com o endoscópio no primeiro portal, (E) posicionamento do segundo trocáter (2) com entrada assistida, (F) posicionamento do terceiro trocáter (3) também com entrada assistida.

Previamente a aspiração dos folículos, os ovários foram examinados e o número de dessas estruturas com dimensões entre 2 - 8 mm foram contabilizados. 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).

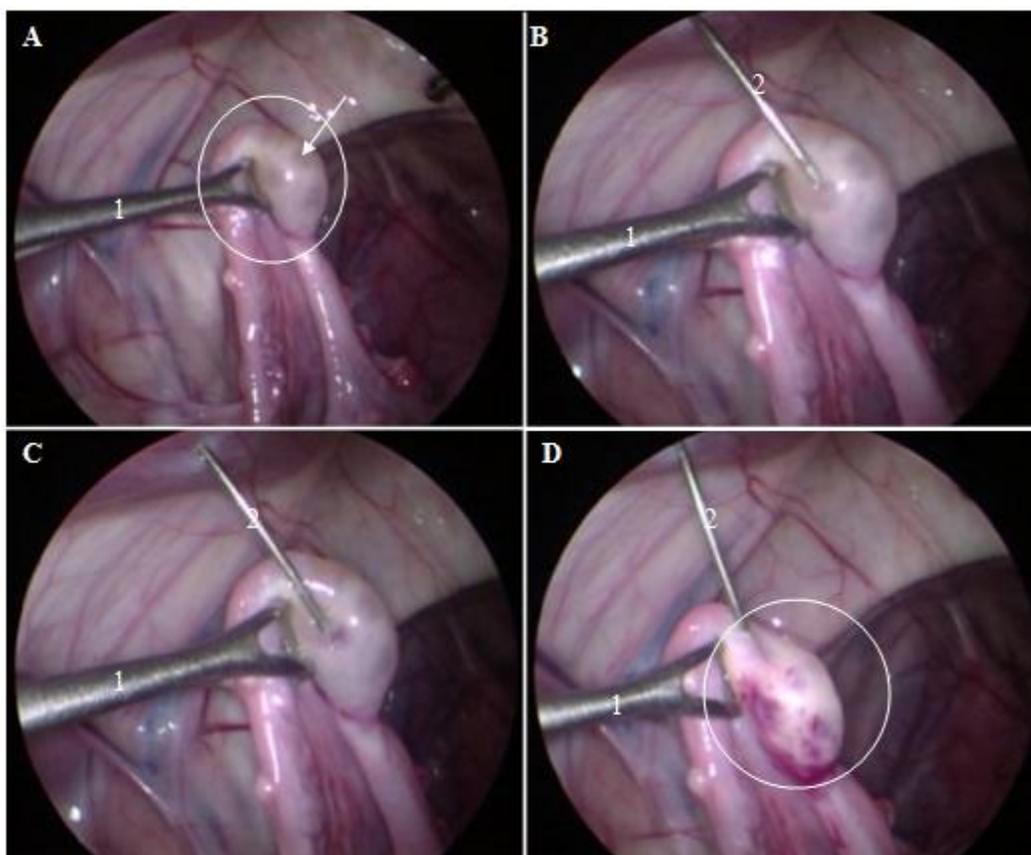


Figura 2: Visão interna da cavidade intra-abdominal de ovelhas em aumento de 10x. (A) Visibilização dos folículos, (B) posicionamento da agulha e (C e D) aspiração dos folículos.

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

Utilizou-se um sistema de aspiração com lume simples, 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 silicone, a qual foi acoplada ao tubo de colheita (50 mL). O vácuo foi produzido por uma bomba de aspiração¹ adaptada com esfigmomanômetro. Previamente à aspiração dos oócitos realizou-se uma lavagem com o meio de colheita (PBS com heparina), deixando ao final deste procedimento aproximadamente 2 mL deste meio para receber os oócitos.

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

Análise dos folículos aspirados e oócitos recuperados

O número de folículos visibilizados, aspirados e oócitos recuperados foi contabilizado, e as médias desses valores analisadas. Em laboratório, o líquido aspirado foi cuidadosamente depositado em placas de petri e levado à observação em estereomicroscópio em aumento de 40X. Uma vez localizados, os oócitos foram transferidos para outra placa contendo 300 a 500 µL de meio de lavagem e então classificados qualitativamente segundo HEWITT e ENGLAND (1997).

Análise estatística

Os dados obtidos 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.

RESULTADOS

Estimulação ovariana e produção oocitária



A maioria das ovelhas (72%) apresentou estros às 36 horas após a retirada dos progestágenos. Assim, seguido da estimulação obteve-se as médias do número de folículos visibilizados, aspirados e oócitos recuperados de $13,32 \pm 2,8$, $11,37 \pm 2,8$ e $6,36 \pm 2,0$ respectivamente, com uma taxa de recuperação de $61,39 \pm 19,97\%$ (folículos aspirados/oócitos recuperados), figura 3. Alguns animais em algumas das sessões apresentaram corpos lúteos (CL), tendo $0,37 \pm 0,74$ CL/animal/sessão. Foi observado que mais de 85% dos oócitos recuperados foram de boa qualidade, sendo 47,6% destes grau I e 42,5% grau II (figura 3).

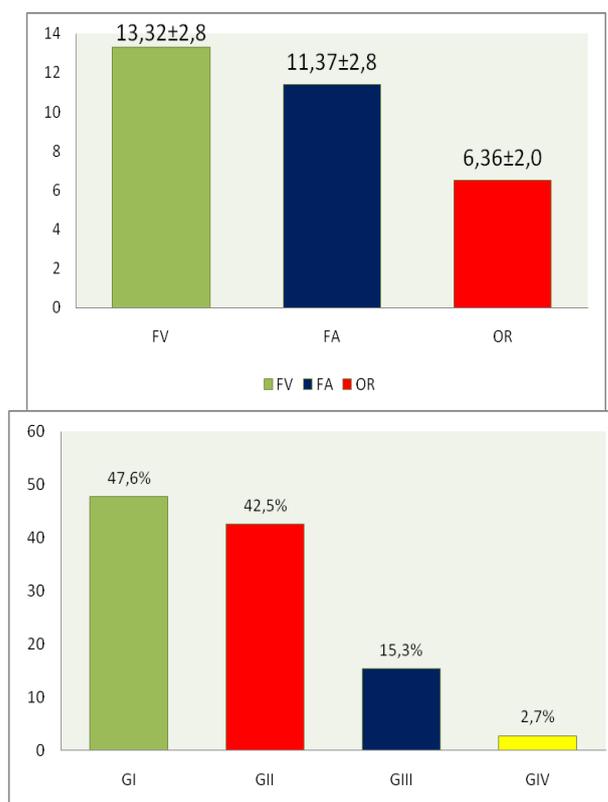


Figura 3: (A) Representação gráfica do número de folículos visibilizados, folículos aspirados e oócitos recuperados em ovelhas durante o experimento. (B) Representação gráfica do grau de classificação dos oócitos recuperados durante o experimento.

Avaliação no trans-operatório e recuperação pós-LOPU

O jejum de 36h, além de evitar refluxo do conteúdo ruminal, facilitou, em conjunto com o pneumoperitônio de 5 mmHg e 5L/min., o posicionamento dos portais laparoscópicos, permitindo uma adequada manipulação e visibilização da

cavidade abdominal, tendo a imagem transmitida ao vídeo aumentada em 10 vezes e conseqüente pequenotempo cirúrgico de $26,75 \pm 9,6$ min.

O jejum de 36h, além de evitar refluxo do conteúdo ruminal, facilitou, em conjunto com o pneumoperitônio de 5 mmHg e 5L/min., o posicionamento dos portais laparoscópicos, permitiram uma adequada a manipulação e visibilização na cavidade abdominal que teve a imagem transmitida ao vídeo aumentada em 10 vezes, obtendo-se um tempo cirúrgico de $26,75 \pm 9,6$ min.

O conjunto agulha 16G com bisel curto, sistema de aspiração lúmen simples, bomba de aspiração adaptada com esfigmomanômetro e pressão de 50 mmHg foram eficientes para recuperação de oócitos. O sangramento observado pelas punções foliculares foi discreto e a lavagem dos ovários promoveu a remoção de coágulos evitando a formação de aderências em todos os animais.

As ovelhas apresentaram boa recuperação anestésica, sempre levantando sem dificuldades após os procedimentos, não apresentando nenhum desconforto doloroso aparente.

DISCUSSÃO

Os protocolos de sincronização e estimulação ovariana foram eficazes, pois a maioria dos animais entrou em estro às 36h após a retirada dos implantes de MAP e com a estimulação ovariana foi observado 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 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, IM ou IV, em doses únicas de eCG 48 horas dos procedimentos, ou até com FSH e LH, combinado ou não ao uso de eCG, 24 à 48h antes da aspiração. No entanto o protocolo usado neste experimento é o protocolo mais utilizado, obtendo boa taxa de recuperação e maturação, obtendo resultados similares ao descrito por BALDASSARE e KARATZAS (2004), 13,4 folículos/ovelha, e BASSO et al. (2008), 14,3 folículos/ovelha.



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.

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. e SILVA et al. (2002) de 21min. em biópsias hepáticas em carneiros e equinos respectivamente 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.

Em ovinos, agulhas de 16 à 22G foram utilizadas para LOPU (BALDASSARRE et al., 1994, ALBERIO et al., 2002), sendo que RODRIGÉZ et al. (2006) descrevem que agulhas 18G longas em conjunto com pressão 10 ml de H₂O/min. e WIECZOREK et al. (2010) relatam o uso de agulhas 20 à 22G curtas com maior eficiência na recuperação de oócitos..Nesse experimento, o conjunto as agulha 16G curtas mais sistema de aspiração lúmen simples, bomba de aspiração adaptada e pressão de 50 mmHg também apresentaram resultados aceitáveis comparando quantidade e qualidade dos oócitos recuperados.

A taxa de recuperação de oócitos está no intervalo de 40 a 90% (RODRIGUEZ et al., 2006). E destes oócitos, mais de 80% encontravam-se ótima qualidade, igualmente observado por BASSO et al. (2008) e BALDASSARE e KARATZAS (2004).

CONCLUSÕES

Concluiu-se que o número de folículos visibilizados, aspirados e oócitos recuperados por ovelha, e a qualidade de oócitos viáveis foi satisfatória, além de obter também uma boa recuperação dos animais após os procedimentos.



A aspiração folicular por videolaparoscopia (LOPU) em ovinos é viável para a produção comercial, mas estudos em protocolos para estimulação ovariana, calibre, comprimento e tipos de agulhas, pressão de vácuo entre outros ainda podem ser melhores estudados para obter melhores resultados.

1

2 FONTE DE AQUISIÇÃO

3 ^aProgespon®, Schering-Plough. Brasil.; ^bSincrocio®, Orofino S.A, Brasil.; ^cNovormon®,
4 Schering-Plough, Brasil.; ^dFolltropin®, Schering-Plough, Brasil.; ^ediazepam® Cristalia.,
5 Brasil.; ^fTramal® Cristalia. Brasil.; ^gProporfol® Cristalia. Brasil.; ^hLidovet®, Bravet, Brasil.;
6 ⁱNevoni. Brasil.

7 COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

8 O Trabalho foi aprovado pela Comissão de ética e bem estar animal, protocolo n. 025988-08.

9

10 REFERÊNCIAS

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

14 **Theriogenology**, v.70 p.765–771. Disponível em:

15 <[http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TCM-4SV6PBR-
16 2&_user=10&_coverDate=09%2F15%2F2008&_alid=1525451792&_rdoc=9&_fmt=high&_or
17 ig=search&_origin=search&_zone=rslt_list_item&_cdi=5174&_sort=r&_st=13&_docanchor=
18 &_view=c&_ct=269&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=b1e
19 a53e11fb1b9b98c198edb3e6e95d4&searchtype=a](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TCM-4SV6PBR-2&_user=10&_coverDate=09%2F15%2F2008&_alid=1525451792&_rdoc=9&_fmt=high&_orig=search&_origin=search&_zone=rslt_list_item&_cdi=5174&_sort=r&_st=13&_docanchor=&_view=c&_ct=269&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=b1ea53e11fb1b9b98c198edb3e6e95d4&searchtype=a)> Acesso em 10 abr 2009.

20 [doi:10.1016/j.theriogenology.2008.04.052](http://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.052)

21

22 ALBERIO, R.; OLIVERA, J.; ROCHE, A.; ALABART, J.; FOLCH, J. Performance of a
23 modified ovum pick-up system using three different FSH stimulation protocols in ewes. **Small**
24 **Ruminant Research** v.46 p.81–87. 2002. Disponível em:

25 <[http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TC5-471FG5P-
26 1&_user=10&_coverDate=11%2F30%2F2002&_alid=1525703534&_rdoc=24&_fmt=high&_
27 orig=search&_origin=search&_zone=rslt_list_item&_cdi=5161&_sort=r&_st=13&_docanchor
28 =&_view=c&_ct=33&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=c1c](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TC5-471FG5P-1&_user=10&_coverDate=11%2F30%2F2002&_alid=1525703534&_rdoc=24&_fmt=high&_orig=search&_origin=search&_zone=rslt_list_item&_cdi=5161&_sort=r&_st=13&_docanchor=&_view=c&_ct=33&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=c1c)>



29 fe4ad38f4e11ecdb68fd8cf80b1f0&searchtype=a> Acesso em 10 mai 2009. [doi:10.1016/S0921-](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(02)00157-8)
30 [4488\(02\)00157-8](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(02)00157-8)

31
32 BALDASSARE, H.; KARATZAS, C.N. Advances assisted reproduction technologies (ART) in
33 goats. **Animal Reproduction Science**, v.82-83 255-266. 2004. Disponível em:
34 [http://www.animalreproductionscience.com/article/S0378-4320\(04\)00082-X/abstract](http://www.animalreproductionscience.com/article/S0378-4320(04)00082-X/abstract)> Acesso
35 em 10 agos 2008. [doi:10.1016/j.anireprosci.2004.04.027](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.027)

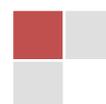
36
37 BASSO, A.C.; MARTINS, J.F.P.; FERREIRA, C.R.; ERENO, A.; TANNURA, J.; TABET,
38 A.; FIGUEIREDO, C.L.; DE OLIVEIRA, P.C.; PONTES, J.H.F. Biotecnologia da Reprodução
39 na Espécie Ovina: Produção *in vitro* de Embriões Ovinos: Aspectos da Técnica de Aspiração
40 Folicular e do Tratamento Hormonal de Doadoras. **O Embrião**, 38 (10) 8-11. 2008. Disponível
41 em:<<http://www.sbte.org.br/oembriao>> Acesso em 10 out 2009.

42
43 BLEUL, U.; HOLLENSTEIN, K.; KÄHN, W. Laparoscopic ovariectomy in standing cows.
44 **Animal Reproduction Science**, 90 193–200. 2005. Disponível em:
45 <[http://www.animalreproductionscience.com/article/S0378-4320\(05\)00050-3/abstract](http://www.animalreproductionscience.com/article/S0378-4320(05)00050-3/abstract)> Acesso
46 em 10 jun 2010. [doi:10.1016/j.anireprosci.2005.01.022](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.01.022)

47
48 CORDEIRO M.F. **Avaliação da laparoscopia na aspiração folicular em fêmeas caprinas**
49 **pré-púberes e adultas com ou sem estimulação ovariana hormonal**. 2006. 59f. Tese
50 (Doutorado) – Programa de Cirurgia Veterinária. Faculdade de Ciências Agrárias e
51 Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

52
53 DUARTE A.L.L., CATTELAN J.W., BEZERRA M.B., VICENTE W.R.R., CORDEIRO M.F.
54 2009. Biópsia hepática com agulha tru-cut guiada por videolaparoscopia em caprinos. **Arquivo**
55 **Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 61 (1) 12-19. Disponível em:
56 <<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v61n1/v61n1a03.pdf>> Acesso em 13 jan 2010. doi:
57 10.1590/S0102-09352009000100003.

58



- 59 FREITAS, V.J.F.; SIMPLÍCIO, A.A. Transferência de embriões em caprinos. In: Gonçalves
60 P.B.D., Figueiredo J.R., Freitas V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São
61 Paulo: Livraria Varela, 2002. 179-194.
62
- 63 HEWITT, D. A.; ENGLAND, G. C. W. Effect of preovulatory endocrine events upon
64 maturation of oocytes of domestic bitches. [Journal of Reproduction & Fertility](#), v.2 p.83-91.
65 Supplement 51. 1997.
66
- 67 RODRÍGUEZ, C.; ANEL, L.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; BOIXO, J.C.; CHAMORRO, C.A.;
68 PAZ, P. Ovum Pick-up in Sheep: a Comparison between Different Aspiration Devices for
69 Optimal Oocyte Retrieval. **Reproduction in Domestic Animals**, v.41 p.106–113. 2006.
70 Disponível em: <[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0531.2006.00648.x/abstract)
71 [0531.2006.00648.x/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1439-0531.2006.00648.x/abstract)> Acesso em 10 jun 2009. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2006.00648.x
72
- 73 SILVA, L.C.L.C; STOPIGLIA, A.J.; FANTONI, D.T. Técnica de biópsia hepática em equino
74 por laparoscopia. **Ciência Rural**, 32 (3) 459-465, 2002. Disponível em:
75 <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v32n3/a15v32n3.pdf>> Acessado em 13 set 2010. doi:
76 10.1590/S0103-84782002000300015
77
- 78 WANI, N.A., *In vitro* maturation and in vitro fertilization of sheep oocytes. **Small Ruminant**
79 **Research**, 44 (2) 89-95. 2002. Disponível em:
80 <<http://www.smallruminantresearch.com/article/PIIS0921448802000202/fulltext>> Acesso em
81 19 dez 2009. [doi:10.1016/S0921-4488\(02\)00020-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0921-4488(02)00020-2)
82
- 83 WIECZOREK J., KOSENYUK Y., CEGŁA M., RYŃSKA B. 2010. A new concept in
84 laparoscopic ovum pick-up (OPU) in sheep – efficiency of method and morphology of
85 recovered oocytes. **Ann Anim Sci**, 10 (1) 39–48. Disponível em:
86 <<http://www.izoo.krakow.pl/czasopisma/annals/2010/1/art5.pdf>> Acessado em: 13 ago 2010

