INVESTIGAÇÃO, 14(2):55-60, 2015

REVISÃO DE LITERATURA | PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO ANIMAL

REVISTA INVESTIGAÇÃO medicina veterinária

ASPIRAÇÃO FOLICULAR POR LAPAROSCOPIA EM OVINOS

Laparoscopic ovum pick-up in sheep

Mariana G. K. Rodriguez[1], Marcela Ambrogi[1], Dayane Priscila Vrisman[1], Giovanna S. Maciel[1], Marcus Antônio R. Feliciano[1], Pedro Paulo M. Teixeira[2]*

1. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, Jaboticabal, São Paulo, Brasil.
2. Pós-graduação em Ciência Animal pela Universidade de Franca - UNIFRAN, Franca, São Paulo, Brasil. Av. Dr Armando Sales Oliveira, 201, CEP: 14.404-600, Pq. Universitário, Franca – SP.

*E-mail: p_paulomt@yahoo.com.br

RESUMO

A ovinocultura brasileira tem se intensificado nos últimos anos. A aspiração folicular por laparoscopia (LOPU) seguida de produção de embriões in vitro (PIV) em ovelhas surge como uma biotécnica promissora, uma vez que sua eficiência reprodutiva é maior que a inseminação artificial e a monta natural. Tem como vantagem ser menos invasiva, provocar mínimo trauma cirúrgico e ter possibilidade de realizar várias sessões de aspiração em um curto intervalo de tempo. A LOPU oferece a possibilidade de aceleração do ganho genético por meio da redução do intervalo entre gerações e a maximização do número de nascimentos a partir de fêmeas de alto valor genético. Entretanto, é de suma importância o continuo desenvolvimento e aplicação da técnica em reprodução de pequenos ruminantes, contribuindo cada vez mais com uma melhor qualidade oocitária dos animais. O objetivo desta revisão é abordar os principais fatores que envolvem a técnica de aspiração folicular por laparoscopia em ovelhas, visando a PIV de embriões.

Palavras-chave: Aspiração folicular. Biotecnologia. Laparoscopia. Oócito. Ovinos.

ABSTRACT

The Brazilian sheep industry has intensified in recent years. Laparoscopic ovum pick-up (LOPU) followed by in vitro embryo production (IVP) in sheep emerges as a promising reproduction biotecnique, since their reproductive efficiency is greater than artificial insemination and natural mating. It has the advantage of being less invasive, cause minimal surgical trauma and have possibility of performing multiple sessions suction in a short time interval. The biotechnical offers the possibility of acceleration of genetic gain by reducing the generation interval and maximizes the number of births from females of high genetic value. However, it is of utmost importance the continued development and application of technical in reproduction of small ruminants, increasingly contributing to a better oocyte quality of the animals. The aim of this review is to discuss the main factors that involve the technique of follicular aspiration by laparoscopy in sheep in order IVP embryos.

Keywords: Biotechnology. Follicular aspiration. Laparoscopy. Oocyte. Sheep.

ISSN 21774780

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a ovinocultura brasileira tem se intensificado, e representa um grande potencial para o desenvolvimento sócio-econômico do país, porém necessita de organização no setor produtivo e da demanda pela aplicação de tecnologias que possam contribuir para o incremento da produtividade dos rebanhos (BASSO et al., 2008).

A produção in vitro de embriões (PIV) surge como uma biotecnologia promissora, devido a possibilidade de otimização das fêmeas doadoras de oócitos e de incremento na quantidade de embriões produzidos (CROCOMO et al., 2012). Oferece a possibilidade de aceleração do ganho genético por meio da redução do intervalo entre gerações e a maximização do número de nascimentos a partir de fêmeas de alto valor genético, principalmente, quando doadoras jovens são utilizadas (BASSO et al., 2008).

Para a execução da biotécnica de PIV, é de fundamental importância a obtenção de oócitos, os quais podem ser obtidos através da ovariectomia, de ovários oriundos de abatedouro, ou ainda, pela aspiração folicular in vivo: via transvaginal guiada por ultrassom, por laparotomia ou por laparoscopia (TEIXEIRA et al., 2013).

Em meados de 1980, um grupo de pesquisadores canadense relatou experimentos de colheita de oócitos in vivo (imaturos ou já maturados) por meio de laparotomia e, posteriormente, com o auxílio da laparoscopia (RODRIGUES et al., 2009). A aspiração folicular por laparoscopia (LOPU) tem sido provada como um método eficiente e pouco invasivo para coleta de oócitos em pequenos ruminantes (KOEMAN et al., 2002). O procedimento laparoscópico tem como vantagem provocar mínimo trauma cirúrgico, com a possibilidade de realizar colheitas repetidas de oócitos em um curto intervalo de tempo, compensando a produção relativamente baixa a cada sessão de aspiração (CORDEIRO et al., 2014).

Dentre os diversos fatores que implicam no sucesso da aspiração folicular por laparoscopia (Laparoscopic ovum pick-up – LOPU), a qualidade dos COCs é essencial (CROCOMO et al., 2012). Deste modo, o objetivo desta revisão é abordar os principais fatores que envolvem a técnica de aspiração folicular por laparoscopia em ovinos, visando a PIV de embriões.

DESENVOLVIMENTO

Fisiologia do ciclo estral

A maturidade sexual e puberdade da ovelha são reguladas por vários fatores: genética, estação do ano, condições nutricionais, manejo, fotoperiodicidade, temperatura e sanidade (GRUNERT et al., 2005). Estes animais são poliéstricos estacionais, dependendo do fotoperíodo, ou seja, a luz influencia na produção de melatonina e consequentemente na liberação de GnRH e FSH/LH. Desta forma, a atividade reprodutiva é dividida em estações de anestro (fim do inverno ao início do verão), de transição (verão) e de acasalamento (final do verão ao final do inverno, com uma maior frequência no outono – de março a maio). A ciclididade também é influenciada pela raça, com ovinos da raça Santa Inês, Morada Nova ou sem raça definida (SRD) apresentando atividade reprodutiva durante o ano inteiro (FONSECA, 2005a).

A manifestação de uma onda pré-ovulatória de gonadotrofinas é o primeiro evento endócrino da puberdade em ovelhas, provavelmente induzida por estrógenos produzidos por folículos em desenvolvimento, resultando na produção de estrutura lútea. Após a morte da estrutura lútea inicial, ocorre outra onda de gonadotrofina, levando a ovulação e formação de Corpo Lúteo (CL) e inicio da atividade ovariana cíclica (STABENFELDT e DAVIDSON, 2004). A duração do ciclo estral é, em média, de 17 dias, com fase luteínica de 13 dias e folicular de 4 dias (FONSECA, 2005a). O estro tem duração aproximada de 30 horas e com a ovulação ocorrendo em seu terço final (BICUDO, 2005).

Dinâmica de crescimento folicular

Para o desenvolvimento de técnicas que maximizem a fertilidade em ovinos, é importante o conhecimento da dinâmica de crescimento folicular (ALVARES, 2005). A dinâmica folicular é um processo contínuo de crescimento e regressão dos folículos antrais que permitem o desenvolvimento do folículo pré-ovulatório (SILVA, 2008). Durante o ciclo estral, são observados nos ovários quatro tipos de folículos: primordiais ou primários; secundários (pré-antrais) em crescimento; folículos terciários e folículo ovulatório ou De Graaf, cujo aparecimento, desenvolvimento e atresia ocorrem em ondas (GRUNERT et al., 2005).

Aspiração folicular laparoscópica (LOPU)

A LOPU para PIV tem sido proposta como um eficiente método para o “resgate reprodutivo” de ovelhas valiosas que adquiriram fertilidade reduzida, principalmente como resultado do aumento da idade (BALDASSARRE et al., 2007). O procedimento laparoscópico tem como vantagem ser menos invasivo e provocar mínimo trauma cirúrgico, com a possibilidade de realizar colheitas repetidas de oócitos em um curto intervalo de tempo em que compensará a produção relativamente baixa

a cada sessão de aspiração (CORDEIRO et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2011).

A técnica de LOPU pode ser ou não associada a vídeo, a abordagem pode ser realizada após um jejum de 36 horas de sólido e 24 horas de líquido, mesmo em animais pré-púberes, e em casos de animais com maior porte até 48 horas. Mesmo que o intervalo seja consideravelmente longo, a aplicação do jejum é indispensável na tentativa de diminuir o volume de conteúdo ruminal, melhorar a visualização dentro da cavidade abdominal, bem como evitar problemas de timpanismo e refluxo gástrico. Associado ao jejum, realiza-se a intubação endotraqueal com sondas (de 8 mm), com balonete insuflável, evitando a aspiração do conteúdo ruminal em caso de regurgitação, a fim de permitir o fornecimento de oxigênio medicinal umidificado, sob ventilação assistida, quando possível (CORDEIRO et al., 2014; TEIXEIRA et al., 2011; TEIXEIRA et al., 2013).

Após um plano anestésico adequado, sob anestesia inalatória, os animais devem ser contidos e posicionados em Trendelenburg, com inclinação de 45°, o que facilita a visualização do sistema geniturinário, pelo deslocamento dos órgãos. Esse posicionamento pode, em alguns casos, promover a depressão respiratória dos animais, por pressão dos órgãos abdominais ao diafragma. Com isso, há necessidade de maior atenção ao monitoramento cardiorrespiratório (WIECZOREK et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2011; TEIXEIRA et al., 2013).

Na técnica descrita por Teixeira et al., (2011), após obtida a manutenção anestésica, analgesia local e realizado o posicionamento, é procedida incisão cutânea com o auxílio de um bisturi, seguido da introdução dos trocáteres (de 5 ou 10 mm), usando três portais para o procedimento (Figura 1), estabelecendo a triangulação necessária. O pneumoperitônio com CO_2 deve obter pressão intrabdominal (PIA) de 5 mmHg e velocidade de insuflação de 5 L/min, permitindo a manipulação do útero, tubas e bursas ováricas e individualização dos ovários, fixando o órgão pelo mesovário e de maneira a evitar lesar qualquer estrutura da cavidade abdominal.

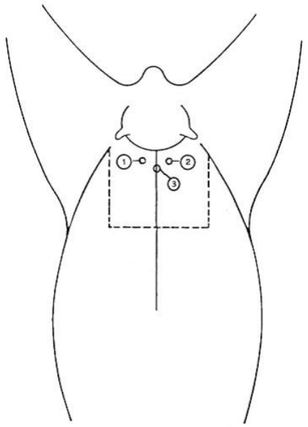

Figura 1 – Locais de inserção dos portais laparoscópicos para procedimento de aspiração folicular. 1- Ótica do laparoscópio; 2- Pipeta de aspiração; 3- Pinça atraumática. Fonte: KOWALSKI, 2011.

Previamente à aspiração folicular, os ovários devem ser examinados e o número de folículos com dimensões entre 2 - 8 mm contabilizados, para futura aspiração. Somente são aspirados folículos nessa escala, uma vez que folículos menores que esse limite mínimo são inviáveis de se aspirar pelo tamanho e os maiores já apresentam menor qualidade. Em seguida, a agulha de aspiração é introduzida de forma percutânea na cavidade próxima ao local onde se encontra o ovário (Figura 2). A punção é realizada movimentando os ovários em diferentes posições, com auxílio da pinça de manipulação atraumática. A agulha é colocada em posição paralela à superfície ovariana, o que permite as perfurações dos folículos nas suas extremidades. Uma vez inserida no folículo, a agulha é cuidadosamente movida para garantir que todo o seu conteúdo seja aspirado (TEIXEIRA et al., 2011).

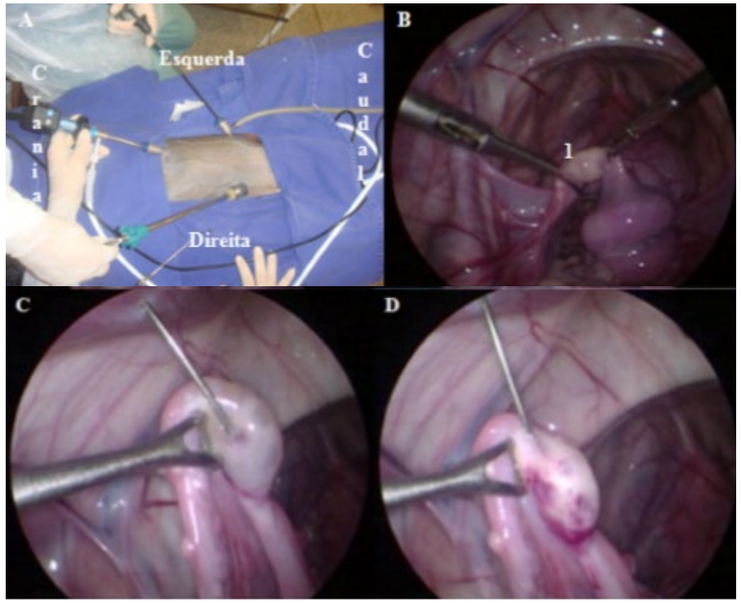

Figura 2 –Sequência do procedimento de videolaparoscopia da cavidade abdominal de uma ovelha, demostrado o posicionamento dos portais laparoscópicos (A), imagem intraperitoneal em aumento aproximado de 10×, notando a fixação do ovário (1) pela pinça de apreensão atraumática (B) e presença de folículos na superfície ovariana, posicionamento da agulha para aspiração (C) e a aspiração dos folículos (D).

O uso desta técnica permite o acesso seguro e rápido para os órgãos do abdômen, fácil estabilização dos ovários e aspirações de folículos ovarianos (WIECZOREK et al., 2010), O qual pode ser utilizada até em ovelhas pré-púberes, gestantes, e em fêmeas com infertilidade temporária ou irreversível (CROCOMO et al., 2012). Entretanto, este método é limitado por sua eficiência variável, pois recupera de 50-80% dos oócitos a partir de folículos aspirados do ovário e 30-90% são aceitos para a maturação e fertilização in vitro. A eficiência da técnica depende

da boa seleção de doadoras, estimulação hormonal, frequência de recuperação de oócitos e fatores técnicos (WIECZOREK et al., 2010).

A LOPU em ovelhas não tratadas com hormônios propicia a recuperação, de aproximadamente, quatro oócitos por fêmea. Porém quando são submetidas ao tratamento de estimulação com FSH, o número de oócitos obtidos por sessão de aspiração é de 10 a 11 (CHAVES et al., 2010). Com base nestas observações, portanto, é necessário otimizar a técnica de LOPU para melhorar a quantidade e qualidade dos embriões produzidos in vitro (BERLINGUER et al., 2004).

Superestimulação Ovariana

Os animais submetidos à LOPU podem ou não receber tratamento hormonal prévio, sendo que em fêmeas não estimuladas o número de oócitos recuperados é de 4-6/animal, considerado um valor baixo (TEIXEIRA et al., 2013). O tratamento com FSH antes da LOPU aumenta a população de 2-4 mm folículos ovarianos e resulta em maior coleta de oócitos (WIECZOREK et al., 2010). Geralmente, em fêmeas com estimulação hormonal prévia, o número de oócitos obtidos é maior do que aquele obtido de fêmeas não estimuladas (BERNARDI, 2005; CROCOMO et al., 2012), o que torna indispensável a estimulação ovariana para melhores índices reprodutivos.

O estro pode ser induzido de forma sincronizada em qualquer época do ano. Desta forma, a indução e sincronização do estro em ovinos vêm sendo bastante utilizada, proporcionando atividade reprodutiva mesmo durante o anestro sazonal e após o parto. Os métodos mais utilizados para a sincronização do estro e estimulação do crescimento folicular em pequenos ruminantes envolvem prostaglandinas, progesterona e/ou progestágenos e a administração de eCG (URIBE-VELÁSQUEZ, 2011). A progesterona (P4) é administrada através de dispositivos intravaginais de liberação lenta, esponjas impregnadas com acetato de fluorogesterona ou acetato de medroxiprogesterona (MAP), implantes auriculares, administrações diárias de P4 por via intramuscular ou, ainda, administrações orais diárias de MAP (FONSECA et al., 2005b). Comumente as fêmeas doadoras de oócitos são sincronizadas com dispositivos intra-vaginais (CROCOMO et al., 2012).

Dentre os protocolos disponíveis de estimulação ovariana em ovelhas, é destacado o seguinte protocolo que vem sendo utilizado pelo grupo do pesquisador Baldassarre: associação de FSH (80 UI) e eCG (300 UI), administrados 36 horas antes da aspiração folicular, em dose única (BASSO et al., 2008). A alta dose de FSH é hábil para recrutar, mas não para sustentar o desenvolvimento de um grupo de folículos FSH-responsivos. A longa meia-vida do eCG possibilita a continuação do crescimento folicular iniciado pela alta dose de FSH, sendo preferível a aplicação única ao invés de múltiplas, pela praticidade, uma vez que o resultado final é semelhante (CORDEIRO et al., 2014). Basso et al. (2008), realizaram 1580 procedimentos de aspiração folicular por laparoscopia, recuperando em média 13,4 oócitos por doadora. Com este protocolo há obtenção de maior número de folículos a serem aspirados utilizando a LOPU, e redução do número oócitos com cúmulus expandido inviáveis à MIV, e ainda promove menor intervalo entre a estimulação hormonal e a LOPU (36 horas) (TRALDI, 2009).

Fatores que contribuem para melhor qualidade oocitária

A idade do animal possui efeito no número e na qualidade dos oócitos colhidos ou na taxa de maturação e fecundação. Deste modo, as taxas de blastocistos obtidas utilizando oócitos oriundos de ovelhas adultas, são significativamente superiores quando comparadas às recém-púberes, porém não havendo diferenças na taxa de gestação (LIMA VERDE et al., 2003). Contudo, Crocomo et al. (2012) consideram importante os fatores intrínsecos da doadora de oócitos, que são eles: condição corporal, raça, idade, e potencial genético, pois estes influenciam a dinâmica folicular e , consequentemente, a qualidade e o número de COCs obtidos.

Dentre os diversos fatores que implicam no sucesso da LOPU, a qualidade do complexo cumulus-oophorus (COCs), caracterizada, principalmente, pela presença das células do cumulus, é essencial para o sucesso da PIV e está diretamente relacionada às peculiaridades dos métodos empregados na recuperação oocitária (CROCOMO et al., 2012). A presença das células do cumulus é benéfica para obtenção de embriões após a FIV, pois oócitos desnudos têm uma baixa taxa de clivagem (CHAVES et al., 2010). As células do cumulus garantem a nutrição e a conexão do oócito com o meio externo, modulam os efeitos dos hormônios e fatores de crescimento e ainda participam da regulação da maturação oocitária, através da transferência de nutrientes, íons, nucleotídeos e substâncias de baixo peso molecular (CROCOMO et al., 2012). Estudos demonstram que não há maturação ou esta ocorre em menor escala, quando as células do cumulus são removidas antes dos oócitos serem maturados in vitro (CORDEIRO et al., 2014).

A eficiência da recuperação de COCs sofre influência de alguns aspectos físicos da aspiração folicular, tais como calibre da agulha e da cânula de aspiração utilizadas; o fluxo (mL água/minuto) e a pressão de aspiração (mmHg). Além disso, o tratamento prévio das fêmeas doadoras de oócitos, bem como

o tamanho do ovário e dos folículos, e as habilidades manuais do operador também estão diretamente relacionados com a qualidade e a quantidade de COCs obtidos (WIECZOREK et al., 2010; CROCOMO et al., 2012).

O fluxo (mL água/minuto) e a pressão de aspiração (mmHg) são importantes aspectos físicos da aspiração folicular com agulha acoplada à seringa ou à bomba a vácuo, e estão diretamente relacionados à eficiência da recuperação de COCs (PADILHA et al., 2013).

A pressão a vácuo não só afeta a qualidade, mas também a quantidade dos oócitos obtidos. O aumento da pressão pode levar à maior taxa de obtenção, contudo há redução no número de oócitos viáveis. A perda de células do cumulus (desnudamento) pode ocorrer durante o trânsito dos oócitos do folículo ao tubo de colheita. Estas podem ser preservadas, ajustando-se adequadamente a pressão à vácuo (CORDEIRO et al., 2014). Os melhores resultados que consideram as pressões de aspiração com bomba à vácuo são entre 50 e 70 mmHg (CROCOMO et al., 2012; PADILHA, 2013).

O fluxo de aspiração e a qualidade dos COCs são inversamente proporcionais. O aumento do fluxo resulta na remoção parcial ou total das células do cumulus (CROCOMO et al., 2012). Preconiza-se a utilização de fluxos de aspiração entre 10 e 20 mL

água/minuto (PADILHA et al., 2013).

Agulhas de aspiração folicular

As agulhas de aspiração apresentam três variáveis importantes: comprimento, diâmetro e largura do bisel. Quanto menor o diâmetro da agulha, maior a força de atrito sob os COCs e, consequentemente, maior possibilidade de remoção das células do cumulus. Estudos relatam que melhores resultados foram constatados com agulhas curtas de calibre 18 ou 20, e cânulas de aspiração de menor diâmetro (1 ou 2 mm) (CROCOMO et al., 2012).

Agulhas mais curtas produzem melhores resultados por causa da curta passagem desde o folículo até a mangueira de silicone, o que é menos traumático para os oócitos comparado à agulha de aço. A porcentagem de colheita dos COCs é determinada pelo bisel, enquanto o diâmetro da agulha determina a qualidade dos COCs recuperados. O comprimento e diâmetro do bisel são importantes para que não ocorra perda de líquido folicular e, consequentemente, dos oócitos no momento da punção (PADILHA et al., 2013).

Agulhas finas podem dificultar a passagem da massa pré-ovulatória de células do cumulus, assim diminuindo a taxa de obtenção. O mesmo acontece em agulhas mais largas, devido à redução do trânsito e a maior turbulência entre as conexões do sistema de aspiração (CORDEIRO et al, 2014).

Tamanho dos folículos aspirados

A seleção dos folículos aspirados pode ser realizada conforme o diâmetro/categoria dos folículos. O tamanho dos folículos pode afetar a proporção de oócitos de boa qualidade e a eficiência da técnica de recuperação (PADILHA et al., 2013). Conforme o tamanho do folículo há uma combinação de variáveis que garantem maior eficácia: em folículos pequenos (< 3mm) ou médios (3-5 mm), baixa pressão ou fluxo de aspiração e menor diâmetro da cânula de aspiração são encontrados resultados melhores. Em contrapartida ocorre com os folículos pré-ovulatórios (> 5 mm), os quais são mais adequados pressão e fluxo de aspiração e cânula de diâmetro maior (CROCOMO et al., 2012).

A estimulação hormonal vem sendo empregada, visando potencializar a quantidade, qualidade e capacidade de desenvolvimento oocitário in vitro, o que aumenta o número de folículos em crescimento (TEIXEIRA et al., 2013).

Transporte do material

Um dos principais problemas encontrado na aplicação da produção de embriões in vitro a campo é a alta variação dos resultados obtidos, isto se deve em parte, às condições de transporte dos oócitos das fazendas para o laboratório, que as vezes são realizadas de maneira inadequada. Vários fatores podem afetar as condições de maturação dos COC's durante o transporte, entre eles, o tipo de tampão utilizado, a temperatura e o tempo de transporte (NEGRI et al., 2009).

O intervalo entre a colheita dos ovários e a obtenção dos oócitos sem efeitos deletérios, se em meio e temperatura adequados, varia de 1 a 3 horas (TEIXEIRA et al., 2013).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aspiração folicular por laparoscopia é uma biotecnologia que pode ser de especial interesse para a preservação de genótipos raros e ameaçados de extinção. O sucesso desta biotécnica seguida de produção in vitro de embrião está diretamente relacionado à qualidade oocitária, devido ao tamanho dos folículos aspirados, ao tipo da agulha de aspiração, ao fluxo e pressão administrados, e às condições de transporte

ISSN 21774780

dos oócitos para o laboratório. Contudo, necessita-se de mais estudos sobre os fatores que contribuem para melhor qualidade oocitária de ovinos, para que possa ter o aperfeiçoamento desta biotecnologia.

REFERÊNCIAS

Alvares CTG. 2005. Efeito de dois protocolos de sincronização de estro na eficiência reprodutiva de ovelhas deslanadas criadas sob o clima tropical úmido. 60 f. Itapetinga, BA. *Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Programa de Pós-graduação em Zootecnia*, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Baldassarre H, Rao KM, Neveu N. et al. 2007. Laparoscopic ovum pick-up followed by in vitro embryo production for the reproductive rescue of aged goats of high genetic value. *Reproduction, Fertility and Development*. 19:612-616.

Basso AC, Martins JFP, Ferreira CR. et al. 2008. Biotecnologia da Reprodução na Espécie Ovina. Jornal "O Embrião". 38:08-11.

Berlinguer F, Leoni G, Bogliolo L. et al. 2004. *FSH different regimes affect the developmental capacity and cryotolerance of embryos derived from oocytes collected by ovum pick-up in donor sheep. Theriogenology*. 61:1477-1486.

Bernardi ML. 2005. Produção in vitro de embriões ovinos. *Acta Scientiae Veterinariae*. 33(1):1-16.

Bicudo SD, Azevedo HC, Maia MSS. et al. 2005. Aspectos Peculiares da Inseminação Artificial em Ovinos. *Acta Scientiae Veterinariae*. 33:127-130.

Chaves RM, Filho CA, Júnior ERS. et al. 2010. Efeito do diâmetro folicular sobre a qualidade dos oócitos obtidos de ovários de ovelhas (Ovis aries) e cabras (Capra hircus). *Ciência Animal Brasileira*. 11(3):683-688.

Cordeiro MF, Teixeira PPM, Oliveira MEF. et al. 2014. Reproductive efficiency of adult and prepubertal goats subjected to repeated follicular aspiration. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Online)*. 66:137-144.

Crocomo LF, Filho WCM, Alvarenga FCL. et al. 2012. Bicudo SD. Peculiaridades da coleta de oócitos para produção in vitro de embriões ovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 36:25-31.

Fonseca JF. 2005a. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. *In Congresso Brasileiro de Reprodução Animal*. Goiás, Brasil. 16: 1-9.

Fonseca JF, Bruschi JH. 2005b. Reprodução assistida em pequenos ruminantes. *Revista Ciência Agrária*. 43:1-13.

Grunert E, Birgel EH, Vale WG. 2005. Súmula Anátomo-funcional do Trato genital Feminino. Grunert E, Birgel EH, Vale WG. *Patologia e clínica da reprodução dos animais mamíferos domésticos: ginecologia.* 1. ed. São Paulo: Livraria Varela. pp. 39-90.

Koeman J, Keefer CL, Baldassarre H. et al. 2002. Developmental competence of prepubertal and adult goat oocytes cultured in semi-defined media following laparoscopic recovery. *Theriogenology*. 60(5): 879-889.

Kowalski LH. 2011. Revisão Bibliográfica Sobre Exame Andrológico E Ultrassonografia Testicular Em Ruminantes Machos. 87 f. Curitiba, PR. *Trabalho de Graduação (Medicina Veterinária)* – Universidade Federal do Paraná.

Lima Verde JB, Rondina D, Freitas, VJF. 2003. Produção in vitro de embriões ovinos. *Ciência Animal*, 13(2): 79-87.

Negri J, Dias CBD, Rigolon LP, Cavalieiri FLB, Emanuelle IP, Lourenço FJ, Seko MB. 2009. Meios de cultivos para produções de embriões in vitro de ovinos. *Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar*, Maringá, PR-Brasil, p. 05-07.

Padilha LC. 2013. Produção in vitro de embriões. In: Oliveira MEF; Teixeira PPM, Vicente WRR. *Biotécnicas Reprodutivas em Ovinos e Caprinos.* 1ª. ed. São Paulo: MedVet, p. 157-179.

Rodrigues JL, Rodrigues BA. 2009. Evolução da biotecnologia da reprodução no Brasil e seu papel no melhoramento genético. *Revista Ceres*, 56(4):428-436.

Silva BDM. 2008. Sincronização de estro com prostaglandina versus progesterona associada à gonadotrofina coriônica equina em ovelhas deslanadas no Distrito Federal. fls. Brasília, DF. *Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária)*- Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade de Brasília.

Stabenfeldt GH, Davidson AP. 2004. Reprodução e Lactação. In: Cunningham, J. G. *Tratado de Fisiologia veterinária*. 3ª.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan p. 391-415.

Teixeira PPM, Padilha LC, Oliveira MEF. 2011 Laparoscopic ovum collection in sheep: gross and microscopic evaluation of the ovary and influence on oocyte production. *Animal Reproduction Science,* 127: 169-175.

Teixeira PPM, Padilha LC, Mariano RS, Coutinho LN, Barros FFPC, Silva MAM, Silva ASL. 2013. Aspiração Folicular. In: Oliveira MEF, Teixeira PPM, Vicente WRR. Biotécnicas Reprodutivas em Ovinos e Caprinos. 1ª. ed. São Paulo: MedVet, p. 147-153.

Traldi AS. 2009. Produção in vitro de embriões de ovinos: uma visão crítica do método e de seu resultado a campo. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38:301-306, 2009.

Uribe-Velásquez LF, Souza MIL, Osorio JH .2011. Efeito de tempo da aplicação de prostaglandina na resposta folicular em ovelhas durante o ciclo estral. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40(5):985-991.

Wieczorek J, Kosenyuk Y, Cegla M.et al. 2014. A new concept in laparoscopic ovum pick-up (OPU) in sheep – efficiency of method and morphology of recovered oocytes. *Animal Science*, 10(1):39-48.