




C A P Í T U L O 3

Estudo Preliminar da Aspiração Folicular Guiada Por Laparoscopia em Ovinos na Paraíba

 <https://doi.org/10.22533/at.ed.540132510113>

Riany Silva Vidal

Universidade Federal de Campina Grande, Patos/PB

Filipe Lima Costa

Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró/RN

Rayara Silva de Freitas

Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró/RN

José Felipe Napoleão Santos

Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró/RN

Valesca Marques Melo

Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró/RN

Aline Silva de Sant'ana

Instituto Federal do Espírito Santo, Montanha/ES

Valdir Moraes de Almeida

Universidade Federal de Campina Grande, Patos/PB

RESUMO: A ovinocultura vem alcançando índices produtivos elevados em todas as regiões do país com um grande potencial de crescimento na região Nordeste. O crescente desenvolvimento da ovinocultura traz consigo a necessidade do aumento de animais com altos padrões genéticos e raciais. Com isso se fez necessário o uso de técnicas que permitem a multiplicação, destacando-se a inseminação artificial, transferência de embriões e a biotecnica mais recente que vem se destacando é a produção *in vitro* de embriões. Desta forma, com o presente estudo objetivou-se descrever o estado da arte da técnica de aspiração folicular guiada por laparoscopia

em ovinos, e executar o passo a passo prático da referida técnica, nas condições disponíveis no laboratório de reprodução animal do Hospital Veterinário da UFCG e utilizando dois protocolos hormonais distintos. Foram utilizadas seis fêmeas Santa Inês, separadas em três grupos. No primeiro grupo utilizou-se, progesterona (CIDR), 800 UI de FSH, 1600 UI de eCG e 50 UI de PGF2alfa por via intramuscular, enquanto para o segundo grupo o protocolo foi composto por progesterona (CIDR), 1000 UI de eCG e 50 UI PGF2alfa e o terceiro grupo não recebeu nenhum protocolo hormonal. Dessa forma, pode concluir que a aspiração folicular por via laparoscópica se mostra como um recurso tecnicamente viável e de elevada aplicabilidade para avanços na reprodução assistida de pequenos ruminantes, sendo uma ferramenta valiosa para o progresso genético da ovinocultura regional e nacional.

PALAVRAS-CHAVE: Biotecnologia, ovinocultura, produção *in vitro*.

Preliminary Study of Follicular Aspiration Guided by Laparoscopy in Sheep in Paraíba

ABSTRACT: Sheep breeding has achieved high production rates across all regions of the country, with significant growth potential in the Brazilian Northeast. The expansion of sheep farming brings with it the need to increase the number of animals with high genetic and breed standards. As a result, reproductive biotechnologies such as artificial insemination, embryo transfer, and more recently, 6 embryo production have gained prominence. This study aims to describe the state of the art of the laparoscopic-guided follicular aspiration technique in sheep and to carry out a practical step-by-step application of this technique under the conditions available in the Animal Reproduction Laboratory of the Hospital Veterinário UFCG. Six Santa Inês ewes were used, divided into three groups. Two of the groups underwent hormonal protocols. The first group received progesterone (CIDR), 800 IU of Folltropin (FSH), 1600 IU of Novormon® (eCG), and 50 IU of Ciosin® (PGF2alpha) intramuscularly. The second group protocol, consisted of progesterone (CIDR), 1000 IU of eCG and 50 IU of PGF2alpha. The third group did not receive any hormonal treatment, and all animals subsequently underwent follicular aspiration via laparoscopy. Therefore, it can be concluded that follicular aspiration via laparoscopy proves to be a technically viable and highly applicable resource for advances in assisted reproduction of small ruminants, being a valuable tool for the genetic progress of regional and national sheep farming.

KEY-WORDS: Biotechnology, oviculture, *in vitro* Production.

INTRODUÇÃO

A ovinocultura representa uma importante atividade pecuária no Brasil, desenvolvida de forma racional e em consonância com os aspectos ambientais, econômicos e sociais. Essa atividade destaca-se como alternativa viável para diversos ecossistemas nacionais, incluindo regiões com condições edafoclimáticas adversas, como o semiárido nordestino, onde a espécie ovina apresenta notável capacidade de adaptação. Nos últimos anos, observa-se um crescimento significativo da produção ovina em todo o território brasileiro, refletido no aumento da oferta de carne, lã, pele, leite e seus subprodutos (Fluck et al., 2025).

Esse crescimento tem contribuído para a consolidação da ovinocultura como um dos segmentos de destaque do agronegócio nacional, impulsionado por fatores como o ciclo produtivo curto, a elevada adaptabilidade dos animais, a boa rentabilidade econômica e a aptidão para exploração em pequenas propriedades (Magalhães et al., 2020). Nesse contexto, torna-se essencial a adoção de estratégias reprodutivas eficientes que possibilitem o incremento dos índices zootécnicos e o progresso genético dos rebanhos.

Entre as raças criadas na região Nordeste, a Santa Inês ocupa posição de destaque, sobretudo por sua rusticidade, porte e bom desempenho produtivo, sendo amplamente utilizada em sistemas de produção extensivos e semi-intensivos. A crescente valorização da ovinocultura tem estimulado a seleção e multiplicação de indivíduos com características genéticas superiores, o que demanda a utilização de biotecnologias reprodutivas que viabilizem o avanço genético dos rebanhos.

Dentre essas biotecnologias, destacam-se a inseminação artificial (IA) e a transferência de embriões (TE), que têm contribuído significativamente para a melhoria dos índices reprodutivos e produtivos da espécie (Fonseca et al., 2019). Mais recentemente, a produção *in vitro* de embriões (PIV) tem se consolidado como ferramenta promissora para o aprimoramento genético de ovinos, além de apresentar potencial de aplicação em caprinos e bovinos, ampliando as possibilidades de intensificação da produção animal (Souza-Fabjan et al., 2023).

Desta forma, o presente estudo tem como objetivo descrever o estado da arte da técnica de aspiração folicular guiada por laparoscopia em ovinos e, executar o passo a passo prático da referida técnica nas condições disponíveis no laboratório de reprodução animal do Hospital Veterinário do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (HV/CSTR).

REVISÃO DE LITERATURA

Santa Inês

A origem da raça Santa Inês não é completamente esclarecida, no entanto é aceita a ideia que seja resultante de combinações entre quatro fontes genéticas. A primeira hipótese trata-se de animais lanados tipo Crioulos, que foram trazidos pelos colonizadores portugueses e espanhóis, mas que sob as condições tropicais. A segunda refere-se a ovinos deslanados oriundos do continente africano, que deram origem à maioria das raças deslanadas do Brasil, América Central e Caribe. A terceira seria raça Bergamácia, de origem italiana, cruzada tanto com as ovelhas remanescentes daquelas oriundas do continente africano, quanto com as da raça Morada Nova de origem africana, seguida por um período de seleção e/ou evolução para ausência de lã. Por fim a quarta diz que as raças Somalis Brasileira e Suffolk, que no final da década de 80 foram adicionadas à raça Santa Inês por um pequeno grupo de criadores (de Sousa et al., 2003).

A raça é de grande porte, alto potencial de crescimento, alta produtividade lactífera para promover boa alimentação aos cordeiros e uma reduzida taxa de partos múltiplos. Apresentam-se na pelagem branca, com tons avermelhados, preto e malhado. Normalmente, em situações de pastejo e manejo alimentar adequado o peso de um adulto varia de 40 a 100 kg e os machos alcançam até 180 kg. A seleção utilizada na raça tem sido orientada para o peso e tamanho, ausência lanosa e cornos, alta pigmentação, as fêmeas com alta habilidade materna e capacidade de parir cordeiros vigorosos (Bueno *et al.*, 2003).

A raça Santa Inês vem adquirindo grande importância na ovinocultura moderna, utilizada como raça pura ou para cruzamentos industriais. Em tais sistemas de produção, a eficiência reprodutiva é o principal fator limitante da lucratividade (Souza, 2003). Segundo Corradello (1988) e Silva (1990), a raça Santa Inês apresenta alta velocidade de crescimento e produz carcaça de boa qualidade, sendo uma raça de potencial para a produção do meio sangue em cruzamentos industriais.

Fisiologia reprodutiva

Ciclo estral

Os ovinos têm sua maturidade sexual determinada por inúmeros fatores: genéticos, climáticos, nutricionais, estação do ano, manejo e sanidade. Estes animais são poliêstricos estacionais e fotoperíodo dependentes, ou seja, a luz solar influencia diretamente no ciclo estral das ovelhas, com influência da luz na produção de

melatonina, consequentemente na liberação de Hormônio Liberador de Gonadotrofina (GnRH) e os Hormônio Folículo Estimulante (FSH) /Hormônio Luteinizante (LH), os quais são hormônios essenciais na regulação neuroendócrina do ciclo estral. Com isso a atividade reprodutiva se divide em fases estacionárias anestro (fim do inverno ou início do verão), de proestro (verão) e de estro (final do verão ou final do inverno com maior incidência nos meses de março a maio) (Grunert *et.al.*, 2005).

O estro é o período durante o qual a fêmea manifesta um comportamento de atividade sexual, sendo o único momento em que aceita o macho (Evans; Maxwell, 1990). A fêmea apresenta vulva edemaciada, e corrimento vaginal de aspecto mucoso límpido (Hafez, 1995).

O ciclo estral é resultado da ação neuroendócrina coordenada pelo hipotálamo, hipófise, ovários e útero, mediada pelos hormônios GnRH, liberado pelo hipotálamo agindo na hipófise, estimulando-a para liberação de LH e FSH. O FSH atua sobre os ovários para maturação folicular, o LH também atua nos ovários, no entanto, realiza a ovulação e maturação do corpo lúteo, estrógeno e progesterona são liberados pelo ovário. O estrógeno age nas gônadas com função de ciclicidade e caráter sexual além de atuar nas glândulas mamárias no seu desenvolvimento.

Já a progesterona tem ação no desenvolvimento das glândulas mamárias e no útero com a preservação gestacional. Por fim, a prostaglandina F2alfa (PGF2) é liberada pelo útero com ação no corpo lúteo para sua latinização quando não há gestação (Almeida; Carneiro, 2017).

Esse ciclo também é definido pela raça, a exemplo da Santa Inês que apresenta atividade reprodutiva durante todo o ano (Fonseca, 2005). Caracterizando-se pela sucessiva repetição dos eventos, que em ovinos tem duração de 17 dias com variação de 2 dias, a mais ou a menos, dividindo-se em fase lútea e folicular. A fase lútea estende-se desde o dia 2 (estro = dia 0) até o dia 13, a fase folicular compreende o dia 14 até o dia 1 (Hafez; Hafez, 2004).

Dinâmica folicular

A dinâmica presente no folículo trabalha por meio de um crescimento contínuo de redução dos folículos antrais permitindo a evolução do folículo pré-ovulatório (Silva, 2008). Em pequenos ruminantes a evolução do folículo acontece em picos ondulatórios intercalados entre 4 a 6 dias, durante a estação reprodutiva e o anestro sazonal (Rubianes, 2000). O número de ondas foliculares por ciclo varia entre duas e quatro em ovinos (Vinoles *et al.*, 2002). O dia de emergência de cada onda folicular tem variações na espécie ovina e, depende do número de ondas em cada ciclo.

Estudos relatam que a primeira onda emerge em torno do dia da ovulação (Dia 0) do ciclo anterior (Brandão, 2010). Em cada onda folicular um recrutamento de pequenos folículos pré-antrais emerge em resposta a elevação da concentração de FSH. Ao menos um único folículo é escolhido para se manter em crescimento, porém os demais sofrem uma supressão. Entre o folículo selecionado e o eixo hipotalâmico-hipofisário é estabelecida uma retroalimentação hormonal positiva que resulta na ovulação (Menchaca; Rubianes, 2002). Ocorrendo a ovulação, ocorre o rompimento do folículo e a proliferação dos vasos sanguíneos dando origem ao corpo hemorrágico. Após 4 a 5 dias da ovulação, o corpo hemorrágico transforma-se no corpo lúteo (Almeida; Carneiro, 2017).

Protocolos hormonais

Os protocolos hormonais têm sido amplamente utilizados na manipulação do ciclo estral de fêmeas ovinas, podendo ser aplicados tanto durante a estação reprodutiva quanto fora dela, em períodos de anestro, com ajustes específicos na escolha e na combinação dos fármacos utilizados (Gonçalves et al., 2001).

Segundo Kuhholzer et al. (1997), é possível recuperar, em média, cinco oócitos por sessão de aspiração folicular em doadoras ovinas sem tratamento hormonal prévio. No entanto, oócitos obtidos de fêmeas previamente tratadas com hormônios apresentam maior competência para maturação, fertilização e desenvolvimento embrionário *in vitro*, como demonstrado por O'Brien et al. (1997).

A sincronização do estro em ovelhas pode ser alcançada com elevado grau de eficácia. Estudos indicam que até 95% das fêmeas demonstram sinais de estro em um intervalo de 24 a 48 horas após a retirada do progestágeno (Boland et al., 1990). Durante o anestro estacional, no entanto, é necessário associar o uso de progestágenos à gonadotrofina coriônica equina (eCG), a qual estimula o desenvolvimento folicular em períodos de inatividade do eixo hipotálamo-hipófise.

Além disso, a prostaglandina F2 α (PGF2 α) e seus análogos sintéticos também são utilizados para indução da luteólise em fêmeas ciclando, promovendo a redução da progesterona plasmática e, conseqüentemente, o aumento do estradiol, a manifestação de cio e o desencadeamento do pico de LH (Hafez & Hafez, 2004). Entretanto, esse protocolo é eficaz apenas durante a estação reprodutiva, em animais que apresentam corpo lúteo funcional (Hoppe; Slyter, 1989). A PGF2 α pode ainda ser utilizada em associação com progestágenos e eCG, compondo protocolos mais robustos para o controle do ciclo reprodutivo.

A eficácia dos protocolos hormonais depende de diversos fatores, como a dose total de hormônios administrada, o número de aplicações e, principalmente, o intervalo entre a estimulação hormonal e a aspiração folicular. Intervalos muito curtos resultam

em folículos imaturos, de difícil aspiração, enquanto intervalos prolongados podem gerar oócitos em estágios distintos de maturação, o que compromete a qualidade da colheita (Baldassarre et al., 1995).

Estudos demonstram que a superovulação, induzida por diferentes protocolos hormonais, é eficaz na recuperação de oócitos por laparoscopia. Comparações entre protocolos que utilizam FSH e LH isoladamente, e aqueles que combinam FSH, LH e uma dose única de eCG, indicam resultados semelhantes quanto ao número de oócitos recuperados 48 horas após a estimulação (Baldassarre et al., 1995). De modo geral, é amplamente reconhecido que fêmeas previamente estimuladas hormonalmente produzem maior número de oócitos viáveis, independentemente do protocolo adotado (O'Brien et al., 1997).

Técnicas de Aspiração folicular

A aspiração folicular em ovelhas pode ser realizada por meio de um sistema de lúmen simples, composto por uma agulha de calibre 16G com bisel curto, conectada a uma cânula de teflon com 50 cm de comprimento, acoplada a uma rolha de silicone ligada a um tubo de coleta de 50 mL. A pressão negativa necessária é fornecida por uma bomba de vácuo (Teixeira et al., 2011). Após o procedimento, recomenda-se lavar os ovários com 10 mL de solução salina a 0,9% para remoção de coágulos e prevenção de aderências (Teixeira et al., 2011).

De acordo com Rodríguez et al. (2006), variáveis físicas do procedimento, como o diâmetro da agulha e da cânula, o fluxo de aspiração (mL/min) e a pressão negativa (mmHg), influenciam diretamente a eficiência de recuperação dos oócitos. A pressão de aspiração deve ser cuidadosamente ajustada, uma vez que valores elevados aumentam a taxa de recuperação, mas reduzem a viabilidade dos oócitos devido à perda de células do cumulus (Cordeiro et al., 2014). As pressões consideradas ideais situam-se entre 50 e 70 mmHg (Crocomo et al., 2012; Padilha, 2013; Baldassarre et al., 2003; Koeman et al., 2003). Pressões inferiores a 25 mmHg resultam em baixa taxa de recuperação (Alberio et al., 2002), enquanto pressões acima de 100 mmHg comprometem a qualidade dos COCs (Morton et al., 2008).

O fluxo de aspiração também deve ser cuidadosamente controlado, pois há uma relação inversamente proporcional entre esse parâmetro e a integridade dos COCs. Fluxos mais elevados aumentam a ocorrência de desnudamento dos oócitos, reduzindo sua qualidade (Crocomo et al., 2012; Padilha et al., 2013). Rodríguez et al. (2006) relataram que fluxos de 10, 20, 30, 40 e 50 mL/min resultaram em 69,5%, 50,5%, 44,8%, 36,5% e 28,3% de COCs de boa qualidade, respectivamente, recomendando-se valores entre 6,5 e 10 mL/min.

Laparoscopia

A laparoscopia é um procedimento considerado pouco invasivo e provoca mínimos danos cirúrgicos, com a possibilidade de realização de sucessivas colheitas de folículos em um curto intervalo de tempo (Cordeiro *et al.*, 2014; Texeira *et al.*, 2011). 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).

A técnica de laparoscopia pode ser ou não associada a vídeo, na qual, o procedimento poderá ser realizado após um jejum de 36 horas de sólidos e 24 horas de líquido. A aplicação de um jejum prolongado é feita na tentativa de diminuir o volume ruminal, melhorando assim a visibilidade da cavidade abdominal, assim também evitando complicações como timpanismo e refluxo gástrico (Texeira *et al.*, 2011).

Na técnica descrita por Texeira e colaboradores (2011), após o protocolo anestésico ser estabelecido os animais deveram ser contidos e posicionados em trendelenburg (mesa cirúrgica), com inclinação de 45 graus, o que facilitará a visualização do sistema reprodutivo. Com o animal em devida analgesia, anestesia e posicionamento segue-se o procedimento realizando duas pequenas incisões de 10 a 15 cm cranial ao úbere e caudal ao umbigo a mais ou menos 5 cm a direita e a esquerda da linha alba, para a introdução dos trocateres, após sua introdução se faz a inflação do abdômen com CO₂ estabelecendo uma pressão abdominal de 5mmhg e velocidade de inflação de 5l/min, permitindo assim uma melhor manipulação de útero, cornos, bursas ovarianas e individualização dos ovários.

Avaliação oocitária

A análise dos oócitos visualizados aspirados e recuperados é feita em laboratório, o líquido aspirado e depositado levemente em placas de petri e levada a observação em estereomicroscópio em aumento de 40X, a parti de sua visualização são contados e então classificados de acordo com sua qualidade, tendo variação de I à VI, sendo selecionado os de classificação I e II (Padilha, 2012). Segundo Padilha (2012) em adaptação á Leibfried e First (1979), esta classificação se dá da seguinte forma: De grau I COC que apresentam plasma homogêneo, escuro e rodeado completamente por mais de três camadas de células do *cumulus*. De grau II, COC com plasma levemente pigmentado com menos de três camadas de células do *cumulus*. De grau III, COC com plasma pálido, frequentemente sem forma e camadas de células do *cumulus* incompletas e *cumulus* expandido. Por fim de grau IV, sem células do *cumulus*.

A qualificação oocitária está diretamente relacionada as células do *cumulus* e sua preservação, as COCs são fundamentais para alcance da competência oocitária

para suporta os posteriores eventos de fertilização e do desenvolvimento embrionário (Shimada; Terada, 2002). Através da transferência de nutrientes, íons, nucleotídeos e células de baixo peso molecular, as COCs garantem a nutrição e a conexão do oócito com o meio externo, modulando os efeitos dos hormônios e fatores de crescimento e ainda participa da regulação da maturação oocitária (Soom et al., 2002).

Produção *in vitro* de embriões

A Produção *in vitro* de Embriões (PIV) em ruminantes é uma ótima fonte de embriões, a custo relativamente baixo para a pesquisa básica ou aplicação das biotecnologias em desenvolvimento, como a transferência nuclear e transgenia (Baldassare et al., 2002).

A PIV surge como uma biotecnologia promissora, já que permite o melhoramento dos embriões de folículos e elevação do número de embriões produzidos (Simplicio et al., 2007). A PIV envolve desde a coleta dos Complexos COCs, seguida pela maturação e fecundação dos folículos *in vitro* até o cultivo embrionário em condições laboratoriais, tendo em vista à obtenção de embriões com viabilidade para desenvolvimento de forma adequada para ocorrer uma transferência de forma direta para o útero da fêmea de aluguel ou criopreservação (Baldassarre, 2008).

A produção *in vitro* (PIV) otimiza a obtenção de embriões e nascimentos em período de tempo inferior ao que se verifica por outras técnicas, tais como a inseminação artificial, transferência de embriões, dentre outras. Sua aplicação pode ser realizada em fêmeas pré-púberes, acíclicas ou em anestro estacional, gestantes e ainda, as previamente submetidas a tratamentos super estimulatórios. É uma biotécnica utilizada, alternativamente, para acelerar a produção de animais geneticamente superiores e impedir, pela aspiração *in vivo* de folículos, o descarte precoce de fêmeas geneticamente privilegiadas portadoras de alterações adquiridas que impedem que a reprodução ocorra de forma natural ou até mesmo pela transferência de embriões (Gonçalves et al., 2002).

O número de folículos de boa qualidade colhidos de um ovário é um ponto importante na PIV de embriões. Os folículos destinados à Fertilização *in vitro* (FIV) podem ser colhidos de uma das seguintes fontes: ovidutos logo após a ovulação, folículos maduros antes da ovulação ou de folículos imaturos ou atresícos presentes em animais mortos (abatedouro) ou vivos (Wani, 2002). Embora a PIV possa ser realizada a partir de oócitos recuperados de ovários de matadouro, a maioria das aplicações práticas requer que estas estruturas sejam de animais vivos (Padilha, 2012).

Os folículos maturados *in vitro* podem ser obtidos por técnicas cirúrgicas ou por laparoscopia (Naqvi; Gulyani, 1999). Baldassare (2008) relatou que os melhores

resultados foram obtidos quando se utilizou a técnica de recuperação de oócitos por aspiração laparoscópica.

METODOLOGIA

O estudo foi realizado seguindo os princípios éticos na experimentação animal, ditados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Campina Grande / Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CEUA/UFCG N°218).

O experimento foi conduzido no laboratório de reprodução animal do hospital veterinário da UFCG, localizado na cidade de Patos, Estado da Paraíba. Foram utilizadas seis fêmeas ovinas, da raça Santa Inês, sexualmente adultas, pluríparas, com idade entre 20 a 50 meses, não prenhes, não lactantes, com peso médio de 40 \pm 5,5 kg, as quais foram identificadas e, consideradas híginas após serem examinadas por ultrassonografia e exame clínico ginecológico. Os animais passaram por um período de adaptação de 30 dias, em manejo semi-intensivo, recebendo suplementação concentrada (200g de ração comercial), sal mineral, água e volumoso composto de pastagem nativa *ad libitum*. Quinze dias antes da aspiração folicular, foi melhorado o fornecimento de concentrado energético realizando o *flushing* alimentar, fazendo assim um balanço energético positivo nas fêmeas. Os animais foram separados em três grupos compostos por duas fêmeas de forma que o primeiro grupo passou pelo processo de sincronização de estro com protocolo hormonal utilizando implante de progesterona e aplicação de eCG mais FSH, o segundo grupo foi sincronizado com protocolo hormonal utilizando implante de progesterona e aplicação de dose única de eCG, enquanto o terceiro grupo não passou por processo de sincronização hormonal. Todas as fêmeas dos três grupos foram submetidas à aspiração folicular.

As ovelhas do primeiro grupo passaram por processo de sincronização do estro, utilizando dispositivo intravaginal de silicone impregnado com 0,3g de progesterona (CIDR), que permaneceu por doze dias, sendo implantado no dia 0 do protocolo. No dia 10 foram aplicados 8mL (800 UI) de Folltropin® (FSH), mais 1,5mL (150 UI) de Novormon® (eCG), mais 0,5mL (50 UI) de Ciosin® (PgF2alfa) por via intramuscular. No dia 12 ocorrerá a retirada do CIDR e a aspiração folicular.

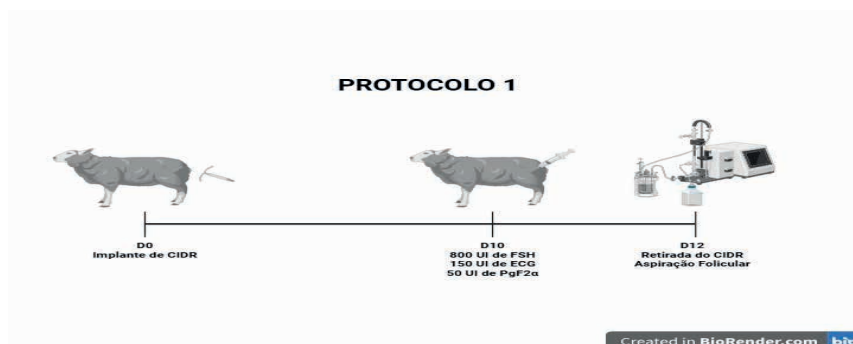


Figura 2: Protocolo hormonal 1

Fonte: Edição própria

As ovelhas do segundo grupo passaram por processo de sincronização do estro, utilizando dispositivo intravaginal de silicone impregnado com 0,3g de progesterona (CIDR), que permaneceu por doze dias, sendo implantado no dia 0 do protocolo. No dia 10 foram aplicados 5 mL (1000 UI) de Novormon® (eCG), mais 0,5mL (50 UI) de Ciosin® (PgF2alfa). No dia 12 ocorrerá a retirada do CIDR e a aspiração folicular.

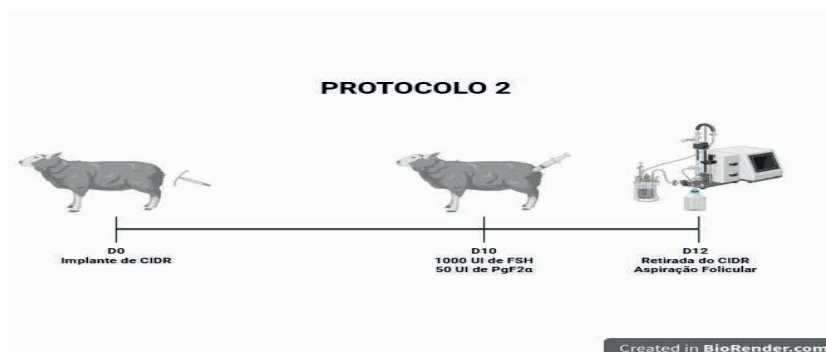


Figura 3: Protocolo hormonal 2.

Fonte: Edição própria

As ovelhas do terceiro grupo passaram pela aspiração folicular sem serem submetidas a protocolo hormonal de sincronização de estro. Segundo Crocomo (2012), os CCOs destinados a produção *in vitro* de embriões podem ser obtidos de fêmeas adultas ou pré-pública, submetidas ou não a tratamento hormonal prévio.

Após jejum hídrico e alimentar de 36 horas, os animais foram submetidos ao processo de anestesia, a qual foi obtida através da administração por via endovenosa

de 0,2 mg/kg de Xilazina, mais 3mg/kg de Cetamina. Após o protocolo anestésico, os animais foram colocados em trendelenburg. Procedera-se a tricotomia, o preparo do campo cirúrgico (região do abdome, cranial ao úbere), e antissepsia com tintura de iodo, seguindo a assepsia e posicionamento dos panos de campo. Seguindo com anestesia local infiltrativa com 0,4 ml de Cloridrato de Lidocaína, sendo 0,2 mL para um botão no tecido subcutâneo e 0,2 mL intramuscular.



Figura 4: Animais embaixados e em jejum pré-operatório.

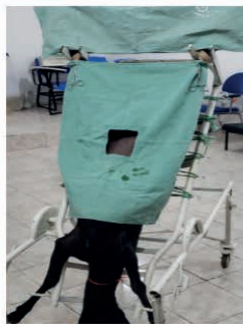


Figura 5: Animal em plano anestésico, posição trendelenburg, com panos de campo posicionados.

Fonte: Arquivo pessoal

Com auxílio do bisturi foram realizadas duas pequenas incisões no abdômen, de 10 a 15 cm cranial ao úbere e caudal ao umbigo mais ou menos 5cm a direita e a esquerda da linha alba, para a introdução dos trocanteres com válvulas para insuflação, com o primeiro trocater introduzido realizara-se a inflação do abdômen com CO₂ estabelecendo uma pressão abdominal de 5mmhg e velocidade de inflação de 5l/min. Sequencialmente, foi introduzida pelo primeiro trocater a ótica laparoscopia, em seguida foi introduzido pelo segundo trocater a pinça Babcock que permitiu a manipulação do útero, tubas, bursas ováricas e individualização dos ovários. Antecedendo a aspiração foi realizada a avaliação ovariana. Em seguida foi realizada a terceira incisão 5 mm na linha média 20 cm cranial ao úbere, introduzida a agulha para aspiração.



Figura 6: Primeira incisão, colocação do primeiro trocar para inflação do abdômen e passagem da ótica



Figura 7: Segunda incisão, passagem da pinça atraumática

Fonte: Arquivo pessoal

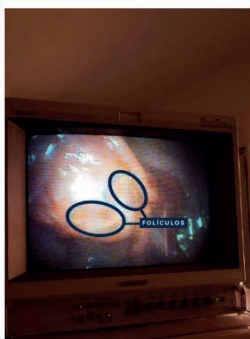


Figura 8: Avaliação ovariana.



Figura 9: Terceira incisão, passagem da agulha de aspiração folicular

Fonte: Arquivo pessoal

A aspiração foi realizada através de movimentos em diferentes posições com auxílio da pinça Babcock. A pressão do vácuo foi ajustada para no máximo 50 mmHg.

Utilizara-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 será acoplada ao tubo de colheita (50 mL). O vácuo foi produzido por uma bomba de aspiração, aspiramax, adaptada.

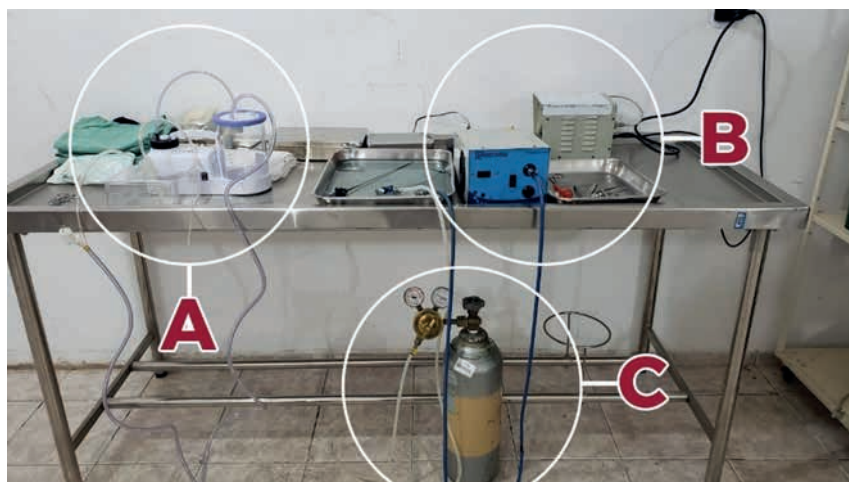


Figura 10: Equipamentos utilizados para o processo de aspiração folicular. A: bomba de aspiração adaptada. B: material laparoscópico. C: cilindro de gás.

Fonte: Arquivo pessoal



Figura 11: Aspiração folicular

Fonte: Arquivo pessoal

Ao término das aspirações os ovários foram lavados com 10 ml de solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,9%, para remoção de coágulos da superfície, minimizando a formação de aderências. As dermorráfias foram realizadas com pontos tipo simples separado. Após a conclusão do procedimento realizou-se a limpeza da ferida cirúrgica com Iodopovidona e utilização de pomada repelente/cicatrizante ao redor da ferida

cirúrgica. As fêmeas foram retiradas da maca cirúrgica e colocadas em local limpo e tranquilo, sendo observadas até total recuperação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A técnica de aspiração folicular guiada por laparoscopia em ovinos Santa Inês demonstrou ser exequível e eficaz com ambos protocolos nas condições estruturais e operacionais disponíveis no Laboratório de Reprodução Animal do HV/CSTR. O procedimento permitiu não apenas a visualização direta dos ovários, mas também a individualização dos folículos, otimizando a coleta de óocitos com mínimo estresse cirúrgico e preservação da integridade fisiológica dos animais.

A adoção da laparoscopia como ferramenta para coleta de óocitos possibilita múltiplas aspirações em curtos intervalos, viabilizando sua aplicação em programas de produção in vitro de embriões (PIV). A análise comparativa entre os protocolos hormonais evidenciou que a estimulação com FSH associada ao uso de eCG promove maior eficiência na recuperação de óocitos, corroborando estudos prévios da literatura. Além disso, a avaliação ovariana intraoperatória permitiu ajustes imediatos na técnica, aumentando a assertividade do procedimento.

Os dados obtidos reforçam o potencial dessa biotécnica como estratégia complementar para intensificação da reprodução assistida em ovinos, especialmente em raças de interesse zootécnico adaptadas ao semiárido. A sua aplicabilidade é promissora tanto para fins comerciais quanto experimentais, com vistas à multiplicação de material genético superior e preservação de matrizes com alto valor zootécnico.

CONCLUSÃO

Dessa forma, pode concluir que a aspiração folicular por via laparoscópica se mostra como um recurso tecnicamente viável e de elevada aplicabilidade para avanços na reprodução assistida de pequenos ruminantes, sendo uma ferramenta valiosa para o progresso genético da ovinocultura regional e nacional. Estudos futuros com maior número de animais e avaliação da viabilidade embrionária pós-PIV poderão consolidar ainda mais os benefícios dessa abordagem.

REFERÊNCIAS

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

ALMEIDA, V. M.; CARNEIRO, G. F. Estudo de Campo. In: ALMEIDA, V. M.; CARNEIRO, G. F. **Transferência de embriões em ovinos.** Olinda: livro rápido, 2017.

BRANDÃO, G.S.B. **Uso da dinâmica folicular ovariana a avaliação de diferentes tratamentos de sincronização de estro em cabras canide exploradas no semiárido do Nordeste do Brasil.** Dissertação de Mestrado, UNIVASF, Petrolina, 2010.

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

BALDASSARRE, H. **Tecnologias reprodutivas de última geração.** In: Aisen EG. Reprodução ovina e caprina. São Paulo: MedVet, 2008. p.179-183.

BALDASSARRE H, WANG B, KAFIDI N, GAUTHIER M, NEVEU N, LAPOINTE J, SNEEK L, LEDUC M, DUGUAY F, ZHOU JF, LAZARIS A, KARATZAS CN. **Production of transgenic goats by pronuclear microinjection of in vitro produced zygotes derived from oocytes recovered by laparoscopy.** *Theriogenology*, v.59, p.831-839, 2003.

BALDASSARRE, H.; FURNUS, C. C.; MATOS, D. G.; PESSI, H. In vitro production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis: alternative gonadotrophin treatments for stimulation of oocyte donors. **Theriogenology**, 1995. V. 45, n. 3, p. 707-717.

BUENO, M. S; CUNHA, E. A; SANTOS, L.E; VERISSIMO, C. J. SANTA INÊS uma boa alternativa para a produção intensiva de carne de cordeiros. **O Berro**, São Paulo, v. 2, n. 12, p.1-5, 01 dez. 2003.

CROCOMO, L. F. et al. Peculiaridades da coleta de oócitos para produção in vitro de embriões ovinos. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 36, n. 01, p.25-31, abr. 2012.

CORDEIRO, M.F.; TEIXEIRA, P.P.M.; OLIVEIRA, M.E.F. 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.

CORRADELLO, E. F. A. **Criação de ovinos: antiga e contínua atividade lucrativa.**

São Paulo: ÍCONE: 1988. 124 p.

DE SOUSA, Wandrick Hauss; LÔBO, Raimundo Nonato Braga; MORAIS, Octavio Rossi. Ovinos Santa Inês: estado de arte e perspectivas. **II Simpósio Internacional sobre Caprinos e Ovinos de Corte**, p. 7-19, 2003.

FLUCK, Ana Carolina et al. Considerações sobre a criação de ovinos a pasto no Brasil. **AGROPECUÁRIA CIENTÍFICA NO SEMIÁRIDO**, v. 21, n. 1, p. 136-149, 2025.

FONSECA, Jeferson F. et al. Non-surgical embryo transfer in goats and sheep: the Brazilian experience. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 31, n. 1, p. 17-26, 2018.

FONSECA, J.F. **Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos**. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2015, Goiânia, GO. Anais: Palestras, 2005.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo:Varela, 2001. cap.03, p.35-41.

GONÇALVES P.B.D.; VISINTIN, J. A.; OLIVEIRA, M. A. L.; MONTAGNER, M. M.; COSTA, L. F. S. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES P.B.D., FIGUEIREDO J.R., FREITAS V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Livraria Varela, 2002. p. 179-194.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 7. ed. Barueri, SP: Manole, p.173-178, 2004.

HOPPE, K.F.; SLYTER, A.L. **Effects of prostaglandin dosage on synchronizing ovine estrous using a modified single injection regimen**. Theriogenology, v.31, p.1191- 1200, 1989.

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

KÜHHOLZERB, MÜLLERS, TREUERA, SEREGIJ, BESENFELDER U, BREMG. **Repeated endoscopic ovum pick-up in hormonally untreated ewes: a new technique**. Theriogenology, v.48, p.545-550, 1997.

MAGALHAES, Klinger Aragão et al. Caprinos e ovinos no Brasil: análise da Produção da Pecuária Municipal 2019. 2020.

MENCHACA, A.; RUBINES, E. **Follicular recruitment and ovulatory response to FSH treatment initiated on Day 0 or DAY 3 post ovulation in goats**. Theriogenology, v. 58, p. 1713-1721, 2002.

NAQVI, S.M.K.; GULYANI, R. **Ovarian response and embryo recovery to different superovulatory regimens in Rambouillet ewes under semi-arid conditions**. Small Ruminant Research 34: 127-131, 1999.

O'BRIEN JK, Catt SL, Ireland KA, Maxwell WMC, Evans G. ***In vitro* and *in vivo* developmental capacity of oocytes from prepubertal and adult sheep**. Theriogenology, v.47, p.1433-1443, 1997.

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.

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

SILVA, F. L. **Efeito de fatores genéticos e de ambiente sobre o desempenho de mestiços Santa Inês, no Estado do Ceará.** 1990. 93 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Vicosa, Vicosa.

SIMPLÍCIO, A.A, FREITAS, V.J.F, FONSECA, J.F. **Biotécnicas da reprodução como técnicas de manejo reprodutivo em ovinos.** Rev Bras Reprod Anim, v.31, p.234-246, 2007.

SHIMADA M, TERADA T. **FSH and LH induce progesterone production and progesterone receptor synthesis in cumulus cells: a requirement for meiotic resumption in porcine oocytes.** Mol Hum Reprod, vol.8, p.612-618, 2002.

SOUZA-FABIAN, Joanna Maria Gonçalves et al. In vitro embryo production in small ruminants: what is still missing?. **Animal reproduction**, v. 20, n. 3, p. e20230055, 2023.

TEIXEIRA, P. P. M. et al. **Aspiração folicular por videolaparoscopia em ovelhas santa inês: descrições da técnica.** Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária, São Paulo, v. 16, n. 9, p.1-13, jan. 2011.

WANI, N.A. **In vitro maturation an in vitro fertilization of sheep oocytes.** Small Rumin Res, v.44, p.89-95, 2002.