



Peculiaridades da coleta de oócitos para produção *in vitro* de embriões ovinos

Peculiarities of oocyte harvesting for in vitro production of sheep embryos

L.F. Crocomo¹, W.C. Marques Filho, F.C. Landim Alvarenga, S.D. Bicudo

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ, UNESP, Botucatu, SP, Brasil.

¹Correspondência: leticia.crocomo@gmail.com; lfcrocomo@hotmail.com

Resumo

A expansão da ovinocultura brasileira impulsionou o desenvolvimento de novas biotécnicas de reprodução assistida visando ao aumento dos índices produtivos em concomitância com o acelerado progresso genético. Neste contexto, a produção *in vitro* de embriões (PIV) ovinos se intensificou, devido à possibilidade de otimização das fêmeas doadoras de oócitos e de incremento da quantidade de embriões produzidos. Entre os vários fatores implicados no sucesso dessa biotecnologia, a qualidade dos complexos *cumulus-oophorus* (COCs), caracterizada, principalmente, pela presença das células do *cumulus*, é considerada crucial. Deste modo, é imprescindível a ampliação do conhecimento referente aos diferentes métodos de coleta dos COCs e suas peculiaridades, visando a futuros aperfeiçoamentos biotecnológicos.

Palavras-chave: ovinos, oócito, *cumulus*, aspiração folicular.

Abstract

The expansion of Brazilian sheep rearing promoted the development of new biotechnologies of assisted reproduction in order to increase the production indices concomitantly with accelerated genetic progress. In this context, the in vitro production (IVP) of sheep embryos has intensified due to the possibility of optimization of the female oocytes donor and increase the number of embryos produced. Among the various factors involved in the success of this biotechnology, the cumulus-oophorus complexes (COCs) quality, characterized, mainly, by the presence of cumulus cells, is considered crucial. Thus, it is essential to increase the knowledge on the different methods of collection of COCs and their peculiarities, aiming for future biotechnological improvements.

Keywords: ovine, oocyte, *cumulus*, follicular aspiration.

Introdução

A ovinocultura, no Brasil, tem se intensificado nos últimos anos, ocupando posição de destaque entre os diversos ramos do agronegócio, principalmente por suas características de ciclo produtivo curto com consequente giro financeiro rápido, alta lucratividade e boa adaptabilidade animal, além da viabilização de pequenas propriedades (Demincis et al., 2008). Diante deste cenário, é necessário adotar estratégias reprodutivas práticas, viáveis e lucrativas, visando aumentar os índices produtivos em concomitância com o progresso genético (Moraes et al., 2007).

Neste contexto, a produção de embrião *in vitro* (PIV) surge como uma biotecnologia promissora, uma vez que permite a otimização das fêmeas doadoras de oócitos e o incremento da quantidade de embriões produzidos (Simplicio et al., 2007), como já constatado na bovinocultura. Além disso, consiste numa alternativa às técnicas invasivas de recuperação de embriões *in vivo* e numa importante ferramenta para pesquisas relacionadas à transgenia e à clonagem, bem como para o esclarecimento dos processos fisiológicos que ocorrem *in vivo* e aprimoramento da técnica *in vitro* (Gonçalves et al., 2008; Traldi, 2008).

A PIV envolve desde a coleta dos complexos *cumulus-oophorus* (COCs), seguida pela maturação e fecundação dos oócitos *in vitro* até o cultivo embrionário em condições laboratoriais visando à obtenção de embriões viáveis em estágio de desenvolvimento adequado para transferência direta para o útero da fêmea receptora ou para criopreservação (Baldassarre, 2008). Ainda de acordo com Rodriguez et al. (2006), o sucesso dessa biotecnologia depende, principalmente, da qualidade oocitária que está diretamente relacionada à presença das células do *cumulus* e às peculiaridades dos métodos de recuperação dos complexos *cumulus-oophorus* (COCs).

Deste modo, diante do evidente desenvolvimento da ovinocultura no Brasil e da perspectiva de consolidação da produção de embriões *in vitro* como ferramenta para o melhoramento genético, esta revisão se propõe a discutir algumas peculiaridades de diferentes métodos de coleta dos COCs, visando à difusão e ao aprimoramento do conhecimento e da tecnologia disponíveis.



Coleta dos complexos *cumulus-oophorus* (COCs)

Os COCs destinados à PIV podem ser obtidos do oviduto, logo após a ovulação, sendo que neste caso, o processo de maturação oocitária já se iniciou *in vivo*, ou de folículos pré-ovulatórios, imaturos e por vezes atresícos, havendo necessidade de ser realizada a maturação oocitária *in vitro* (Wani, 2002). Embora haja a possibilidade de recuperação de COCs de ovários de abatedouro, estes não podem ser utilizados em programas de melhoramento genético, pois, em geral, são oriundos de animais de descarte, cujos históricos sanitário, nutricional e reprodutivo são desconhecidos, sendo, portanto, destinados apenas às pesquisas por constituírem uma fonte abundante e barata de oócitos (Gibbons et al., 2008).

Quando se trabalha com ovários oriundos de abatedouro, os COCs podem ser obtidos por meio da técnica do fatiamento dos ovários (*slicing*) ou do método da aspiração folicular com agulha acoplada à seringa ou bomba a vácuo (Bernardi, 2005). De acordo com Wani et al. (2000), a técnica de *slicing* possibilita o acesso a folículos localizados profundamente dentro do córtex do ovário, resultando na recuperação de maior quantidade de COCs do que o método da aspiração folicular com agulha acoplada à seringa, no qual ainda há maior possibilidade de perda de COCs.

No entanto, o *slicing* apresenta a desvantagem de ser uma técnica demorada além de gerar muitos debris, os quais dificultam a posterior identificação dos COCs, havendo necessidade de maior treinamento do indivíduo que a efetua (Wani, 2002). Já a aspiração folicular é considerada um método mais simples, rápido e permite a obtenção de COCs de melhor qualidade, caracterizados pela presença de generosa quantidade de células do *cumulus* (Wani et al., 2000). A quantidade e a qualidade dos COCs recuperados por meio da aspiração folicular dependem, entretanto, dos aspectos físicos envolvidos em tal técnica, podendo haver discrepância entre autores com relação aos resultados obtidos.

In vivo, os COCs são recuperados por meio da aspiração folicular com bomba a vácuo, podendo ser realizada por laparoscopia ou laparotomia. Esta última de uso questionável por ser uma técnica cirúrgica invasiva que predispõe a aderências ovarianas, dificulta colheitas repetidas e pode levar as doadoras à infertilidade (Kühholzer et al., 1997).

Atualmente, preconiza-se a foliculocentese laparoscópica, ou seja, a recuperação de COCs por meio da aspiração folicular com agulha acoplada à bomba a vácuo guiada por laparoscópio, também conhecida como *laparoscopic ovum pick-up* (LOPU; Baldassarre, 2008), uma vez que consiste em uma técnica minimamente invasiva, podendo ser realizada sucessivas vezes sem comprometer a fertilidade das fêmeas doadoras (Stangl et al., 1999). Esta técnica permite a produção de cordeiros a partir de fêmeas de alto valor genético, nas quais os procedimentos convencionais de produção e transferência de embriões não são aplicáveis, como é o caso de fêmeas pré-púberes, gestantes, e de fêmeas com infertilidade temporária ou irreversível (Baldassarre et al., 1996; Kühholzer et al., 1997).

Importância das células do *cumulus*

Logo após a coleta, os COCs são analisados sob estereomicroscópio e classificados em diferentes graus, de acordo com a presença das células do *cumulus* e características do ooplasma (Shirazi et al., 2005), sendo selecionados para a posterior maturação *in vitro*.

A presença das células do *cumulus*, bem como sua íntima associação com oócito por meio das junções GAP comunicantes (GJCs), é fundamental para aquisição de competência oocitária para suportar os posteriores eventos da fertilização e do desenvolvimento embrionário (Shimada e Terada, 2002). Através da transferência de nutrientes, íons, nucleotídeos e substâncias de baixo peso molecular, 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 (Soom et al., 2002).

Evidências indicam ainda que a comunicação entre o oócito e as células do *cumulus* não é unidirecional, mas sim bidirecional, de modo que os fatores solúveis sintetizados pelos oócitos podem afetar diversas funções das células da granulosa, como: a proliferação das células da granulosa, a secreção de inibinas, a expressão de receptores de LH, a expansão das células do *cumulus* e a função esteroidogênica das células da granulosa (Shirazi et al., 2007).

Blagiolo et al. (2007) relataram que a taxa de maturação nuclear em oócitos de ovinos desnudos foi significativamente menor que naqueles envolvidos pelas células do *cumulus*, confirmando a importância do suporte celular promovido por estas células e do papel das GJCs no processo de maturação nuclear. Sendo assim, constata-se que a qualidade dos COCs, caracterizada pela presença das células do *cumulus*, é crucial para o sucesso da produção de embrião *in vitro* e está diretamente relacionada às peculiaridades dos métodos empregados na recuperação oocitária (Wani et al., 2000).

Fatores implicados na eficiência da aspiração folicular

Em ovinos, 25 a 30% dos COCs recuperados se desenvolvem em blastocistos quando cultivados *in vitro*



(Ptak et al., 1999). Segundo Vassena et al. (2003), o potencial de desenvolvimento oocitário e embrionário *in vitro* está diretamente relacionado à presença de adequado revestimento de células do *cumulus*, uma vez que oócitos desnudos apresentam baixas taxas de clivagem.

Para Rodríguez et al. (2006), desconsiderando-se o animal doador e o operador da aspiração folicular, a eficiência da recuperação de COCs sofre interferência de alguns aspectos físicos desta técnica como o calibre da agulha e da cânula de aspiração utilizadas; o fluxo (mL água/minuto) e a pressão de aspiração (mmHg). Além disso, o tamanho do ovário e dos folículos, bem como o tratamento hormonal prévio das fêmeas doadoras de oócitos, também estão diretamente relacionados à qualidade e à quantidade de COCs obtidos.

Fluxo e pressão de aspiração

O fluxo e a pressão de aspiração, mensurados por mL água/ minuto e mmHg, respectivamente, consistem em importantes aspectos físicos da aspiração folicular com agulha acoplada à bomba a vácuo e estão diretamente relacionados à eficiência da recuperação de COCs.

Segundo Rodríguez et al. (2006), o fluxo de aspiração e a qualidade dos COCs, caracterizada, principalmente, pela presença de adequado revestimento de células do *cumulus*, são inversamente proporcionais, sendo que, para fluxos de 10, 20, 30, 40 e 50 mL água/min, foram obtidos 69,5%; 50,5%; 44,8%; 36,5% e 28,3% COCs considerados de boa qualidade, respectivamente. Diante disto, alguns autores preconizam a utilização de fluxos de aspiração entre 6,5 e 10 mL água/minutos (Rodríguez et al., 2000).

Quanto à pressão de aspiração, constata-se relação diretamente proporcional à quantidade e inversamente proporcional à qualidade dos COCs recuperados, uma vez que o aumento da pressão resulta na remoção parcial ou total das células do *cumulus*, do mesmo modo como constatado para o fluxo de aspiração (bovinos: Bols et al., 1997; Fry et al., 1997).

As pressões de aspiração com bomba a vácuo consideradas ótimas por Baldassarre et al. (2003) e Koeman et al. (2003), em ovinos e caprinos, variam de 50 a 70 mmHg. Pressões na ordem de 25 mmHg resultam em menores taxas de colheita (Alberio et al., 2002) enquanto que pressões mais elevadas, na ordem de 100 mmHg, resultam em menor proporção de COCs de boa qualidade (Morton et al., 2008).

Ainda segundo Morton et al. (2008), a melhor pressão de aspiração baseada na quantidade e na qualidade dos COCs recuperados não necessariamente é ótima para o desenvolvimento embrionário, visto que a força mecânica exercida sobre o oócito pela pressão de aspiração pode afetar sua capacidade de desenvolvimento. Deste modo, enquanto Tervit et al. (1995) obtiveram melhores taxas de desenvolvimento embrionário para COCs aspirados com pressão de 15, 20 e 50 mmHg, Morton et al. (2008) relataram melhores resultados quando COCs foram aspirados com pressão de 50 e 100 mmHg.

No entanto, quando se compara o efeito da pressão e do fluxo de aspiração sobre a taxa de desenvolvimento embrionário, outros fatores também devem ser considerados, como comprimento e diâmetro da cânula de aspiração, comprimento e calibre da agulha, uma vez que estes podem interferir nos resultados obtidos (Rodríguez et al., 2006).

Cânula de aspiração e agulha

O calibre da agulha e da cânula de aspiração empregadas no processo de aspiração folicular também influencia a eficiência da recuperação dos COCs. Rodríguez et al. (2006) constataram que a proporção de COCs considerados de boa qualidade foi maior quando cânulas de aspiração de menor diâmetro foram utilizadas, obtendo valores de 34,9%; 32,3% e 28,1% para tubos com diâmetro de 1, 2 e 3 mm, respectivamente, provavelmente devido à menor turbulência dentro da cânula.

Já as agulhas apresentam três importantes variáveis: comprimento, diâmetro e largura do bisel. Segundo Bols et al. (1997), em bovinos, o bisel determina a porcentagem de colheita dos COCs, e o diâmetro da agulha determina a qualidade dos COCs recuperados. Deste modo, quanto menor o diâmetro da agulha, maior a força de atrito sobre o COCs e, conseqüentemente, maior a possibilidade de remoção das células do *cumulus*. Comumente, preconiza-se a utilização de agulhas de calibre intermediário, 18 (Baldassarre et al., 1996), 20 (Ptak et al., 1999) e 21 (O'Brien et al., 1997), com taxas de recuperação de oócitos ente 50,4% e 88,2%.

Rodríguez et al. (2006) relataram ainda que, enquanto o calibre (18 ou 20) não afetou a eficiência da aspiração folicular, o comprimento da agulha interferiu na qualidade dos COCs obtidos, sendo que melhores resultados foram constatados com agulhas curtas. Isto porque, quanto menor o trajeto percorrido pelos COCs, menores são os danos sofridos.

Em bovinos, as agulhas longas são amplamente utilizadas na aspiração *in vivo*, devido à maior rigidez (Brogliatti e Adams, 1996). Já em ovinos, considerando os melhores resultados obtidos com agulhas curtas, a incorporação de um extensor de aço rígido com intuito de permitir o uso destas agulhas na aspiração *in vivo* (Rodríguez et al., 2006).

Ainda segundo Rodríguez et al. (2006), a eficiência da recuperação dos COCs depende da associação entre diversas variáveis, sendo que a combinação preconizada para aspiração folicular em ovelhas envolve fluxo



de aspiração de 10 ou 20 mL água/min, cânulas de aspiração de menor diâmetro (1 ou 2 mm) e agulhas curtas de calibre 18 ou 20.

Tamanho do ovário

Segundo Wani et al. (1999), a recuperação de COCs por meio da aspiração folicular é significativamente maior em ovários de tamanho superior a 5x7x9 mm do que em ovários menores, provavelmente devido à quantidade reduzida de folículos visíveis em ovários pequenos. Desta forma, quando se trabalha com ovários de fêmeas pré-púberes oriundos de abatedouros preconiza-se a utilização da técnica de *slicing* para recuperação dos COCs, visto que a aspiração folicular é dificultada pelo pequeno tamanho do ovário.

Tamanho dos folículos

Segundo Arlotto et al. (1996), em bovinos, o tamanho do folículo está diretamente relacionado ao diâmetro do óocito, sendo que óocitos de maior diâmetro apresentam maior potencial de desenvolvimento em blastocistos devido ao acúmulo de RNA mensageiro (mRNA) e de proteínas (Lazzari et al., 1994).

Em seus estudos, Rodríguez et al. (2006) constataram que o tamanho dos folículos não afetou a taxa de recuperação oocitária por meio da aspiração, mas a proporção de COCs de boa qualidade, caracterizada pela presença de várias camadas compactas de células do *cumulus* e ooplasma homogêneo, foi mais elevada em folículos grandes (77,9%), com 5 a 7 mm de diâmetro, e médios (64,4%), com 3 a 5 mm de diâmetro. Crozet et al. (1995) observaram ainda que COCs oriundos de folículos grandes (>5mm) sofreram melhor maturação *in vitro* que aqueles oriundos de folículos pequenos (2-5mm).

Considerando estas informações, Rodríguez et al. (2006) inferiram que apenas folículos grandes deveriam ser selecionados para aspiração com intuito de reduzir o número de punções e danos ao ovário, assim como, o tempo de intervenção cirúrgica e de exposição do animal à anestesia.

Ainda segundo estes mesmos autores, conforme o tamanho do folículo, há uma combinação de variáveis que garante maior eficácia do método de aspiração. Em folículos pequenos (<3mm) ou médios (3-5mm), baixo fluxo ou pressão de aspiração e menor diâmetro da cânula de aspiração permitem melhores resultados. O contrário ocorre com os folículos pré-ovulatórios (>5mm), para os quais é mais adequado alto fluxo ou pressão de aspiração e cânula de aspiração de maior diâmetro, uma vez que, sob estímulo gonadotrófico, próximo à ovulação, ocorre síntese de uma matriz extracelular rica em ácido hialurônico pelas células do *cumulus*, a qual confere ao fluido folicular aspecto viscoso, dificultando a passagem do COCs em cânulas de menor diâmetro e sob baixo fluxo ou pressão de aspiração (Baldassarre et al., 1994).

Tratamento hormonal prévio

Os COCs destinados à produção *in vitro* de embriões ovinos podem ser obtidos de fêmeas adultas ou pré-púberes, submetidas ou não a tratamento hormonal prévio. O tratamento hormonal visa estimular o crescimento folicular, permitindo a obtenção de maior número de COCs por ovário, sendo indicado principalmente para fêmeas pré-púberes, fêmeas em anestro estacional ou geneticamente superiores (Bernardi, 2005). Surge ainda como alternativa à problemática de se trabalhar com uma população folicular aleatória e eventualmente pequena observada em fêmeas não submetidas a tal tratamento (Baldassarre, 2008).

A resposta ovariana das fêmeas estimuladas, no entanto, está na dependência de diversos fatores: idade, indivíduo, tratamento hormonal e *status* folicular antes da estimulação (Ptak et al., 2003). Em geral, em fêmeas previamente estimuladas com hormônios, o número de COCs obtidos é maior do que aquele obtido de fêmeas não estimuladas, independentemente do método utilizado. Ainda segundo O'Brien et al. (1997), COCs obtidos de fêmeas previamente tratadas hormonalmente apresentam melhor capacidade de maturação, fertilização e desenvolvimento *in vitro*.

Comumente, as fêmeas doadoras de óocitos são sincronizadas com dispositivos intravaginais: CIDR intravaginal ou esponjas impregnadas com progesterona, associados ou não à prévia administração de análogos de prostaglandina F₂-alfa (Baldassarre, 2008). O desenvolvimento folicular é estimulado mediante a administração de gonadotrofinas: múltiplas doses de FSH (hormônio foliculo estimulante); dose única de FSH associado à eCG (gonadotrofina coriônica equina); ou ainda dose única de eCG (Bernardi, 2005; Gibbons et al., 2007).

Vários protocolos de estimulação hormonal vêm sendo empregados, visando potencializar a quantidade, qualidade, e capacidade de desenvolvimento oocitário *in vitro* (Bernardi, 2005). Berlinguer et al. (2004) observaram que fêmeas não submetidas ao tratamento hormonal apresentaram maior proporção de folículos pequenos (<2mm) e menor quantidade total de folículos que aquelas submetidas ao tratamento. Ainda segundo estes autores, fêmeas tratadas com doses decrescentes de FSH (38,8; 28,8; 19,2 e 9,6 UI), administradas com intervalo de 12 horas, apresentaram maior número de folículos grandes (>5 mm) que aquelas submetidas a



tratamento com doses constantes de FSH (4 doses de 24 UI a cada 12 horas).

Estes grupos experimentais não diferiram quanto à qualidade dos oócitos obtidos, à taxa de maturação e à taxa de fertilização, no entanto, maior porcentagem de COCs provenientes de fêmeas submetidas a doses constantes de FSH alcançou o estágio de blastocisto. Segundo Berlinguer et al. (2004), uma provável explicação para o menor potencial de desenvolvimento embrionário no tratamento hormonal com dosagem decrescente de FSH, se deve ao fato de as duas primeiras altas doses deste hormônio induzirem a um desenvolvimento folicular rápido e anormal, resultando em assincronia entre crescimento do oócito e *status* folicular (Blondin et al., 1996). Além disso, a elevada concentração de estrógeno no fluido folicular de folículos maiores que 5 mm pode interferir no potencial de desenvolvimento oocitário (Becker et al., 2002).

Já Gibbons et al. (2007) observaram que a administração de dose única de 60mg de FSH associada a 300 UI eCG, 24 horas antes da recuperação dos COCs por aspiração folicular laparoscópica, elevou a quantidade de grandes folículos e, conseqüentemente, maximizou o número de COCs recuperados, sem alterar a qualidade oocitária. Além disso, estes autores relataram a possibilidade de repetição deste protocolo em intervalos de quatro dias, sem provocar qualquer efeito prejudicial sobre quantidade e qualidade de folículos e de COCs recuperados.

Com relação à estimulação hormonal com eCG, Stangl et al. (1999) observaram que a quantidade de COCs recuperados foi maior em fêmeas tratadas com dose única de 1500 UI eCG do que em fêmeas não tratadas, no entanto, não houve diferença significativa na qualidade dos complexos *cumulus*-oócito.

O'Brien et al. (1997) constataram ainda que a aplicação de dose única de estrógeno associado à progesterona, antes da estimulação de fêmeas pré-púberes com gonadotrofinas, aumenta o percentual de blastocistos obtidos por oócitos clivados e reduz a mortalidade embrionária. Já Valasi et al. (2007) observaram que o desenvolvimento folicular e a quantidade de COCs recuperados podem ser potencializados quando a dose de FSH é ajustada ao peso corporal das fêmeas aspiradas.

É importante considerar, ainda, os fatores intrínsecos da doadora de oócitos, em particular: condição corporal, raça, idade, e potencial genético, pois estes influenciam a dinâmica folicular e, conseqüentemente, a qualidade e o número de COCs obtidos (Cognié et al., 2004).

Considerações finais

Considerando-se que o sucesso da PIV está diretamente relacionado à qualidade oocitária, depreende-se a necessidade de novas investigações sobre as variáveis implicadas na eficiência dos diferentes métodos de obtenção de COCs e conseqüente aperfeiçoamento de biotecnia, para que se possa dispor de uma efetiva ferramenta de melhoramento genético.

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.
- Arlotto T, Schwartz JL, First NL, Leibfried-Rutledge ML.** Aspects of follicle and oocyte stage that affect *in vitro* maturation and development of bovine oocytes. *Theriogenology*, v.45, p.943-956, 1996.
- Baldassarre H.** Tecnologias reprodutivas de última geração. In: Aisen EG. Reprodução ovina e caprina. São Paulo: MedVet, 2008. p.179-183.
- Baldassarre H, Furnus CC, Matos DG, Pessi H.** *In vitro* production of sheep embryos using laparoscopic folliculocentesis: alternative gonadotrophin treatments for stimulation of oocyte donors. *Theriogenology*, v.45, p.707-717, 1996.
- Baldassarre H, Matos DG, Furnus CC, Castro TE, Fischer EIC, Matos DG.** Technique for efficient recovery of sheep oocytes by laparoscopic folliculocentesis. *Anim Reprod Sci*, v.35, p.145-150, 1994.
- 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.
- Becker AR, Colenbrander B, Bevers MM.** Effect of 17beta - estradiol on the *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Theriogenology*, v.58, p.1663-1673, 2002.
- Berlinguer F, Leoni G, Bogliolo L, Pintus PP, Rosati I, Naitana S.** FSH different regimes affect the developmental capacity and cryotolerance of embryos derived from oocytes collected by ovum pick-up in donor sheep. *Theriogenology*, v.61, p.1477-1486, 2004.
- Bernardi ML.** Produção *in vitro* de embriões ovinos. *Acta Sci Vet*, v.33, p.1-16, 2005.
- Blondin P, Coenen K, Guibault LA, Sirard MA.** Superovulation can reduce the developmental competence of bovine embryos. *Theriogenology*, v.46, p.1191-1203, 1996.
- Bogliolo L, Ariu F, Fois S, Rosati I, Zedda MT, Leoni G, Succu S, Pau S, Ledda, S.** Morphological and biochemical analysis of immature ovine oocytes vitrified with or without cumulus cells. *Theriogenology*, v.68, p.1138-1149, 2007.



- Bols PEJ, Ysebaert MT, Soom AV, Kruif AD, Van Soom A, De Kruif A.** Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocyte complexes. *Theriogenology*, v.47, p.1221-1236, 1997.
- Brogliatti GM, Adams GP.** Ultrasound-guided transvaginal oocyte collection in prepubertal calves. *Theriogenology*, v.45, p.1163-1176, 1996.
- Cognie Y, Poulin N, Locatelli Y, Mermillod, P.** State of the production, conservation and transfer of *in vitro* produced embryos in small ruminants. *Reprod Fertil Dev*, v.16, p.437-445, 2004.
- Crozet N, Ahmad Ali M, Dubos MP.** Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation fertilization and culture *in vitro*. *J Reprod Fertil*, v.103, p.293-298, 1995.
- Deminicis BB, Lima LCO, Araújo SAC, Lunga L, Blume MC.** Avaliação de modelos simulados de sistemas de produção de cordeiros para abate em pequenas propriedades. *PUBVET*, v.2, p.1-19, 2008.
- Fry RC, Niall EM, Simpson TL, Squires TJ, Reynolds J.** The collection of oocytes from bovine ovaries. *Theriogenology*, v.47, p.977-987, 1997.
- Gibbons A, Bonnet FP, Cueto MI, Catala M, Salamone DF, Gonzalez-Bulnes A.** Procedure for maximizing oocyte harvest for *in vitro* embryo production in small ruminants. *Reprod Domest Anim*, v.42, p.423-426, 2007.
- Gibbons A, Bonnet FP, Cueto MI, Salamone D, Catala M.** Colheita de oócitos guiada por laparoscopia em caprinos e ovinos. *Acta Sci Vet*, v.36, supl. 2, p.s223-230, 2008.
- Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF.** Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 2.ed. São Paulo: Varela, 2008. 340p.
- 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.
- Kühholzer B, Müller S, Treuer A, Seregi J, Besenfelder U, Brem G.** Repeated endoscopic ovum pick-up in hormonally untreated ewes: a new technique. *Theriogenology*, v.48, p.545-550, 1997.
- Lazzari, G.** Functional changes in the somatic and germinal compartments during follicle growth in pigs. *Anim Reprod Sci*, v.35, p.119-130, 1994.
- Moraes JCF, Souza DCJH, Jaume CM.** Organização e gestão de um programa de controle da reprodução ovina com foco no mercado. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.227-233, 2007.
- Morton KM, Maxwell WMC, Evans G.** Effect of aspiration pressure during oocyte harvesting on oocyte recovery and *in vitro* development of ovine oocytes. *Reprod Domest Anim*, v.43, p.106-110, 2008.
- 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.
- Ptak G, Dattena M, Loi P, Tischner M, Cappai P.** Ovum pick-up in sheep: efficiency of *in vitro* embryo production, vitrification and birth of offspring. *Theriogenology*, v.52, p.1105-1114, 1999.
- Ptak G, Tischer M, Bernabo N, Loi P.** Donor-dependent developmental competence of oocytes from lambs subjected to repeated hormonal stimulation. *Biol Reprod*, v.69, p.278-285, 2003.
- 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.
- Rodríguez C, Anel L, Anel E, Kaabi M, Boixo JC, De Paz P, Olmedo J.** Variación de la respuesta ovárica en aspiraciones foliculares repetidas en corderas. In: Libro de Ponencias y Comunicaciones de las XXV Jornadas Científicas de la Sociedad Española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. Teruel, Espanha: SEOC, 2000. p.571-574.
- 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.
- Shirazi A, Shams-Esfandabadi N, Hosseini SM.** A comparison of two recovery methods of ovine oocytes for *in vitro* maturation. *Small Rumin Res*, v.58, p.283-286, 2005.
- Shirazi A, Shams-Esfandabadi N, Hosseini SM, Karimi I.** The presence of cumulus cells on nuclear maturation of sheep oocytes during *in vitro* maturation. *Small Rumin Res*, v.68, p.291-295, 2007.
- Simplicio AA, Freitas VJF, Fonseca JF.** Biotécnicas da reprodução como técnicas de manejo reprodutivo em ovinos. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.234-246, 2007.
- Soom AV, Tanghe S, Pauw ID, Maes D, Kruif A.** Function of the cumulus oophorus before and during mammalian fertilization. *Reprod Dom Anim*, v.37, p.144-151, 2002.
- Stangl M, Kühholzer B, Besenfelder U, Brem G.** Repeated endoscopic ovum pick-up in sheep. *Theriogenology*, v.52, p.709-716, 1999.
- Tervit HR, Smith JF, McGowan LT, Pugh PA.** Birth of lambs from embryos produced *in vitro* following laparoscopic recovery of follicular oocytes. *Proc Aust Soc Reprod Biol*, v.27, p.68 1995.
- Traldi AS.** Biotécnicas aplicadas em reprodução de pequenos ruminantes. In: Congresso Internacional FEINCO, 3, 2008, São Paulo. Anais... São Paulo: FEINCO, 2008. p.1-11.
- Valasi I, Leontides L, Papanikolaou TH, Amiridis GS.** Age, FSH Dose and Follicular Aspiration Frequency Affect Oocyte Yield from Juvenile Donor Lambs. *Reprod Domest Anim*, v.42, p.230-237, 2007.



Vassena R, Mapletoft RJ, Allodi S, Singh J, Adam GP. Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. *Theriogenology*, v.15, p.923-932, 2003.

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

Wani NA, Wani GM, Khan MZ, Salahudin S. Effect of oocyte harvesting techniques on in vitromaturation and in vitro fertilization in sheep. *Small Rumin Res*, v.36, p.63-67, 2000.

Wani NA, Wani GM, Khan MZ, Sidiqi MA. Effect of different factors on the recovery rate of oocytes for in vitro maturation and in vitro fertilization procedures in sheep. *Small Rumin Res*, v.34, p.71-76, 1999.
