

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

**MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS DE OVELHAS
SANTA INÊS SUBMETIDAS A SUCESSIVAS SESSÕES DE
ASPIRAÇÃO FOLICULAR POR VIDEOLAPAROSCOPIA**

Luciana Cristina Padilha

Médica Veterinária

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
FEVEREIRO 2012

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

**MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS DE OVELHAS
SANTA INÊS SUBMETIDAS A SUCESSIVAS SESSÕES DE
ASPIRAÇÃO FOLICULAR POR VIDEOLAPAROSCOPIA**

Luciana Cristina Padilha

Orientador: Prof. Dr. Wilter Ricardo Russiano Vicente

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária (Reprodução Animal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
FEVEREIRO 2012

Padilha, Luciana Cristina

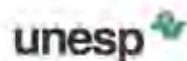
P123 Maturação *in vitro* de oócitos de ovelhas santa inês
m submetidas a sucessivas sessões de aspiração folicular
por videolaparoscopia / Luciana Cristina Padilha. – –
Jaboticabal, 2012.
viii, 84 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual
Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,
2012

Orientador: Wilter Ricardo Russiano Vicente
Banca examinadora: Eliandra Antônia Pires Buttler,
Marcelo Marcondes Seneda
Bibliografia

1. Laparoscopia. 2. Maturação citoplasmática. 3.
Maturação nuclear. 4. Ovino. I. Título. II. Jaboticabal-
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:612.6:636.3



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

CAMPUS DE JABOTICABAL

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: MATURAÇÃO *in vitro* DE OÓCITOS DE OVELHAS SANTA INÊS
SUBMETIDAS A SUCESSIVAS SSSÕES DE ASPIRAÇÃO FOLICU-
LAR POR VIDEOLAPAROSCOPIA

AUTORA: LUCIANA CRISTINA PADILHA

ORIENTADOR: Prof. Dr. WILTER RICARDO RUSSIANO VICENTE

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. ARACÉLLE ELISANE ALVES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM MEDICINA
VETERINÁRIA, Área: REPRODUÇÃO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. WILTER RICARDO RUSSIANO VICENTE

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Profa. Dra. ELIANDRA ANTONIA PIRES BUTTLER

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Prof. Dr. MARCELO MARCONDES SENEDA

Departamento de Clínicas Veterinárias / Universidade Estadual de Londrina

Data da realização: 13 de fevereiro de 2012.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

LUCIANA CRISTINA PADILHA - nascida em 2 de agosto de 1983, em Campinas - SP. Médica Veterinária formada pela Universidade Estadual de Londrina – PR, em dezembro de 2007. Fez Residência em Obstetrícia Veterinária e Reprodução Animal de 2008 a 2010 na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Câmpus de Jaboticabal. Em março de 2010 ingressou no Mestrado pelo Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária (Reprodução Animal) na mesma instituição.

“Todo projeto de vida que não for feito com amor, compreensão e razão, não deve então ser seguido.”

Albert Einstein

DEDICO

Aos meus queridos pais, Glória e Nivaldo, que me deixaram voar, bem alto, sempre com a certeza de que estariam ao meu lado para me segurar. Se hoje estou feliz e realizada por ser médica veterinária é graças a vocês que permitiram e permitem que todos os meus sonhos se realizem. Muito obrigada! Amo vocês!

À minha vó Josefa (*in memorian*), que rezou com muita fé para eu passar no mestrado. Que falta me faz ir correndo ao seu abraço. Mas hoje, mesmo em pensamento, tenho a certeza de que continua rezando por mim...

À minha tia, a “madrinha” Nialva (*in memorian*), pelo exemplo de dedicação, força e perseverança contra uma doença tão injusta. Descanse em paz!

AGRADECIMENTOS

Já é difícil expressar o que sentimos frente a frente, no dia-a-dia e no papel isso se torna ainda mais complicado. Ainda que as palavras não sejam as mais bonitas, os agradecimentos escritos aqui são realmente sinceros. Sintam-se agradecidos da forma mais verdadeira que possa existir....

À Deus, por nos permitir ter a escolha de nos tornarmos pessoas melhores...

Ao meu noivo, meu amor e meu melhor amigo, Eduardo Nakaghi. Difícil colocar no papel a imensidão do meu sentimento por você! Estou muito feliz por tê-lo ao meu lado e mais ainda, por concretizarmos este ano, nosso sonho de ficarmos juntos para sempre! Muito obrigada pelo seu amor e sua presença carinhosa em minha vida! Te amo muito!

Aos meus irmãos, Guilherme e Maura, e meu cunhado Robinson (Preto), pela amizade, carinho e a certeza de que sempre estarão ao meu lado. E principalmente minha irmã, por ter me proporcionado a felicidade de ser tia de duas meninas maravilhosas, Júlia e Luiza, meus maiores tesouros. Amo todos vocês!

À minha família, meu vô Luiz, minhas tias, tios, primas e primos, minha imensa gratidão por me apoiarem sempre! Agradeço todos os dias pela oportunidade de fazer parte desta família abençoada! Amo todos vocês!

À D. Laura e S. Edson Nakaghi, pessoas pelas quais tenho muita admiração e carinho, e sou muito grata por terem me acolhido em todos os momentos! Ao Leonardo e Ricardo Nakaghi, por fazerem esta união ainda mais especial! Estou muito feliz de poder fazer parte desta família maravilhosa!

Ao Professor Wilter, pela oportunidade de chegar onde estou hoje, por sempre me incentivar e principalmente por acreditar em mim. Sou muito feliz por poder trabalhar com o senhor. MUITO OBRIGADA!

Ao Professor Marcelo Seneda, pelo início de todo meu trabalho desde a graduação e pela amizade, por sempre ter me acolhido nas horas que mais

precisei. Tenho grande admiração pelo senhor e sua família e serei eternamente grata a vocês por tudo o que fizeram por mim. Obrigada por participar da minha banca, é uma honra e alegria!

Às Professoras e amigas Eliandra e Maricy, pessoas maravilhosas e nas quais me espelho, tanto pessoal quanto profissionalmente. Meu mais sincero obrigada por tudo que me ensinaram e me ensinam. Vocês me estenderam as mãos e me mostraram o caminho. Sem vocês não teria conseguido fazer este trabalho. Muito obrigada!

Ao Pedro Paulo, grande amigo e companheiro de trabalho. Muito obrigada por tornar real este trabalho, sempre ao meu lado, fazendo tudo se tornar possível.

À minha prima, meu “irmão”, Ana Carolina, pela amizade e companheirismo, e pelo primeiro caderno do mestrado, e que por sua orientação, tudo foi anotado! E pela força, quando o desespero bateu e achei que nada ia dar certo! Obrigada e saudades!

Às queridas e grandes amigas Paula Savi e Tathiana Motheo por sempre cuidarem de mim!!

Aos meus queridos amigos da Obstetrícia, que sempre me ajudaram, deram força (muita força!) e me apoiaram nestes anos: Paula Savi, Tathiana Motheo, Giuliano Mostacchio, Aracelle Alves, Fabiana Voorwald, Caio Tiosso, Diogo Cardilli, Marco Augusto Silva, Maria Emília, Allana Silva, Valeska Rodrigues, Patrícia Medeiros, Felipe Barros, Leandro Coutinho, Beatrice Macente e Raquel Gutierrez. E às minhas amigas de residência Mariana Rondelli e Ana Paula Gering.

À Marina R. Lima, pela disposição em ter me ajudado e me ensinado muito na hora que mais precisei.

Ao Professor Joaquim Mansano Garcia, por estar sempre a disposição para esclarecer as dúvidas e nos proporcionar conhecimentos.

À Professora e amiga Maria Isabel por ter me ensinado tanto e me mostrado caminho para eu ingressar na Unesp Jaboticabal.

Às minhas amigas, minhas irmãs de coração, Bianca Ferruccio, Paula Canhos, Valéria Lisondo e Jakeline Zanon. Mesmo a distância, nossa amizade será sempre verdadeira e eterna.

Aos colegas e amigos do Departamento de Reprodução Animal, em especial ao Edson Aguiar, Isabel Natarelli, Roberta Vantini, Ivo Luis Júnior e Naiara Zoccal.

À **FAPESP** - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa, o que tornou possível a realização deste trabalho com mais responsabilidade, pela dedicação exclusiva à pesquisa.

Aos funcionários e enfermeiros do Hospital Veterinário, principalmente Anésia, Arnildo, D. Izilda e Zé (esterilização). Muito obrigada por sempre terem me ajudado!

Aos animais, a razão de todo esse trabalho!

Meu muito obrigada a todos!

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	Página iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. Métodos de obtenção de oócitos em ovinos.....	5
2.2. Maturação oocitária.....	11
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Localização e caracterização da área.....	17
3.2. Animais e tratamentos.....	17
3.3. Preparo dos animais e protocolo anestésico.....	18
3.4. Vídeolaparoscopia para aspiração folicular.....	19
3.5. Análise dos folículos visibilizados, aspirados e oócitos recuperados.....	22
3.6. Maturação <i>in vitro</i>	23
3.7. Avaliação do estágio de maturação nuclear e citoplasmática.....	24
3.8. Classificação dos estádios de maturação nuclear.....	24
3.9. Classificação dos estádios de maturação citoplasmática.....	26
3.10. Análise estatística.....	26
4. RESULTADOS.....	27
5. DISCUSSÃO.....	33
5.1. Aspiração folicular e recuperação oocitária.....	33
5.2. Influência do número de sessões de aspiração folicular sobre a taxa de recuperação.....	36

5.3. Influência do tamanho do folículo puncionado.....	39
5.4. Influência da estimulação hormonal sobre as taxas de recuperação.....	40
5.5. Maturação <i>in vitro</i> de oócitos recuperados pela aspiração folicular por videolaparoscopia.....	43
5.6. Considerações finais.....	48
6. CONCLUSÕES.....	50
7. REFERÊNCIAS.....	51
APÊNDICES.....	81

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Número de oócitos recuperados e número de oócitos recuperados viáveis (GI e GII) por ovelha no total das nove semanas de aspiração com intervalo de sete dias entre cada aspiração. Não houve diferença estatística ($p>0,05$). Jaboticabal, 2011.....	30
Tabela 2: Porcentagem de maturação nuclear, citoplasmática e degenerados dos oócitos recuperados, no total das nove aspirações. Comparação entre as classificações. Jaboticabal, 2011.....	31
Tabela 3: Classificação dos oócitos (%) quanto a maturação nuclear durante as nove semanas (S) de experimento. Frequência relativa (%) e absoluta. Jaboticabal, 2011.....	31
Tabela 4: Classificação dos oócitos quanto a maturação citoplasmática durante as nove semanas (S) de experimento. Frequência relativa (%) e absoluta. Jaboticabal, 2011.....	32

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Imagem da cavidade abdominal de ovelha em aumento de 10x, onde se observa em destaque: fixação do ovário (circulo) com pinça atraumática (1), e presença de folículos (seta) (A); posicionamento da agulha (2) para a punção folicular (B); e aspiração dos folículos (C e D).....	21
Figura 2: A: Meio de lavagem (esquerda) e meio de maturação (direita). B e C: placas de cultivo contendo gotas de meio de maturação sob óleo mineral.....	23
Figura 3: Fotomicrografia de oócitos de ovelhas Santa Inês corados para avaliação da competência meiótica através da coloração da cromatina pela técnica de fluorescência (Hoescht 33342). A: MI; B: MII; C: MII com presença de CP (seta) em campo claro; D: MII com presença de CP (seta). C e D - mesmo oócito.....	25
Figura 4: Fotomicrografia de oócitos de ovelhas Santa Inês corados para avaliação da maturação citoplasmática através da coloração dos grânulos corticais (<i>Lens culinaris</i> , FITC conjugada). A: Maturação citoplasmática incompleta; B: Maturação citoplasmática incompleta; C: Maturação citoplasmática completa.....	26
Figura 5: Representação gráfica do número de folículos visibilizados (FV), folículos aspirados (FA) e oócitos recuperados (OR) pelo tempo em semanas. Não houve diferenças significativas entre as sessões ($p>0,05$).....	28
Figura 6: Representação gráfica da classificação qualitativa dos oócitos durante as nove semanas de aspiração folicular. Não houve diferença estatística na qualidade oocitária ao longo das observações entre as sessões ($p>0,05$).....	29

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	Albumina sérica bovina
°C	Graus Celsius
CL	Corpo lúteo
cm	Centímetros
CP	Corpúsculo polar
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
COC	Complexo <i>cumulus</i> -oócito
D0	Dia zero do protocolo
D5	Quinto dia do protocolo
eCG	Gonadotrofina coriônica equina
E ₂	Estradiol
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FITC	Conjugado isotiocianato de fluoresceína
FSHp	Hormônio folículo estimulante sintético
GC	Grânulos corticais
h	Horas
IM	Intramuscular
Kg	Kilograma
L	Litros
LH	Hormônio luteinizante
LOPU	Aspiração folicular por laparoscopia
MAP	Acetato de Medroxiprogesterona
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
mg	Miligrama
mm Hg	Milímetro de mercúrio
mL	Mililitros
MI	Metáfase I
MII	Metáfase II
O ₂	Oxigênio
PBS	Tampão fosfato salino
%	Porcentagem
PIA	Pressão intrabdominal
PIV	Produção <i>in vitro</i>
PVA	Álcool polivinil
QVG	Quebra de vesícula germinativa
SB	Solução de bloqueio

SFB	Soro Fetal Bovino
TCM 199	Meio de cultura de tecidos 199
TE	Transferência de Embriões
UI	Unidade internacional
VG	Vesícula germinativa

**MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS DE OVELHAS SANTA INÊS SUBMETIDAS A
SUCESSIVAS SESSÕES DE ASPIRAÇÃO FOLICULAR POR
VIDEOLAPAROSCOPIA**

RESUMO - O sucesso da produção *in vitro* de embriões requer a utilização de uma técnica de recuperação eficiente de oócitos, e os melhores resultados têm sido obtidos pela aspiração laparoscópica. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos de sucessivas sessões de aspirações foliculares na quantidade, qualidade e capacidade de maturação *in vitro* de oócitos obtidos de ovelhas submetidas à estimulação hormonal prévia (80 mg FSH + 300 UI eCG). Foram selecionadas seis ovelhas (n=6) da raça Santa Inês, as quais foram submetidas a nove sessões de aspiração folicular por vídeolaparoscopia com intervalo de sete dias, totalizando 56 aspirações. Ao final do período de cultivo de 24 horas, os oócitos foram corados e classificados quanto ao estágio de maturação nuclear e citoplasmática. A taxa de recuperação foi de $61,4 \pm 2\%$, observando-se ausência de variação entre as sessões ($p > 0,05$), e a média de oócitos recuperados por fêmeas de $6,4 \pm 2$ por semana, com um total de 249 oócitos recuperados, sendo a média de 42 ± 4 oócitos por fêmea no total das aspirações. Não houve diferença significativa entre a classificação da maturação nuclear ($p = 0,937$), mas sim entre a maturação citoplasmática ($p < 0,0001$), entretanto não foi observado variação estatística entre as semanas quanto a maturação nuclear ($p = 0,908$) e a maturação citoplasmática ($p = 0,792$). Concluímos que após nove sessões consecutivas de aspiração folicular o número e a qualidade dos oócitos recuperados permaneceram constantes assim como as taxas obtidas de maturação nuclear e citoplasmática, demonstrando a viabilidade desta técnica para repetidas aspirações foliculares em uma mesma doadora.

Palavras-chave: laparoscopia, maturação citoplasmática, maturação nuclear, ovino

**IN VITRO MATURATION OF OVINE OOCYTES OF SANTA INÊS BREED
SUBMITTED TO SUCCESSIVE FOLLICLE ASPIRATION SESSIONS**

SUMMARY - The success of *in vitro* production requires an effective collection technique as well as an efficient oocyte recovery. In addition, the best results have been applied for using laparoscopic aspiration. The aim of the present study was to evaluate if successive follicle aspiration sessions may interfere on quantity, quality and *in vitro* maturation of oocytes recovery from ewes submitted to hormonal stimulation. Santa Ines ewes (n=6) were submitted to a total of nine sessions (one session per week) of follicle aspiration performed by videolaparoscopy. The oocytes from each session were classified in according to quality and to *in vitro* maturation capacity. Nuclear and cytoplasmatic maturation were assessed. The recovery rate was $61,39 \pm 19,97\%$, with no variation among the sessions ($p > 0,05$) and the mean of recovered oocytes per ewe was $6,36 \pm 2,0$ per week. There was no significant difference among nuclear maturation classification ($p = 0,937$), but there was significant difference among cytoplasmatic maturation ($p < 0,0001$). There was no statistical variation among weeks to nuclear maturation ($p = 0,908$), neither to cytoplasmatic maturation ($p = 0,792$). We could conclude that after nine consecutive sessions of follicle aspiration the number and quality of the recovery oocytes were constant, as well as nuclear and cytoplasmatic maturation rates. Therefore, laparoscopic recovery of oocytes is a viable technique for repeated follicle aspiration in the same donor.

Keywords: laparoscopy, cytoplasmatic maturation, nuclear maturation, ovine

1. INTRODUÇÃO

A ovinocultura é uma atividade pecuária de importância crescente em todo mundo (CARNEIRO et al., 2007). Este fato decorre de incentivos governamentais, ampliação do mercado consumidor, além da boa capacidade de adaptação desta espécie a diferentes condições de ambiente e a situação edafoclimáticas das mais rigorosas em todo mundo (GUSMÃO & ANDRADE MOURA, 2005). No entanto, irregularidades de oferta e qualidade das carcaças são fatores que limitam o consumo da carne ovina no Brasil (LEÃO, 2008).

A otimização na produção está diretamente relacionada a manejos nutricionais, sanitários e reprodutivos adequados. Neste quesito, a utilização de biotécnicas reprodutivas, associadas a programas de melhoramento genético tem possibilitado avanços importantes (CARNEIRO et al., 2007).

O incremento no uso de biotécnicas na reprodução animal vem promovendo melhorias na criação de animais de interesse zootécnico. Neste aspecto, os pequenos ruminantes se apresentam como um bom modelo para o desenvolvimento destas tecnologias, a exemplo do primeiro animal clonado por transferência nuclear de célula somática, entre as espécies domésticas, foi um ovino (FREITAS et al., 2007).

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 superestimulatórios. 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).

Repetidas colheitas laparoscópicas de oócitos seguidas de fertilização *in vitro* e cultivo dos zigotos até o estágio de blastocisto possibilitam a obtenção de um grande número de embriões e conseqüente aumento na progênie de fêmeas de elite, quando comparado à produção de embriões *in vivo*. Essas técnicas permitem produzir, em tempo relativamente curto, mais embriões a partir de uma mesma fêmea. A punção folicular também é menos invasiva e mais simples que a colheita de embriões dos cornos uterinos, e pode ser repetida em um número maior de vezes sem a necessidade de um tratamento hormonal (BESENFELDER et al., 1999).

Esta biotécnica envolve a colheita de oócitos e procedimentos *in vitro* (maturação – MIV, fertilização - FIV e o cultivo - CIV), até o estágio de desenvolvimento compatível para a transferência à receptora (BALDASSARE, 2008).

A escolha do melhor e mais eficiente método de recuperação de oócitos é o passo mais importante e o primeiro para o desenvolvimento embrionário de sucesso (BUCCIONE et al., 1990). A recuperação de oócitos de boa qualidade é a primeira etapa da prática de PIV, sendo muito importante, desde o envolvimento da qualidade e quantidade dos complexos *cumulus*-oócitos (COC) recuperados até a preservação dos ovários e bem estar do animal doador. A colheita pode ser feita em ovários de animais de abatedouro, animais vivos destinados à pesquisa ou de alto valor zootécnico. Apesar de vários fatores influenciarem a colheita, a finalidade de recuperar oócitos intactos é sempre a mesma. Sendo assim, como recuperar estes COCs de uma maneira mais eficaz é o início de todo trabalho. Além disso, um grande número de oócitos recuperados de boa qualidade é necessário, pois somente 30% aproximadamente destas células se desenvolvem em blastocistos (GULER et al. 2000; ALBERIO et al., 2002; MORTON et al., 2005a; SHABANKAREH & ZANDI, 2009).

Em pequenos ruminantes, nos quais não é possível, ou fácil, manipular o trato reprodutivo pelo reto como ocorre em bovinos e eqüinos, opta-se por intervenções cirúrgicas para facilitar o diagnóstico e manejo da reprodução, sendo a mais antiga a laparotomia. Nesta técnica, no entanto, a exteriorização do trato reprodutivo inevitavelmente leva a algum grau de trauma cirúrgico e quase sempre à formação de aderências pós-operatórias envolvendo útero, tubas e ovário, o que a torna imprópria

como método de obtenção de oócitos, a médio e longo prazo, em especial em fêmeas de alto valor genético. Assim, uma alternativa é o emprego da laparoscopia, a qual é uma técnica menos invasiva, proporcionando recuperação mais rápida da doadora e podendo ser realizada diversas vezes na mesma fêmea. Por estas razões, 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 caprinos (CORDEIRO, 2006) e ovinos.

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. BALDASSARE (2008) relatou que os melhores resultados foram obtidos quando se utilizou a técnica de recuperação de oócitos por aspiração laparoscópica, e segundo MORTON et al. (2008), poderiam ser ainda melhores se o número de oócitos coletados fosse maior, sem prejudicar a competência de seu desenvolvimento.

O sucesso da PIV de embriões está totalmente relacionado a taxa de sucesso da MIV, a qual é fator limitante para todo o processo. Assim, mesmo após cuidadosa seleção de COCs homogêneos, somente 35% irão atingir completa maturação nuclear e citoplasmática e produzir blastocistos viáveis para serem transferidos (BLONDIN & SIRARD, 1995). Portanto, inadequada maturação citoplasmática ou nuclear resulta em baixas taxas de fertilização e desenvolvimento embrionário. De acordo com este fato, reconhecemos a necessidade de avaliar a condição de maturação citoplasmática e nuclear dos oócitos provenientes de um processo de aspiração folicular, o qual submete esta célula a certa pressão de vácuo, o que causa danos que comprometem a sua viabilidade. Sendo assim é que formulamos a hipótese se aspirações foliculares semanais, consecutivas, realizadas por videolaparoscopia interferem na obtenção de oócitos em quantidade e qualidade que permita adequada maturação *in vitro*, tanto citoplasmática quanto nuclear.

Por esta razão, aventou-se quantificar e avaliar a qualidade de oócitos provenientes de ovelhas superovuladas submetidas a várias sessões de aspiração folicular por videolaparoscopia, bem como verificar se a repetição deste procedimento influencia nas taxas de MIV dos oócitos recuperados.

Em vista do exposto, o escopo geral deste trabalho foi avaliar comparativamente as taxas de MIV, tanto nuclear quanto citoplasmática, de oócitos provenientes de ovelhas da raça Santa Inês superovuladas, submetidas à sucessivas sessões de aspiração folicular por videolaparoscopia, bem como estabelecer o número ideal de sessões consecutivas de aspirações, por pelo menos até nove semanas. Uma vez que esta técnica de aspiração folicular está sendo amplamente difundida, estes resultados trarão, em nosso entendimento, uma importante contribuição no avanço biotecnológico da reprodução animal, possibilitando a padronização de técnicas e gerando mais conhecimentos sobre os fenômenos biológicos da reprodução nesta espécie animal.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Métodos de obtenção de oócitos em ovinos

Em pequenos ruminantes os COCs podem ser obtidos *in vitro* a partir da aspiração de folículos ovarianos (SLAVIK et al., 1992; WATSON et al., 1994; SAMAKE et al., 2000), dissecação folicular (CROSBY et al., 1981; FUKUI et al., 1988) ou “slicing” (fatiamento) dos ovários (WAHID et al., 1992a, b; SAMAKE et al., 2000) provenientes de abatedouro ou, *in vivo*, por laparotomia, “ovum pick-up” guiada por laparoscopia (BALDASSARRE et al., 2002), ou ainda por “ovum pick-up” via transvaginal guiada por ultrassom (GRAFF et al., 1999). A maior parte destes métodos *in vitro* tem seu uso limitado à pesquisas, pois apresentam desvantagens que os tornam inviáveis para uso comercial. A abordagem por ultrassonografia apresenta uma baixa taxa de colheita (4,3 oócitos/doadora) (FREITAS, 2007), enquanto a por laparoscopia, realizada em ovinos e caprinos (BALDASSARRE et al., 1996; BALDASSARRE et al., 2002), apresenta uma taxa de colheita oocitária de aproximadamente 16 oócitos/doadora (FREITAS, 2007). A recuperação oocitária após LOPU em fêmeas hormonalmente tratadas fornece um bom número de oócitos/doadora/sessão, os quais são utilizados ao procedimento *in vitro*, sendo o primeiro passo a MIV (FREITAS, 2007).

A aspiração folicular por laparoscopia (LOPU) em ovelhas foi primeiramente descrita por SNYDER & DUKELOW (1974), os quais aspiraram 21 folículos e recuperaram 6 oócitos. Este procedimento foi então desenvolvido e a técnica de aspiração folicular por laparoscopia tem sido refinada (SMITH et al., 1994; TERVIT et al., 1992; 1993; 1995; BALDASSARE et al., 1994a, b; 1996), como a pressão de vácuo e o tipo de agulha, e após vinte anos, BALDASSARE et al. (1994 a, b) estudaram a LOPU em 46 ovelhas com uma taxa de recuperação de 82%. Dois anos subsequentes, estes autores produziram embriões *in vitro*, pela mesma técnica, em ovelhas superovuladas.

A colheita de oócitos imaturos por laparoscopia em conjunto com PIV é uma alternativa para MOET (Múltiplas Ovulações para Transferência de Embriões). LOPU combinada com PIV são usadas pra tentar minimizar os efeitos deletérios durante o desenvolvimento dos oócitos e dos embriões associado com superovulação em um programa de MOET, e pode ser um processo mais eficiente (KAFI & MCGOWAN, 1997). Um dos principais determinantes no número de embriões produzidos é o número de oócitos recuperados. Como mencionado anteriormente, segundo MORTON et al. (2008), a eficiência da tecnologia LOPU-PIV poderia ser melhorada se o número de oócitos coletados fosse maior sem prejudicar a competência de seu desenvolvimento.

Para o sucesso da MIV, os oócitos devem ser submetidos à maturação nuclear e citoplasmática *in vitro*. O meio de cultura usualmente empregado para maturação de oócitos de caprinos e ovinos é o TCM-199 tamponado e suplementado com piruvato, soro de origem animal tratado pelo calor e hormônios (FSH, LH, estradiol) (BALDASSARRE et al., 1996).

WANI et al. (2000) compararam 3 técnicas de recuperação de COCs de ovários de ovelhas de abatedouro e seus efeitos na maturação e fertilização *in vitro*: punção folicular (toda superfície ovariana puncionada com uma agulha hipodérmica 18 G), “slicing” dos ovários (incisões por toda superfície ovariana com uma lâmina de bisturi) e a aspiração folicular (folículos visíveis aspirados utilizando uma agulha hipodérmica 20 G acoplada a uma seringa). Nos dois primeiros métodos, os ovários permaneceram completamente submersos no meio de colheita na placa de Petri, enquanto os oócitos foram recuperados. Embora, o número total de oócitos recuperados por ovário por punção ($9,5 \pm 0,45$) e “slicing” ($9,5 \pm 0,4$) tenha sido significativamente maior do que por aspiração ($6,8 \pm 0,3$), a porcentagem de oócitos de melhor qualidade foi maior no método de aspiração folicular (64,4) comparado ao de punção (54,7) e “slicing” (54,3). As técnicas de punção e “slicing” obtiveram números similares de oócitos, entretanto, o método por “slicing” resultou na maior produção de debris, o que interferiu na seleção dos oócitos sob estereomicroscópio. Todavia, não houve diferença significativa nas taxas de maturação e fertilização dos oócitos obtidos pelas 3 técnicas e também em relação ao número de oócitos que atingiram a MII. Achado semelhante foi descrito em

bovinos (CAROLON et al., 1992), caprinos (PAWSHE et al., 1994) e ovinos (WAHID et al., 1992a,b). Outros estudos realizados em bovinos (IWASAKI et al., 1987; KATASKA, 1984; LONERGAN et al., 1991), caprinos (MOGAS et al., 1992; PAWSHE et al., 1994) e ovinos (WAHID et al., 1992a,b) encontraram resultados similares e demonstraram que a punção de toda superfície ovariana através de uma agulha hipodérmica 18 G é um método simples e eficiente de recuperação de alto número de oócitos morfolologicamente normais, o que também pode ser atribuído ao método por “slicing”. O baixo número de oócitos recuperados pela técnica de aspiração pode ser atribuído a presença de alguns folículos se encontrarem dentro do córtex, os quais podem ser alcançados através da punção ou “slicing” do ovário, mas não pela aspiração, evitando a perda de oócitos. Portanto, estes autores acreditam que a punção da superfície ovariana com uma agulha hipodérmica é um método simples e prático e o mais eficiente para colheita de oócitos em ovelhas, comparado ao “slicing”.

A videolaparoscopia com finalidade reprodutiva apresenta grande indicação em ovinos, pela dificuldade da transposição cervical. Com o uso de biotecnologias avançadas de reprodução assistida em pequenos ruminantes, a videolaparoscopia encontra atualmente espaço para sua utilização nas aspirações de folículo para colheita de oócitos, nos lavados uterinos para recuperação e transplante de embriões, ou simplesmente para uma inseminação artificial. (GHELLER, 2008)

A recuperação de oócitos imaturos seja por ultrassom ou LOPU em conjunto com a PIV é uma alternativa para a MOET. A natureza laparoscópica de recuperação de oócitos permite repetir o procedimento na mesma doadora maior quantidade de vezes que a recuperação de embriões por lavagem uterina, sendo esse um procedimento que deixa sequelas (aderências) que limitam sua repetibilidade no mesmo animal (GONÇALVES et al., 2002). Para obtenção de oócitos procedentes de animais vivos, de alto valor econômico e/ou que tenham uma história sanitária documentada, os melhores resultados obtidos foram através da aplicação da técnica de recuperação de oócitos por aspiração laparoscópica. Para recuperação de oócitos *in vivo* via transvaginal guiada por ultrassom, “ovum pick-up”, largamente realizada em bovinos, em pequenos ruminantes tal técnica é ainda bastante limitada, tornando-se de difícil execução até

para operadores com habilidade, além de ser mais traumática que por laparotomia ou a laparoscopia (TEIXEIRA et al., 2011a). Já a laparotomia inevitavelmente acarreta algum grau de trauma cirúrgico, necessitando-se de extremo cuidado para não ocorrer formação de aderências pós-operatórias (BASSO et al., 2008). Tais consequências tornam-na imprópria a médio e longo prazo, em especial em fêmeas de alto valor genético (FREITAS e SIMPLÍCIO, 2002). Por outro lado, a laparoscopia se destaca por ser menos invasiva, proporcionando recuperação mais rápida do animal e podendo ser realizada diversas vezes na mesma fêmea (TEIXEIRA, 2010). Mais recentemente esta técnica tem sido utilizada para a obtenção de oócitos *in vivo* para uso na pesquisa fundamental e na produção *in vitro* de embriões em pequenos ruminantes (BALDASSARRE et al., 2002; CORDEIRO, 2006).

Foi observado por TEIXEIRA (2010) e TEIXEIRA et al. (2011b, c) que aspirações foliculares consecutivas, através da videolaparoscopia em ovelhas não ocasionaram alterações macroscópicas no trato genital interno dos animais e nem alterações microscópicas nos ovários. Tais autores relataram que a repetição do procedimento de aspiração folicular não causou desconforto doloroso nos animais que pudesse limitar a técnica; o intervalo de sete dias entre as sessões de aspiração folicular permitiu a adequada recuperação dos animais; e ainda a sequência operatória para a realização das aspirações foliculares não causou lesões macro e microscópicas em nenhuma das estruturas avaliadas, particularmente nos ovários.

Durante os programas de OPU-PIV os oócitos são geralmente recuperados com uma agulha e uma seringa (KUHHOLZER et al. 1997; PTAK et al. 1999; STANGL et al. 1999; BERLINGUER et al. 2004; MORTON et al. 2005b) ou através de aspiração por bomba de vácuo com diferentes pressões (15 mmHg: SMITH et al. 1994; 25 mmHg: SMITH et al. 1994; ALBERIO et al. 2002; 50 mmHg: SMITH et al. 1994; BALDASSARRE et al. 1996; 100 mmHg: ANEL et al. 1997). Um estudo realizado por MORTON et al. (2008) determinou um sistema de aspiração para recuperação de oócitos de ovinos provenientes de ovários de abatedouros e o desenvolvimento *in vitro* de embriões ovinos, utilizando uma bomba de aspiração à vácuo acoplada a uma agulha descartável de 20 G ou a uma seringa de 2,5 mL com igual agulha, com

diferentes pressões (25, 50 e 100 mm Hg). Os resultados deste estudo sugeriram que a recuperação de oócitos foi semelhante entre as duas técnicas, apesar da proporção de oócitos de melhor qualidade ter sido menor para o grupo de 100 mm Hg. A taxa de desenvolvimento embrionário foi maior para oócitos aspirados com 50 mm Hg (45.4% de oócitos cultivados), 100 mm Hg (43.8%) e seringa e agulha (45.0%) do que com 25 mm Hg de pressão (18.8%), assim como outros autores os quais também utilizaram dessas pressões em ovinos (BALDASSARRE et al. 1996; ANEL et al. 1997, 1998; SEVILLANO et al. 1997). Outros estudos mostraram que o aumento da pressão aumenta o número de oócitos recuperados mas reduz o número de oócitos viáveis (bovinos: UDY et al., 1994; BOLS et al., 1996; FRY et al., 1997; SASAMOTO et al., 2003; ovinos: TERVIT et al., 1995; RODRIGUEZ et al., 2000, 2006) devido a remoção das células do *cumulus* e deformação da membrana vitelínica (FRY et al. 1997). Na maioria dos estudos foi observado que a competência de desenvolvimento oocitário é afetada pela pressão de vácuo durante a aspiração folicular (bovino: BOLS et al. 1996; WARD et al. 2000; ovino: SMITH et al. 1994).

Em baixas pressões de aspiração ou quando utilizada uma mangueira de conexão muito longa, há aumento do tempo entre a saída do oócito do folículo e chegada deste no tubo coletor, ocorrendo exposição dos oócitos a oscilações de temperatura (RODRIGUEZ et al., 2006). Inclusive, o diâmetro interno desta mangueira afeta a taxa de recuperação dos oócitos, a qual é maior em mangueiras com 1 e 3 mm de diâmetro (RODRIGUEZ et al., 2006). Neste mesmo estudo de RODRIGUEZ et al. a proporção de oócitos de boa qualidade foi maior quando utilizado mangueiras de 1 e 2 mm, provavelmente devido a um maior movimento laminar do fluido dentro da mangueira, ou a menor turbulência quando os oócitos passam da agulha a mangueira (BOLS et al., 1997; HASHIMOTO et al., 1999).

O diâmetro da agulha de aspiração também interfere na recuperação dos oócitos. Em ovelhas, a maioria dos estudos utiliza agulhas entre 18 G (BALDASSARRE et al. 1996; ANEL et al. 1998; ALVAREZ et al. 1999; RODRIGUEZ et al. 2000), 19 e 20 G (TERVIT et al., 1995; PTAK et al., 1999; MORTON et al., 2005a, 2006) e 21 G (O'BRIEN et al., 1997), com taxas de recuperação entre 50,4% e 88,2%. BALDASSARE

et al. (1994) obtiveram uma taxa de recuperação de 81% utilizando uma agulha 16 G, e ALBERIO et al. (2001) uma taxa de 45% com 23 G. Em um estudo feito por RODRIGUEZ et al. (2006) foi avaliado o comprimento da agulha, e os autores observaram que agulhas mais curtas produziam melhores resultados, por causa da curta passagem desde o folículo até a mangueira de silicone, o que é menos traumático para os oócitos comparado a agulha de aço.

A taxa de recuperação de oócitos varia muito, oscilando de 32% a 90% dependendo dos procedimentos de aspiração. A proporção de oócitos de boa qualidade recuperados é usualmente de 70-80%, apesar desses valores variarem consideravelmente dependendo da taxa de fluxo de aspiração, como explicado anteriormente. A proporção de oócitos viáveis recuperados por folículo aspirado também tem grande variação, com valores entre 9,5% e 42,5% (RODRIGUEZ et al, 2006b).

A seleção folicular pode ser útil na recuperação laparoscópica *in vivo* de oócitos, pois o número de punções poder ser reduzido, minimizando o dano causado ao ovário, bem como diminuindo o tempo de intervenção e exposição do animal ao anestésico (RODRÍGUEZ et al., 2006). Em estudo feito por RODRÍGUEZ et al. (2006) em ovinos, a taxa de recuperação não foi afetada pelo tamanho do folículo o que também foi observado em bovinos por HELEIL et al. (2000), os quais conseguiram taxas de 69%, 66,1% e 71%, para pequenos, médios e grandes folículos, respectivamente. Entretanto, SENEDA et al. (2001) observaram para oócitos bovinos melhores taxas de recuperação de folículos menores do que 4 mm de diâmetro, comparado a grandes folículos (taxa de recuperação de 50% e 72% para >4 mm e <4 mm, respectivamente). Similarmente, nesta mesma espécie, PIETERSE et al. (1991) obtiveram taxas de recuperação de 59%, 55% e 4% para tamanhos de folículos entre 3-5, 6-10 e >10 mm, respectivamente. Estes autores concluíram que os folículos maiores são aspirados mais facilmente, mas devido ao denso conteúdo, o número de oócitos recuperados é baixo e talvez se justifique pelo colapso do folículo com o orifício da agulha. Assim, o tamanho do folículo afeta a proporção de oócitos de boa qualidade e a eficiência da OPU, com valores superiores observados para médios e grandes folículos (RODRIGUEZ et al., 2006b).

Demais autores normalmente aspiram folículos de ovelhas entre 2–6 mm (SHIRAZI et al., 2008; SHI et al., 2009), 2-4 mm (MORTON et al., 2008), 2-8 mm (SHABANKAREH & ZANDI, 2009), 2-10 mm (MAALOUF et al., 2009) ou folículos visíveis (SHABANKAREH et al., 2010).

Outro fator que influencia a qualidade do oócito recuperado é o transporte adequado do material coletado, seja ovário ou oócito. A temperatura, o meio e o tempo do transporte são aspectos fundamentais para preservação do material e com este objetivo cada autor tem uma maneira de fazê-lo. Este tempo também deve ser o mais curto possível, mas se realizado no período de até 3 horas parece não afetar a viabilidade dos COCs (GONÇALVES et al., 2002). Ovários coletados de abatedouro normalmente são transportados em solução salina a 0,9% de NaCl aquecida 30-35 °C (SHI et al., 2009) e, como descrito anteriormente, pode ser adicionado de antibióticos (SHI et al., 2009) em uma embalagem térmica, dentro de 2-3 horas. Após a sedimentação em placa de Petri, os COCs são examinados sob estereomicroscópio e somente aqueles de boa qualidade são selecionados para MIV, geralmente de grau I e II, dependendo da classificação adotada: citoplasma uniforme ou até mesmo citoplasma granulado e com no mínimo de três camadas de células do cumulus (SHABANKAREH & ZANDI, 2009; MAALOUF et al, 2009; SHI et al, 2009; ZHANG et al, 2009), somente aqueles com *cumulus-oophorus-corona radiata* compacta e não atrésico e citoplasma homogêneo (NATARAJAN et al, 2010); COCs com 4 a 10 camadas de células da granulosa e citoplasma uniforme com distribuição homogênea de gotas de lipídeos (LEONI et al, 2007) dentre outras classificações.

2.2. Maturação oocitária

Sabe-se que uma fertilização normal e um desenvolvimento embrionário de sucesso estão intimamente ligados com a maturação do oócito, na qual ocorre diversas mudanças, tanto estruturais quanto bioquímicas. Tais mudanças podem ser classificadas como maturação nuclear e citoplasmática (ALBERTINI, 1992; EPPIG, 1996; MATTSON & ALBERTINI, 1990).

A maturação nuclear refere-se a progressão da cromatina durante a meiose do estágio de vesícula germinativa (VG) a MII. A competência meiótica tem sido relacionada com mudanças no crescimento do oócito, organização da cromatina, estágio do ciclo celular meiótico, fosforilação da proteína reativa a fosfoproteína mitótica monoclonal-2 (MPM-2), atividade transcricional e organização dos microtúbulos citoplasmáticos em oócitos de várias espécies de mamíferos (COMBELLES et al., 2002; FAIR et al., 1995; SCHRAMM et al., 1993; WICKRAMASINGHE et al., 1991). O controle da maturação nuclear está intrinsicamente ligado as atividades enzimáticas de proteínas cinases citoplasmáticas, fator promotor da maturação (MPF) e proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK) (RUDERMAN et al., 1991). Oócitos incompetentes são deficientes em RNAs mensageiros que codificam para MPF. Enzimas cinases e fosfatases estão envolvidas no reinício e na completa maturação meiótica do oócito (GONÇALVES et al., 2002). O aumento das atividades de ambas cinases é responsável pelo início da quebra de vesícula germinativa (QVG) e essencial para a parada do oócito na metáfase da segunda divisão meiótica (MII) (KALOUS et al., 1993; NURSE, 1990; KOSAKO, 1994; FISSORE et al., 1996; MASUI e MARKERT, 1971), a qual é então mantida pelas atividades elevadas contínuas de ambas cinases (KOSAKO et al., 1994; MASUI & MARKERT, 1971; HASHIMOTO & KISHIMOTO, 1986). Existem evidências que os oócitos são mantidos em MII por ação de fatores citostáticos (CSF) que são capazes de manter a atividade elevada do MPF (GONÇALVES et al., 2002). Atividade da proteína cinase, nucleação do centrosomo do microtúbulo e modificações pós-translacionais da tubulina influenciam na reorganização dos microtúbulos e estabilidade na transição da interfase para metáfase. De fato, os microtúbulos tem um importante papel para o movimento do cromossomo, bem como para uma grande variedade de eventos celulares tais como na forma celular, transporte e secreção intracelular, e mudanças na fluidificação da membrana. Microtúbulos também constituem o fuso meiótico que são formados pela polimerização da α -tubulina e β -tubulina (ZHOU et al., 2002), e começam dos centros de organização de microtúbulos (MTOCs) em ambos os pólos e ancoram os cromossomos ao cinetocoro, ficando em forma de barril (MARO et al., 1986). Consequentemente, os cromossomos se alinham

no plano equatorial do fuso meiótico (CHEN et al., 2003). Portanto, os microtúbulos são muito importantes para maturação nuclear (CAO et al., 2009).

O ovário de mamífero tem uma população diversa de oócitos “presos” em estágio de VG antes da ovulação. A produção de oócitos viáveis depende da síntese de RNAm e proteínas durante o crescimento oocitário seguido pela complexa reorganização do citoesqueleto e organelas no citoplasma antes do oócito deixar o folículo. A retomada da meiose pelos oócitos requer sinais endócrinos e parácrinos e a presença de moléculas vitais para mediar receptores e sinal de transdução intercelular (MOOR et al., 1998). A sequência de eventos, inclui QVG, condensação do cromossomo e progressão para metáfase da meiose I (MI), extrusão do primeiro corpúsculo polar (CP) e pára na metáfase II da segunda meiose (KOCHHAR et al., 2002). Progressão dos eventos nucleares na maturação do oócito é também controlada pelos componentes citoplasmáticos (EPPIG et al., 1994). MOOR & CROSBY (1986) sugeriram que a retomada da meiose requer a síntese de novas proteínas que são necessárias para quebra da vesícula em oócitos de ovinos totalmente crescidos.

A maturação citoplasmática inclui todas as outras mudanças internas do oócito tais como, acúmulo de RNAm e proteína, mudanças no metabolismo celular, reorganização do citoesqueleto ou organelas como os grânulos corticais (GC), mitocôndrias, complexo de Golgi e retículo endoplasmático ou exocitose dos GC (DUCIBELLA et al., 1990, HERRICK et al., 2006; YOSHIDA et al., 1993). Ocorrem também modificações em número, tamanho e/ou posição das organelas citoplasmáticas. Nesta reestruturação, a maioria das organelas migram para o centro da célula. Por exemplo, mitocôndrias são localizadas periféricamente em oócitos imaturos e mais central em oócitos maduros. No entanto, durante o crescimento e maturação do oócito, os GCs, como vesículas secretórias que circundam a membrana, aumentam em número e migram em direção ao córtex, assumindo uma posição de 0,4-0,6 μm abaixo da membrana plasmática (DUCIBELLA & BUETOW, 1994), e tal redistribuição é um importante critério para avaliação da maturação citoplasmática (DAMIANI et al., 1996; HOODBHOY & TALBOT, 1994; MIYARA et al., 2003b).

Os GC são organelas derivadas do Golgi formadas durante os estágios iniciais do crescimento e maturação do oócito e estão localizados dentro da sua região cortical (CRAN & ESPER, 1990). Os GC dos mamíferos contêm enzimas, incluindo proteinases, glicosidases e também material glicosilado. Após a fusão das membranas do oócito com o espermatozóide ocorre a exocitose destes e seu conteúdo é subsequentemente liberado para o espaço perivitelínico. Este processo é chamado de Reação Cortical. Acredita-se que as enzimas liberadas modificam a zona pelúcida e então previnem a poliespermia (MILLER et al., 1993; HOODBHOY & TALBOT, 1994). Estudos em camundongos, hamster (LEE et al., 1988; STEWARD-SAVAGE & BAVISTER, 1991; KLINE & STEWART-SAVAGE, 1994) e humanos (CHERR et al., 1988; DANDEKAR & TALBOT, 1992) demonstraram que o exsudato dos GC é disperso uniformemente ao redor de todo oócito e permanece até a clivagem do blastocisto. Com o uso da lecitina fluorescente é possível identificar açúcares específicos originados dos GC e então localizá-los (CHERR et al., 1988; DUCIBELLA et al., 1990; TAM et al., 1990; DANDEKAR & TALBOT, 1992).

Apesar da meiose, ou maturação nuclear ser completada com sucesso, há uma variedade de outros processos ocorrendo dentro do citoplasma do oócito que são requeridos para um desenvolvimento completo seguido da fertilização (KRISHER, 2004). O sucesso destes eventos é independente da maturação nuclear e é referido, como já descrito, como maturação citoplasmática. Um oócito que não tenha completado a maturação citoplasmática é pobre em qualidade e portanto, incapaz de completar o processo de desenvolvimento normal. Entretanto, os mecanismos celulares que levam a competência de desenvolvimento do oócito são totalmente nucleares (KRISHER, 2004). Assim, a maturação deve ser determinada através da avaliação de ambas maturação nuclear e citoplasmática. Cerca de 70-80% dos oócitos de bovinos maturados *in vitro* chegam até o estágio de MII da maturação nuclear, porém a falta de desenvolvimento destes é devido a impariedade com maturação citoplasmática (IZADYAR et al., 1998).

Recentemente, tem sido realizados muitos estudos com o objetivo de determinar quais condições são necessárias durante os processos de maturação, fertilização e cultivo *in vitro* para maximizar a produção de embriões. A competência de maturação

(nuclear e citoplasmática) e de desenvolvimento (fertilização, formação de pronúcleos e clivagem) é influenciada por vários fatores, como fluidos folicular e de oviduto, diversos tipos de soro, esteróides, gonadotrofinas e o tamanho do folículo do qual os COCs são recuperados (PAVLOK et al., 1992; LONERGAN et al., 1994; VATZIAS & HAGEN, 1999; MARCHAL et al., 2002). Durante o crescimento dos oócitos dentro do folículo, muitos genes são expressos (SCHULTZ, 1986) e algumas dessas proteínas, tais como fator de promoção de maturação e *mos* (proteína do pro-oncogene *c-mos*), estão envolvidos em uma progressão meiótica e controle do ciclo celular (WICKRAMASINGHE & ALBERTINI, 1993). Parece que oócitos de folículos pequenos ainda não completaram a maturação citoplasmática, o que pode ser reflexo da deficiência de RNAm ou acúmulo de proteínas (PAVLOK et al., 1992; PAVLOK et al., 1993; LONERGAN et al., 1994).

A qualidade do oócito também tem um grande impacto na sobrevivência do embrião inicial, no estabelecimento e manutenção da gestação, desenvolvimento fetal e até nas doenças na fase adulta (KRISHER, 2004). A qualidade, ou a competência de desenvolvimento é adquirida durante a foliculogênese enquanto o oócito cresce e durante o período de maturação deste. Tecnologias reprodutivas assistidas envolvendo hiperestimulação ovariana ou recuperação de oócitos imaturos seguida pela MIV perturbam este processo e resultam em oócitos com competência de desenvolvimento reduzida. O COC deve ter a camada de células do *cumulus* completa para ser capaz de se desenvolver *in vitro* (BRUYNZEEL, et al. 1997), sendo que esta comunicação entre tais células é essencial para o desenvolvimento de um oócito competente até a ovulação. Oócitos de suínos claramente dependem da presença das células foliculares para gerar sinais celulares específicos que coordenam seu crescimento e maturação (MOOR & DAI, 2001). Proteínas derivadas dos oócitos são requeridas para o sucesso da foliculogênese ovariana (DONG et al., 1996) e o crescimento oocitário durante a foliculogênese é regulado por proteínas derivadas das células da granulosa (STERNECK et al., 1997), as quais são, por sua vez, reguladas pelos fatores derivados dos oócitos (ELVIN et al., 1999). Também, antes da ovulação, proteínas secretadas

pelo oócito sinalizam para as células somáticas para iniciar a ovulação (KRISHER, 2004).

A morfologia e o grau de expansão das células do *cumulus* são métodos clássicos para avaliação da maturação oocitária (CHAVES et al., 2010). Em bovinos, a expansão e o enegrecimento do *cumulus* são características utilizadas para se verificar a maturação oocitária e estão diretamente relacionados com boa qualidade embrionária (WURTH & KRIUP, 1992). O estágio nuclear dos oócitos após a MIV pode ser examinado sob microscopia ótica com contraste de fase, após fixação dos oócitos com metanol-ácido acético e coloração com 1% de lacmóide em 45% de solução de ácido acético (HUNTER & POLGE, 1966) ou com 1% deorceína em 40% de solução de ácido acético (LI et al., 2002). Outra técnica para visualização dos cromossomos dos oócitos e determinação dos estádios nucleares de maturação é a microscopia por fluorescência (MIYARA et al., 2003a). Após serem submetidos às técnicas de MIV, os oócitos são desnudados, marcados com Hoechst 33342 e visualizados em microscópio invertido com fluorescência (GRONDAHL et al., 1995). Infelizmente, somente métodos invasivos que causam a destruição dos oócitos são capazes de prever com relativa precisão a qualidade deles (CHAVES et al. 2010). No entanto, recentemente tem sido utilizado o corante Azul Cresil Brilhante, um método não invasivo, para tal finalidade. Esta substância é capaz de determinar a atividade da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH) presente em oócitos durante o crescimento (RODRIGUÉZ-GONZÁLEZ et al., 2003). A maturação citoplasmática pode ser avaliada pela distribuição das organelas por microscopia eletrônica (FERNANDES, 2004), migração dos grânulos corticais (CURCIO, 2005), clivagem partenogenética (CARNEIRO et al., 2001) ou técnicas de fecundação (CARNEVALE, 1996). Apesar da grande quantidade de informações disponíveis sobre o assunto, não se chegou ainda a um método ideal para avaliação da maturação citoplasmática que não seja a própria fecundação e o posterior desenvolvimento normal do embrião e do feto (KRISHER, 2004).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Localização e Caracterização da Área

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

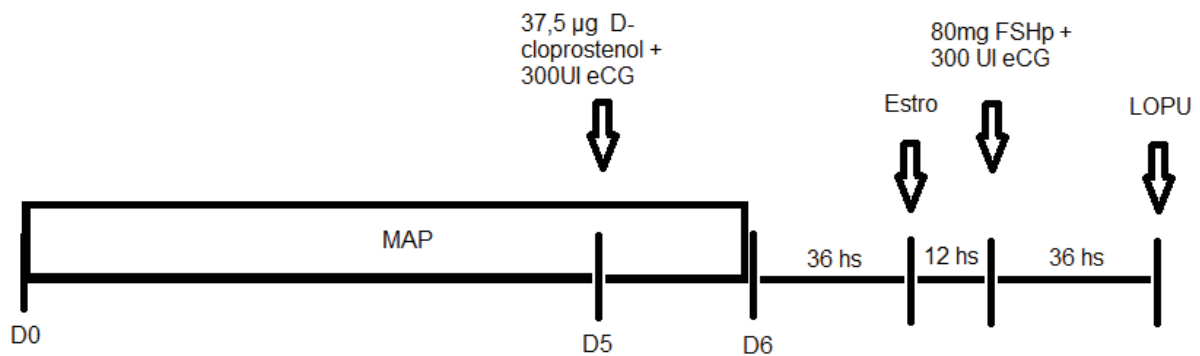
Os animais foram mantidos em piquete do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal, os processos de aspiração folicular por vídeolaparoscopia foram realizados no centro cirúrgico de grandes animais do Hospital Veterinário e a avaliação e a MIV dos oócitos no Departamento de Reprodução Animal.

3.2. Animais e tratamentos

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

Os animais foram submetidos a nove sessões de aspiração folicular por vídeolaparoscopia consecutivas, com intervalo de 7 dias.

O protocolo de sincronização de estro e estimulação ovariana dos animais foram realizadas como a seguir:



Para a sincronização de estro se utilizou esponja intravaginal impregnada com 60mg de acetato de medroxiprogesterona (MAP)¹ em um dia aleatório do ciclo estral (Dia 0), permanecendo por um período de seis dias. No D5 foram aplicados 37,5 µg de D-cloprostenol² e 300UI de eCG³ via IM. A maioria dos animais manifestou estro, confirmando com auxílio de rufiões, após 36 horas da retirada dos progestágenos. A estimulação ovariana foi realizada 12 horas depois de detectado o estro e consistiu da administração de 80mg de FSHp⁴ e 300 UI de eCG³, e após 36 horas realizavam-se as aspirações foliculares por vídeolaparoscopia. Para as aspirações subseqüentes, as fêmeas foram somente estimuladas.

Para as aspirações subseqüentes, as fêmeas foram somente estimuladas, utilizando os mesmos fármacos.

3.3. Preparo dos animais e protocolo anestésico

Os procedimentos cirúrgicos eram realizados duas vezes por semana, sendo que em cada dia eram submetidos três animais, no total das seis ovelhas por semana.

¹ Progespon®, Schering-Plough, Brasil.

² Sincrocio® Orofino S.A, Brasil.

³ Novormon®, Schering-Plough, Brasil.

⁴ Folltropin®, Schering-Plough, Brasil.

Antes de cada intervenção cirúrgica, as fêmeas tiveram seus pesos corpóreos aferidos em balança digital para permitir o cálculo da dosagem anestésica e avaliação da condição corporal ao longo do experimento.

Após jejum hídrico e alimentar de 36 horas, os animais foram submetidos a anestesia, a qual foi obtida através da administração de 0,5 mg/kg de diazepam⁵ (IM) e 2 mg/kg de tramadol⁶ (IM) como medicação pré-anestésica (MPA) e na sequência indução com propofol⁷ (IV) na dose de 6 mg/kg, mantendo com infusão contínua de propofol na dose de 0,5mg/kg/min (IV) e bôlus e infusão de cloridrato de lidocaína⁸ 1mg/kg (IV) e 1mg/kg/min (IV).

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

No campo cirúrgico, na região do abdome cranial ao úbere foi feito a tricotomia e antissepsia do com tintura de iodo, e em seguida, a anestesia local infiltrativa com 0,4 mL de cloridrato de lidocaína⁸, sendo 0,2 mL para um botão no tecido subcutâneo e 0,2 mL intramuscular.

3.4. Videolaparoscopia para aspiração folicular

Depois de estabelecida a manutenção anestésica e analgesia local, as fêmeas foram posicionadas em *Trendelenburg* (cefalodeclive em 30 graus) para facilitar o manejo dos órgão reprodutivos e evitar manipulações e possíveis lesões nos demais órgão do animal. Com o auxílio de um bisturi, fez-se incisão cutânea, de 10 a 15 cm cranial ao úbere e 5 cm à direita da linha média, para facilitar a introdução do trocáter com válvulas para insuflação (5 mm), a fim de se estabelecer o pneumoperitônio com

⁵ Diazepam® Cristalia, Brasil.

⁶ Tramal® Cristalia, Brasil.

⁷ Propofol® Cristalia, Brasil.

⁸ Lidovet®, Bravet, Brasil.

CO₂, utilizando pressão intrabdominal (PIA) variando de 5 a 8 mm Hg, e velocidade de insuflação de 5 L/min. Por este trocater foi introduzido o laparoscópio conectado a uma câmera e a um cabo de fibra ótica, fornecendo luz para o interior da cavidade, sendo a imagem visualizada no monitor; seguindo-se a introdução video-assistida do segundo trocater de 10 mm em posição antimérica ao primeiro e terceiro de 5 mm na linha média 20 cm cranial ao úbere.

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

Previamente a aspiração dos folículos, os ovários foram examinados e o número dessas estruturas, com dimensões entre 2 - 6 mm, foi contabilizado. Em seguida, a agulha de aspiração foi introduzida na cavidade próxima ao local onde se encontrava o ovário. A punção foi realizada movimentando os ovários em diferentes posições com a pinça de manipulação atraumática. A agulha foi inicialmente colocada em posição paralela à superfície ovariana, o que permitiu as perfurações dos folículos nas suas extremidades e na impossibilidade, a punção foi feita perpendicularmente (Figura 1).

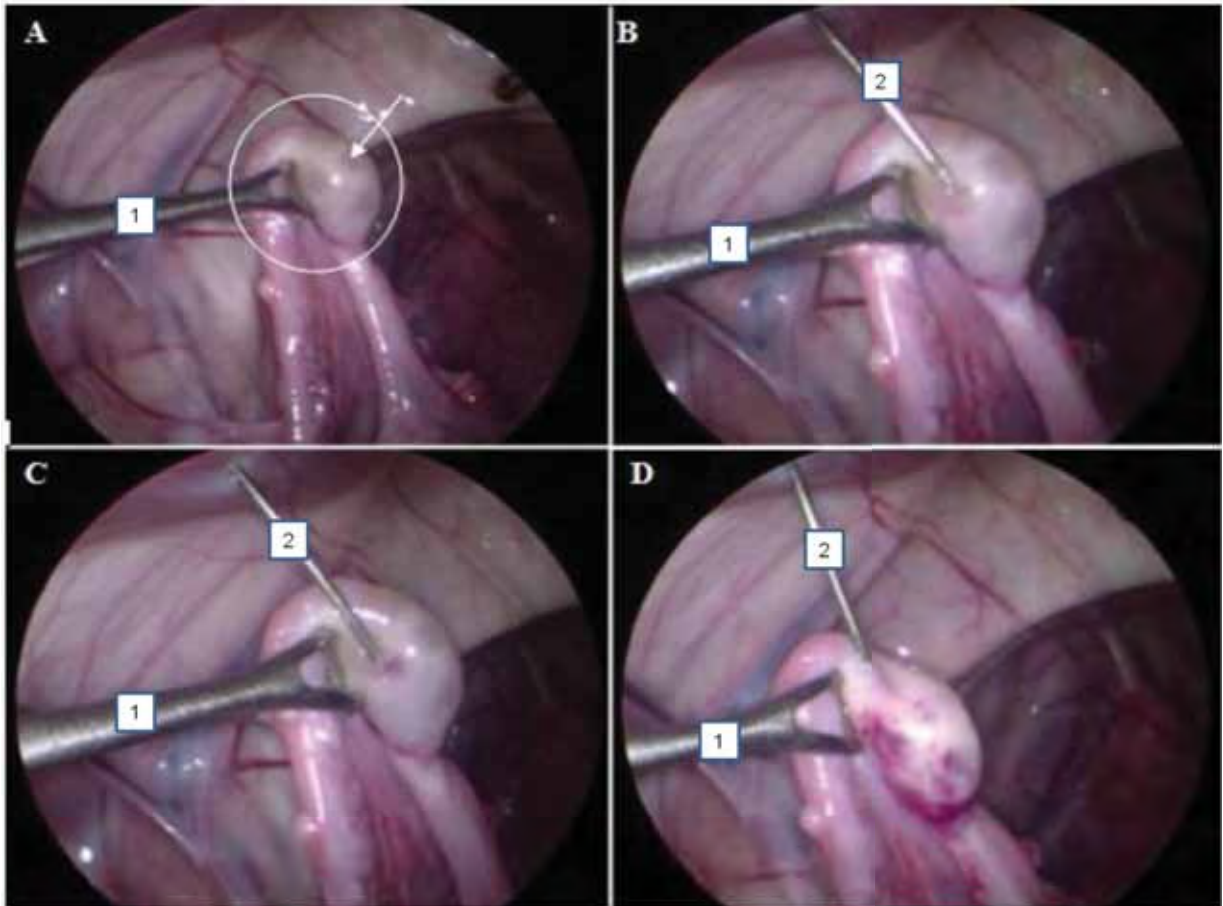


Figura 1. Imagem da cavidade abdominal de ovelha em aumento de 10x, onde se observa em destaque: fixação do ovário (círculo) com pinça atraumática (1), e presença de folículos (seta) (A); posicionamento da agulha (2) para a punção folicular (B); e aspiração dos folículos (C e D).

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

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

⁹ Handle Cook®, Brasil

¹⁰ Nevoni. Brasil

aspiração dos oócitos realizou-se uma lavagem do sistema com o meio de colheita aquecido a 36° C (PBS e heparina - 10UI/mL).

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

Após serem retiradas da maca cirúrgica as fêmeas foram colocadas em local limpo e tranquilo e observadas até ficarem em posição quadrupedal. Nos procedimentos cirúrgicos subsequentes, as incisões foram feitas lateralmente à anterior.

3.5. Análise dos folículos visibilizados, aspirados e oócitos recuperados

Foi utilizado tubo falcon de 50 mL cotendo 15 mL de meio de colheita aquecido a 36°C, para recuperar os oócitos durante as aspirações foliculares. O transporte deste meio já com os oócitos era imediato, pela proximidade entre os locais da cirurgia e do laboratório.

Em laboratório, o líquido aspirado foi cuidadosamente depositado em placas de Petri e levado à observação em estereomicroscópio em aumento de 40X, no mesmo meio de colheita. Uma vez localizados, os oócitos foram transferidos para outra placa contendo 300 a 500 µL de meio de lavagem (Apêndice 1) e então classificados de acordo com sua qualidade adaptado de LEIBFRIED e FIRST (1979).

- **Grau I:** COC com ooplasma homogêneo, escuro e rodeado completamente por mais de três camadas de células do *cumulus*.
- **Grau II:** COC com o ooplasma levemente pigmentado com menos de três camadas de células do *cumulus* completa.
- **Grau III:** COC com o ooplasma pálido, frequentemente disformes e camadas de células do *cumulus* incompletas ou *cumulus* expandido.
- **Degenerados:** desnudo, sem células do *cumulus*.

¹¹ Ungüento Pearson, Pearson Saúde Animal Ltda.

Foram selecionados os oócitos de GI e GII e então lavados três vezes em gotas com meio de lavagem antes do procedimento de maturação.

3.6. Maturação *in vitro*

Após a lavagem, os oócitos de cada animal foram transferidos para placa de cultivo (35 mm X 10 mm, Corning®) contendo gotas de 90 μ L de meio de maturação (Apêndice 2) sob óleo mineral e mantidos, em estufa, a 38 °C em atmosfera de 5% de CO₂ em ar durante 24 horas (Figura 2). Foram colocados até dez oócitos por gota.

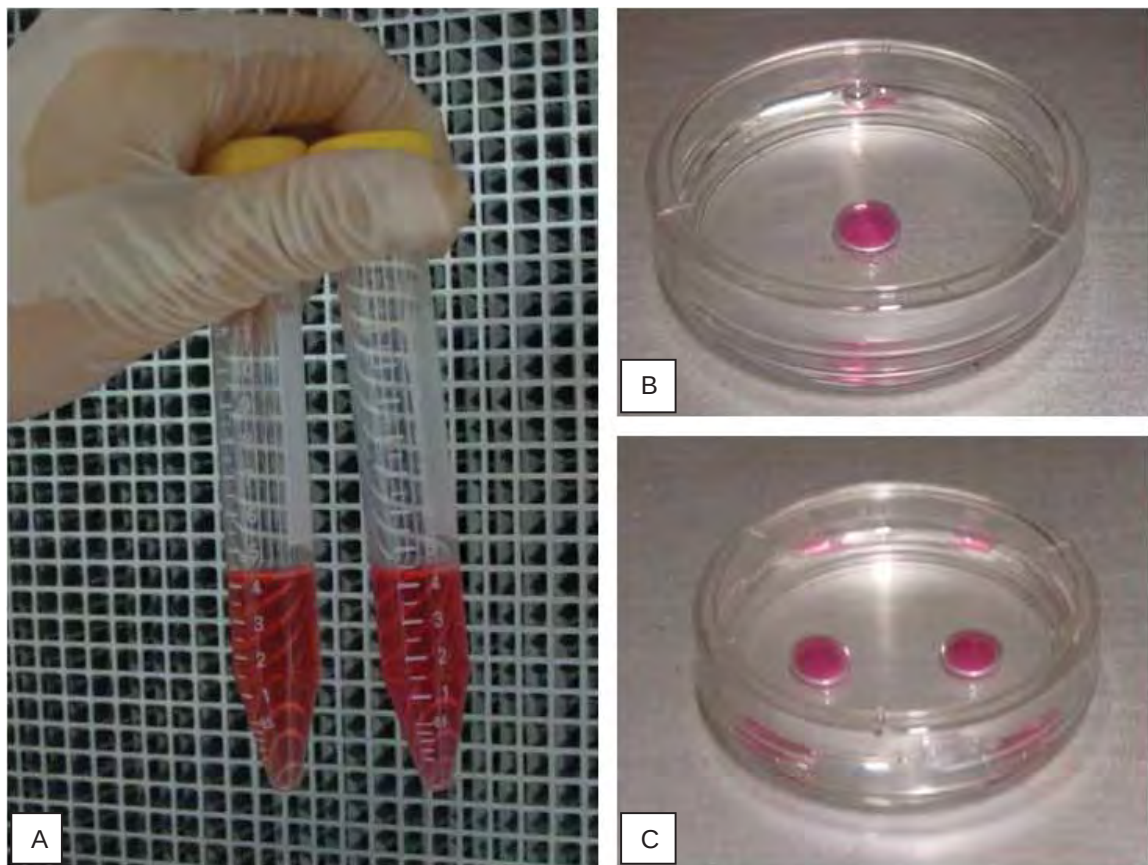


Figura 2. A: Meio de lavagem (esquerda) e meio de maturação (direita). B e C: placas de cultivo contendo gotas de meio de maturação sob óleo mineral.

3.7. Avaliação do estágio de maturação nuclear e citoplasmática

Após o período de maturação *in vitro*, os oócitos foram submetidos à coloração FITC-Lecitina-Hoescht 33342 de acordo com a metodologia descrita por CHERR et al. (1988) com algumas modificações, para avaliação do estágio de maturação nuclear e citoplasmática. Sendo assim, os oócitos foram retirados do meio de maturação e colocados em placas de cultivo (60 X 40mm, TPP®) contendo 200 µL de solução PBS onde foram aspirados repetidamente com pipeta de 100 µL para retirada completa das células do *cumulus*. Na sequência, foram transferidos para gotas contendo 70 µL de solução de pronase 0,1% (Apêndice 3) por aproximadamente 5 minutos ou até que a zona pelúcida não fosse mais visualizada. Os oócitos foram então fixados por 30 minutos em formaldeído 3% (Apêndice 4) em temperatura ambiente e incubados a 4°C “overnight” em solução de bloqueio (SB) (Apêndice 5). No dia subsequente, os oócitos foram retirados e permeabilizados com Triton a 0,1% (Apêndice 6) a 38° C por 5 minutos e transferidos para outra placa de cultivo (60 X 40mm, TPP) contendo 10 µg/mL de *Lens culinaris* (Apêndice 7) diluída em 500µL de SB por 15 minutos a 38°C. Em seguida, os oócitos foram lavados três vezes em SB, e transferidos para lâmina de microscopia contendo uma gota de bisbenzimidide (Hoeschst 33342) diluído em glicerol (0,001%), sendo recobertos por lamínula, selados com esmalte e colocados em caixa de lâminas para que fossem examinados em microscópio invertido equipado com luz ultravioleta no dia subsequente. O comprimento de onda utilizada no microscópio de fluorescência para leitura com o Hoeschst e com a lecitina foi 330-385 nm e 420-490 nm, respectivamente.

3.8. Classificação dos estádios de maturação nuclear

A classificação dos estádios de maturação nuclear foi avaliada segundo WANG et al. (1998) e adaptada, baseada na morfologia do DNA, por graus variados de condensação dos cromossomos: (1) oócitos maturados (MII), onde era possível observar a formação de um eixo em metáfase na periferia do ooplasma com expulsão

do primeiro corpúsculo polar (CP); (2) oócitos imaturos (MI), nos quais a placa metafásica não era observada; e (3) oócitos degenerados/não passíveis de determinação (D/NI), aqueles cujo estágio de desenvolvimento nuclear não era passível de determinação ou não apresentavam cromatina evidente (Figura 3).

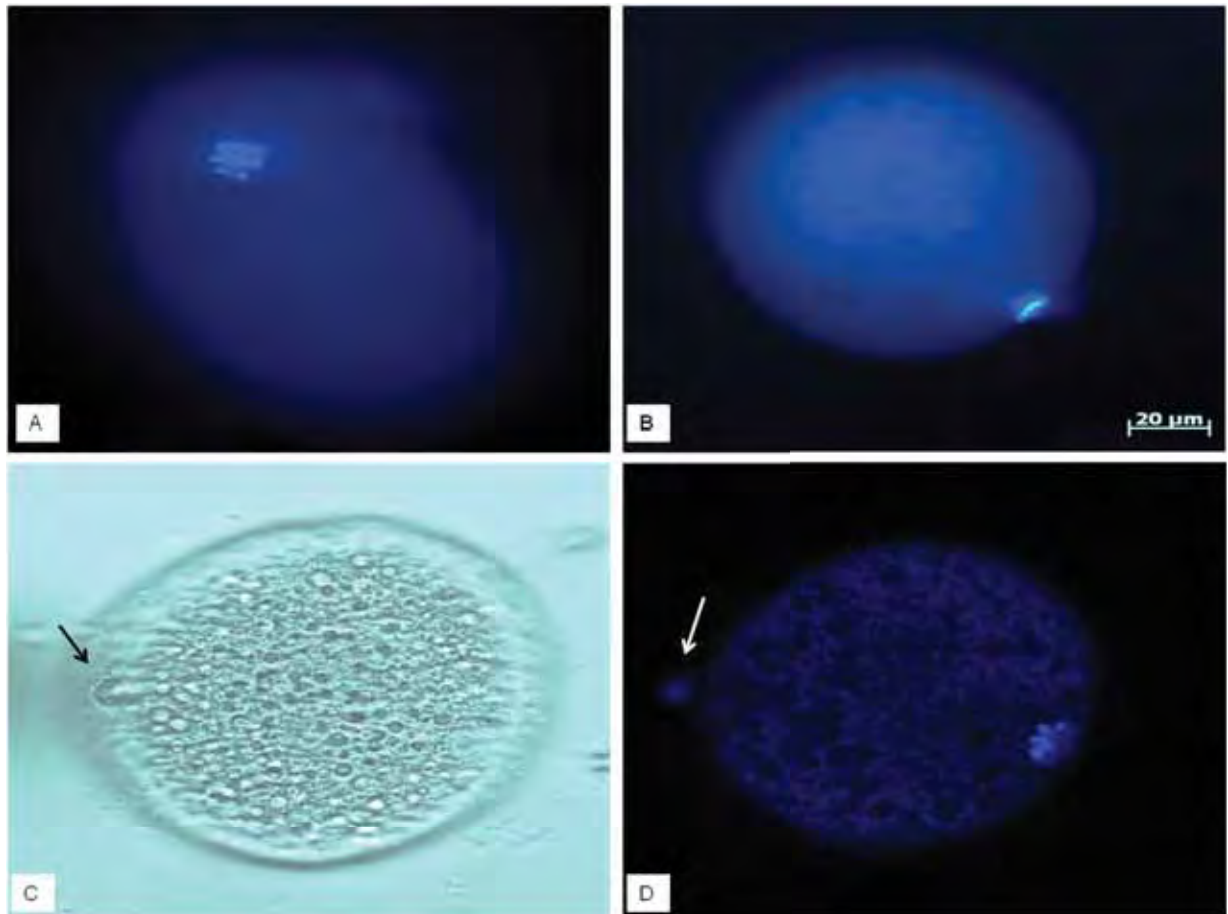


Figura 3. Fotomicrografia de oócitos de ovelhas Santa Inês corados para avaliação da competência meiótica através da coloração da cromatina pela técnica de fluorescência (Hoescht 33342). A: MI; B: MII; C: MII com presença de CP (seta) em campo claro; D: MII com presença de CP (seta). C e D - mesmo oócito.

3.9. Classificação dos estádios de maturação citoplasmática

A classificação da maturação citoplasmática foi avaliada baseada na distribuição dos grânulos corticais no citoplasma do oócito (APPARÍCIO-FERREIRA, 2006; PIRES-BUTTLER, 2010) (Figura 4):

- Imaturo: Grânulos corticais distribuídos uniformemente por todo o citoplasma.
- Maturação citoplasmática incompleta, mas em estágio transicional de maturação – Grânulos corticais dispersos no citoplasma e também na região periférica do oócito, próximos à membrana plasmática.
- Maturação citoplasmática completa: Grânulos corticais dispersos somente na periferia do oócito, próximos à membrana plasmática.

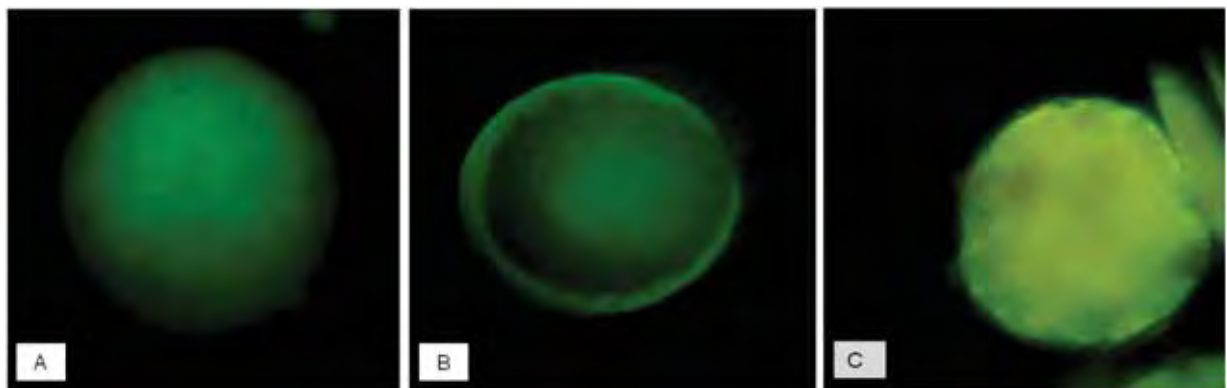


Figura 4. Fotomicrografia de oócitos de ovelhas Santa Inês corados para avaliação da maturação citoplasmática através da coloração dos grânulos corticais (*Lens culinaris* , FITC conjugada). A: Imaturo; B: Maturação citoplasmática incompleta; C: Maturação citoplasmática completa.

3.10. Análise estatística

Os dados obtidos sobre folículos visibilizados, aspirados, quantidade, qualidade e MIV dos oócitos colhidos por sessão, foram expressos em médias + desvio padrão e submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($P < 0,05$) utilizando o programa estatístico GraphPad Prisma 4.

4. RESULTADOS

O jejum estabelecido, além de evitar refluxo do conteúdo ruminal, o qual é favorecido pela posição *Trendelenburg*, facilitou, em conjunto com o pneumoperitônio, uma adequada visibilização da cavidade abdominal. O sangramento observado pelas punções foliculares foi incipiente e a lavagem dos ovários promoveu a remoção de coágulos evitando a formação de aderências em todos os animais. Ainda, o peso dos animais não teve variação durante as avaliações, as ovelhas tiveram boa recuperação anestésica e a posição quadrupedal ocorria, sem dificuldades, em média com 20 min.

As médias do número de folículos visibilizados, aspirados e oócitos recuperados foram de $13,3 \pm 2,8$, $11,4 \pm 2,8$ e $6,4 \pm 2$ respectivamente, com uma taxa de recuperação de $61,39 \pm 19,97\%$ (folículos aspirados/oócitos recuperados), observando-se ausência de variação entre as sessões ($p > 0,05$), como observado na Figura 5. Em algumas sessões os animais apresentaram corpos lúteos (CL), tendo $0,46 \pm 0,84$ CL/animal/sessão.

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

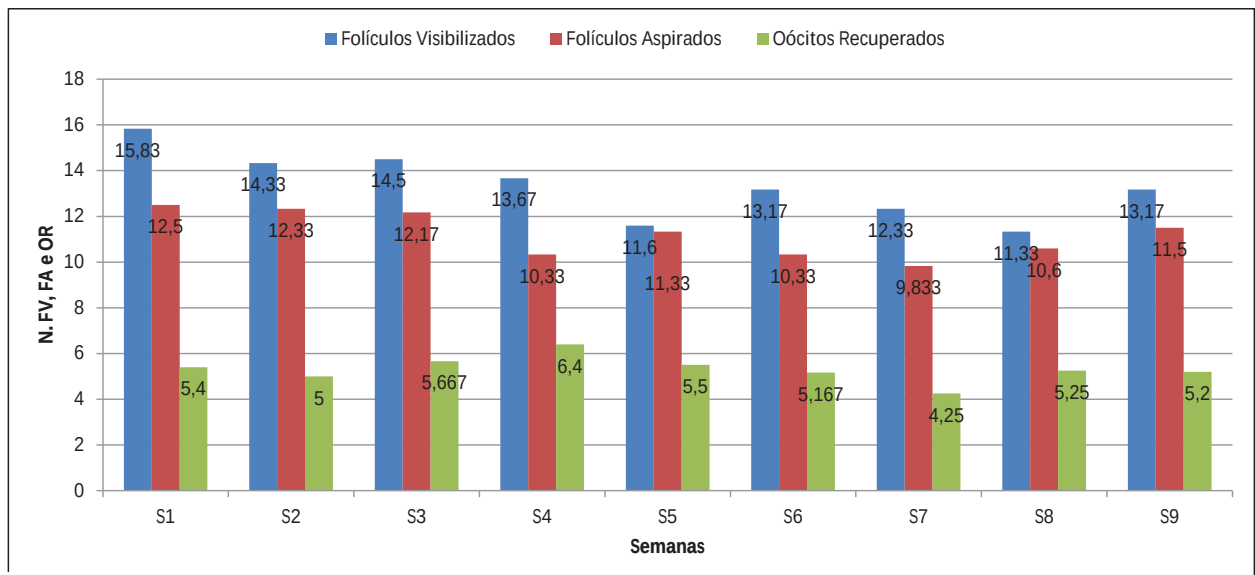


Figura 5. Representação gráfica do número de folículos visibilizados (FV), folículos aspirados (FA) e oócitos recuperados (OR) pelo tempo em semanas (S). Não houve diferenças significativas entre as sessões ($p > 0,05$).

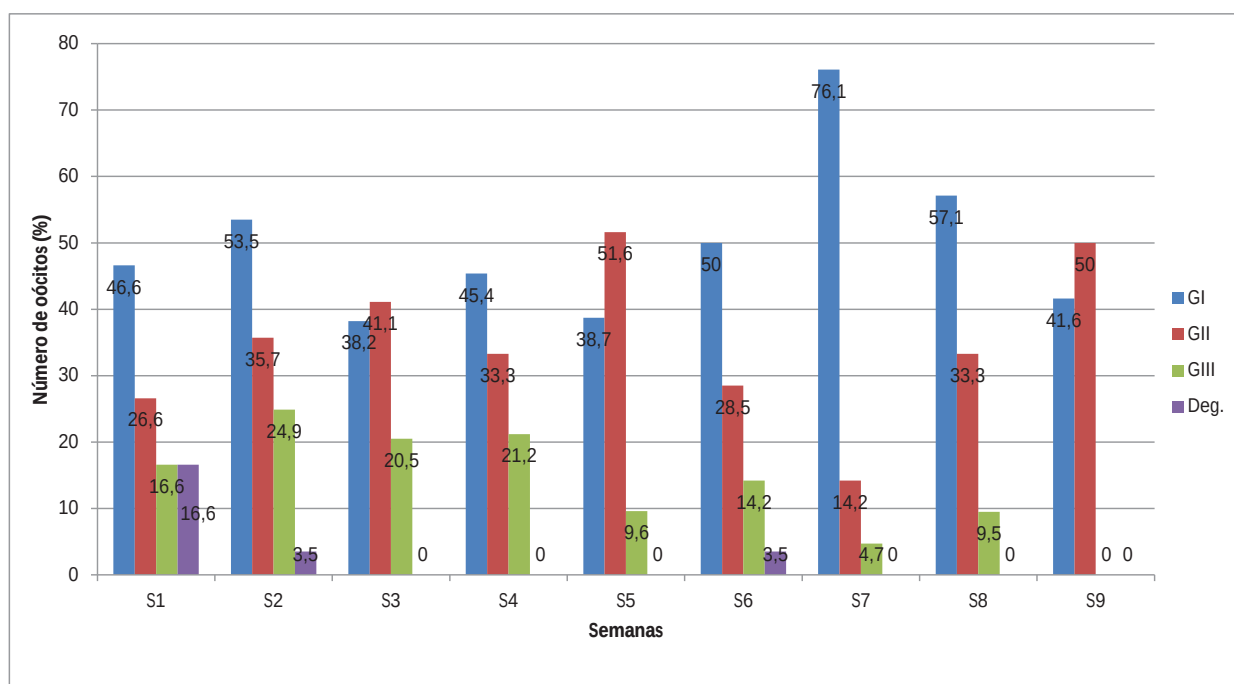


Figura 6. Representação gráfica da classificação qualitativa dos oócitos durante as nove semanas de aspiração folicular. Não houve diferença estatística na qualidade oocitária de GI, GII e GIII ao longo das observações entre as sessões ($p>0,05$), mas houve entre as S1, S2 e S6 das demais semanas, em relação aos oócitos degenerados.

Foi recuperado um total de 249 oócitos, sendo a média de oócitos recuperados por fêmeas de $6,4 \pm 2$ por semana, com 84% de oócitos viáveis (GI e GII) (Tabela 1). O número de oócitos recuperados por fêmea no total das nove semanas com intervalo de sete dias entre cada aspiração está demonstrado na Tabela 1. A média de oócitos coletado por ovelha foi de 42 ± 4 oócitos no total das nove semanas.

Tabela 1. Número de oócitos recuperados e número de oócitos recuperados viáveis (GI e GII) por ovelha no total das nove semanas de aspiração com intervalo de sete dias entre cada aspiração. Não houve diferença estatística ($p > 0,05$). Jaboticabal, 2012.

Ovelhas	1	2	3	4	5	6	Total
Nº oócitos recuperados	30	32	46	51	37	53	249
Nº oócitos recuperados viáveis	24	29	38	44	31	44	210

Com relação a maturação oocitária, não houve diferença significativa entre a classificação da maturação nuclear ($p = 0,937$), mas sim entre a classificação da maturação citoplasmática ($p < 0,0001$), como está demonstrado na Tabela 2. Nas Tabelas 3 e 4, encontram-se os resultados da maturação nuclear e citoplasmática por sessão, respectivamente. Não houve variação estatística entre as semanas tanto na maturação nuclear ($p = 0,908$), quanto na citoplasmática ($p = 0,792$).

Tabela 2. Porcentagem de maturação nuclear, citoplasmática e degenerados dos oócitos recuperados, no total das nove aspirações. Comparação entre as classificações. Jaboticabal, 2012.

Parâmetros	Maturação nuclear (%)	Maturação citoplasmática (%)
Maturos	32,72 ^a	10,7 ^b
Imaturos	40,74 ^a	73,25 ^b
Degenerados	26,54 ^a	16,05 ^b

a: valores significativamente iguais (p=0,937)

b: valores significativamente diferentes (p<0,0001)

Tabela 3. Classificação dos oócitos (%) quanto a maturação nuclear durante as nove semanas (S) de experimento. Frequência relativa (%) e absoluta. Jaboticabal, 2012.

Frequência relativa (%) e absoluta da classificação dos oócitos por semana										
Classificação	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	Total
Maturo	27,7 (5)	46,1 (6)	26,3 (5)	23,0 (6)	43,4 (10)	23,0 (3)	8,3 (1)	47,0 (8)	42,8 (9)	32,7 (53)
Imaturo	11,1 (2)	53,8 (7)	31,5 (6)	38,4 (10)	47,8 (11)	53,8 (7)	66,6 (8)	41,1 (7)	38,1 (8)	40,7 (66)
Degenerado	61,1 (11)	0 (0)	42,1 (8)	38,4 (10)	8,7 (2)	23,0 (3)	25,0 (3)	11,7 (2)	19,0 (4)	26,5 (43)

Não houve diferença estatística entre as sessões (p=0,908)

Tabela 4. Classificação dos oócitos quanto a maturação citoplasmática durante as nove semanas (S) de experimento. Frequência relativa (%) e absoluta. Jaboticabal, 2012.

Frequência relativa (%) e absoluta da classificação dos oócitos por semana										
Classificação	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	Total
Maturo	38,8 ^A (7)	15,3 ^A (2)	21,0 ^A (4)	26,9 ^A (7)	21,7 ^A (5)	0 ^A (0)	0 ^A (0)	5,8 ^A (1)	0 ^A (0)	10,7^{Aa} (26)
Imaturo	22,2 ^A (4)	53,8 ^A (7)	52,6 ^A (10)	38,4 ^A (10)	69,5 ^A (16)	76,9 ^A (10)	75,0 ^A (9)	82,3 ^A (14)	80,9 ^A (17)	73,2^{Ab} (178)
Degenerado	38,8 ^A (7)	30,7 ^A (4)	26,3 ^A (5)	34,6 ^A (9)	8,7 ^A (2)	23,0 ^A (3)	25,0 ^A (3)	11,7 ^A (2)	19,0 ^A (4)	16,0^{Ac} (39)

Letras maiúsculas na mesma linha não diferem significativamente ($p=0,792$).

Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($p<0,0001$).

5. DISCUSSÃO

5.1. Aspiração folicular e recuperação oocitária

A competência do oócito para alcançar estágio de blastocisto em um sistema de PIV não depende somente de fatores intrínsecos, mas também está relacionada a fatores extrínsecos como métodos de colheita, tamanho do folículo, dentre outros (HENDRIKSEN et al., 2000). A taxa de recuperação de oócitos também pode ser influenciada por artefatos durante a execução da técnica de aspiração folicular como a pressão de vácuo, tamanho da agulha e sistema de aspiração (TERVIT et al., 1992; 1993; 1995; SMITH et al., 1994).

A maioria dos estudos sobre diferentes pressões de aspiração folicular tem se atentado na colheita de oócitos e procurado definir a melhor pressão de aspiração dos mesmos baseado no número e qualidade dos oócitos recuperados. Entretanto, a pressão de aspiração folicular afeta subsequentemente o desenvolvimento embrionário *in vitro*. A aspiração dos ovários para recuperação dos COCs tem que ser feita de maneira eficiente e adequada, para não comprometer a quantidade, qualidade e posterior viabilidade destes. A pressão com a qual serão aspirados é fundamental para que não ocorra, por exemplo, um turbilhonamento dentro do material provocando o desnudamento parcial ou total do oócito. Entretanto, uma ótima pressão de aspiração para a recuperação dos oócitos pode não ser a melhor pressão para o desenvolvimento embrionário.

A pressão de aspiração utilizada nos trabalhos varia de 25 a 100 mm Hg (BALDASSARRE et al. 1996; ANEL et al. 1997, 1998; SEVILLANO et al. 1997, ALBERIO et al., 2002), e ainda outros autores não especificam a pressão (KUEHOLZER et al., 1997; PTAK et al., 1999), tornando difícil uma comparação fidedigna entre os resultados. Há relatos de que uma maior pressão de vácuo oferece maior taxa de recuperação (TERVIT et al., 1992; BALDASSARRE et al., 1996; STANGL et al., 1999), entretanto a qualidade do oócito é prejudicada (RODRIGUEZ et al., 2000b), fato também observado por BOLS et al. (1996) e HASHIMOTO et al. (1999) em

bovinos, e BRUSSOW et al. (1997) em suínos. O número de oócitos viáveis recuperados pela aspiração utilizando pressão de vácuo de 50 mm Hg, com agulha 16 G em nosso estudo foi 84%, valor que está de acordo com a revisão de RODRÍGUEZ et al. (2006), já que a proporção de oócitos viáveis recuperados é normalmente entre 70-80%, apesar destes valores variarem consideravelmente dependendo da pressão de aspiração.

A quantidade de oócitos viáveis recuperados em nosso estudo foi superior ao valor relatado por RODRÍGUEZ et al. (2006) que observaram taxas entre 28,3-69,5% e RODRÍGUEZ et al. (2000b) entre 29,6%-82,3%. Contudo, deve ser levado em consideração que pressão de aspiração e calibre da agulha utilizados nestes estudos foram diferentes, não permitindo então comparação fidedigna.

Entretanto, é necessário ter cautela ao comparar estudos de taxas de desenvolvimento oocitário quando utilizam pressão à vácuo em mm Hg. Fatores como comprimento e diâmetro da mangueira coletora, comprimento e diâmetro da agulha afetam a taxa de fluxo e pode haver uma considerável diferença nas taxas de fluxo dos oócitos em dois sistemas de aspiração usando a mesma pressão à vácuo.

Além disso, outro fator pode influenciar as taxas de recuperação e qualidade dos oócitos. Segundo BALDASSARE et al. (1994, 1996) os oócitos podem perder parcialmente as células do *cumulus* durante a passagem do folículo ao tubo de coleta, fenômeno também descrito por KIM et al. (1990), LONERGAN et al. (1992) e MADISON et al. (1992). Assim sendo, as células do *cumulus* poderiam ser preservadas por meio do refinamento da pressão de vácuo e/ou trabalhando com estágio foliculares mais primitivos objetivando a obtenção de células do *cumulus* mais compactadas, entretanto deve-se levar em consideração que estágios foliculares anteriores possuem oócitos com capacidade inferior de desenvolvimento *in vitro*.

O número de oócitos de boa qualidade por nós obtidos foi similar ao encontrado por ALBERIO et al. (2002) e TERVIT (1996) e superior ao reportado por STANGL (1999). A quantidade de oócitos parcial ou totalmente desnudos (GIII e degenerados) obtida por nosso sistema de aspiração foi pequena, bem como observado ALBERIO et al. (2002), apesar destes autores terem utilizado uma pressão menor (25 mm Hg) e

agulha mais fina (23 G). Acreditamos que este dado pode estar atribuído a baixa pressão de vácuo utilizada (25 e 50 mm Hg) mais do que em relação ao calibre da agulha, já que RODRÍGUEZ et al. (2006) afirmaram que o diâmetro desta não interfere nas taxas de recuperação e qualidade dos oócitos. Em bovinos, ao contrário do que foi observado por nós, foi relatado que agulhas com diâmetros maiores que 18 G promovem maiores taxas de recuperação embora com maior percentual de oócitos desnudos, além de maiores danos ao estroma e maior quantidade de sangue no líquido aspirado (BOLS et al., 1997).

As agulhas mais comumente utilizadas tem diâmetros intermediários, 18 G (BALDASSARRE et al. 1996; ANEL et al. 1998; ALVAREZ et al. 1999; RODRÍGUEZ et al. 2000a), 20 G (PTAK et al. 1999) e 21 G (O'BRIEN et al. 1997), com taxas de recuperação entre 50,4% e 88,2%, e ainda 23 G (ALBERIO et al., 2002) com taxa de 33,6%. Como nossa taxa se encontra dentre as citadas e de acordo com a taxa de recuperação de BALDASSARE et al. (1994), os quais também utilizaram a mesma agulha que nós, acreditamos que o uso de agulha calibre 16 G em nosso estudo beneficiou a recuperação de boa taxa de oócitos aspirados, inclusive de boa qualidade.

Considerando o procedimento de aspiração folicular por videolaparoscopia, este não causou alterações na córtex ovariana e o crescimento folicular foi similar ao início das análises, mesmo após repetidas sessões, corroborando com autores que sugerem que esta técnica não afeta negativamente a função ovariana após repetidas punções foliculares (STANGL et al., 1999). Entretanto, CORDEIRO (2006) observaram o inverso em cabras, sendo que a qualidade dos oócitos recuperados diminuiu após seis semanas consecutivas de aspiração folicular e este mesmo dado foi observado em vacas por BROADBENT et al. (1996), após oito semanas.

Estudo paralelo ao nosso, realizado por TEIXEIRA (2010), evidenciou por meio da avaliação microscópica por histologia dos ovários aspirados, que o uso repetido desta técnica de aspiração folicular não compromete a vida reprodutiva da fêmea. Em tal avaliação, não foram encontradas lesões nos ovários, fato que deve ter ocorrido pelas punções serem em locais específicos, já que os folículos ovarianos localizam-se na superfície do ovário, na região cortical.

O risco da laparoscopia está, como em muitas outras técnicas cirúrgicas, na anestesia, a qual é imprescindível para a realização da intervenção e deve ser a mais prática e eficiente possível (CORDEIRO, 2006). Os princípios gerais para sua escolha na cirurgia tradicional são aplicáveis à laparoscopia (MARCELINO & PENICHE, 2002). Aumento das frequências cardíacas e respiratórias são atribuídas ao posicionamento (*Trendelenburg*) e à distensão abdominal causada pelo gás (pneumoperitônio), os quais causam entre outros efeitos, grande compressão diafragmática (CORDEIRO, 2006). De acordo com este autor, o período de 36 horas destinado ao jejum em nosso estudo, estabelecido pela observação dos animais sob efeito anestésico, foi ideal, uma vez que um tempo menor de restrição alimentar, principalmente de alimentos sólidos, predisponha o animal com mais frequência à regurgitação do conteúdo ruminal, que eram favorecidos pela posição em *Trendelenburg*. Desta forma, o risco de pneumonia por aspiração é alto, podendo levá-los a óbito.

A aspiração folicular por videolaparoscopia em ovinos é viável para a produção comercial, entretanto mais estudos com protocolos para estimulação ovariana, calibre, comprimento e tipos de agulhas, pressão de vácuo entre outros, ainda devem ser realizados para obtenção de melhores resultados.

5.2. Influência do número de sessões de aspiração folicular sobre a taxa de recuperação

Há relatos de que ocorre diminuição constante no número e na qualidade dos oócitos recuperados durante sucessivas sessões de OPU em ovelhas (KUHHLER et al., 1997) e em bovinos (BROADBENT et al., 1996). Entretanto, em nosso estudo observamos que não ocorreu este fenômeno, sendo que a quantidade de folículos e qualidade dos oócitos, como pode ser observados nas Figuras 5 e 6, não alteraram durante 9 semanas consecutivas de análises, fato também relatado por STANGL et al. (1999) e ALBERIO et al. (2002). Acreditamos que a influência do número de sessões sobre a atividade ovariana esteja correlacionada com o intervalo entre as sessões, sendo o aumento do intervalo entre sessões não prejudicial ao crescimento folicular,

assim como descrito por BONI et al. (1996) ao realizar várias sessões de OPU em búfalos e GIBBONS et al. (1994) em bovinos. Todavia, STANGL et al., (1999) verificaram que o aumento para o intervalo de sete dias não resultou em um aumento significativo no número de folículos na córtex ovariana.

Fato interessante foi relatado por KUHHLER et al., (1997) os quais observaram taxa de recuperação de oócitos em ovinos menor na primeira sessão de laparoscopia, aumentando na segunda e terceira sessões, e então diminuiu e permaneceu constante na quarta e quinta sessões. Estes animais não foram submetidos a tratamentos hormonais, o que pode ter contribuído para tais diferenças entre as sessões consecutivas, uma vez que em nosso estudo e nos demais já descritos, utilizando animais superovulados, as taxas de recuperação de oócitos permaneceram constantes.

Em nosso estudo foram aspirados média de $11,4 \pm 2,8$ folículos/ovelhas, sendo destes $6,4 \pm 2$ oócitos/ovelha e a taxa de recuperação total de oócitos de 61,4%. Esta taxa é inferior aos valores encontrados por BALDASSARE et al. (1994a), BALDASSARE et al. (1994b) e BALDASSARE et al. (1996) os quais obtiveram 79,9%, 79,5% e 82%, respectivamente, de oócitos recuperados ao realizar aspiração folicular por laparoscopia em ovelhas e similar ao verificado por KUHHLER et al. (1997) realizando um procedimento por semana durante cinco semanas obtiveram 67,9%.

Sendo importante ressaltar novamente que esta média se manteve durante as nove sessões consecutivas realizadas com uma semana de intervalo e o número de folículos por ovelha foi similar entre as sessões, assim como também observado por BALDASSARE et al. (2002) em ovelhas e AGUILAR et al. (2002) em cabras. Este fenômeno também foi observado por ALBERIO et al (2002), ao realizar o mesmo procedimento por seis vezes no mesmo animal, com intervalo de cinco dias, os quais puncionaram $13,9 \pm 5,3$ folículos por ovelha, sendo a média de $4,9 \pm 1,3$ oócitos por ovelha com uma taxa de recuperação de 33,6%. Estes últimos autores também fizeram uso da aspiração por videolaparoscopia, e obtiveram taxa de recuperação muito inferior a nossa, o que se deve a diferenças de técnica (agulha, pressão etc), como já mencionado, porém com 87% de oócitos viáveis, o que foi similar ao nosso estudo.

Ainda em estudo de ALBERIO et al. (2002), a taxa de oócitos de boa qualidade permaneceu constante durante as 5 sessões de LOPU em todos os grupos. As taxas de clivagem (72,2; 61,5 e 54,5%) e taxas de blastocistos (22,5; 24,1 e 12,2%), avaliadas em duas sessões, não mostraram diferença significativa entre os tratamentos. Essa constante taxa de recuperação ao longo das sessões também foi verificada em nosso estudo e discutida anteriormente.

Durante a pesquisa de KUHHLER et al. (1997) o número de folículos e oócitos por ovelha e a taxa de recuperação também não diferiram significativamente entre os períodos de colheita, durante 5 sessões. Entretanto, uma grande variabilidade em número de folículos e oócitos foi observada individualmente entre os animais, o que também foi observado por nós, como demonstrado na Tabela 1, sendo importante ressaltar que trabalhamos com fertilidade e que esta tem um caráter individual.

Comparando com outras técnicas de recuperação de oócitos, PTAK et al. (1999), por meio de laparotomia obteve 79,5% de recuperação oócitaria, enquanto CHAUBAL et al. (2007) aspirando por ultrassonografia vaginal em vacas, uma vez por semana, durante nove semanas, obtiveram 68,2% - 73,5% de oócitos recuperados, sendo que a taxa de oócitos de boa qualidade foi menor enquanto os oócitos de qualidade intermediária representaram a maioria. Sendo assim, observamos que nosso estudo (61,4%) está de acordo com os resultados destes autores obtidos utilizando outras técnicas e em outras espécies.

PTAK et al. (1999) repetiram a recuperação de oócitos em ovelhas, entretanto por procedimento de laparotomia duas vezes com 14 dias de intervalo e também não observaram diferença entre as sessões quanto ao número de oócitos recuperados.

A colheita de oócitos guiada por laparoscopia em cabras (AGUILAR et al., 2002) e em ovelhas (STANGL et al., 1999; BALDASSARRE et al., 2002) e por videolaparoscopia repetidas vezes (ALBERIO et al., 2002) resultou na recuperação de quatro a seis oócitos por fêmea em cada sessão, dado que corrobora com a quantidade de oócitos recuperados por sessão neste estudo ($6,4 \pm 2$ oócitos), sendo importante ressaltar que esta média se manteve em todas as nove sessões. Ainda por laparoscopia, porém aspirações únicas, BALDASSARRE et al. (1994; 1996) recuperaram

10,2±5,1-10,5±5,2 óócitos por fêmea, valores superiores ao nosso. Por outras técnicas de aspiração folicular o número de óócitos por ovelha por laparotomia foi de 10,9 (PTAK et al., 1999) e por ultrassonografia transvaginal foi de 4,3 (FREITAS et al., 2007). Tais taxas variam muito e dependem da técnica, estimulação ovariana dentre outros fatores que nos impedem comparar de forma correta os estudos. Entretanto, nossas taxas estão entre as encontradas e sendo mais importante, como elas não variaram entre as semanas, no final das aspirações a média de 42,2 óócitos recuperados por doadora pode ser considerada significativa, ainda mais quando pode se estender a fêmeas geneticamente superiores.

5.3. Influência do tamanho do folículo puncionado

Dinâmica dos ovários é importante porque o tamanho do folículo está diretamente relacionado ao diâmetro do óócito e isto afeta a capacidade subsequente de desenvolvimento *in vitro* (ARLOTTO et al. 1996; SONGSASEN et al., 2009).

O tamanho do folículo pode ser avaliado facilmente antes da aspiração, principalmente por videolaparoscopia. Seleção dos folículos pode ser útil na recuperação laparoscópica *in vivo*, já que o número de punções pode ser minimizada, assim, diminuindo o dano ao ovário, bem como diminuindo o tempo do procedimento e exposição do animal ao anestésico (RODRÍGUEZ et al., 2006). De acordo com estes autores a taxa de recuperação não é afetada pelo tamanho do folículo.

O diâmetro dos folículos em ovelhas estimuladas variaram entre 2 a 10 mm (PTAK et al., 1999). Ao avaliar a recuperação de óócitos de diferentes diâmetros foliculares, BALDASSARE et al. (1994b) não observaram diferença significativa nas taxas de recuperação de óócitos aspirados de folículos maiores e menores que 5 mm. Entretanto estes autores observaram que folículos maiores que 5 mm são mais difíceis de aspirar por possuírem conteúdo mais denso e que folículos grandes podem romper quando puncionados, favorecendo a perda de óócitos. Este fenômeno foi por nós evitado ao aspirar folículos com até 6 mm. Os autores ainda observaram que o tamanho do folículo não influenciou na qualidade dos óócitos, fato não verificado em nosso

estudo já que não houve separação dos oócitos recuperados de acordo com o tamanho do folículo punccionado.

Alguns autores sugerem a aspiração de folículos maiores que 3 mm por oferecerem melhor taxa de recuperação em ovelhas (BALDASSARE et al., 1994a) (83,8%), enquanto RODRÍGUEZ et al. (2006) não observaram diferença na obtenção de oócitos aspirados de folículos com diâmetro de 3 mm, entre 3-5 mm e maior que 5 mm, contudo a proporção de oócitos de boa qualidade aumentou com o tamanho do folículo. A competência do oócito em retomar a meiose espontaneamente (maturação nuclear) fora do folículo é adquirida quando este é oriundo de folículo de diâmetro superior a dois milímetros. Então, a aquisição da competência para o desenvolvimento (maturação citoplasmática) aumenta progressivamente com o tamanho do folículo ovariano do qual o oócito é obtido (COGNIÉ & BARIL, 2002). Nós optamos por aspirar apenas os folículos entre 2 e 6 mm de diâmetro, o que nos ofereceu taxa de recuperação de 61,4%, sendo 84% viáveis, sendo então nossos resultados satisfatórios e em acordo com estes autores.

O maior diâmetro folicular e a taxa de recuperação de oócitos por sessão é inversamente proporcional (SENEDA & BLASCHI, 2004), justificadas por alterações morfológicas no complexo *cumulus oophorus* (BOLS et al, 1998), viscosidade do fluído folicular (GOODHAND et al, 1999), quantidade de material a ser aspirado e pressão intrafolicular (SENEDA, 1999). Apesar da aspiração de folículos maiores que 5 mm ser mais facilitada (BOLS et al, 1997), a aspiração de folículos menores revelou ser mais eficiente na recuperação dos oócitos (SENEDA et al, 2001).

Vale ressaltar que baixas taxas de recuperação podem ser causadas ainda pelo colapso do folículo no orifício da agulha (PIETERSE et al, 1991) e presença de corpo lúteo (HAFEZ, 1993).

5.4. Influência da estimulação hormonal sobre as taxas de recuperação

Ao comparar as taxas de recuperação de oócitos por nós obtidas deve-se ainda levar em consideração os protocolos de estimulação hormonal utilizados. Tal aspecto

torna difícil avaliar os resultados já existentes, pois há grande variação entre os protocolos hormonais e intervalos de aplicação entre os estudos.

A média do número de folículos por nós aspirados foi de $11,4 \pm 2,8$, sendo este resultado similar ao encontrado em ovelhas (ALBERIO et al., 2002) e em cabras (FREITAS et al., 2007) submetidas a diferentes tratamentos hormonais, sendo $16,2 \pm 5,9$ e $12,5 \pm 1,5$, respectivamente. O número médio de folículos puncionáveis nos animais tratados com múltiplas injeções de FSH é $10,8 \pm 3,8$ e $9,5 \pm 6,5$ naqueles que receberam o protocolo dose única. Todavia, não foram observadas diferenças na taxa de colheita utilizando os diferentes protocolos hormonais. Podemos concluir que nosso protocolo hormonal único e consecutivo por semanas foi suficiente para estimular as doadoras.

Administrando a combinação de eCG + anti eCG em um grupo de ovinos pré-púberes e apenas FSH em outro, ANEL et al. (1997) puncionando folículos de 2 a 8 mm com agulha 18 G e pressão a vácuo de 100 mm Hg e realizando seis aspirações durante 11 semanas com intervalo de 14 dias, obtiveram 51,2% ($7,0 \pm 2,9$ fêmea/semana) de oócitos em pré-púberes tratadas com eCG e 45,1% ($7,2 \pm 1,7$ fêmea/semana) tratadas com FSH, sendo 87,6% de oócitos viáveis para eCG (36,6 oócitos válidos total) e 92,1% para FSH. Observamos que os resultados verificados por estes autores foram inferiores aos nossos, provavelmente devido a uma alta pressão de aspiração utilizada cabendo ainda ressaltar diferente protocolo de superovulação.

A OPU combinada com MIV/FIV é um método independente do tratamento hormonal segundo SCHRICK et al. (1993) e KUHHLZER et al. (1997), já que os folículos de diferentes tamanhos estão presentes em qualquer momento do ciclo estral. Entretanto, outros autores sempre utilizam superovulação dos animais afim de obter maior número de oócitos (ALBERIO et al., 2002; BALDASSARE et al., 1994b, PTAK et al., 1999; RODRÍGUEZ et al., 2006, SEVILLANO et al., 1997, ANEL et al., 1997). Ainda, estudos anteriores mostraram que o número de oócitos recuperados na primeira sessão pode ser aumentado utilizando doadoras que foram superovuladas (BALDASSARE et al., 1994b; 1996). Em nosso trabalho não realizamos aspiração em fêmeas não estimuladas. Sendo assim não possuímos um grupo sem estimulação, pois o objetivo

foi avaliar a diferença de recuperação dos oócitos após sucessivas aspirações e não diferentes protocolos hormonais.

Todavia, KUHHLZER et al. (1997) demonstraram que repetidas sessões de aspiração é o suficiente para aumentar o número de ooócitos obtidos em ovelhas sem estimulação hormonal. Estes autores, por um período de 5 semanas consecutivas, reportaram taxa de recuperação 67,9%. Nosso estudo combinou o tratamento de superovulação com repetidas sessões de aspiração folicular por 9 semanas e obtivemos taxa de 61,4%. Tais resultados são similares, indicando que a realização de protocolo de superovulação não interfere nas taxas de recuperação, mas podemos inferir que se houvesse tratamento de superovulação nos animais do estudo de KUHHLZER, as taxas encontradas poderiam ser maiores.

Uma das barreiras para a eficiência do tratamento superovulatório diz respeito à variabilidade individual da doadora em relação à eficiência das gonadotrofinas exógenas no recrutamento, crescimento, maturação e ovulação dos folículos (COGNIE et al., 2003). Um outro problema a ser transposto diz respeito à formação de anticorpos anti-FSH de origem suína após sucessivas administrações destas gonadotrofinas no protocolo de superovulação com conseqüente diminuição na resposta ovariana (CARNEIRO, 2008) e de anticorpos anti-eCG (ROY et al., 1999; DRION et al., 2001; DE RUIGH et al., 2000) o que comprometeria a obtenção de oócitos. Ao realizar a administração de eCG e anti-eCG, STANGL et al. (1999) obtiveram taxa de recuperação de oócitos de 55,5%, durante dez semanas, e valores similares foram observados por SEVILLANO et al. (1997). Nossos resultados foram superiores (61,4%), mas vale ressaltar que nosso protocolo hormonal foi diferente (MAP, FSH e eCG). Além disso, os resultados obtidos se contrapõem ao mencionado por estes autores, fato que faculta se questionar estes relatos e se propõe o desenvolvimento de pesquisas para esclarecer estes fenômenos.

Há relatos do uso de LH seis horas antes da OPU, resultando em oócitos morfollogicamente superiores, entretanto revelando hipertrofia dos ovários durante a luteinização folicular (CHAUBAL et al., 2007). Este fato demonstra a necessidade do uso criterioso de protocolos hormonais, com adequado intervalo entre as sucessivas

sessões de estimulação e aspiração quando o objetivo é utilizar o animal por um longo período de tempo. Em nosso trabalho, não observamos alterações macroscópicas nos ovários das doadoras, sugerindo mais uma vez que nosso protocolo hormonal foi adequado para uso por tempo prolongado.

Houve recuperação de boa qualidade de oócitos e não foi observada diminuição no número de COCs ao longo das análises após consecutivos procedimentos realizados em nosso estudo, assim como também observado por ANEL et al., (1997) com protocolo similar em intervalo de 14 dias, durante 11 semanas e por ALBERIO et al. (2002), em intervalo de cinco dias, por seis semanas. Os dados também corroboram com STANGL et al. (1999) (13.7 vs 7.0 $\pm$ 2.9 – folículos-oócitos) utilizando um tratamento com eCG/anti-eCG com intervalo entre procedimentos de sete dias durante 10 semanas, não havendo diferença destes resultados quando realizados procedimentos 2 vezes por semana sem estimulação hormonal (7.0 vs 7.4 COCs por animal por semana). Entretanto, estimulação adicional semanal com eCG resultou em 2,1 COCs a mais por animal por semana do que sem estimulação (7.0 vs 4.9 COCs; $P < 0.05$) de acordo com STANGL et al. (1999).

Sessões únicas de aspiração em outros estudos (BALDASSARE et al., 1994b; 1996; SMITH et al., 1994; TERVIT et al., 1992; 1993) resultaram em números de folículos variando de 10,4 a 14,7 por animal e sessão, com taxas de recuperação 49 a 54% (SMITH et al., 1994; TERVIT et al., 1992; 1993), o que foi similar a STANGL et al. (1999) (55.5%) em dez semanas e a taxa de recuperação por nós observada (61,4%) em 9 sessões. Apesar de pouca diferença, nossa taxa encontrada foi maior que estes autores, sugerindo que mais repetições, em animais estimulados hormonalmente, pode-se obter maior quantidade de oócitos.

5.5. Maturação *in vitro* de oócitos recuperados pela aspiração folicular por videolaparoscopia

A maturação do oócito é um dos estágios mais importantes para PIV de embriões em animais domésticos. Para o oócito estar apto a fertilização e alcançar o

estágio embrionário esta célula deve passar pela maturação nuclear e citoplasmática (KRISHER, 2004). Entretanto, a MIV ainda não está totalmente elucidada nas espécies domésticas, especialmente em pequenos ruminantes (SHI et al., 2009).

O sucesso da PIV de embriões está totalmente relacionado a taxa de sucesso da MIV, a qual é fator limitante para todo o processo. Assim, mesmo após cuidadosa seleção de COCs homogêneos, somente 35% irão atingir completa maturação citoplasmática e produzir blastocistos viáveis para serem transferidos segundo BLONDIN & SIRARD (1995). Portanto, inadequada maturação citoplasmática ou nuclear resulta em baixas taxas de fertilização e desenvolvimento embrionário. De acordo com este fato, reconhecemos a necessidade de avaliar a condição de maturação citoplasmática e nuclear dos oócitos provenientes de um processo de aspiração folicular, o qual submete esta célula a certa pressão de vácuo, o que causa danos que comprometem a sua viabilidade.

Até o momento, em ovinos, não há relatos da análise de maturação nuclear e citoplasmática de oócitos provenientes de aspiração folicular pela técnica de videolaparoscopia, tornando dificultosa a comparação de nossos resultados. Apenas um estudo foi relatado utilizando a mesma técnica, entretanto os autores não avaliaram os estágios de maturação nuclear e citoplasmática dos oócitos recuperados, e sim a análise das taxas de FIV (ALBERIO et al., 2002).

As análises de maturação nuclear revelaram taxas de MII de 90,1% (BALDASSARE et al., 1994a) e 75,1% (BERLINGUER et al., 2006) para oócitos obtidos pela laparoscopia; e para oócitos recuperados de ovários de abatedouro de 94,2% BALDASSARE et al. (1994a), 84% (LEDDA et al., 1997), 70,2% (WANG et al., 1998), 83% (KOCHHAR et al., 2002), 73,1% (SHIRAZI et al., 2008) e 81,3% (SHI et al., 2009). Nossas taxas de MII (32,72%) foram inferiores a essas apresentadas, mas similares a encontradas por FREITAS et al. (2007) para oócitos de ovinos (33,3%) e caprinos (48,9%), entretanto este autor não revela a técnica de obtenção de oócitos utilizada. É reconhecido que a MIV ainda não é tão eficiente como a maturação *in vivo*, portanto novos estudos são necessários para maximizar as taxas de maturação e melhorar a qualidade dos oócitos maturados *in vitro* (SHI et al., 2009). Apesar do sucesso da

maturação e fertilização, a competência de desenvolvimento subsequente de oócitos maturados *in vitro* ao estágio de blastocisto são baixas (MARTINO et al., 1995; RHO et al., 2001; TEOTIA et al., 2001). Sendo assim, torna-se importante a investigação criteriosa para a obtenção de um meio ideal que ofereça melhores taxas de maturação do que aquelas por nós verificadas, já que mesmo com bons resultados obtidos em maturação não garantem o prosseguimento do desenvolvimento *in vitro* satisfatório.

Acreditamos que devido a heterogeneidade natural dos oócitos imaturos utilizados para PIV, a maturação oocitária pode ser influenciada, dentre outros fatores, pelos componentes do meio e as várias condições de cultivo de acordo com COGNIÉ et al. (2003) e DIELEMAN et al., (2002), nos levando a acreditar que nosso meio necessite de reavaliação para oferecer taxas de maturação nuclear superiores.

Apesar de nosso estudo revelar taxas de maturação inferiores, é importante ressaltar que estas permaneceram estáveis durante as nove semanas consecutivas de análises, avaliação a qual era o objetivo do estudo. Assim, se conseguida a constituição ideal para o meio de maturação que ofereça melhores resultados, a combinação de bons resultados de MIV constante por nove semanas poderá ser obtida. Demais estudos, com repetidas sessões de aspiração folicular, não descrevem variações nas taxas de MIV ou FIV entre as sessões, mas apenas relatam diferenças entre taxas de maturação nuclear de acordo com os tratamentos hormonais utilizados nas doadoras (ANEL et al., 1997; ALBERIO et al., 2002; CHAUBAL et al., 2007). Podemos ainda, inferir que se a capacidade de MIV dos oócitos não foi afetada, as etapas subsequentes da PIV também não serão comprometidas.

Observamos ainda, em nosso estudo, que não foram encontrados os estágios de VG e QVG em 24 h de MIV. SHI et al. (2009) verificaram tais estágios após 24 h de MIV, contudo WANG et al., (1998) não os observaram após 27 h de incubação, dado que corrobora com nossas análises de maturação nuclear.

Apesar de baixas taxas de maturação serem observadas em nosso estudo, estas foram verificadas em estágio mais avançado no mesmo tempo decorrido de MIV, comparado ao estudo de KOCCHAR et al., 2002. Este fato pode ser devido as boas condições oferecidas pelo meio utilizado para o desenvolvimento nuclear, o que

proporcionou um avanço no estágio de maturação, em MI e MII, até momento das análises (24 h de MIV). Acreditamos que se realizássemos a análise do estágio de maturação nuclear precocemente, provavelmente os estágios de VG e QVG seriam observados.

Ainda em estudo de KOCCHAR et al. (2002), a maioria dos oócitos (81,8%) atingiram o estágio de QVG após quatro horas de MIV, e 83% o estágio de MI em 12 h. A prevalência deste estágio foi progressivamente menor após este período em ambos tipos de oócitos. O primeiro sinal de transição de anáfase-telófase foi observado 16 h após o início da incubação e MII foi evidenciado após 20 e 22 h. Em 26 h de maturação mais 83% dos oócitos atingiram o estágio de MII.

Nossos dados revelaram em 24 h de MIV uma taxa inferior quando comparada à este estudo sendo apenas 32,7% de oócitos maduros neste mesmo intervalo de tempo. Além do meio de maturação, uma outra possível explicação para este fato pode estar correlacionada com o exato momento da análise, pois MAXIMO et al. (2011) em um estudo descritivo da ultraestrutura do oócito de ovelhas durante a MIV, encontraram que após 24 h os oócitos mostravam sinais de degeneração, sugerindo que 18 h são suficientes para a completar a maturação. Eles também sugerem que os sinais de degeneração podem ser devido ao excesso de tempo de MIV (24 h), o que pode prejudicar as estruturas do oócito, resultando em falhas de pareação do cromossomo e diminuição na habilidade de fertilização. Sendo assim, sugerimos um estudo com análises das taxas de maturação em diferentes intervalos de incubação, possivelmente entre 18 e 26 h permitiriam o reconhecimento do momento apropriado que ofereça melhores taxas de MIV.

A maioria dos estudos em ovinos com MIV relatam somente a avaliação do estágio de maturação nuclear dos oócitos recuperados (LEDDE et al., 1997; WANG et al., 1998; KOCHAR et al., 2002; LUTHER et al., 2005; BERLINGUER et al., 2006; KELLY et al., 2007; SHIRAZI et al., 2008; SHI et al., 2009; SHABANKAREH et al., 2010). A avaliação da maturação citoplasmática tem sido pouco avaliada, e ainda apenas provenientes de estudos com outras espécies (bovinos – NIMURA & HOSOE et al., 1995; IZADYAR et al., 1998; humanos – GHELLER et al., 1998; COMBELLES et al.,

2002; equinos – CARNEIRO et al., 2002; caninos – APPARÍCIO-FERREIRA, 2010; PIRES-BUTTLE, 2010; suínos - HU et al., 2011). Nosso trabalho se ressalta por avaliar além do estágio de maturação nuclear também a maturação citoplasmática.

No que diz respeito a maturação citoplasmática, encontramos até o momento somente um relato de estudo que mostra esta avaliação em ovinos, sendo esta por análise ultraestrutural (MAXIMO et al., 2011), o que difere da técnica por nós utilizada, já que nosso estudo é o primeiro a realizar esta análise por coloração de FITC-lecitina nesta espécie. Este fato torna cautelosa a comparação de nossos resultados. Um pequeno número de oócitos em nosso estudo revelaram alcançar estágio de maturação citoplasmática (10,7%), este dado está de acordo com CROZET et al. (1993) que relataram que somente uma pequena proporção de oócitos de caprinos selecionados para MIV conseguem completar este estágio.

Evidências disponíveis indicam que o sistema de cultura oferece suporte adequado para maturação nuclear em oócitos humanos, mas falham em produzir oócitos com competência citoplasmática, resultando em embriões com reduzido potencial de desenvolvimento (COMBELLES et al., 2002; CHA & CHIAN, 1998; MOOR et al., 1998; TROUSON et al., 2001). Sendo assim, novamente reforçamos a necessidade do estudo da composição de meio para a MIV ideal e que ofereça além de taxas satisfatórias de maturação nuclear também de maturação citoplasmática, permitindo assim o favorecimento até o desenvolvimento embrionário.

Três possibilidades responsáveis pelo sucesso limitado da MIV em humanos foram descritas por COMBELLES et al. (2002), e que podem ter ocorrido em nosso estudo, sendo elas: condições de cultura, que até então não oferecem suporte na expressão de competência do desenvolvimento intrínscio oocitário; os sistemas atuais de MIV induzem assincronia na progressão da maturação nuclear e citoplasmática; os oócitos selecionados não contem componentes necessários para maturação nuclear e citoplasmática.

Os resultados por nós obtidos ainda revelaram a assincronia descrita entre a maturação nuclear e citoplasmática, evidenciando que são eventos independentes de acordo com IZADYAR et al., 1998. Este fato, além do já descrito por COMBELLES et al.

(2002), também pode ser causado pela superovulação realizada em nosso trabalho por repetidas vezes, pois esta é reconhecida por causar alta incidência de assincronia entre o estágio de maturação do folículo e seus oócitos (DE LOOS et al., 1991) e entre estágio de maturação nuclear e citoplasmática nos oócitos (HYTTEL et al., 1986; ASSEY et al., 1994). Além disso, alterações na maturação citoplasmática são mais aparentes nos estádios finais do desenvolvimento embrionário (TROUNSON, 2001).

5.6. Considerações finais

Concordando com as conclusões em aspiração folicular transvaginal em vacas, segundo SENEDA & BLASCHI (2004), e comparando com a aspiração folicular em ovelhas por videolaparoscopia, os principais desafios para maior disseminação da aspiração folicular são o alto custo dos equipamentos e a dedicação necessária ao treinamento da técnica. Assim, maior padronização na recuperação dos oócitos será obtida com a aplicação de protocolos de sincronização do estro, visando a realização da aspiração em momentos mais propícios. Mais pesquisas são necessárias para estabelecer o momento mais apropriado para aspiração folicular, e para estudar a maturação e fertilização desses oócitos recuperados *in vivo*.

Como desvantagem da técnica, estão os altos custos em equipamento e a necessidade de treinamento, tanto do operador quanto do auxiliar para efetivamente minimizar trauma e tempo cirúrgico (TABET, 2007). Em um passado recente, o instrumental necessário para uma videolaparoscopia era muito caro, sem encontrar demanda de utilização que o tornasse economicamente viável. No entanto, com a frequência de uso da vídeocirurgia nas outras espécies animais e a maior demanda por serviços mais profissionalizados na produção de pequenos ruminantes, as abordagens laparoscópicas têm encontrado seu nicho de atuação, e começam a se difundir ainda mais entre os Médicos Veterinários (GHELLER, 2008).

Em conclusão, consecutivas aspirações foliculares semanais por videolaparoscopia combinada com tratamento hormonal dos animais, é um procedimento prático e eficiente para recuperação de oócitos em ovelhas. Esta técnica

provém grande quantidade de COCs de boa qualidade por período de no mínimo nove semanas e também garante a manutenção da fertilidade da doadora. Portanto, este método, combinado com programas de PIV bem estabelecidos, permite aumentar o número de descendentes de animais geneticamente superiores mesmo quando estes são afetados pela infertilidade.

Apesar de nosso estudo não obter as melhores taxas de recuperação de oócitos nem de MIV, o objetivo foi alcançado, pois não almejávamos resultados superiores, e sim obtermos o conhecimento se as consecutivas aspirações foliculares por videolaparoscopia interferiam na recuperação de oócitos quanto a quantidade e qualidade e na sua capacidade de maturação *in vitro*, o que não ocorreu. Além disso, foi importante tomarmos conhecimento que apesar de nove semanas consecutivas de aspiração, os animais não sofreram nenhuma injúria nem aos órgãos reprodutivos nem ao seu bem estar. Se mais estudos forem realizados para melhorar aspectos técnicos, tratamento hormonal e meios de maturação, repetidas recuperações laparoscópicas de oócitos de ovelhas, associadas a PIV e transferência de embriões trarão avanços importantes na biotecnologia da reprodução em pequenos ruminantes.

6. CONCLUSÕES

- Procedimentos de aspiração folicular por videolaparoscopia consecutivos, em nove sessões semanais, apresentaram-se viáveis, mostrando que a técnica apresenta um enorme potencial para otimização da reprodução assistida em ovinos;
- A repetição das sessões de aspiração folicular não alterou o número de folículos visibilizados e aspirados, nem a quantidade e qualidade dos oócitos recuperados;
- A capacidade de MIV dos oócitos recuperados foi preservada ao longo das sessões;
- O intervalo entre as sessões de aspiração folicular permitiu a adequada recuperação dos animais.

7. REFERÊNCIAS

ACCARDO, C.; DATTENA, M.; PILICHI, S.; MARA, L.; CHESSA, B.; CAPPAL, P. Effect of recombinant human FSH and LH on in vitro maturation of sheep oocytes; embryo development and viability. **Animal Reproduction Science**, v. 81, p. 77-86, 2004.

AGUILAR, B.; ROCHE, A.; OLIVEIRA, J.; FOLCH, J.; ALABART, J. L. Oocyte retrieval after repeated *ovum pick-up* in unstimulated sheep and goat. In: MEETING ASSOCIATION EUROPÉENNE DE TRANSFERT EMBRYONNAIRE (AETE), 18, 2002, Nouzilly, France. **Proceedings ...** Nouzilly: INRA, 2002. p.130.

ALBERIO, R.H.; ECHEGOYEN, E.; OLIVERA, J.; ROCHE, A.; ALABART, J.; FERNANDEZ-ARIAS, A.; FOLCH, J. Performance in an OPU program of FSH stimulated or nonstimulated Romanov and Rasa aragonesa ewe breeds. **Theriogenology**, v. 55, p. 509, 2001. (Abstract).

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 Ruminant Research**, v. 46, p. 81–87, 2002.

ALBERTINI, D. F. Cytoplasmic microtubular dynamics and chromatin organization during mammalian oogenesis and oocyte maturation. **Mutation Research**, v. 296, p. 57–68, 1992.

ANEL, L.; SEVILLANO, C.; ALVAREZ, M.; ALEGRE, B.; ANEL, E.; DOMINGUEZ, C.; CARBAJO, M.; DE LA FUENTE, J. Repeated laparoscopic follicular aspiration in ewe. **Theriogenology**, v. 47, p. 152, 1997 (Abstract).

ANEL, L.; SEVILLANO, C.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; BOIXO, J.C.; OLMEDO, J., DE PAZ, P.; DE LA FUENTE, J. Oocyte recovery rate in repeated laparoscopic follicle

aspiration (LFA) in lambs. In: LAURIA, A.; GANDOLFI, F.; ENNE, G.; GIANAROLI, L. (Eds). **Gametes: Development and Function**. Milan: Serono Symposia, 1998. p. 505. (Abstract).

ALVAREZ, M.; ANEL, L.; ANEL, E.; RODRIGUEZ, C.; KAABI, M.; BOIXO, J.; DE PAZ, P.; OLMEDO, J. Efficiency of laparoscopic follicular aspiration in sheep. **Theriogenology**, v. 51, p. 432, 1999.

APPARICIO-FERREIRA, M. **Efeito da suplementação de hCG, progesterona e estradiol na maturação nuclear e citoplasmática *in vitro* de oócitos de cadelas (*canis familiaris*) obtidos por ovariosalpingo-histerectomia**. 2006. 65 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Cirurgia Veterinária. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

APPARÍCIO-FERREIRA, M. **Maturação nuclear e citoplasmática de oócitos de cadelas colhidos em diferentes fases do ciclo estral e cultivados *in vitro* em meios sequenciais com hormônios e espermatozóide**. 2010. 69f. Tese (Doutorado) – Programa de Medicina Veterinária, Reprodução Animal. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

ARLOTTO, T.; SCHWARTZ, J. L.; FIRST, N. L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L. Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 45, p. 943–956, 1996.

ASSEY, R.J.; HYTTEL, P.; ROCHE, J. F.; BOLAND, M. Oocyte structure and follicular steroid concentrations in superovulated versus unstimulated heifers. **Mol Reprod Dev**, v. 39, p. 8–16, 1994.

BALDASSARE, H. Tecnologias reprodutivas de última geração. In: AISEN, E. G. **Reprodução ovina e caprina**. 1. ed. São Paulo: MedVet, 2008. p. 179-192.

BALDASSARRE, H.; FURNUS, C.C.; MATOS, D.; PESSI, H.; DE MATOS, D.G. 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.; CASTRO, T.E.; FURNUS, C.C.; DE MATOS, D.G. In vitro maturation and fertilization of sheep oocytes collected by laparoscopic folliculocentesis. **Theriogenology**, v. 41, p. 159, 1994a.

BALDASSARRE, H.; DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C.; CASTRO, T.E.; FISCHER, E.I.C. Technique for efficient recovery of sheep oocytes by laparoscopic folliculocentesis. **Animal Reproduction Science**, v. 35, p. 145–150, 1994b.

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

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

BERLINGUER, F.; LEONI, G.; BOGLIOLO, L.; PINTUS, P.P.; ROSATI, I.; LEDDA, S.; NAITANA, S. FSH different regimes affect the developmental capacity and cryotolerance of embryos derived from oocytes collected from ovum pick-up in donor sheep. **Theriogenology**, v. 61, p.1477–1486, 2004.

BERLINGUER, F.; GONZALEZ-BULNES, A.; SUCCU, S.; LEONI, G. G.; VEIGA-LOPEZ, A.; MOSSA, F.; GARCIA-GARCIA, R. M.; BEBBERE, D.; GALIOTO, M.; COCERO, M. J.; NAITANA, S. GnRH antagonist enhance follicular growth in FSH-treated sheep but affect developmental competence of oocytes collected by ovum pick-up. **Theriogenology**, v. 65, p.1099–1109, 2006.

BERNARDI, M.L.; FLECHON, J.E.; DELOUIS, C. Influence of culture system and oxygen tension on the development of ovine zygotes matured and fertilized in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 106, p. 161–167, 1996.

BESENFELDER, U.; MÖBLAHER, G.; BREM, G. Oocyte collection. **Reproduction in Domestic Animals Suppl**, v. 6, p. 38-44, 1999.

BLONDIN, P.; SIRARD, M. A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.41, p. 54-62, 1995.

BOLS, P.E.J.; B.; VAN SOOM, A.; VANDENHEEDE, J.M.M.; KRUIF, A.D. Oocyte pick-up in the cow: the effect of changes in aspiration vacuum and disposable needle diameter on the morphology of the cumulus oocyte complex and the developmental capacity of the oocyte. In: **REUNION AETE**, Hannover, Germany, p.132, 1995. (Abstract).

BOLS, P. E. J.; VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M.T.; VANDENHEEDE, J. M. M.; DE KRUIF, A. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 45, p. 1001–1014, 1996.

BOLS, P.E.J.; YSEBAERT, M.T.; VAN SOOM, A.; KRUIF, A.D. 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.

BOLS, P.E.J.; YSEBAERT, M.T.; LEIN, A.; CORYN, M.; VAN SOOM, A.; KRUIF, A.D. Effects of long-term treatment with bovine somatotropin on follicular dynamics and subsequent oocyte and blastocyst yield in an OPU-IVF program. **Theriogenology**, v. 49, p.983-995, 1998.

BONI, R.; ROVIELLO, S.; ZICARELLI, L. Repeated ovum pick-up in italian mediterranean buffalo cows. **Theriogenology**, v. 46, p. 899-909, 1996.

BROADBENT, P. J.; DOLMAN, D. F.; WATT, R. G.; SMITH, A. K.; FRANKLIN, M. F. Effect of frequency of follicle aspiration on oocyte yield and subsequent superovulatory response in cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 1027-1040, 1996.

BROGLIATTI, G.M.; ADAMS, G.P. Ultrasound-guided transvaginal oocyte collection in prepubertal calves. **Theriogenology**, v. 45, p. 1163–1176, 1996.

BRUSSOW, K. P.; TORNER, H.; RATKY, J.; HUNTER, M. G.; NURNBERG, G. Ovum pick up in swine: the influence of aspiration vacuum pressure on oocyte recovery from preovulatory follicles. **Acta Vet Hung**, v. 45, p.189–196, 1997.

BRUYNZEEL, A. W.; MERTON, J. S.; WIJST, J. V.; HAZELEGER, W.; KEMP, B. Effect of cumulus cells during IVM on bovine early embryonic development. **Theriogenology**, v. 47, p. 185, 1997 (Abstract).

BUCCIONE, R.; SCHROEDER, A.C.; EPPIG, J. J. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. **Biology of Reproduction**, v.43, p.543-547, 1990.

CAO, X.; ZHOU, P.; LUO, H.; ZHAO, Y.; SHI, G. The effect of VEGF on the temporal-spatial change of α -tubulin and cortical granules of ovine oocytes matured in vitro. **Animal Reproduction Science**, v.113, Issues 1-4, p. 236-250, 2009.

CARLIN, S.K.; GARST, A.S.; TARRAF, C.G.; BAILEY, T.L.; MCGILLIARD, M.L.; GIBBONS, J.R.; AHMADZADEH, A.; GWAZDAUSKAS, F.C. Effects of ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on oocyte recovery and hormonal profiles before and after GnRH treatment. **Theriogenology**, v. 51, p. 1489–1503, 1999.

CARNEIRO, G. F.; LIU, I. K.; HYDE, K.; ANDERSON, G. B.; LORENZO, P. L.; BALL, B. A. Quantification and Distribution of Equine Oocyte Cortical Granules During Meiotic Maturation and After Activation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 63, p. 451–458, 2002.

CARNEIRO, G.; LORENZO, P.; PIMENTEL, C.; PEGORARO, L.; BERTOLINI, M.; BALL, B.; ANDERSON, G.; LIU, I. Influence of insulin-like growth factor-I and interaction with gonadotropins, estradiol, and fetal calf serum on *in vitro* maturation and parthenogenic development in equine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 899-905, 2001.

CARNEIRO, G. F.; SILVA, S. V.; MEDEIROS, L. R. D.; GOMES NETO, O. C.; PROCÓPIO, O. C. S. Utilização Prática de Sêmen Congelado. In: I **Simpósio Brasileiro de Reprodução Assistida em Caprinos e Ovinos**, 2007, Gravata - PE. ASSIST 2007, 2007.

CARNEIRO, G. F. Biotécnicas da reprodução assistida em pequenos ruminantes. **Tecnol. & Ciên. Agropec.**, v.2, n.3, p.23-28, 2008.

CARNEVALE, E. M. Gamete intrafallopian transfer. **Veterinary Clinics of North America Equine Practice**, v. 12, p. 47-60, 1996.

CAROLON, C.; MONAGHAN, P.; MEHMOOD, A.; LONERGAN, P.; GALLAGHER, M.; GORDON, I. Slicing of bovine ovaries as a means of oocyte recovery. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 9, p. 51, 1992.

CHA, K. Y.; CHIAN, R. C. Maturation in vitro of immature human oocytes for clinical use. **Human Reproduction Update**, v. 4, p. 103-120, 1998.

CHAUBAL, S. A.; FERRE L. B.; MOLINA, J. A.; FABER, D. C.; BOLS, P.E.J.; REZAMAND, P.; TIAN, X.; YANG, X. Hormonal treatments for increasing the oocyte and embryo production in an OPU–IVP system. **Theriogenology**, v. 67, p. 719–728, 2007.

CHAVES, R. N.; DUARTE, A. B. G.; MATOS, M. H. T.; FIGUEIREDO, J. R. **Sistemas de cultivo *in vitro* para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos** Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v.34, n.1, p.37-49, jan./mar. 2010. Disponível em www.cbpa.org.br

CHEN, S.U.; LIEN, Y.R.; CHAO, K.H.; HO, H.N.; YANG, Y.S.; LEE, T.Y. Effects of cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocyte freezing - a review article. **Molecular and Cellular Journal of Endocrinology**, v. 202, p. 101–107, 2003.

CHERR, G.; DROBNIS, E.; KATZ, D. Localization of cortical granule constituents before and after exocytosis in hamster eggs. **Journal of Experimental Zoology**, v. 246, p. 81–93, 1988.

COGNIÉ Y, BARIL G. Le point sur la production et le transfert d'embryons obtenus *in vivo* e *in vitro* chez la brebis e la chèvre. **Animal Production**, v. 15, p. 199-207, 2002.

COGNIÉ, Y.; BARIL, G.; POULIN, N.; MERMILLOD, P. Current status of embryo technologies in sheep and goat. **Theriogenology**, v. 59, p. 171-188, 2003.

COMBELLES, C.M.; CEKLENIK, N.A.; RACOWSKY, C.; ALBERTINI, D.F. Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in in-vitro matured human oocytes. **Human Reproduction**, v. 17, p. 1006–1016, 2002.

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

CRAN, D.G.; ESPER, C.R. Cortical granules and the cortical reaction in mammals. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 42 (Suppl.), p. 177–188, 1990.

CROSBY, I.M.; OSBORN, J.C.; MOOR, R.M. Follicle cell regulation of protein synthesis and developmental competence in sheep oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 62, p. 575-582, 1981.

CROZET, N.; DE SMEDT, V.; AHMED-ALI, M.; SEVELLEC, C. Normal development following in vitro maturation and fertilization in the goat. **Theriogenology**, v. 39, p. 206, 1993 (Abstract).

CURCIO, B. R. **Maturação e vitrificação de oócitos eqüinos incubados em meio contendo hormônio do crescimento e fator de crescimento semelhante à insulina-I**. 2005. 65f. Dissertação (Mestrado em Veterinária) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS.

DAMIANI, P.; FISSORE, R.A.; CIBELLI, J.B.; LONG, C.R.; BALISE, J.J.; ROBL, J.M.; DUBY, R.T. Evaluation of developmental competence, nuclear and ooplasmic

maturation of calf oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 45, p. 521–534, 1996.

DANDEKAR, P.; TALBOT, P. Perivitelline space of mammalian matrix of unfertilized oocytes and formation of cortical granule envelope following fertilization. **Molecular Reproduction and Development**, v. 31, p. 135–143, 1992.

DE LOOS, F. A. M.; BEVERS, M. M.; DIELEMAN, S. J.; KRUIP, T. H. A. M. Follicular and oocyte maturation in cows treated for superovulation. **Theriogenology**, v. 35, p. 537–46, 1991.

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

DIELMAN, S. J.; HENDRIKSEN, P. J. M.; VIUFF, D.; THOMSEN, P. D.; HYTTEL, P.; KNIJN, H. M.; WRENZYCKI, C.; KRUIP, T. A. M.; NIEMANN, H.; GADELLA, B. M.; BEVERS, M. M.; VOS, P. L. A. M. Effect of in vivo prematuration and in vivo final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. **Theriogenology**. v. 57, p. 5-20, 2002.

DONG, J. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. **Nature**, v. 383, p. 531–535, 1996.

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

DUCIBELLA, T.; BUETOW, J. Competence to undergo normal, fertilization-induced cortical activation develops after metaphase I of meiosis in mouse oocytes. **Developmental Biology**, v. 165, p. 95–104, p. 1994.

DUCIBELLA, T.; KURASAWA, S.; RANGARAJAN, S.; KOPF, G.S.; SCHULTZ, R.M. Precocious loss of cortical granules during mouse oocyte meiotic maturation and correlation with an egg-induced modification of the zona pellucid. **Developmental Biology**, v. 137, p. 46–55, 1990.

ELVIN, J. A.; YAN, C.; WANG, P.; NISHIMORI, K.; MATZUK, M. M. Molecular characterization of the follicle defects in the growth factor-9-deficient ovary. **Molecular Endocrinology**, v. 13, p. 1018–1034, 1999.

EPPIG, J. J.; SCHULTZ, R. M.; O'BRIEN, M.; CHESNEL, F. Relationship between developmental programs controlling nuclear and cytoplasmic maturation of mouse oocytes. **Dev Biol**, v. 164, p. 1-9, 1994.

EPPIG, J.J. Coordination of nuclear and cytoplasmic oocyte maturation in eutherian mammals, **Reproduction Fertility and Development**, v. 8, p. 485–489, 1996.

FAIR, T.; HYTTEL, P., GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity, **Molecular Reproduction and Development**, v. 42, p. 437–442, 1995.

FERNANDES, C. B. **Maturação *in vitro* de ovócitos eqüinos: comparação entre meios TCM 199, SOFaa e HTF: BME, e avaliação da adição de FSH bovino, FSH eqüino e do hormônio do crescimento eqüino por meio da transferência de ovócito.** 2004. 129f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

FISSORE, R.A.; HE, C.L.; VANDEWOUDE, G.F. Potential role of mitogenactivated protein kinase during meiosis resumption in bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 1261–1270, 1996.

FREITAS V. J. F.; ANDRADE M. L. L.; CAJAZEIRAS, J. B.; LUZ J. V. Produção *in vitro* de embriões em pequenos ruminantes explorados no nordeste do Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35(Supl. 3), p. 781-786, 2007.

FREITAS, V. J. F.; SIMPLÍCIO, A. A. Transferência de embriões em caprinos. In: GONÇALVES P.B.D., FIGUEIREDO J.R., FREITAS V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Livraria Varela, 2002. p. 179-194.

FRY, R.C.; NIAL, E.M.; SIMPSON, T.L.; SQUIRES, T.J.; REYNOLDS, J. The collection of oocytes from bovine ovaries. **Theriogenology**, v. 47, p. 977–987, 1997.

FUKUI, Y.; GLEW, A.M.; GANDOL, F.; MOOR, R.M. In vitro culture of sheep oocytes matured and fertilized in vitro. **Theriogenology**, v. 29, p. 883-891, 1988.

GALLI, C., MOOR, R. M. Gonadotrophin requirement for the in vitro maturation of sheep oocytes and their subsequent development. **Theriogenology**, v. 35, p. 1083–1093, 1991.

GHELLER, V. Abordagens laparoscópicas em pequenos ruminantes. **Ciênc. vet. tróp.**, v. 11, supl. 2, p. 52 – 55, 2008.

GHETLER, Y.; RAZ, T.; BEN NUN, I.; SHALGI, R. Cortical granules reaction after intracytoplasmic sperm injection. **Molecular Human Reproduction**, v.4, n.3, p. 289–294, 1998.

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

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.

GOODHAND, K. L.; WATT, R.G.; STAINES, M. E.; HUTCHINSON, J. S. M.; BROADBENT, P. J. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following fsh treatment. **Theriogenology**, v. 51, p. 951-961, 1999.

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

GRONDAHL, C.; HOST, T.; BRÜCK, I.; VIUFF, D.; BEZARD, J.; FAIR, T.; GREVE, T.; HYTTEL, P. In vitro production of equine embryos. **Biology of Reproduction**, v. 1, p. 299-307, 1995.

GULER, A.; POULIN, N.; MERMILLOD, P.; TERQUI, M.; COGNIÉ, Y. Effect of growth factor, EGF and IGF-I, and estradiol on in vitro maturation of sheep oocytes. **Theriogenology**, v. 54, p. 209-218, 2000.

GUSMÃO, A. L.; ANDRADE MOURA, J.C. Transferência de embriões em caprinos e ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33 (supl 1), p. 29 – 33, 2005.

HAFEZ, E. S. E. Folliculogenesis, egg maturation and ovulation. In: **Reprod. Farm Anim.** Lea Febiger Philadelphia. V. 1, p. 114-143, 1993.

HASHIMOTO, N.; KISHIMOTO, T. Cell cycle dynamics of maturationpromoting factor during mouse oocyte maturation. **Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine**, v. 11, p. 471–477, 1986.

HASHIMOTO, S.; TAKAKURA, R.; KISHI, M.; SUDO, T.; MINAMI, N.; YAMADA, M. Ultrasound-guided follicle aspiration: the collection of bovine cumulus-oocyte complexes from ovaries of slaughtered or live cows. **Theriogenology**, v. 51, p. 757–765, 1999.

HELEIL, B.; TORNER, H., ALM, H.; KUZMINA, T. Effect of follicle size and bovine prolactin on quality of bovine cumulusoocyte complexes. **Theriogenology**, v. 53, p. 356, 2000.

HENDRIKSEN, P.; VOS, P.; STEENWENG, W.; BEVERS, M.; DIELEMAN, S. Bovine follicular development and its effect on the in vitro competence of oocytes. **Theriogenology**, v. 53, p. 11–20, 2000.

HERRICK, J.R.; BRAD, A.M.; KRISHER, R.L. Chemical manipulation of glucose metabolism in porcine oocytes: effects on nuclear and cytoplasmic maturation in vitro. **Reproduction**, v. 131, p. 289–298, 2006.

HEWITT, D. A.; ENGLAND, G. C. W. The effect of preovulatory endocrine events upon maturation of oocytes of domestic bitch. **Journal of Reproduction and Fertility** supplement, v. 51, p. 83-91, 1997.

HEYNER, S.; SHAN, N.; SMITH, R.M.; WATSON, A.J.; SCHULTZ, G.A. The role of growth factors in embryo production. **Theriogenology**, v. 39, p. 151–161, 1993.

HOODBHOY, T.; TALBOT, P. Mammalian cortical granules: contents, fate, and function. **Molecular Reproduction and Development**, v. 39, p. 439–448, 1994.

HU, J.; MA, X.; BAO, J. C.; LI, W.; DE CHENG, GAO, Z.; LEI, A. YANG, C.; WANG, H. Insulin–transferrin–selenium (ITS) improves maturation of porcine oocytes *in vitro*. **Zygote**, v. 19, p. 191–197, 2011.

HUNTER, R. H. F.; POLGE, C. Maturation of follicular oocytes in the pig after injection of human chorionic gonadotrophin. **J Reprod Fertil**, v. 12, p. 525-531, 1966.

HYTTEL, P.; XU, K. P.; SMITH, S.; GREVE, T. Ultrastructure of in vitro maturation in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 78, p. 615–625, 1986.

IWASAKI, S.; KONO, T.; NAKAHAI, T.; SHIOYO, Y.; FUKUSHIMA, M.; HANADA, K. New methods for the recovery of oocytes from the bovine ovarian tissue in relation to in vitro maturation and fertilization. **Japanese Journal of Animal Reproduction**, v. 33, p. 188-191, 1987.

IZADYAR, F.; HAGE, W.J.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M.M. The promotory effect of growth hormone on the developmental competence of in vitro matured bovine oocytes is due to improved cytoplasmic maturation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 49, p. 444–453, 1998.

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

KAFI, M.; MCGOWAN, M. R. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 48, p. 137–157, 1997.

KALOUS, J.; KUBELKA, M.; RIMKEVICOVA, Z.; GUERRIER, P.; MOTLIK, J. Okadaic acid accelerates germinal vesicle breakdown and overcomes cycloheximide- and 6-dimethylaminopurine block in cattle and pig oocytes. **Developmental Biology**, v. 157, p. 448–454, 1993.

KATASKA, L. Comparison of two methods for the recovery of ovarian oocytes from slaughtered cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 7, p. 461-463, 1984.

KELLY, J. M.; KLEEMANN, D. O.; MAXWELL, W. M. C.; WALKERA, S. K. Effect of GnRH treatment on the maturation and *in vitro* development of oocytes collected from 4- to 6-week-old Merino lambs. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, p. 947–953, 2007.

KIM, S. K.; PARK, H. K. Studies on the *in vitro* maturation and fertilization rate of bovine follicular oocytes. **Theriogenology**, v. 33, p. 267. 1990.

KLINE, D.; STEWART-SAVAGE, J. The timing of cortical granule fusion, content dispersal, and endocytosis during fertilization of the hamster egg: An electrophysiological and histochemical study. **Developmental Biology**, v. 162, p. 277–287, 1994.

KOCHHAR, H. P. S.; WU, B.; MORRIS, L. H. A.; BUCKRELL, B. C.; POLLARD, J. W.; BASRUR, P. K.; KING, W. A. Maturation status, protein synthesis and developmental competence of oocytes derived from lambs and ewes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, p. 19-25. 2002.

KOSAKO, H.; GOTOH, Y.; NISHIDA, E. Mitogen-activated protein kinase is required for the mos-induced metaphase arrest. **Journal of Biology Chemistry**, v. 269, p. 28354-28358, 1994.

KRISHER, R.L. The effect of oocyte quality on development. **Journal of Animal Science**, v. 82, p.14-23, 2004.

KUHHOLZER, B.; MULLER, 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.

LEÃO, A. G. **Qualidade de carne de cordeiros terminados com dietas contendo cana-de-açúcar ou silagem de milho**. 2008. 117 f. tese (doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

LEDDA, S.; BOGLIOLO, L.; CALVIA, P.; LEONI, G.; NAITANA, S. Meiotic progression and developmental competence of oocytes collected from juvenile and adult ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 109, p. 73-78, 1997.

LEE, S.H.; AHUJA, K.K.; GILBURT, D.J. The appearance of glycoconjugates associated with cortical granule release during mouse fertilization. **Development**, v. 102, p. 595–604, 1988.

LEIBFRIED, L.; FIRST, N. L.; Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. **Journal of Animal Science**, v. 48, p. 76-86, 1979.

LEONI, G.G.; ROSATI, I.; SUCCU, S.; BOGLIOLO, L.; BEBBERE, D.; BERLINGUER, F.; LEDDA, S.; NAITANA, S. A Low Oxygen Atmosphere during IVF Accelerates the Kinetic of Formation of In Vitro Produced Ovine Blastocysts. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 299–304, 2007.

LI, Z.; JIANG, Q.; SABET, M. R.; ZHANG, Y.; RITCHIE, T.; ENGELHARDT, J. F. Conditions for *in vitro* maturation and artificial activation of ferret oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 66, p.1 380-1386, 2002.

LONERGAN, P.; MONAGHAN, P.; RIZOS, D.; BOLAND, M. P.; GORDON, I. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following maturation, fertilization and culture in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 37, p. 48–53, 1994.

LONERGAN, P.; SHARIF, H.; MONAGHAN, P.; WAHID, H.; GALLAGHER, M.; GORDON, I. Effect of follicle size on bovine oocyte morphology and embryo yield following maturation, fertilization and culture in vitro. **Theriogenology**, v. 37, p. 248, 1992.

LONERGAN, P.; VERGOS, E.; KINIS, A.; SHRIF, H.; GALLAGHER, M.; GORDON, I. The effect of recovery method on type of bovine oocytes obtained for in vitro maturation. **Theriogenology**, v. 35, p. 231, 1991.

LUO, H.; KIMURA, K.; AOKI, M.; HIRAKO, M. Effect of vascular endothelial growth factor on maturation, fertilization and developmental competence of bovine oocytes. **Journal Veterinary Medical Science**, v. 64, p. 803–806, 2002.

LUO, H.L.; TIAN, S.J.; ZHU, S. Effect of vascular endothelial growth factor on the development of ovine embryo in vitro. **Biology of Reproduction**, p. 154, 2005.

LUTHER, J. S.; REDMER, D.A.; REYNOLDS, L. P.; CHOI, J. T.; PANT, D.; NAVANUKRAW, C.; ARNOLD, D. R.; SCHEAFFER, A. N.; BOROWICZ, P.; KIRSCH, J. D.; WEIGL, R. M.; KRAFT, K. C.; GRAZUL-BILSKA, A. T. Ovarian follicular development and oocyte quality in anestrus ewes treated with melatonin, a controlled internal drug

release (CIDR) device and follicle stimulating hormone. **Theriogenology**, v. 63, p. 2136-2146, 2005.

MAALOUF, W.E.; LEE, J.H.; CAMPBELL, K.H.S. Effects of caffeine, cumulus cell removal and aging on polyspermy and embryo development on in vitro matured and fertilized ovine oocytes. **Theriogenology**, v. 71, Issue 7, p. 1083-1092, 2009.

MADISON, V.; AVERY, B.; GREVE, T. Selection of immature bovine oocytes for developmental potential in vitro. **Animal Reproduction Science**, v. 27, p 1-11. 1992.

MARCHAL, R.; VIGNERON, C.; PERREAU, C.; BALI-PAPP, A.; MERMILLOD, P. Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. **Theriogenology**, v. 57, p. 1523–1532. 2002.

MARO, B.; JOHNSON, M.H.; WEBB, M.; FLACH, G. Mechanism of polar body formation in the mouse oocyte: an interaction between the chromosomes, the cytoskeleton and the plasma membrane. **Journal of Embryology and Experimental Morphology**, v. 92, p. 11–32, 1986.

MARTINO, A.; MOGAS, T.; PALOMO, M. J.; PARAMIO, M. T. In vitro maturation and fertilization of prepubertal goat oocytes. **Theriogenology**, v. 43, p. 473—485, 1995.

MASUI, Y.; MARKERT, C.L. Cytoplasmic control of nuclear behaviour during meiotic maturation of frog oocytes. **Journal of Experimental Zoology**, v. 177, p.129–145, 1971.

MATTSON, B.A.; ALBERTINI, D.F. Oogenesis: chromatin and microtubule dynamics during meiotic prophase. **Molecular Reproduction and Development.**, v. 25, p. 374–383, 1990.

MÁXIMO, D.M.; MARTINS DA SILVA, I. G.; MONDADORIC, R. G.; NEVES, J. P.; LUCCI, C.M. Ultrastructural characteristics of sheep oocytes during in vitro maturation (IVM). **Small Ruminant Research**, 2011.

MILLER, D.J.; GONG, X.; DECKER, G. Egg cortical granule N-acetylglucosaminidase is required for the mouse zona block to polyspermy. **The Journal of Cell Biology**, v. 123, p. 1431–1440, 1993.

MIYARA, F.; AUBRIOT, F.; GLISSANT, A.; NATHAN, C.; DOUARD, S.; STANOVICI, A.; HERVE, F.; DUMONT-HASSAN, M.; LEMEURE, A.; COHEN-BACRIE, P.; DEBEY, P. Multiparameter analysis of human oocytes at metaphase II stage after IVF failure in non-male infertility. **Human Reproduction**, v. 18, p. 1494-1503, 2003a.

MIYARA, F.; MIGNE, C.; DUMONT-HASSAN, M.; LE MEUR, A.; COHEN-BACRIE, P.; AUBRIOT, F.X.; GLISSANT, A.; NATHAN, C.; DOUARD, S.; STANOVICI, A.; DEBEY, P. Chromatin configuration and transcriptional control in human and mouse oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 64, p. 458–470, 2003b.

MOGAS, T.; MARTINO, A.; PALAMO, M.J.; PARAMIO, M.T. Effect of method of recovery on the number and type of oocytes obtained for IVM. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 9, p. 52, 1992.

MOOR, R. M.; CROSBY, I. M. Protein requirements for germinal vesicle breakdown in ovine oocytes. *Journal of Embryol. Exp. Morph.*, v. 94, p. 207-220, 1986.

MOOR, R. M.; DAY, Y.; LEE C.; FULKA, J. Oocyte maturation and embryonic failure. **Human Reproduction Update**, v.4, p. 223-246, 1998.

MOOR, R.; DAI, Y. Maturation of pig oocytes in vivo and in vitro. **Reproduction**, (Supplement), v. 58, p. 91–104, 2001.

MORTON, K.M.; CATT, S.L.; MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G. In vitro and in vivo developmental capabilities and kinetics of in vitro development of in vitro matured oocytes from adult, unstimulated and hormone stimulated prepubertal ewes. **Theriogenology**, v. 64, p. 1320–1332, 2005a.

MORTON, K.M.; DE GRAAF, S.P.; CAMPBELL, A.; TOMKINS, L.M.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Repeated oocyte pick up and in vitro embryo production from adult ewes with and without FSH treatment. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, p. 422–428, 2005b.

MORTON, K.M.; MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G. Effect of aspiration pressure during oocyte harvesting on oocyte recovery and in vitro development of ovine oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 106–110, 2008.

MORTON, K.M.; ROWE, A.R.; MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G. In vitro and in vivo survival of bisected in vitro produced embryos derived from frozen-thawed unsorted, and frozenthawed sex-sorted and re-frozen-thawed ram spermatozoa. **Theriogenology**, v. 65, p. 1333–1345, 2006.

MORTON, K.M.; MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G. Effect of Aspiration Pressure during Oocyte Harvesting on Oocyte Recovery and in vitro Development of Ovine Oocytes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 106–110, 2008.

NATARAJAN, R.; SHANKAR, M. B.; MUNUSWAMY, D. Effect of α -tocopherol supplementation on in vitro maturation of sheep oocytes and in vitro development of preimplantation sheep embryos to the blastocyst stage. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 27, p. 483-490, 2010.

NIMURA, S.; HOSOE, M. Changes in cortical granule distribution within bovine oocytes during maturation and fertilization in vitro. **Journal of Reproduction and Development**, v. 41, p.103–108, 1995.

NURSE, P. Universal control mechanism regulating the onset of Mphase. **Nature**, v. 344, p. 503–508, 1990.

O'BRIEN, J.K.; BECK, N.F.G.; MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G. Effect of hormone pre-treatment of prepubertal sheep on the production and developmental capacity of oocytes in vitro and in vivo. **Reproduction Fertility and Development**, v. 9, p. 625–631, 1997.

PAVLOK, A.; KOPECNY, V.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMANN, H. Transcriptional activity and nuclear ultrastructure of 8-cell bovine embryos developed by in vitro maturation and fertilization of oocytes from different growth categories of antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v. 35, p. 233–243, 1993.

PAVLOK, A.; LUCAS-HAHN, A.; NIEMAN, H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v. 31, p. 63–67, 1992.

PAWSHE, C.H.; TOTEY, S.M.; JAIN, S.K. Influence of the methods of recovery of goat oocytes for in vitro maturation and fertilization. **Theriogenology**, v. 42, p. 117-125, 1994.

PIETERSE, M.C.; VOS, P.L.A.M.; KRUIP, T.A.M.; WURTH, Y.A.; BENEDEN T.V.; WILLEMSE, A.H.; TAVERNE, M.A.M.; VAN BENEDEN, T.H.; BONDIOLI, K.; GREVE, T.; WILMUT, I. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 35, p.19–24, 1991.

PIRES-BUTTLER, E. A. **Efeito do estágio do ciclo estral e adição de hormônios ao meio de cultivo *in vitro* sobre a morfologia do complexo cumulus-oócito canino.** 2010. 160f. Tese (Doutorado) – Programa de Medicina Veterinária, Reprodução Animal. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

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

RAO, B. S.; NAIDU, K. S.; AMARNATH, D.; VAGDEVI, R.; RAO, A. S.; BRAHMAIAH, K. V.; RAO, V. H. In vitro maturation of sheep oocytes in different media during breeding and non-breeding seasons. **Small Ruminant Research**, v.43, p. 31-36, 2002.

RHO, G. J.; HAHNEL, A. C.; BETTERIDGE, K. J. Comparisons of oocyte maturation and of three methods of sperm preparation for their effects on the production of goat embryos in vitro. **Theriogenology**, v. 56, p. 503-516, 2001.

RODRIGUEZ, C.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; BOIXO, J.; CHAMORRO, C.; OLMEDO, J.; ANEL, L. Follicular population and oocyte recovery in lambs treated with two different protocols of FSH. **Theriogenology**, v. 53, p. 507, 2000a.

RODRIGUEZ, C.; ANEL, L.; ANEL, E.; KAABI, M.; BOIXO, J.C.; DE PAZ, P.; OLMEDO, J. Ovine oocyte recovery efficiency with different aspiration flows. **Proceedings of the 14th Int. Congr. Anim. Reprod.**, v. 2, p. 141, 2000b (Abstract).

RODRÍGUEZ, C.; ANEL, L.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; BOIXO, J.C.; CHAMORRO, C.A.; PAZ, P. Ovum Pick-up in Sheep: a Comparison between Different Aspiration Devices for 68 Optimal Oocyte Retrieval. **Reproduction in Domestic Animals**, v.41 p.106–113. 2006.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, E.; LÓPEZ-BEJAR, M.; IZQUIERDO, D.; PARAMIO, M. T. Developmental competence of prepubertal goat oocytes selected with brilliant cresyl blue and matured with cysteamine supplementation. **Reproduction Nutrition Development**, v. 43, p. 179-187, 2003.

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

RUDERMAN, J.; LUCA, F.; SHIBUYA, E.; GAVIN, K.; BOULTON, T.; COBB, M. Control of the cell cycle in early embryos. **Cold spring harbor symposia on quantitative biology**, v. 56, p. 495–502, 1991.

SAMAKE, S.; AMOAH, E. A.; MOBINI, S.; GAZAL, O.; GELAYE, S. In vitro fertilization of goat oocytes during the nonbreeding season. **Small Ruminant Research**, v. 35, p. 49–54, 2000.

SASAMOTO, Y.; SAKAGUCKI, M.; KATAGIRI, S.; YAMADA, Y.; TAKAHASHI, Y. The effects of twisting and type of aspiration needle on the efficiency of transvaginal ultrasound guided ovum pick-up in cattle. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 65, p. 1083–1086, 2003.

SCHRAMM, R.D.; TENNIER, M.T.; BOATMAN, D.E.; BAVISTER B.D. Chromatin configurations and meiotic competence of oocytes are related to follicular diameter in nonstimulated rhesus monkeys, **Biology of Reproduction**, v. 48, p. 349–356, 1993.

SCHULTZ, R. M. Molecular aspects of mammalian oocyte growth and maturation. In: ROSSANT, J.; PEDERSEN, R. A. **Experimental Approaches to Mammalian Embryonic Development.**, Cambridge: Cambridge Univ. Press, C., 1986. p.195–237.

SENEDA, M. M. **Aspiração folicular transvaginal guiada pela ultra-sonografia. Efeito do diâmetro do folículo sobre a recuperação, qualidade e competência do oócito para o desenvolvimento in vitro.** 1999. 57f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Medicina Veterinária, Patologia Animal. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

SENEDA, M.M.; ESPER, C.R.; GARCIA J.M.; OLIVEIRA, J.A.; VANTINI, R. Relationship between follicle size and ultrasoundguided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, v. 67, p. 37–43, 2001.

SENEDA, M. M.; BLASCHI, W. Considerações técnicas sobre a ovum pick up. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2004, Londrina. **Biotecnologia da Reprodução em Bovinos**, 2004. v. 1. p. 231-237.

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

SHABANKAREH, H. K.; SARSAIFI, K.; MEHRANNIA, T. In vitro maturation of ovine oocytes using different maturation media: effect of human menopausal serum. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**. 2010.

SHABANKAREH, H. K.; ZANDI, M. Developmental potential of sheep oocytes cultured in different maturation media: effects of epidermal growth factor, insulin-like growth factor I, and cysteamine. **Fertility and Sterility**, 2009.

SHI, L.; YUE, W.; ZHANG, J.; LV, L.; REN, Y.; YAN, P. Effect of ovarian cortex cells on nuclear maturation of sheep oocytes during in vitro maturation. **Animal Reproduction Science**, v. 113, p. 299–304, 2009.

SCHRICK, F. N.; SURFACE, W.; PRITCHARD, J. Y.; DAILEY, R. A.; TOWNSEND, E. C.; INSKEEP, E. K. Ovarian structures during the estrous cycle and early pregnancy. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 1133- 1140, 1993.

SHIRAZI, A.; SADEGHI, N. The effect of ovine oocyte diameter on nuclear maturation. *Small Ruminant Research*, v. 69, p. 103–107, 2007.

SHIRAZI, A.; SHAMS-ESFANDABADI, N.; AHMADI, E.; HEIDARI, B. Effects of Growth Hormone on Nuclear Maturation of Ovine Oocytes and Subsequent Embryo Development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, p. 530-536, 2008.

SLAVIK, T.; FULKA, J.; GALL, I. Pregnancy rate after the transfer of sheep embryos originated from randomly chosen oocytes matured and fertilized in vitro. **Theriogenology**, v. 38, p. 749-756, 1992.

SMITH, J.F.; TERVIT, H.R.; MCGOWAN, L.T.; PUGH, P.A. Effect of aspiration system on the recovery and development of sheep follicular oocytes. **Proceedings of Australian Society for Reproduction Biology**, v. 26, p. 16, 1994.

SNYDER, D. A.; DUKELOW, R. Laparoscopic studies of ovulation, pregnancy diagnoses, and follicle aspiration in sheep. **Theriogenology**, v. 2, p. 143-148, 1974.

SONGSASEN, N.; FICKES, A.; PUKAZHENTHI, B. S.; WILDT, D. E. Follicular morphology, oocyte diameter and localization of fibroblast growth factors in the domestic dog ovary. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 44, p. 65-70, 2009.

STANGL, M.; KUHHLER, B.; BESENFELDER, U.; BREM, G. Repeated endoscopic ovum pick-up in sheep. **Theriogenology**, v. 52, p. 706–716, 1999.

STERNECK, E.; TESSAROLLO, L.; JOHNSON, P. F. An essential role for C/EBP β in female reproduction. **Genes Dev.**, v. 11, p. 2153–2162, 1997.

STEWART-SAVAGE, J.; BAVISTER, B.D. Time course and pattern of cortical granule breakdown in hamster eggs after sperm fusion. **Molecular Reproduction and Development**, v. 30, p. 390–395, 1991.

TABET, A. F. **Transferência intratubárica videolaparoscópica de embriões ovinos fertilizados *in vitro***. Tese de Doutorado, 2006.

TAM, P.P.L.; LOONG, E.P.L.; CHIU, T.T.Y. Localization of fucosyl glycoconjugates in human oocytes following insemination for *in vitro* fertilization. **Journal of In Vitro Fertilization and Embryo Transfer.**, v. 7, p. 141–145, 1990.

TEIXEIRA, P.P.M. **ASPIRAÇÃO FOLICULAR VIDEOLAPAROSCÓPICA EM OVINOS: AVALIAÇÃO OVARIANA MACRO E MICROSCÓPICA**. 2010. 56 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Veterinária) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

TEIXEIRA, P.P.M.; PADILHA, L.C.; OLIVEIRA, M.E.F.; MOTHEO, T.F.; SILVA, A.S.L.; BARROS, F.F.P.C.; COUTINHO, L.N.; FLORES, F.N.; LOPES, M.C.S.; BANDARRA, M. B.; VICENTE, W.R.R. Aspiração folicular por videolaparoscopia em ovelhas Santa Inês: descrições da técnica. **Revista Científica Eletrônica De Medicina Veterinária**, ano IX, n. 16, 2011a.

TEIXEIRA, P.P.M.; PADILHA, L.C.; MOTHEO, T.F.; SILVA, M. A. M.; OLIVEIRA, M.E.F.; SILVA, A.S.L.; BARROS, F.F.P.C.; COUTINHO, L.N.; FLORES, F.N.; LOPES,

M.C.S.; RODRIGUES, L.F.S.; VICENTE, W.R.R. Ovariectomy by laparotomy, a video-assisted approach or a complete laparoscopic technique in Santa Ines sheep. **Small Ruminant Research**, v. 99, p. 199-202, 2011b.

TEIXEIRA, P.P.M.; PADILHA, L.C.; OLIVEIRA, M.E.F.; MOTHEO, T.F.; SILVA, A.S.L. BARROS, F.F.P.C.; COUTINHO, L.N.; FLORES, F.N.; LOPES, M.C.S.; BANDARRA, M.B.; SILVA, M.A.M., VASCONCELOS, R.O.; RODRIGUES, L.F.S.; VICENTE, W.R.R. Laparoscopic ovum collection in sheep: Gross and microscopic evaluation of the ovary and influence on oocyte production. **Animal Reproduction Science**, v. 127, p. 169–175, 2011c.

TEOTIA, A.; SHARMA, G. T.; MAJUMDAR, A. C. Fertilization and development of caprine oocytes matured over granulosa cell monolayers. **Small Ruminant Research**, v. 40, p. 165-177, 2001.

TERVIT, H. R.; SMITH, J. F.; MCGOWAN, L. T.; WELLS, R. W.; PARR, J. Laparoscopic recovery of oocytes from sheep. **Proceedings of Australian Society for Reproduction Biology**, v. 24, p. 26. 1992 (Abstract).

TERVIT, H. R.; SMITH, J. F.; MCGOWAN, L. T.; WELLS, R. W., PUGH, P. A. Laparoscopic recovery of ovarian oocytes from slaughtered or living sheep. **Proceedings of Australian Society for Reproduction Biology**, v. 25, p.60, 1993 (Abstract).

TERVIT, H. R.; SMITH, J. F.; MCGOWAN, L. T.; PUGH, P. A. Birth of lambs from embryos produced in vitro following laparoscopic recovery of follicular oocytes **Proceedings of Australian Society for Reproduction Biology**, v. 27, p. 68, 1995 (Abstract).

TERVIT, H. Laparoscopy/laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 227–238, 1996.

TROUNSON, A. The derivation and potential use of human embryonic stem cells. **Reproduction Fertility and Development**, v. 13, p. 523-532, 2001.

UDY, G.B.; MCGOWAN, L.T.; NEMAIA, F.A.; ANKERSMIT, A.E.L.; TERVIT, H.R. Cattle oocyte recovery is affected more by aspiration pressure than needle size. **Proceedings of Australian Society for Reproduction Biology**, v. 26, p. 17, 1994 (Abstract)

VATZIAS, G.; HAGEN, D.R. Effects of porcine follicular fluid and oviduct-conditioned media on maturation and fertilization of porcine oocytes in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 42–48, 1999.

VANHOUTTE, L.; SUTTER, P.; NOGUEIRA, D.; GERRIS, J.; DHONT, M.; VAN DER ELST, J. Nuclear and cytoplasmic maturation of *in vitro* matured human oocytes after temporary nuclear arrest by phosphodiesterase 3-inhibitor. **Human Reproduction**, v. 22, p. 1239-1246, 2007.

WAHID, H.; GORDON, I.; SHARIF, H.; LONERGAN, P.; GALLAGHER, M.; Effect and efficiency of recovery method for obtaining ovine follicular oocytes for in vitro procedures. **Theriogenology**, v. 37, p. 318, 1992a.

WAHID, H.; MONAGHAN, P.; GORDON, I. In vitro maturation of sheep follicular oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 9, p. 52, 1992b.

WANG, S.; LIU, Y.; HOLYOAK, G.R.; EVANS, R.C.; BUNCH, T.D. A protocol for *in vitro* maturation and fertilization of sheep oocytes. **Small Rumimant Research**, v. 29, p.83-88, 1998.

WANI, N.A.; WANI, G.M.; KHAN, M.Z.; SIQUIDI, M.A. Effect of different factors on the recovery of oocytes for IMV-IVF procedures in sheep. **Small Ruminant Research**, v. 34, p. 71-76, 1999.

WANI, N.A.; WANI, G.M.; KHAN, M.Z.; SALAHUDIN, S. Effect of oocyte harvesting techniques on in vitro maturation and in vitro fertilization in sheep. **Small Ruminant Research**, v. 36, p. 63–67, 2000.

WARD, F.A.; LONERGAN, P.; ENRIGHT, B.P.; BOLAND, M. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using ovum pick-up technology. **Theriogenology**, v. 54, p. 433–446, 2000.

WATSON, A. J.; WATSON, P. H.; WARNES, D.; WALKER, S. K.; ARMSTRONG, D. T.; SEAMARK, R. F. Preimplantation development of in vitro matured and in vitro fertilized ovine zygotes: Comparison between coculture on oviductal epithelial cell monolayer and culture under low oxygen atmosphere. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 715-724, 1994.

WICKRAMASINGHE, D.; ALBERTINI, D. F. Cell cycle control during mammalian oogenesis. In: PEDERSON, R. A., **Current Topics in Developmental Biology**, San Diego: Academic Press, 1993. p. 125–153.

WICKRAMASINGHE, D.; EBERT, K. M.; ALBERTINI, D.F. Meiotic competence acquisition is associated with the appearance of M-phase characteristics in growing mouse oocytes. **Developmental Biology**, v. 143, p. 162–172, 1991.

WURTH, Y. A.; KRIUP, T. H. A. M. Bovine embryo production *in vitro* after selection of the follicles and oocytes. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 1992, The Hague. **Proceedings...** The Hague: ICAR, 1992. v.1, p.387-389.

YOSHIDA, M.; CRAN, D.G.; PURSEL, V.G. Confocal and fluorescence microscopic study using lectins of the distribution of cortical granules during the maturation and fertilization of pig oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 36, p. 462–468, 1993.

ZHANG, J.; NEDAMBALE, T.L.; YANG, M.; LI, J. Improved development of ovine matured oocyte following solid surface vitrification (SSV): Effect of cumulus cells and cytoskeleton stabilizer. **Animal Reproduction Science**, v. 110, p. 46–55, 2009.

ZHOU, J.; SHIN, H.G.; YI, J.; SHEN, W.; WILLIAMS, C.P.; MURRAY, K.T. Phosphorylation and putative ER retention signals are required for protein kinase A-mediated potentiation of cardiac sodium current. **Circulation Research**, v. 91, p. 540–546, 2002.

APÊNDICES

APÊNDICE 1**MEIO DE LAVAGEM (5 ML)**

TCM 199	4,5 mL
Estreptomicina (75 µg/mL)	25 µL
Piruvato de sódio	10 µL
Soro Fetal Bovino	500 µL
Hepes sódico (10mM)	0,013 g
Hepes ácido (10mM)	0,012 g
Filtrar em membrana 0,22 µm	

APÊNDICE 2**MEIO DE MATURAÇÃO (5 ML)**

TCM 199	4,5 mL
Estreptomicina (75 µg/mL)	25 µL
Piruvato de sódio (0,3 mM)	10 µL
Soro Fetal Bovino	500 µL
FSH (0,1 UI/mL)	5 µL
hCG (0,1 UI/mL)	5 µL
Estradiol 17 β (1 µg/mL)	5 µL
Cisteamina (100mM)	5 µL
Filtrar em membrana 0,22 µm	

Esta solução deve ser mantida por 1 hora na estufa para estabilizar

APÊNDICE 3**SOLUÇÃO DE PRONASE 0,1% (10 mL)**

PBS Ca ⁺⁺ free	10 mL
PVA	0,01 g
Pronase	0,01 g

APÊNDICE 4**PARAFORMALDEÍDO 3% (10 mL)**

Paraformaldeído	300 µL
PBS	9700 mL

APÊNDICE 5**SOLUÇÃO DE BLOQUEIO (100 mL)**

PBS	100 mL
BSA (1 mg/mL)	0,1 g
Glicina (100mM)	0,7507 g
Azida de sodio (0,2%)	0,2 g

APÊNDICE 6**SOLUÇÃO DE TRITON 0,1% (1 mL)**

Triton	10 µL
PBS	990 µL

APÊNDICE 7**SOLUÇÃO DE *LENS CULINARIS* (LECITINA)(10 mL)**

Lecitina	0,01 g
PBS	10 mL