



Abanico Veterinario. Janeiro-Dezembro 2023; 14:1-24. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2023.110>  
Revisão da literatura. Recebido: 12/06/2023. Aceito:28/11/2023. Publicado: 12/12/2023. Chave: e2023-110.  
<https://www.youtube.com/watch?v=bhUxhxTiNDc>

## Evolução da aspiração folicular para a produção *in vitro* de embriões em ruminantes

Evolution of follicular aspiration for *in vitro* embryo production in ruminants



Álvarez-Gallardo Horacio\*<sup>1</sup> ID, Urbán-Duarte David<sup>1</sup> ID, Estrada-Cortés Eliab<sup>2</sup> ID, Villaseñor-González Fernando<sup>2</sup> ID, Velázquez-Roque Adriana<sup>3</sup> ID

Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro Nacional de Recursos Genéticos - INIFAP, Tepatitlán, Jalisco, México, <sup>2</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Centro Altos de Jalisco - INIFAP, Tepatitlán, Jalisco, México, <sup>3</sup>H&A Biotecnologías en Reproducción Animal, Tepatitlán, Jalisco, México. \*Autor responsável e para correspondência: Álvarez-Gallardo Horacio. Centro Nacional de Recursos Genéticos, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Boulevard de la Biodiversidad # 400, Racho Las Cruces, CP. 47600. Tepatitlán de Morelos, Jalisco. E-mail: alvarez.horacio@inifap.gob.mx, urban.david@inifap.gob.mx, estrada.eliab@inifap.gob.mx, villaseñor.fernando@inifap.gob.mx, velazquezra0809@gmail.com

### RESUMO

Desde o nascimento da primeira prole gerada a partir da produção *in vitro* de embriões (PIV) em 1982, os avanços nessa tecnologia não pararam. A PIV foi tão bem-sucedida que foi adaptada a uma variedade de espécies, tanto produtivas quanto selvagens. Sem dúvida, o maior sucesso da PIV foi em bovinos, de acordo com os dados relatados pela Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS) em 2020. Esse sucesso se deve em grande parte à evolução dos sistemas de cultura *in vitro* e à coleta eficiente e minimamente invasiva de oócitos de doadoras vivas. Nas últimas três décadas, os avanços na fisiologia ovariana, no desenvolvimento da ultrassonografia, nos tipos de agulha, na pressão de aspiração e nos genótipos utilizados permitiram que a aspiração folicular ovariana fosse uma técnica que pode ser desenvolvida em nível de campo, com resultados cada vez melhores e sem afetar o bem-estar das doadoras. Esta revisão descreverá a evolução da técnica de aspiração folicular em ruminantes, com ênfase em suas variantes e novas estratégias para melhorar a qualidade dos oócitos.

**Palavras-chave:** embriões produzidos *in vitro*, aspiração folicular ovariana, ruminantes.

### ABSTRACT

Since the birth of the first offspring generated from *in vitro* embryo production (IVP) in 1982, advances in this technology have not stopped. PIV has been so successful that it has been adapted to various species, both productive and wild. Undoubtedly, the greatest success of PIV has been in cattle, according to data reported by the International Embryo Technology Society (IETS). This success is largely due to the evolution of *in vitro* culture systems and the efficient and minimally invasive collection of oocytes from living donors. In the last 3 decades, advances in ovarian physiology, development of ultrasonography, types of needles, aspiration pressure, used genotypes, have allowed follicular aspiration to be a technique that can be



developed at the field level, with results better each time without affecting the well-being of the donors. In this review, the evolution of the follicular aspiration technique in ruminants will be described with emphasis on its variants and new strategies to improve oocyte quality.

**Keywords:** *In vitro* produced embryos, ovarian follicular aspiration, ruminants.

## INTRODUÇÃO

Atualmente, a produção *in vitro* de embriões (PIV) e a transferência de embriões (TE) têm tido um grande impacto na produção animal. No caso dos bovinos, a PIV é amplamente aplicada e a grande maioria dos embriões produzidos em todo o mundo é gerada por essa tecnologia, de acordo com dados relatados pela International Embryo Technology Society (IETS) (Viana, 2021) (Tabela 1). Uma das razões para a ampla aplicação da PIV em bovinos, em comparação com outras espécies, é o avanço em outras tecnologias reprodutivas, como a aspiração folicular (de complexos cumulus-oócitos de folículos de 2-8 mm), que permitiu a coleta repetida e eficiente de oócitos imaturos de doadoras vivas (Galli *et al.*, 2001) sem afetar o bem-estar animal das doadoras Chastant-Maillard *et al.*, 2003; Petyim *et al.*, 2007; Currin *et al.*, 2017). É importante observar que há relatos de programas com duas sessões de coleta de óvulos (OPU) por doadora por semana (Petyim *et al.*, 2003), o que maximiza o potencial genético das doadoras (Pontes *et al.*, 2011).

**Tabela 1. Produção *in vivo* e *in vitro* de embriões bovinos transferíveis durante 2020, por região (Viana, 2021)**

Região	África	Ásia	Europa	América do Norte	Oceania	América do Sul	Total
DIV	2.763	0	126.491	196.704	4.211	31.559	<b>361.728</b>
PIV	4.977	0	47.470	578.995	14.345	500.397	<b>1.156.422</b>

DIV: embriones producidos *in vivo*

PIV: embriones producidos *in vitro*

A PIV requer várias técnicas, como coleta de oócitos de doadoras, maturação *in vitro*, fertilização *in vitro* e cultivo *in vitro* até a produção de embriões no estágio de blastocisto (Galli *et al.*, 2001; Tamassia *et al.*, 2003). A coleta de oócitos pode ser realizada por aspiração folicular guiada por ultrassom (OPU) em espécies maiores, como bovinos, ou por aspiração folicular laparoscópica (LOPU) em pequenos ruminantes (ovelhas, cabras, veados e bezerras) (Baldassarre, 2021). O principal objetivo de ambas as tecnologias é coletar oócitos (principalmente imaturos) de doadoras geneticamente superiores para serem fertilizados *in vitro* com reprodutores de elite e gerar embriões, que podem ser transferidos para receptoras previamente sincronizadas (Merton *et al.*, 2003). No entanto, elas também podem ser usadas para fins de conservação e/ou resgate genético (Ruiz *et al.*, 2013; Baldassarre, 2021). Essas técnicas de aspiração folicular são minimamente invasivas e a recuperação repetida de oócitos de doadoras permite a realização de



múltiplos cruzamentos, bem como a redução do intervalo de geração em programas de melhoramento genético, produzindo mais embriões e gestações por doadora do que pela técnica de multicoovulação e produção de embriões *in vivo* (DIV) (Merton *et al.*, 2003; Baldassarre *et al.*, 2007).

## RESUMO GERAL DA TÉCNICA DE OPU

O sistema OPU consiste em três partes: um ultrassom com um transdutor linear (retal) ou micro convexo (5-7.5 MHz) associado a um dispositivo de fixação (pistola de aspiração), uma bomba de aspiração e uma agulha conectada ao sistema de aspiração (Bols *et al.*, 1996).

Para a aspiração folicular, são necessários transdutores que aumentem a resolução e o tamanho das imagens para uma melhor manipulação dos ovários (Ginther, 2014). O transdutor microconvexo é o mais comumente usado, com um campo de ultrassom de 150°, que pode ser de 5 a 7.5 MHz, sendo o de 7.5 MHz o preferido, pois tem melhor resolução e permite a localização mais fácil de folículos pequenos. O campo de ultrassom de 150° ajuda a facilitar a manipulação dos ovários e a localizar os folículos na linha de punção, permitindo o uso de agulhas mais curtas que entram diretamente no campo de ultrassom, sem perder partes utilizáveis da agulha (Ginther, 2014). A agulha é fixada e direcionada para o campo de ultrassom por meio de um guia que é feito de um tubo fino de aço inoxidável. Dentro do tubo de aço está a mangueira do sistema de sucção, que é presa à agulha e ao tubo de aço por meio de um tubo de silicone que, em conjunto com uma peça de conexão, cria uma estrutura rígida que permite o movimento para frente e para trás da agulha e a fácil substituição da agulha romba por uma nova (Palma, 2001).

O transdutor e o guia da agulha são inseridos na pistola de aspiração, que tem uma alça que dá ao operador a oportunidade de fixar o dispositivo OPU dentro da vagina pressionando suavemente a alça com a mão direita, deixando a mão esquerda livre para manipular o ovário (Palma, 2001). As vacas usadas para OPU devem ser imobilizadas e/ou podem ser sedadas, se necessário. As fezes são removidas do reto durante a palpação e a anestesia epidural com lidocaína a 2 % é usada para evitar o desconforto do animal e os movimentos do reto durante o procedimento. A vulva e o períneo são limpos e desinfetados antes da inserção do dispositivo OPU. O dispositivo tem uma alça com a qual pode ser manipulado com uma mão fora da vaca. A cabeça do transdutor é fixada em uma posição cranial dorsal na parte inferior da vagina, acima do colo do útero (Palma, 2001).

### Aspectos técnicos

Após o desenvolvimento inicial da técnica, vários estudos foram realizados para aprimorar as técnicas de aspiração folicular, que agora são amplamente utilizadas como ferramenta reprodutiva para programas de reprodução. Entre os principais aspectos



técnicos trabalhados estão o tipo de agulha, o tipo de bisel, a pressão de vácuo e o tipo de transdutor (Bols *et al.*, 1996; Bols *et al.*, 1997; Palma, 2001; Van Wagtendonk-de Leeuw, 2006).

Com relação ao tipo de agulha, o calibre da agulha foi avaliado com agulhas 18G, 19G e 21G, sendo 18G o diâmetro com a maior recuperação. No entanto, isso é relativo, pois a pressão de sucção tem maior influência sobre a quantidade e a integridade dos oócitos recuperados (Bols *et al.*, 1996). Inicialmente, foram usadas agulhas longas, de 50 a 65 centímetros, com um diâmetro externo de 1-1.5 mm e um bisel curto (Bols *et al.*, 1997). (Figura 1). A principal desvantagem das agulhas longas é que elas ficam cegas rapidamente e precisam ser afiadas, mas não atingem o estado inicial de afiação, o que é importante, pois a afiação da agulha é essencial para o sucesso da técnica) (Bols *et al.*, 1996). Essas agulhas longas são caras e têm um grande espaço morto no lúmen da agulha, deixando os oócitos em um ambiente desfavorável por um longo período, e são necessárias grandes quantidades de meio para limpá-las (Palma, 2001).



Figura 1. Dispositivo para OPU com agulha longa

A simplificação dos dispositivos usados para OPU para o uso de agulhas descartáveis abriu um novo cenário para a técnica, já que uma agulha romba pode ser facilmente trocada por ser barata. Diferentes diâmetros e comprimentos de agulhas descartáveis estéreis estão disponíveis no mercado. O espaço morto é mínimo, de modo que os oócitos podem ser recuperados em condições mais favoráveis (Bols *et al.*, 1997). O risco de contaminação de uma doadora para outra é reduzido, e o tempo que os complexos *cumulus*-oócito (CCOs) passam em um ambiente desfavorável é minimizado (Van Wagtendonk-de Leeuw, 2006).

Outro aspecto estudado foi a influência do tipo de bisel, curto ou longo (Figura 2), na recuperação do oócito. Embora tenha sido observada uma recuperação semelhante para os dois tipos de bisel, verificou-se que a pressão de sucção afetava significativamente a recuperação e a integridade dos oócitos quando se usavam agulhas de bisel curto (Bols *et al.*, 1997). Atualmente, estão disponíveis agulhas comerciais para OPU, que têm uma

extensão que se conecta diretamente à linha de aspiração (Figura 3).

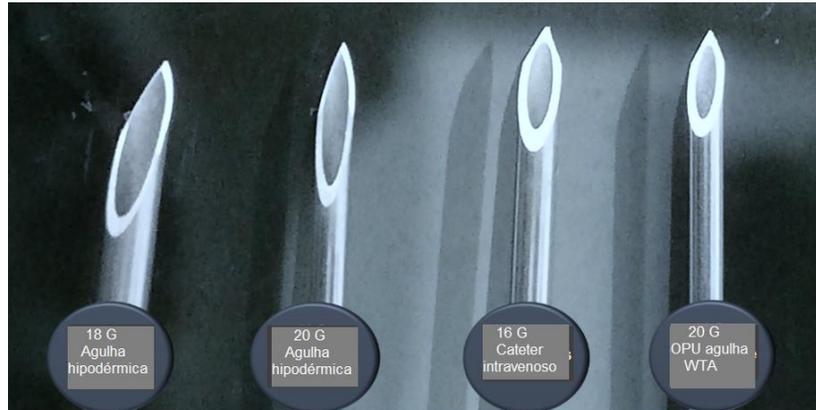


Figura 2. Bisel curto e longo de acordo com o tipo de agulha

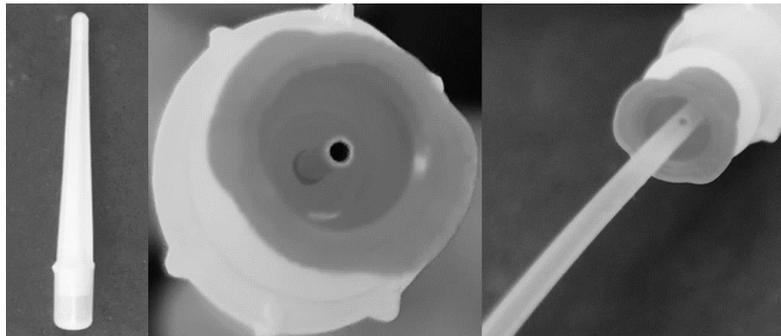
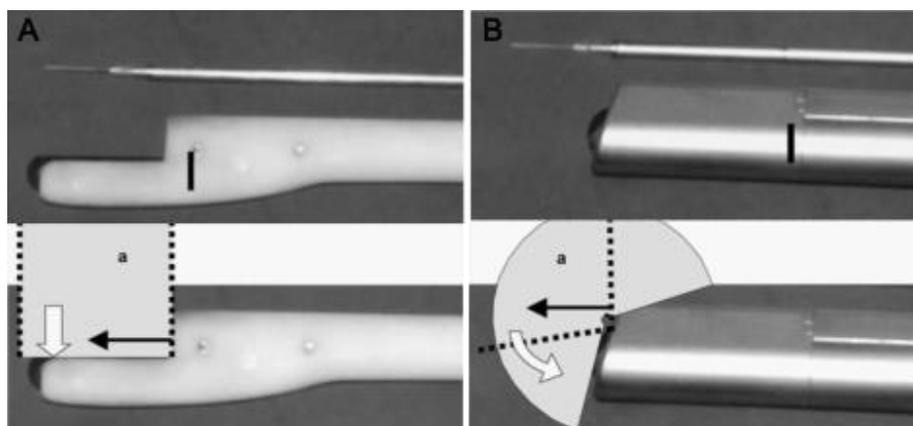


Figura 3. Agulha WTA™ com extensão para conexão da linha de sucção

Quanto à pressão de vácuo, observou-se que ela varia de acordo com o tipo de agulha e o bisel utilizado; entretanto, verificou-se que quanto maior a pressão, maior a recuperação de oócitos, mas também aumenta o número de oócitos desnudos (Palma, 2001). Para agulhas descartáveis, a pressão de sucção recomendada varia de 70 a 130 mm Hg, pois a redução da pressão de vácuo aumenta a integridade dos CCOs e isso aumenta a produção de blastocistos (Bols *et al.*, 1996; Bols *et al.*, 1997).

Desde 1984, quando foram gerados os primeiros relatos de avaliação reprodutiva em bovinos (Reeves *et al.*, 1984; Pierson & Ginther., 1984), a ultrassonografia transretal tornou-se uma ferramenta básica na reprodução bovina (Ginther *et al.*, 2014), por isso, inicialmente tentou-se utilizar um transdutor linear retal, pois a grande maioria dos profissionais da área de reprodução em espécies de grande porte possui um ultrassom com transdutor linear retal (Van Wagtendonk-de Leeuw, 2006) (Figura 4A). Ao comparar o uso de um transdutor linear com um transdutor microconvexo (Figura 4B), observou-se que não houve diferença na detecção de folículos grandes (<5 mm); no entanto, quando os folículos eram pequenos (>5 mm), houve uma redução de 12 % na visualização com

o transdutor linear. Em termos de recuperação de oócitos, com o transdutor microconvexo, houve uma duplicação da recuperação de oócitos em comparação com o transdutor linear, embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa (Bols *et al.*, 2004). Essa diferença se deve ao fato de que a área para manipular o ovário para realizar a punção é maior com o transdutor microconvexo em comparação com o transdutor linear (Figura 4).



**Figura 4. Dispositivos OPU.** A) Dispositivo e área de punção com transdutor linear retal.  
B) Dispositivo e local de punção com transdutor microconvexo (Bols *et al.*, 2004)

Atualmente, a maioria dos dispositivos usa um transdutor microconvexo (Xavier *et al.*, 2023; Camargo *et al.*, 2019; de Carvalho *et al.*, 2019), e há até mesmo um transdutor microconvexo ajustado à forma para o dispositivo OPU (Figura 5).



**Figura 5. Transdutor microconvexo moldado para dispositivo OPU**

### Aspectos biológicos

Os aspectos biológicos relacionados à técnica de OPU incluem o genótipo do animal, a estimulação ovariana, o momento e a frequência da OPU, a resposta individual da doadora, o estado fisiológico da doadora (vazia/gestacional; lactante/não-lactante), a idade da doadora (vaca, novilha, bezerro), a época do ano e a experiência do técnico para realizar a OPU (Palma, 2001; Tamassia *et al.*, 2003; Camargo *et al.*, 2005; Van



Wagtendonk-de Leeuw, 2006; Takuma *et al.*, 2010; Vieira *et al.*, 2014). A estimulação hormonal é, sem dúvida, uma das melhorias mais importantes com relação à qualidade dos oócitos e à produção de blastocistos *in vitro*.

Além disso, o uso de hormônios para a estimulação folicular é uma vantagem que a OPU-PIV tem sobre a DIV. O hormônio folículo estimulante (FSH) e a gonadotrofina coriônica equina (eCG) podem ser usados para a estimulação folicular (Aller *et al.*, 2012) e, embora essa prática seja feita principalmente em bovinos *Bos taurus* (Presicce *et al.*, 2011; Aller *et al.*, 2012; Chasombat *et al.*, 2013; Vieira *et al.*, 2014), bons resultados também foram observados quando aplicados em bovinos *Bos indicus* (Tabela 2). No entanto, programas de PIV em larga escala também foram observados em bovinos *Bos indicus* (Nelore), nos quais as doadoras não foram estimuladas e a produção de embriões foi eficiente (Pontes *et al.*, 2011).

Por outro lado, para fazer programas intensivos de produção de embriões, a PIV foi combinada com a IVD, onde bons resultados (5,1 embriões por lavagem e 3,2 embriões congeláveis) foram obtidos ao iniciar a superovulação 2 dias após a OPU usando doadoras Nelore (Surjus *et al.*, 2014). Por outro lado, o genótipo da doadora tem muito a ver com a população de folículos. Sabe-se que as doadoras *Bos indicus* têm de 2 a 4 vezes o número de oócitos coletados por OPU em comparação com as doadoras *Bos taurus* (Baruselli *et al.*, 2015). Também foi observado que as doadoras *Bos indicus* têm mais ondas foliculares e uma população maior de folículos antrais com mais de 5 mm de diâmetro em comparação com as doadoras *Bos taurus* (Silva-Santos *et al.*, 2011).



**Tabela 2. Resumo do progresso da técnica de aspiração folicular em bovinos**

Uso de hormônios para estimular	Agulha L = longa C= curto	Pressão mmHg	Transdutor	Número de oócitos <sup>a</sup>	Recuperação (%) <sup>b</sup>	Oócitos viáveis(%) <sup>c</sup>	Embriões viáveis <sup>*d</sup>	Referência
<i>Bos Taurus</i>								
No	23G L	-	Vaginal	13.0	50.4	-	2.2	Pieterse <i>et al.</i> , 1991
No	20G L	40-50	Vaginal	8.0	55.1	77.61	1.0	Kruip <i>et al.</i> , 1994
FSH 24-30 mg	17G L	75-100	Convexo	8.6	69.9	-	1.3	Looney <i>et al.</i> , 1994
FSH 75 UI	17G L	70	Vaginal	9.5	-	80.0	2.7	Rocha <i>et al.</i> , 1998
No	20G C	50	Vaginal	3.9	58.5	86.0	-	Petyim <i>et al.</i> , 2003
No	19G C	-	Linear	0.9	9.2	73.0	-	Bols <i>et al.</i> , 2004
No	19G C	-	Convexo	11.4	-	70.1	2.1	Pontes <i>et al.</i> , 2010
eCG 1600 UI	20G C	65	Vaginal	2.2	34.2	73.8	-	Aller <i>et al.</i> , 2012
FSH 200 mg	20G C	85-90	Convexo	9.9	61.1	83.9	4.4	Vieira <i>et al.</i> 2014
No	20G C	68	Convexo	17.3	81.8	71.1	3.0	Guerreiro <i>et al.</i> , 2014
No	20G C	60-70	Convexo	14.6	60.4	74.1	0.7	Sales <i>et al.</i> , 2015
No	20G C	68	Convexo	9.2	36.9	51.08	0.5	Batista <i>et al.</i> 2016
No	18G C	90	Convexo	6.3	-	71.2	5.2	Oliveira <i>et al.</i> , 2019
FSH 70 UI	18G C	70	-	26.4	64.6	96.5	7.1	Simmons <i>et al.</i> , 2023
<i>Bos indicus</i>								
FSH 75 UI	17G L	70	Vaginal	10.3	-	83.3	5.4	Rocha <i>et al.</i> , 1998
No	20G C	80	Vaginal	8.9	61.3	74.1	1.1	Viana <i>et al.</i> , 2004
No	20G C	80	Vaginal	7.0	69.3	62.1	-	Viana <i>et al.</i> , 2010
No	19G C	-	Convexo	17.1	-	70.1	3.2	Pontes <i>et al.</i> , 2010
FSH 100 mg	17G L	120	Vaginal	20.8	91.6	64.4	6.8	Chasombat <i>et al.</i> , 2013
No	20G C	68	Convexo	45.3	77.5	50.7	7.0	Guerreiro <i>et al.</i> , 2014
No	20G C	60-70	Convexo	22.8	88.8	84.9	3.8	Sales <i>et al.</i> , 2015
No	20G C	68	Convexo	29.9	63.6	60.5	9.3	Batista <i>et al.</i> , 2016
No	18G C	90	Convexo	10.0	-	78.8	10.2	Oliveira <i>et al.</i> , 2019
No	18G C	60-80	Convexo	30.1	-	85.7	10.3	García <i>et al.</i> , 2020
No	20G C	90-100	Convexo	58.6	78.3	74.2	9.7	de Silva <i>et al.</i> 2022
No	20G C	80	Convexo	24.7	88.4	78.7	9.6	Xavier <i>et al.</i> , 2023

\* Número de oócitos recuperados a partir do número de aspirações foliculares

\*\* Número de oócitos viáveis do número de oócitos recuperados

\*\*\* Número de embriões viáveis por aspiração



Com relação às estratégias para aumentar a PIV, foi demonstrado que os oócitos maturados *in vivo* são mais competentes em comparação com os maturados *in vitro* (Van de Leemput *et al.*, 1999; Camargo *et al.*, 2019). Em 1994, foi relatado que oócitos bovinos aspirados de folículos dominantes antes do pico do hormônio luteinizante (LH) apresentam alterações em sua morfologia nuclear e citoplasmática que, segundo os autores, são um pré-requisito para a aquisição de sua competência plena.

Isso indicaria que não apenas a maturação final do oócito é crucial, mas que o processo ocorre entre o pico de LH e a ovulação. Além disso, o período que antecede o pico de LH pode ser importante para o estabelecimento da competência de desenvolvimento (Assey *et al.*, 1994).

Em um trabalho de 2014, 54.9 % dos blastocistos foram obtidos com sucesso com sêmen sexado em gado Holstein a partir de oócitos maturados *in vivo* (Figura 6) e sincronização do surto folicular por ablação do folículo dominante (Matoba *et al.*, 2014). Em 2019, ao trabalhar com PIV em gado Black Japanese, concluiu-se que embriões de maior qualidade podem ser gerados com eficiência ao usar oócitos maturados *in vivo* coletados por OPU em comparação com oócitos imaturos (Egashira *et al.*, 2019).

Entre as estratégias para selecionar doadoras de oócitos para PIV está a avaliação dos níveis plasmáticos de hormônio anti-Mülleriano (AMH). As doadoras classificadas como tendo altos níveis de AMH produziram um número maior de embriões por OPU em comparação com aquelas classificadas como tendo baixos níveis de AMH, independentemente de serem *Bos taurus* ou *Bos indicus*. Com esses resultados, concluiu-se que os níveis plasmáticos de AMH são um marcador endócrino preciso para a seleção de doadoras de oócitos (Guerreiro *et al.*, 2014)

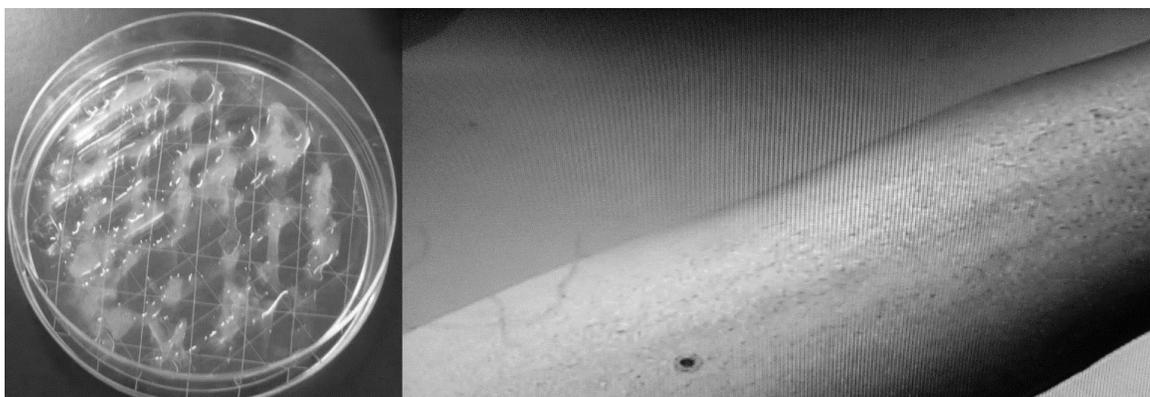


Figura 6. Busca de oócitos maduros *in vivo*



Atualmente, a ultrassonografia com Doppler colorido tem tido várias aplicações na avaliação reprodutiva de bovinos. Sabe-se que a irrigação ovariana é muito importante para a proteção e formação de oócitos (barreira hematofolicular), formação de fluido folicular e transporte de nutrientes (Da Broi *et al.*, 2018). Recentemente, descobriu-se que a irrigação ovariana desempenha um papel muito importante na PIV; observou-se que os ovários de doadoras de oócitos com uma irrigação oocitária entre 50 e 70 %, aproximadamente, produzem mais embriões do que doadoras com irrigação ovariana de cerca de 30 % (Figura 7). Nesse estudo, observou-se que doadoras com ~70 % de irrigação ovariana produziram 38 % de blastocistos, enquanto doadoras com ~50 % de irrigação produziram 30 % de blastocistos e aquelas com ~30 % de irrigação produziram 18 % de blastocistos (Villaseñor-González *et al.*, 2021).

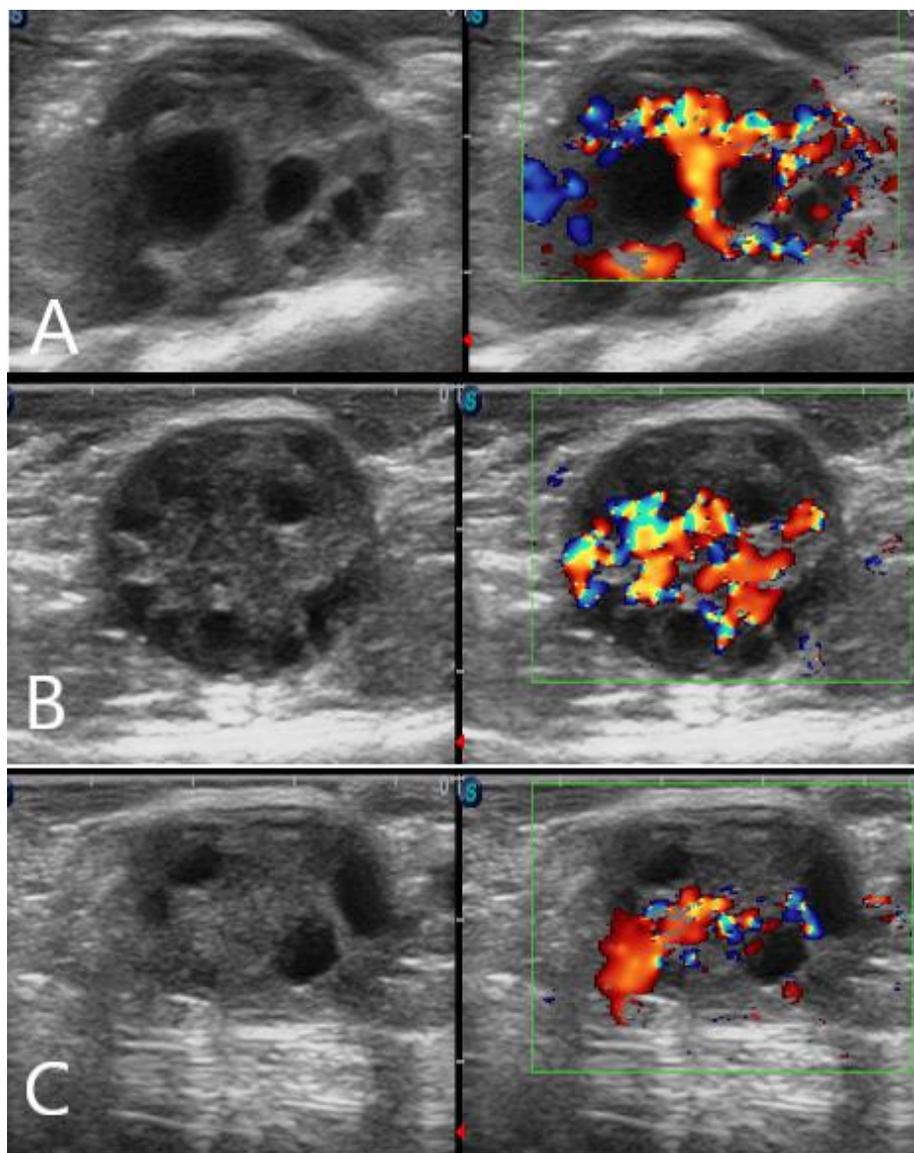
## ASPIRAÇÃO FOLICULAR EM PEQUENOS RUMINANTES

### Produção de embriões de ovinos

O DIV é atualmente o principal método usado para gerar embriões em pequenos ruminantes. A coleta de embriões é realizada pelo método cirúrgico de laparotomia; no entanto, essa técnica tem várias desvantagens, incluindo aderências, trauma pós-operatório e o longo tempo entre um procedimento e outro (Jorge-Neto *et al.*, 2018), o que significa que o processo só pode ser repetido de 4 a 5 vezes na grande maioria das doadoras.

Como alternativa à coleta cirúrgica de embriões, nos últimos anos muitos pesquisadores têm trabalhado no desenvolvimento de uma técnica não cirúrgica (dilatação do colo do útero), utilizando principalmente substâncias como misoprostol, prostaglandina F2 $\alpha$  e estrogênios. Embora haja resultados promissores (penetração completa do colo do útero variando de 27 a 78 % das doadoras, recuperação do meio de lavagem de cerca de 88 a 91 %), ainda é necessário um maior desenvolvimento da técnica para que ela substitua a lavagem cirúrgica (Fonseca *et al.*, 2019; da Fonseca *et al.*, 2019).

Considerando o exposto, a PIV em pequenos ruminantes também é uma ferramenta para o melhoramento genético e a preservação de gametas e embriões usando LOPU. Essa ferramenta é altamente repetível, minimamente invasiva (pois não gera aderências) e com um tempo de execução curto (aproximadamente 15 minutos por doadora). O período entre os procedimentos pode ser de 14 dias, o que é consideravelmente mais curto em comparação com os 60 dias para a obtenção de embriões por DIV (Jorge-Neto *et al.*, 2018). No entanto, são necessários pessoal altamente treinado e um laboratório de produção de embriões *in vitro*.



**Figura 7. Avaliação do grau de irrigação ovariana por ultrassonografia com Doppler colorido.** A) Ovário com ~70 % de irrigação; B) Ovário com ~50 % de irrigação; C) Ovário com ~30 % de irrigação (Villaseñor-González *et al.*, 2021)

De acordo com as estatísticas apresentadas pelo IETS (Tabela 3), a PIV é usada comercialmente em ovinos, mas em menor escala em comparação com o DIV, que ocorre principalmente na América do Norte. Embora no caso dos caprinos, seja possível observar uma tendência de aumento no uso da PIV, conforme relatado pela IETS em 2020 (Viana, 2021).



**Tabela 3. Produção de embriões ovinos *in vivo* e *in vitro* em 2020 por região (Viana, 2021)**

Região	Ovinos		Caprinos	
	DIV	PIV	DIV	PIV
África	0	0	0	0
Ásia	0	0	0	0
Europa	966	0	346	0
América do Norte	9.204	141	10.757	2.275
Oceania	12.427	0	1.890	0
América do Sul	7.222	0	184	0
<b>Total 2020</b>	<b>29.819</b>	<b>141</b>	<b>13.177</b>	<b>2.275</b>
<b>Total 2019</b>	<b>22.374</b>	<b>1.137</b>	<b>8.725</b>	<b>748</b>

DIV: embriões produzidos *in vivo*

PIV: embriões produzidos *in vitro*

### Visão geral da LOPU

A LOPU é uma técnica muito confiável e eficiente para coletar oócitos de alta qualidade de animais vivos e, em alguns casos, de animais mais velhos, o que permite seu uso para PIV. Essa técnica tem aplicação em ovinos, caprinos, bovinos, búfalos (Jorge-Neto *et al.*, 2018; Baldassarre, 2021) e cervídeos (Locatelli *et al.*, 2006; Baldassarre, 2021). A repetição da LOPU no mesmo doador não causa sequelas com impacto na vida reprodutiva da fêmea, mesmo quando realizada em animais pré-púberes ou selvagens. Outra vantagem da LOPU é que ela pode ser realizada em pequenos ruminantes, mesmo quando estão fora da estação reprodutiva, e também pode ser aplicada em animais pré-púberes, incluindo bovinos e búfalos (Jorge-Neto *et al.*, 2018; Currin *et al.*, 2021; Sousa *et al.*, 2022).

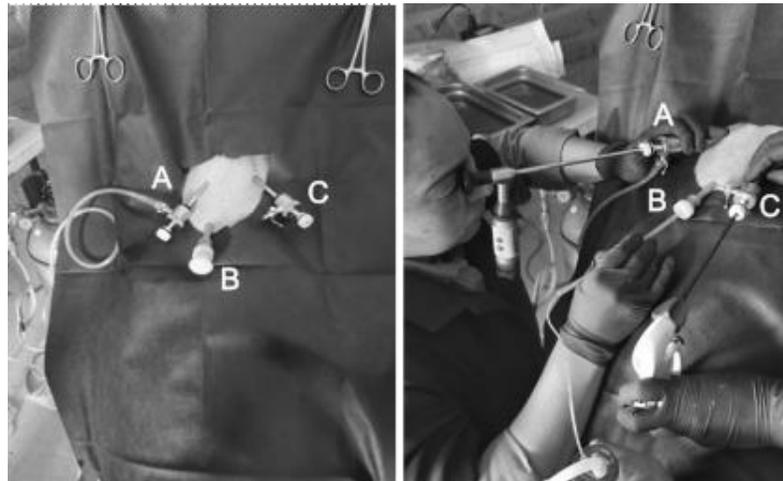
Em pequenos ruminantes, a LOPU associada à PIV e à TE é a maneira mais eficiente de produzir um número maior de descendentes de fêmeas com genética e produtividade excepcionais. Em programas de melhoramento genético, isso permite aumentar o diferencial de seleção, bem como o intervalo de geração e, assim, acelerar a velocidade do progresso genético.4

A LOPU é realizada sob anestesia com cetamina (5 mg/kg IM) mais xilazina (0.2 mg/kg IM) após um jejum de 24 horas. Depois de anestesiada, a doadora é colocada na maca laparoscópica, raspada e desinfetada na área abdominal imediatamente cranial ao úbere. A doadora é colocada com a cabeça para baixo em um ângulo de aproximadamente 45 a 60 graus, de modo que os órgãos digestivos repousem sobre o diafragma e permitam a visualização do útero e dos ovários. Isso é feito com um endoscópio de 0° (preferencialmente de 5 mm de diâmetro), associado a três trocartes (um trocater para o endoscópio, um para uma pinça atraumática e um para o mandril de sucção, todos preferencialmente de 5 mm) (Figura 8) para obter acesso à cavidade abdominal, o que nos permite minimizar o grau de trauma cirúrgico.

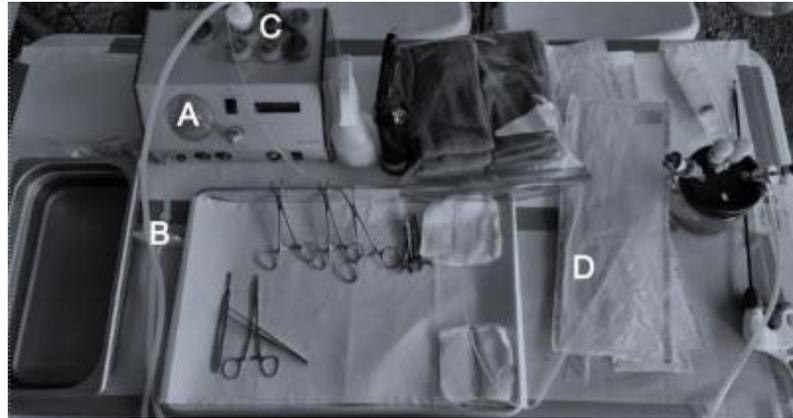


Para aumentar a visualização, o pneumoperitônio é realizado insuflando a cavidade abdominal com CO<sub>2</sub>. O mandril de sucção é composto por um tubo de aço inoxidável ou acrílico de 5 mm de diâmetro, acoplado a uma agulha 20G que é conectada a uma mangueira siliconizada que leva a um tubo de coleta de 50 mL que, por sua vez, é conectado à bomba de vácuo (Figura 9). A pressão do vácuo é ajustada em uma taxa de 50-70 gotas por minuto. Depois que os três trocartes tiverem sido inseridos adequadamente e o laparoscópio, a pinça de preensão atraumática e a pipeta de aspiração tiverem sido inseridos através deles, a punção folicular é realizada. Para realizar a punção folicular, o ovário é agarrado com a pinça atraumática e girado em diferentes direções para visualizar toda a superfície do ovário, a fim de puncionar todos os folículos com mais de 2 mm de diâmetro. O procedimento é repetido em ambos os ovários, e os ovários são lavados com solução fisiológica heparinizada para remover qualquer sangue remanescente e evitar a formação de aderências (Baldassarre, 2021).

Além disso, a estimulação hormonal com FSH é necessária nas doadoras, porque os ovários geralmente são pequenos e para facilitar a punção (Palma *et al.*, 2001; Baldassarre *et al.*, 2007; Baldassarre, 2021). Foi relatado que a estimulação com FSH a cada 8 horas, começando 36 horas antes da LOPU e mudando a última aplicação para eCG em bezerras, produziu embriões semelhantes aos obtidos com doadoras adultas (Baldassarre *et al.*, 2018). É importante aplicar a prostaglandina F2 $\alpha$  antes da LOPU porque, se houver algum corpo lúteo presente, o sangramento é maior devido à alta irrigação nessa estrutura (Vilá *et al.*, 2007).



**Figura 8. Posição dos trocartes, endoscópio, fórceps e mandril de sucção.** A) Luva na qual o endoscópio é colocado. B) Manga na qual o mandril de sucção é colocado. C) Luva na qual é colocado o fórceps atraumático para agarrar o ovário

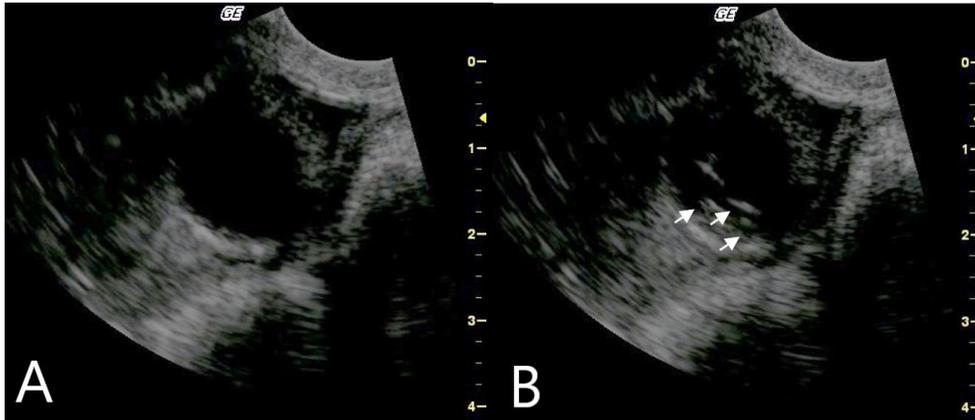


**Figura 9. Sistema de sucção.** A) Bomba de sucção. B) Mangueira de vácuo e filtro. C) Tubo de coleta. D) Mandril de sucção

## TRANSFERÊNCIA INTRA-FOLICULAR DE OÓCITOS (IFOT)

### História

Embora a transferência intrafolicular de oócitos (TIOF) não seja uma técnica recente, ela tem sido relatada desde 1985 em primatas, em bovinos (Fleming *et al.*, 1985) e na década de 1990 em cavalos (Hinrichs & DiGiorgio, 1991). Atualmente, ela está associada a novas biotecnologias. Essa técnica consiste na transferência de oócitos heterólogos para o folículo pré-ovulatório de uma fêmea previamente inseminada (Figura 10). Essa técnica foi aperfeiçoada na década de 1990 com o uso da ultrassonografia transvaginal na reprodução de bovinos, equinos e humanos (Kassens *et al.*, 2015). A aplicação dessa técnica surge em bovinos como uma alternativa à PIV para produzir embriões mais criotolerantes (Kassens *et al.*, 2015). Além disso, ela evita a necessidade de equipamentos de laboratório de PIV (Sprícigo *et al.*, 2016). Com essa técnica, as incubadoras são substituídas pelo útero da receptora e os embriões são obtidos usando a técnica de lavagem uterina transcervical empregada nos protocolos tradicionais de coleta de embriões produzidos *in vivo*. Embriões foram gerados com sucesso com a IFOT em bovinos e equinos, mas somente em 2015 foi relatada a primeira prole nascida de embriões gerados por essa técnica, na qual foram usados oócitos obtidos de ovários obtidos de ovários vestigiais e maturados *in vitro* (Kassens *et al.*, 2015). Atualmente, há mais estudos em que descendentes vivos foram obtidos por IFOT a partir de oócitos imaturos (Sprícigo *et al.*, 2016; Hoelker *et al.*, 2017).



**Figura 10. Confirmação da IFOT.** A) Folículo pré-ovulatório antes da IFOT; B) Folículo pré-ovulatório após a IFOT, as setas indicam a presença de CCOs (Kassens *et al.*, 2015)

Essa técnica também foi usada para a produção *in vivo* de embriões de ovelhas por IFOT (Falchi *et al.*, 2022). A IFOT seria complementada pela LOPU para a coleta de oócitos de doadoras de alto valor genético, que seriam transferidos para receptoras (animais comerciais) para a produção de embriões *in vivo*, de modo que efeitos adversos, como aderências, não ocorressem nas doadoras e sua vida útil fosse prolongada. É importante enfatizar que, embora essa tecnologia seja promissora, os resultados obtidos com a PIV tradicional ainda não foram alcançados (Kassens *et al.*, 2015; Sprícigo *et al.*, 2016; Hoelker *et al.*, 2017; Falchi *et al.*, 2022).

## CONCLUSÕES

A aspiração folicular ovariana em ruminantes está melhorando constantemente, o que facilita sua aplicação. Ainda há espaço para melhorias, como o aumento da qualidade dos oócitos, o aumento da vida útil das doadoras, o aumento do número de oócitos coletados, bem como a seleção das doadoras de oócitos. Atualmente, as pesquisas continuam nessas áreas e tudo indica que, nos próximos anos, a aspiração folicular ovariana e suas variantes se consolidarão como ferramentas reprodutivas eficazes, assim como suas técnicas antecessoras.

## LITERATURA CITADA

ALLER JF, Mucci NC, Kaiser GG, Callejas SS, Alberio RH. 2012. Effect of repeated eCG treatments and ovum pick-up on ovarian response and oocyte recovery during early pregnancy in suckling beef cows. *Animal Reproduction Science*. 133(1-2):10-15. ISSN: 1873-2232. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.06.001>



ASSEY RJ, Hyttel P, Roche JF, Boland M. 1994. Oocyte steroid and follicular steroid concentrations in superovulated versus unstimulated heifers. *Molecular Reproduction and Development*. 39(1): 8-16. ISSN:1098-2795.

<https://doi.org/10.1002/mrd.1080390103>

BALDASSARRE H, Rao KM, Neveu N, Brochu E, Begin I, Behboodi E, Hockley DK. 2007. Laparoscopic ovum pick-up followed by *in vitro* embryo production for the reproductive rescue of aged goats of high genetic value. *Reproduction, Fertility, and Development*. 19(5):612-6. ISSN: 1448-5990. <https://doi.org/10.1071/RD07024>

BALDASSARRE H, Currin L, Michalovic L, Bellefleur AM, Gutierrez K, Mondadori RG, Glanzner WG, Schuermann Y, Bohrer RC, Dicks N, Lopez R, Grand FX, Vigneault C, Blondin P, Gourdon J, Bordignon V. 2018. Interval of gonadotropin administration for *in vitro* embryo production from oocytes collected from Holstein calves between 2 and 6 months of age by repeated laparoscopy. *Theriogenology*. 116:64-70. ISSN: 1879-3231. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.05.005>

BALDASSARRE H. 2021. Laparoscopic Ovum Pick-Up Followed by *In Vitro* Embryo Production and Transfer in Assisted Breeding Programs for Ruminants. *Animals*. 11(1):216. ISSN: 2076-2615. <https://doi.org/10.3390/ani11010216>

BARUSELLI PS, Vieira LM, Batista EOS, Ferreira RM, Sales JNS, Gimenes LU, Torres-Junior, Martins CM, Sá Filho MF, Bo GA. 2015. Updates on embryo production strategies. *Animal Reproduction*. 12(3):375-382. ISSN 1984-3143. <https://www.animal-reproduction.org/article/5b5a6030f7783717068b4606>

BATISTA EOS, Guerreiro BM, Freitas BG, Silva JCB, Vieira LM, Ferreira RM, Rezende RZ, Basso AC, Lopes RNVR, Rennó FP, Souza AH, Baruselli PS. 2016. Plasma anti-Müllerian hormone as a predictive endocrine marker to select *Bos taurus* (Holstein) and *Bos indicus* (Nelore) calves for *in vitro* embryo production. *Domestic Animal Endocrinology*. 54:1-9. ISSN: 1879-0054.

<https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2015.08.001>

BOLS PEJ, Van Soom A, Ysebaert MT, Vandenheede JMM, de Kruif A. 1996. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology*. 45(5):1001-1014. ISSN: 1879-3231. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(96\)00028-3](https://doi.org/10.1016/0093-691X(96)00028-3)



BOLS PEJ, Ysebaert MT, Van Soom A, de Kruif A. 1997. Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocyte complexes. *Theriogenology*. 47(6):1221-1236. ISSN: 1879-3231. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00102-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00102-7)

BOLS PE, Leroy JL, Vanholder T, Van Soom A. 2004. A comparison of a mechanical sector and a linear array transducer for ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval (OPU) in the cow. *Theriogenology*. 62(5):906-14. ISSN: 1879-3231. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.12.016>

CAMARGO LS, Viana JH, Sá WF, Ferreira AM, Vale Filho VR. 2005. Developmental competence of oocytes from prepubertal *Bos indicus* crossbred cattle. *Animal Reproduction Science*. 85(1-2):53-9. ISSN: 1873-2232. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.04.020>

CAMARGO LSA, Munk M, Sales JN, Wohlres-Viana S, Quintão CCR, Viana JHM. 2019. Differential gene expression between *in vivo* and *in vitro* maturation: a comparative study with bovine oocytes derived from the same donor pool. *JBRA Assisted Reproduction*. 23(1):7-14. ISSN: 1518 0557. [https://www.researchgate.net/publication/330267788\\_Differential\\_gene\\_expression\\_between\\_in\\_vivo\\_and\\_in\\_vitro\\_maturation\\_a\\_comparative\\_study\\_with\\_bovine\\_oocytes\\_derived\\_from\\_the\\_same\\_donor\\_pool](https://www.researchgate.net/publication/330267788_Differential_gene_expression_between_in_vivo_and_in_vitro_maturation_a_comparative_study_with_bovine_oocytes_derived_from_the_same_donor_pool)

CHASOMBAT J, Nagai T, Parnpai R, Vongpralub T. 2013. Ovarian Follicular Dynamics, Ovarian Follicular Growth, Oocyte Yield, *In vitro* Embryo Production and Repeated Oocyte Pick Up in Thai Native Heifers Undergoing Superstimulation. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 26(4):488-500. ISSN: 1976-5517. <http://dx.doi.org/10.5713/ajas.2012.12519>

CHASTANT-MAILLARD S, Quinton H, Lauffenburger J, Cordonnier-Lefort N, Richard C, Marchal J, Mormede P, Renard JP. 2003. Consequences of transvaginal follicular puncture on well-being in cows. *Reproduction*. 125(4):555-63. ISSN: 1741-7899. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1250555>

CURRIN L, Michalovic L, Bellefleur AM, Gutierrez K, Glanzner W, Schuermann Y, Bohrer RC, Dicks N, da Rosa PR, De Cesaro MP, Lopez R, Grand FX, Vigneault C, Blondin P, Gourdon J, Baldassarre H, Bordignon V. 2017. The effect of age and length of gonadotropin stimulation on the *in vitro* embryo development of Holstein calf oocytes. *Theriogenology*. 104:87-93. ISSN: 1879-3231. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.08.011>



CURRIN L, Baldassarre H, Bordignon V. 2021. *In Vitro* Production of Embryos from Prepubertal Holstein Cattle and Mediterranean Water Buffalo: Problems, Progress and Potential. *Animals*. 11(8):2275. ISSN: 2076-2615. <https://doi.org/10.3390/ani11082275>

DA BROI MG, Giorgi VSI, Wang F, Keefe DL, Albertini D, Navarro PA. 2018. Influence of follicular fluid and cumulus cells on oocyte quality: clinical implications. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 35(5):735-751. ISSN: 1573-7330. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1143-3>

DA FONSECA JF, Zambrini FN, Guimarães JD, Silva MR, Oliveira MEF, Brandão FZ, Bartlewski PM, Souza-Fabjan JMG. 2019. Combined treatment with oestradiol benzoate, d-cloprostenol and oxytocin permits cervical dilation and nonsurgical embryo recovery in ewes. *Reproduction in Domestic Animals*. 54(1):118-125. ISSN: 1439-0531. <http://dx.doi.org/10.1111/rda.13318>

de CARVALHO JGS, de Carvalho NAT, Bayeux BM, Watanabe YF, Watanabe OY, Mingoti RD, Baruselli PS. 2019. Superstimulation prior to the ovum pick-up improves the *in vitro* embryo production in nulliparous, primiparous and multiparous buffalo (*Bubalus bubalis*) donors. *Theriogenology*. 15(138):164-168. ISSN: 1879-3231. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.07.003>

EGASHIRA J, Ihara Y, Khatun H, Wada Y, Konno T, Tatemoto H, Yamanaka K. 2019. Efficient *in vitro* embryo production using *in vivo*-matured oocytes from superstimulated Japanese Black cows. *Journal of Reproduction and Development*. 65(2):183-190. ISSN:1348-4400. <https://doi.org/10.1262/jrd.2018-155>

FALCHI L, Pivato I, Ledda M, Melosu V, Scanu A, Pau S, Ledda S, Zedda MT. 2022. Intrafollicular oocyte transfer (IFOT): Potential feasibility in the ovine species. *Theriogenology*. 179:7-13. ISSN: 1879-3231. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.11.009>.

FLEMING AD, Salgado R, Kuehl TJ. 1985. Maturation of baboon or cow oocytes transplanted into a surrogate dominant follicle *in vivo*. *Theriogenology*. 23(1):193. ISSN: 1879-3231. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(85\)90099-8](https://doi.org/10.1016/0093-691X(85)90099-8)



FONSECA JF, Zambrini FN, Guimarães JD, Silva MR, Oliveira MEF, Bartlewski PM, Souza-Fabjan JMG. 2019. Cervical penetration rates and efficiency of non-surgical embryo recovery in estrous-synchronized Santa Inês ewes after administration of estradiol ester (benzoate or cypionate) in combination with d-cloprostenol and oxytocin. *Animal Reproduction Science*. 203:25-32. ISSN: 1873-2232. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.02.004>

GARCÍA SM, Morotti F, Cavalieri FLB, Lunardelli PA, de Oliveira Santos A, Membrive CMB, Castillo C, Puelker RZ, Silva JOF, Zangirolamo AF, Seneda MM. 2020. Synchronization of stage of follicle development before OPU improves embryo production in cows with large antral follicle counts. *Animal Reproduction Science*. 221:106601. ISSN: 1873-2232. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106601>

GINTHER OJ. 2014. How ultrasound technologies have expanded and revolutionized research in reproduction in large animals. *Theriogenology*. 81(1):112-25. ISSN: 1879-3231. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.007>

GUERREIRO BM, Batista EO, Vieira LM, Sá Filho MF, Rodrigues CA, Castro Netto A, Silveira CR, Bayeux BM, Dias EA, Monteiro FM, Accorsi M, Lopes RN, Baruselli PS. 2014. Plasma anti-mullerian hormone: an endocrine marker for *in vitro* embryo production from *Bos taurus* and *Bos indicus* donors. *Domestic Animal Endocrinology*. 49:96-104. Print ISSN: 0739-7240. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2014.07.002>

HINRICHS K, DiGiorgio LM. 1991. Embryonic development after intra-follicular transfer of horse oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*. Suppl 44:369–374. ISSN: 2251-676X. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1795280/>

HOELKER M, Kassens A, Salilew-Wondim D, Sieme H, Wrenzycki C, Tesfaye D, Neuhoff C, Schellander K, Held-Hoelker E. 2017. Birth of healthy calves after intra-follicular transfer (IFOT) of slaughterhouse derived immature bovine oocytes. *Theriogenology*. 15(97):41-49. ISSN: 1879-3231. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.04.009>

JORGE-NETO PN, Alecho RL, Schilbach PC, Baldassarre H. 2018. Laparoscopic ovum pick-up (LOPU): from animal production to conservation. *Spermova*. 8(1): 61-67. ISSN: 2308-4928. <https://doi.org/10.18548/aspe/0006.07>



KASSENS A, Held E, Salilew-Wondim D, Sieme H, Wrenzycki C, Tesfaye D, Schellander K, Hoelker M. 2015. Intrafollicular Oocyte Transfer (IFOT) of Abattoir-Derived and *In Vitro*-Matured Oocytes Results in Viable Blastocysts and Birth of Healthy Calves. *Biology of reproduction*. 92(6):150-1. ISSN 1529-7268.

<https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.124883>

KRUIP TA, Boni R, Wurth YA, Roelofsen MWM, Pieterse MC. 1994. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology*. 42(4):675-684. ISSN: 1879-3231. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(94\)90384-U](https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90384-U)

LOCATELLI Y, Vallet JC, Huyghe FP, Cognié Y, Legendre X, Mermillod P. 2006. Laparoscopic ovum pick-up and *in vitro* production of sika deer embryos: effect of season and culture conditions. *Theriogenology*. 66(5):1334-42. ISSN: 1879-3231. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.05.005>

LOONEY CR, Lindsey BR, Gonseth CL, Johnson DL. 1994. Commercial aspects of oocyte retrieval and *in vitro* fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. *Theriogenology*. 41(1):67-72. ISSN: 1879-3231. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(05\)80050-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(05)80050-0)

MATOBA S, Yoshioka H, Matsuda H, Sugimura S, Aikawa Y, Ohtake M, Hashiyada Y, Seta T, Nakagawa K, Lonergan P, Imai K. 2014. Optimizing production of *in vivo*-matured oocytes from superstimulated Holstein cows for *in vitro* production of embryos using X-sorted sperm. *Journal of Dairy Science*. 97:743-753. ISSN: 1525-3198. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6838>

MERTON JS, de Roos APW, Mullaart E, de Ruigh L, Kaal L, Vos PLAM, Dieleman SJ. 2003. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology*. 59:651-674. ISSN: 1879-3231. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01246-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01246-3)

OLIVEIRA CS, Serapiao RV, dos Reis Camargo AJ, de Freitas C, Iguma LT, Carvalho BC, Camargo LSA, Oliveira LZ, Silva Verneque R. 2019. Oocyte origin affects the *in vitro* embryo production and development of Holstein (*Bos taurus taurus*)-Gyr (*Bos taurus indicus*) reciprocal cross embryos. *Animal Reproduction Science*. 209:106165. ISSN: 1873-2232. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106165>



PALMA GA, Tortonese DJ, Sinowatz F. 2001. Developmental capacity *in vitro* of prepubertal oocytes. *Anatomia Histologia Embryologia*. 30(5):295-300. ISSN:1439-0264. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0264.2001.00324.x>

PALMA GA. 2001. Punción folicular (Ovum pick up, OPU) en la vaca. En Palma, GA, *Bioteconologías de la reproducción*. Argentina. 185-224. ISBN: 987-43-3779-6. [https://books.google.com.mx/books?id=zmHbayu\\_hfIC&hl=es&source=gbs\\_book\\_other\\_versions](https://books.google.com.mx/books?id=zmHbayu_hfIC&hl=es&source=gbs_book_other_versions)

PETYIM S, Båge R, Hallap T, Bergqvist AS, Rodríguez-Martínez H, Larsson B. 2003 Two different schemes of twice-weekly ovum pick-up in dairy heifers: effect on oocyte recovery and ovarian function. *Theriogenology*. (1):175-88. ISSN: 1879-3231. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01363-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01363-8)

PETYIM S, Båge R, Madej A, Larsson B. 2007. Ovum pick-up in dairy heifers: does it affect animal well-being? *Reproduction in Domestic Animals*. 42(6):623-32. ISSN:1439-0531. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2006.00833.x>

PIERSON RA, Ginther OJ. 1984. Ultrasonography for detection of pregnancy and study of embryonic development in heifers. *Theriogenology*. 22(2):225-33. ISSN: 1879-3231. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(84\)90435-7](https://doi.org/10.1016/0093-691X(84)90435-7)

PIETERSE MC, Vos PLAM, Kruip TA, Wurth YA, Van Beneden TH, Willemse AH, Taverne MAM. 1991. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology*. 35(1):19-24. ISSN: 1879-3231. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(91\)90426-E](https://doi.org/10.1016/0093-691X(91)90426-E)

PONTES JH, Melo Sterza FA, Basso AC, Ferreira CR, Sanches BV, Rubin KC, Seneda MM. 2011. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology*. 75(9):1640-6. ISSN: 1879-3231. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.12.026>

PONTES JHF, Silva KCF, Basso AC, Rigo AG, Ferreira CR, Santos GMG, Sanches BV, Porcionato JPF, Vieira PHS, Faifer FS, Sterza FAM, Schenk JL, Seneda MM. 2010. Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology*. 74(8):1349-1355. ISSN: 1879-3231. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.06.004>



PRESICCE GA, Xu J, Gong G, Moreno JF, Chaubal S, Xue F, Bella A, Senatore EM, Yang X, Tian XC, Du F. 2011. Oocyte source and hormonal stimulation for *in vitro* fertilization using sexed spermatozoa in cattle. *Veterinary Medicine International*. 2011, e145626. ISSN: 2042-0048. <https://doi.org/10.4061/2011/145626>

REEVES JJ, Rantanen NW, Hauser M. 1984. Transrectal real-time ultrasound scanning of the cow reproductive tract. *Theriogenology*. 21(3):485-94. ISSN: 1879-3231. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(84\)90410-2](https://doi.org/10.1016/0093-691X(84)90410-2)

ROCHA A, Randel RD, Broussard JR, Lim JM, Blair RM, Roussel JD, Godke RA, Hansel W. 1998. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos taurus* cows. *Theriogenology*. 49(3):657-665. ISSN: 1879-3231. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00016-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00016-8)

RUIZ S, Romero-Aguirregomezcorta J, Astiz S, Peinado B, Almela L, Poto A. 2013. Application of reproductive biotechnology for the recovery of endangered breeds: birth of the first calf of Murciana-Levantina bovine breed derived by OPU, *in vitro* production and embryo vitrification. *Reproduction in Domestic Animals*. 48(6):81-84. ISSN:1439-0531. <https://doi.org/10.1111/rda.12179>

SALES JNDS, Iguma LT, Batista RITP, Quintão CCR, Gama MAS, Freitas C, Pereira MM, Camargo SA, Viana HM, Souza JV, Baruselli PS. 2015. Effects of a high-energy diet on oocyte quality and *in vitro* embryo production in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. *Journal of Dairy Science*. 98(5):3086-3099. ISSN: 1525-3198. <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8858>

SILVA-SANTOS KC, GMG Santos, LS Siloto, MF Hertel, ER Andrade, MIB Rubin, L Sturion, FA Melo-Sterza, MM Seneda. 2011. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. *Theriogenology*. 76(6):1051-1057. ISSN: 1879-3231. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.05.008>

SIMMONS R, Tutt DA, Guven-Ates G, Kwong WY, Labrecque R, Randi F, Sinclair KD. 2023. Enhanced progesterone support during stimulated cycles of transvaginal follicular aspiration improves bovine *in vitro* embryo production. *Theriogenology*. 199:77-85. ISSN: 1879-3231. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.01.003>



SOUSA AJO, Gurgel HJ, Coelho PSA, Silva CRG, Araújo LHV, Nascimento HSD, Rodrigues IDSR, Pantoja LC, Cardoso TDS, Silva MD, Torres ACC, Teixeira PPM, Miranda MDS. 2022. Surgical Description of Laparoscopic Ovum Pick-Up in Buffalo Calves. *Animals*. 13(1):102. ISSN: 2076-2615. <https://doi.org/10.3390/ani13010102>

SPRÍCIGO JF, Sena Netto SB, Muterlle CV, Rodrigues Sde A, Leme LO, Guimarães AL, Caixeta FM, Franco MM, Pivato I, Dode MA. 2016. Intrafollicular transfer of fresh and vitrified immature bovine oocytes. *Theriogenology*. 86(8):2054-62. ISSN: 1879-3231. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.07.003>

SURJUS RS, Prata AB, Borsato M, Mattos FC, Martins da Silveira MC, Mourão GB, Pires AV, Wiltbank MC, Sartori R. 2014. *In vivo* embryo production in cows superovulated 1 or 2 days after ovum pick-up. *Reproduction, Fertility and Development*. 26(4):527-32. ISSN: 1448-5990. <https://doi.org/10.1071/RD12398>

TAKUMA T, Sakai S, Ezoe D, Ichimaru H, Jinnouchi T, Kaedei Y, Nagai T, Otoi T. 2010. Effects of season and reproductive phase on the quality, quantity and developmental competence of oocytes aspirated from Japanese black cows. *Journal Reproduction and Development*. 56(1):55-9. ISSN: 1348-4400. <https://doi.org/10.1262/jrd.09-071H>.

TAMASSIA M, Heyman Y, Lavergne Y, Richard C, Gelin V, Renard JP, Chastant-Maillard S. 2003. Evidence of oocyte donor cow effect over oocyte production and embryo development *in vitro*. *Reproduction*. 126(5):629-37. ISSN: 1741-7899. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1260629>

VAN DE LEEMPUT EE, Vos PLAM, Zeinstra EC, Bevers MM, van der Weijden GC, Dieleman SJ. 1999. Improved *in vitro* embryo development using *in vivo* matured oocytes from heifers superovulated with a controlled preovulatory LH surge. *Theriogenology*. 52:335-349. ISSN: 1879-3231. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00133-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00133-8)

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW AM. 2006. Ovum pick up and *in vitro* production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. *Theriogenology*. 65(5):914-25. ISSN: 1879-3231. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.007>

VIANA JHM. 2021. 2020 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter – IETS*. 39 (4): 24-38. [https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS\\_Data\\_Retrieval\\_Report\\_2020.pdf](https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS_Data_Retrieval_Report_2020.pdf)



VIANA JHM, de Almeida Camargo LS, de Moraes Ferreira A, De Sa WF, de Carvalho Fernandes CA, Junior ADPM. 2004. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. *Animal Reproduction Science*. ISSN: 1873-2232. 84(1-2):1-12. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2003.12.002>

VIANA JHM, Palhao MP, Siqueira LGB, Fonseca JFD, Camargo LDA. 2010. Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gyr breed (*Bos indicus*) cows undergoing repeated ovum pick-up. *Theriogenology*. 73(7):966-972. ISSN: 1879-3231. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.11.025>

VIEIRA LM, Rodrigues CA, Castro Netto A, Guerreiro BM, Silveira CRA, Moreira RJC, Sá Filho MF, Bó GA, Mapletoft RJ, Baruselli PS. 2014. Superstimulation prior to the ovum pick up to improve *in vitro* embryo production in lacting and non-lacting Holstein cows. *Theriogenology*. 82:318-324. ISSN: 1879-3231. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.04.013>

VILÁ VV, Pérez AML., Perozo PE, Riera NM, Rivera L. 2007. Vascularización arterial del ovario durante el ciclo estral en ovinos. *Revista Científica*. 17(4):341-348. ISSN: 0798-2259. [http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0798-22592007000400005&script=sci\\_arttext](http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0798-22592007000400005&script=sci_arttext)

VILLASEÑOR-GONZÁLEZ F, Álvarez-Gallardo H, Kjelland M, Velázquez-Roque A, Romo S. 2021. Colour-doppler ultrasonography as a tool for oocyte donor selection. *Reproduction, Fertility and Development*. 33(1):169. ISSN: 1448-5990. <https://doi.org/10.1071/RDv33n2Ab122>

XAVIER MC, Martins LP, Moura RM, Morais DF, Barbosa JVL, Figueiredo RA, Peixer MAS, de Andrade RV, Viana JHM. 2023. Evaluation of the effects of the recommended oral dose of diflubenzuron on bovine sperm and oocyte quality using CASA and OPU-IVEP. *Frontiers in Veterinary Science*. 11(10):1215722. ISSN: 2297-1769. <https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1215722>

[Errata Erratum](#)

<https://abanicoacademico.mx/revistasabanico-version-nueva/index.php/abanico-veterinario/errata>