

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE FORMIGA-UNIFOR-MG
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA
RÚBIA CRISTINA DE MIRANDA

EFEITOS DO INTERVALO ENTRE ASPIRAÇÕES FOLICULARES NA
QUALIDADE DE OÓCITOS BOVINOS DA RAÇA GIR

Formiga -MG
2010

Rúbia Cristina de Miranda

**EFEITOS DO INTERVALO ENTRE ASPIRAÇÕES FOLICULARES NA
QUALIDADE DE OÓCITOS BOVINOS DA RAÇA GIR**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao
instituto ciências da saúde do UNIFOR-MG,
como requisito parcial para obtenção do título de
bacharel em Medicina Veterinária.
Orientador: Fabrizia Portes Cury Lima

**FORMIGA- MG
2010**

M672 Miranda, Rúbia Cristina Antonia de.
Efeitos do intervalo entre aspirações foliculares na
qualidade de oócitos
bovinos da raça GIR / Rúbia Cristina Antônia de Miranda. -
2010.

50 f.

Orientadora: Fabrizia Portes Curry Lima.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina
Veterinária) -
Centro Universitário de Formiga–UNIFOR-MG, Formiga, 2010.

1. Oócitos. 2. Embriões. 3. Aspiração folicular. I. Título.

Rúbia Cristina de Miranda

**EFEITOS DO INTERVALO ENTRE ASPIRAÇÕES FOLICULARES NA
QUALIDADE DE OÓCITOS BOVINOS DA RAÇA GIR**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao instituto ciências da saúde do UNIFOR-MG, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Fabrizia Portes Cury Lima

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr. Fabrizia Portes Curry Lima
Orientadora

Prof. Ms. Dênio Garcia S. de Oliveira
UNIFOR-MG

Prof. Dr. José Mauricio de Rocha Júnior
UNIFOR-MG

Formiga, 26 de Outubro de 2010

Dedico este trabalho a meu pai Milton à quem tenho toda a admiração do mundo , ao meu noivo Vandélisso, ao Roberto Dias meu grande incentivador e a todas as pessoas que me incentivaram e contribuíram de alguma forma na concretização do mesmo.

AGRADECIMENTO

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por me permitir chegar até aqui e conquistar essa vitória. Ao meu pai, meu noivo e familiares pela dedicação e apoio. A professora e orientadora Fabrizia Lima, agradeço pelo incentivo e dedicação. Ao médico veterinário Claudiney e sua esposa Priscila pela atenção, amizade e acima de tudo paciência. Aos meus colegas de sala, pelo carinho e amizade durante esses cinco anos. Agradeço a todos da Fazenda que se dispuseram a contribuir com todas as informações necessárias à realização deste estudo. Meus sinceros agradecimentos àqueles que direta e indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos vocês o meu muito obrigado!

"Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos".

Fernando Pessoa

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo analisar a qualidade de oócitos bovinos, em diferentes períodos de aspiração folicular na Fazenda Juá em Arcos/MG, foram

utilizados 13 vacas da raça Gir (*Bos taurus indicus*). Assim, como direcionador deste estudo estabeleceu-se o seguinte questionamento: Qual é o melhor intervalo entre aspirações foliculares em animais da raça Gir. Conseqüentemente, para fundamentar e validar os propósitos aqui estabelecidos desenvolveu-se uma revisão da literatura acerca das principais teorias pertinentes ao tema estudado, destacando-se, dentre as principais, endocrinologia do ciclo estral, desenvolvimento folicular, punção folicular, colheita de oócitos, maturação, fecundação in vitro e cultivo in vitro. Todos os animais foram submetidos a todas as aspirações foliculares, foram três tratamentos onde se classificou como três grupos, T1 n=(13) que foi a primeira aspiração feita ou que se pode denominar de um ponto inicial onde estes animais estavam em fases diferentes do ciclo estral, T2 n=(13) a segunda aspiração feita com o intervalo de 15 dias após a primeira, T3 n=(13) foi a terceira aspiração feita no intervalo de trinta dias após a segunda aspiração objetivando evitar efeitos individuais no resultado. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado do tipo cross-over 2x2. Foi feita análise de variância (ANOVA) e diferença entre médias comparadas pelo teste “t de student” ao nível de 5%. O estudo mostrou que oócitos obtidos de aspirações com intervalo de 15 dias entre uma e outra, possuem melhor qualidade de oócitos como demonstram os seguintes resultados, no grupo T1 obteve-se 12,6 % GI, 49,4% GII, 37,9% GIII, no grupo obteve-se T2 12,9% GI, 46,1% GII, 39,9% GIII, no grupo T3 obteve-se 10 % GI, 46,9% GII e 43% GIII.

Palavras chave: Oócitos, embriões, aspiração folicular.

ABSTRACT

This study aimed to examine the quality of bovine oocytes at different stages of follicular aspiration in the Fazenda Jua Arcos / MG, we used 13 Gir cattle (*Bos taurus*

indicus). So, as director of this study we established the following question: What is the best interval between follicular aspiration in animals of Gir. Consequently, to substantiate and validate the purposes set forth herein has developed a literature review on the major theories relevant to the subject studied, especially among the major endocrinology of the estrous cycle, follicular development, ovum, oocyte collection, maturation, in vitro fertilization and in vitro. All animals were subjected to all follicular aspirations were three treatments in which classified as three groups, n = T1 (13) that the first aspiration was done or what might be called a threshold where these animals were at different stages of estrous cycle, n = T2 (13) a second suction made with an interval of 15 days after the first, n = T3 (13) was the third aspiration performed in the range of thirty days after the second aspiration aiming to prevent individual effects on the outcome. The experimental design was randomized to this crossover 2x2. It was made analysis of variance (ANOVA) and differences between means compared by t test for student "at 5%. The study showed that oocyte aspirations with a 15 day interval between each other, have a better quality of oocytes as shown by the following results, obtained in T1 was 12.6% GI, GII 49.4%, 37.9 GIII% in group T2 was obtained 12.9% GI, 46.1% GII, GIII 39.9% in T3 group obtained a 10% GI, 46.9% GII and 43% GIII.

Key words: oocytes, embryos, follicular aspiration.

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
BST/ rbst	Somatropina recombinante bovina
CCO	Complexo cumulus oophorus
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
IA	Inseminação artificial
LH	Hormônio luteinizante
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
MOET	Multiple ovulation and embryo transfer
OPU	<i>Ovum pick up</i> , punção folicular
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PIV	Produção <i>in vitro</i>
SFB	Soro fetal bovino
TE	Transferência embrião
VG	Vesícula germinativa

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Classificação oocitária segundo Lonergan (1992).....	23
---	----

LISTAS DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Classificação de oócitos bovinos da raça Gir, em porcentagem de acordo com as células do cumullus oophorus em: s/c (sem cumullus), c/ Exp. (cumullus expandido), c/ deg. (cumullus degenerado) e c/ atrs. (cumullus atresicos).....32

Gráfico 2: Média de oócitos totais, oócitos viáveis, embriões e taxa de prenhez de vacas doadoras de embriões da Fazenda Jua, obtidos em diferentes periodos de aspiração folicular.....35

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1- Classificação de oócitos bovinos da raça Gir, em números reais de acordo com as células do cumullus oophorus em: s/c (sem cumulus), c/ Exp. (cumullus expandido), c/ deg. (cumullus degenerado) e c/ atrs. (cumullus atresicos).....31

Tabela 2- Classificação de oócitos bovinos da raça Gir, em porcentagem de acordo com as células do cumullus oophorus em: s/c (sem cumullus), c/ Exp. (cumullus expandido), c/ deg. (cumullus degenerado) e c/ atrs. (cumullus atresicos).....33

Tabela 3 : Média de oócitos totais, oócitos viáveis, embriões e taxa de prenhez de vacas doadoras de embriões da Fazenda Jua, obtidos em diferentes periodos de aspiração folicular.....34

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REFERÊNCIAL TEÓRICO.....	15
2.1 FERTILIZAÇÃO IN VITRO.....	15
2.2 PUNÇÃO FOLICULAR.....	16
2.3 Endocrinologia do Ciclo Estral.....	19
2.4 Desenvolvimento Folicular.....	19
2.5 Colheita de Oócitos.....	21
2.6 Maturação.....	23
2.7 Fecundação in vitro.....	26
2.8 Cultivo in vitro.....	26
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 Cuidados Eticos.....	28
3.2 Animais.....	28
3.3 Local.....	28
3.4 Procedimentos.....	29
3.5 Delineamento Experimental e Análise estatística.....	30
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
5 CONCLUSÃO.....	37
6 REFÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38
ANEXOS.....	44
Anexo A Carta ao proprietário	44
Anexo B Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	45

1 INTRODUÇÃO

O rebanho bovino brasileiro é composto de cerca de 80% de animais zebuínos (*Bos taurus indicus*) puros ou mestiços, que se encontram adaptados ao ambiente tropical e, por isso, merecem destaque no panorama da pecuária. Nesse contexto, a raça Gir possui enorme potencial de mercado, visto que seus cruzamentos apresentam bom desempenho na produção de leite e bom rendimento ao abate, tornando-a bastante procurada como animais mais rústicos e produtivos (BORGES *et al*, 2004).

Em função do importante papel econômico e social dos rebanhos zebuínos na pecuária brasileira e do interesse nacional e internacional na aquisição e multiplicação de animais de elevado valor genético, o mercado de embriões cresceu bastante nos anos 90. Entretanto, grande parte das metodologias e biotecnologias desenvolvidas e utilizadas na obtenção e criopreservação de embriões foram desenvolvidas para animais taurinos (FONSECA *et al*, 2001).

Segundo Varago (2008), a produção *in vitro* de embriões (PIVE), que utiliza associação de técnicas de maturação, fecundação e cultivo, é uma importante biotécnica da reprodução que está associada ao aumento da produtividade. Na espécie bovina, a técnica de PIVE, associada à coleta de oócitos a partir da punção folicular guiada por ultra-som (*ovum pick up* - OPU), tem sido utilizada como instrumento para maximizar o potencial reprodutivo dos rebanhos, diminuindo o intervalo entre gerações e acelerando o melhoramento genético animal.

O entendimento da dinâmica folicular ovariana e de todos os mecanismos neuro-hormonais envolvidos no processo são de grande importância para melhorar os índices reprodutivos utilizando as biotécnicas da reprodução.

A dinâmica folicular dos bovinos deve ser bem entendida. Sabe-se que o crescimento dos folículos ovarianos nas fêmeas bovinas se dá em ondas, cada onda folicular é composta por uma fase de recrutamento, no qual um grupo de folículos

primordiais e primários inicia seu crescimento. Dentre estes, um folículo é selecionado, não sofre atresia e potencialmente pode chegar a ovular (fase de seleção), este passa a exercer dominância (fase de dominância) sobre os demais folículos, suprimindo o crescimento dos mesmos e inibindo o recrutamento de um novo grupo de folículos (GINTHER *et al.*, 1996; GINTHER; KNOPF; KASTELIC, 1989; SIROIS e FORTUNE, 1990).

Diversos são os parâmetros utilizados para avaliar a qualidade dos oócitos e embriões na FIV como morfologia, criotolerância, transcrição (mRNA), eclosão *in vitro* e prenhez após a transferência. Estudos recentes estão comprovando que oócitos no momento do pool de folículos (seleção e divergência) tem melhores resultados após fecundação. Entretanto, nenhuma dessas técnicas permite uma seleção eficiente que assegure bons índices de prenhez.

Assim o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito na qualidade de oócitos aspirados em diferentes períodos em vacas Gir, na intenção de obter melhores taxas de fecundação e qualidade de embriões.

2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 Fertilização *in vitro*

Segundo Renesto (2004), com a evolução das principais biotecnologias trabalhadas no Brasil, é importante destacar, inicialmente, a Inseminação Artificial (IA), sendo a primeira biotecnologia adotada nos sistema de produção brasileiro, que visa à multiplicação genética de touros de alto valor genético. Segundo Rodrigues, (2001), com a introdução de esquemas de ovulações múltiplas, recuperação e transferência de embriões, mais conhecida como *Multiple Ovulation and Embryo Transfer* (MOET), junto com a criopreservação de embriões na década de 80, a bovinocultura passou a ter ferramentas para aumentar o número de gestações provenientes de fêmeas de alto mérito genético. Concordando com está afirmação Thibier, (2000), acrescenta que a produção embrionária através da transferência de embrião (TE) é uma biotécnica mundialmente difundida e vem apresentando um crescimento acentuado onde mais de 500.000 embriões são colhidos e transferidos ou congelados anualmente.

Dode *et al* (2004), ressalta que a utilização de novas tecnologias, em especial aquelas relacionadas com o melhoramento animal, possui importância fundamental para o desenvolvimento da pecuária, como podemos citar a IA e TE que têm sido utilizadas para reproduzir aspectos genéticos desejados. Entretanto, novas opções para seleção e produção animal são proporcionadas pela produção *in vitro* de embriões, que surge como mais uma ferramenta, pois otimiza a utilização das fêmeas, por aumentar a sua produção.

A FIV, dentro deste contexto, é considerada a terceira geração de biotecnologia aplicada ao Melhoramento Genético. Na década de 90, com a introdução da aspiração folicular guiada por ultrasonografia, seguida pela produção *in vitro* de embriões (OPU-PIV), a expectativa no crescimento da produtividade das

fêmeas, e melhoramento genético em tempo reduzido, aumentou significativamente (RENESTO, 2004).

Segundo Dode *et al* (2004), embora os avanços alcançados com a produção *in vitro* de embriões ainda apresentar limitações, como baixos índices de blastocisto, dificuldade na criopreservação dos embriões oriundos por essa técnica, menor viabilidade dos oócitos obtidos de bezerras em relação aos de vacas e novilhas e alto custo do embrião. Portanto, novas pesquisas estão sendo desenvolvidas no sentido de aumentar os índices de produção e, dessa forma, reduzir os custos, assim como o desenvolvimento de métodos mais adequados para o congelamento de embriões de FIV.

O uso comercial dessa técnica ainda está sendo difundido no mercado, pois apresenta custo mais elevado que as demais e produção em larga escala dependente do equilíbrio entre o tipo de produto (embrião) e o custo de sua produção. Apesar disso, a aspiração associada à FIV está sendo gradualmente integrada aos esquemas de seleção e melhoramento genético, como uma complementação da IA e TE (DODE *et al*, 2004).

O método de aspiração *in vivo*, associado à FIV, é de grande importância para produzir embriões de vacas prenhes, para vacas que não respondem à superovulação, para animais portadores de patologias reprodutivas e para animais senis e pré-púberes. Os oócitos podem ser coletados em períodos menores entre uma aspiração e a outra, sem causar transtornos no ciclo estral ou para a prenhez (DODE *et al*, 2004).

De acordo com Seneda (2008), procurando aumentar a eficiência e reduzir o investimento inicial para realização da técnica, a punção folicular tem sido estudada por diversos grupos pela obtenção de uma maior produção de embriões pelo procedimento *in vitro* em relação a TE, isso tem possibilitado que um maior número de criadores optem por essa técnica, buscando mais rapidez na produção e maior número de descendentes de vacas e touros de linhagens superiores.

2.2 Punção Folicular

Segundo Fernandes (2002), a obtenção de oócitos bovinos por ultrassonografia e manipulação transretal com os ovários em posicionamento dorso-lateral na cavidade abdominal foi pela primeira vez relatada por Callensen *et al.* (1987),

permitindo a visualização com um transdutor de 3.5 MHz posicionado sobre a pele, e a introdução da agulha capaz de puncionar os folículos. No ano seguinte, Pieterse *et al.* (1988), descreveram a aspiração folicular via transvaginal através da ultrasonografia, que tornou possível o aproveitamento de oócitos bovinos sem as limitações dos procedimentos já existentes.

Segundo Viana *et al.* (2003), a técnica de punção folicular por ultra-sonografia foi desenvolvida pela necessidade de um método de recuperação de oócitos que fosse menos traumático que os procedimentos já existentes, como a laparotomia e a laparoscopia, e que não envolvesse uma abordagem cirúrgica ou semi-cirúrgica dos ovários. A ultra-sonografia possibilita a obtenção de oócitos pela utilização de um sistema de biópsia por agulha, o que é considerado pouco traumático, e que pode ser utilizada repetidas vezes em um mesmo animal, com eficiência semelhante ou eventualmente até maior que a da laparoscopia.

Neste sentido Fernandes (2002), demonstrou que a técnica mostrou-se simples e sem danos ao animal, viabilizando todas as etapas de recuperação, maturação e fertilização de oócitos obtidos, podendo ser repetida várias vezes em um mesmo animal como afirma Bols *et al.*, (1995); Meintjes *et al.*, (1995), Bols *et al.*, (1996a), inclusive com um aumento no número de folículos após várias semanas de aspirações foliculares (STUBBINGS e WALTON, 1995).

As técnicas para obtenção de oócitos, causam impacto sobre a quantidade e a qualidade do complexo *Cumulus oophorus* (CCO's), e, portanto sobre a competência para o desenvolvimento oocitário (BOLS *et al.*, 1997 *apud* FERNANDES 2002).

Segundo Fernandes (2002), agulhas longas específicas para aspiração folicular, apresentam custo elevado além de perda da eficiência progressiva, o que pode levar a uma má recuperação dos oócitos, já agulhas hipodérmicas descartáveis de 18 e 19 Gauge (G) possibilita uma boa taxa de recuperação, conservando a qualidade dos oócitos. Diâmetros maiores que 19G mostram taxas maiores de recuperação comparadas com agulhas de menor diâmetro. Bols *et al.*, (1997) concordam com esta visão, no entanto, ressaltam que, sistemas que utilizam agulhas descartáveis com maior número de conexões pode ser obstáculo capaz de reter os oócitos.

Bols *et al.*, (1996a) citado por Fernandes (2002), ressalta ainda que a pressão do vácuo está inteiramente relacionada com a agulha utilizada, existe uma grande

discussão em diferentes trabalhos, com valores de 40 a 400mmHg, embora isto deva ser considerado com reservas, já que todo o sistema que corresponde ao comprimento e diâmetro de conexões, altura do equipamento de vácuo e diâmetro da agulha, podem influenciar na pressão de vácuo final. Para quantificar a pressão negativa de forma mais real, estes autores sugeriram mensurar o vácuo em volume de água por minuto, mesmo com a mensuração existem variações consideráveis, de 4,4 a 40 ml de água/minuto segundo VOS *et al.*, (1994); BUNGARTZ *et al.*, (1995); RICK *et al.*,(1996).

A frequência do transdutor constitui-se em uma variável importante no processo de recuperação dos ovócitos (Hashimoto *et al.* 1999). Há citações de frequências de 3.5 MHz (Callensen *et al.*, 1987), 7.5 MHz (Van Der Schans *et al.*, 1991), 5.0 MHz (Hasler *et al.*, 1995) e 6.5 MHz (Bungartz *et al.*, 1995). A maioria dos autores cita a utilização de transdutores convexos ou setoriais para a aspiração folicular transvaginal (Looney *et al.*, 1994; Meintjes *et al.*, 1995b; Bols *et al.*, 1996; Bols *et al.*, 1998; Carlin *et al.*, 1999), com poucos relatos de transdutores lineares (Hashimoto *et al.*, 1999; Matthews *et al.*, 1995). No entanto, sendo o transdutor linear bastante difundido na área de reprodução de grandes animais, sua utilização para a aspiração folicular transvaginal poderia ser incrementada, uma vez que Hashimoto *et al.* (1999) obtiveram resultados satisfatórios com este equipamento (FERNANDES; 2002).

Fernandes (2002) cita de acordo com Pieterse *et al.*, (1992); Meintjens, *et al.*, (1995aA), que a taxa de recuperação dos oócitos podem ser influenciada por tratamentos hormonais como aplicações de bst (somatotropina recombinante bovina), frequência de realização da técnica, fase do ciclo estral, pressão de vácuo, tipo de agulha e tamanho do folículo aspirado, além da experiência do operador. Um ponto em comum entre estes artigos foi a menor recuperação de oócitos quando havia predomínio de grandes folículos no momento da aspiração, o que também foi observado em ovários de matadouro por Lonergan *et al.* (1994), o contrário ocorreu com as taxas de recuperação que foram maiores quando os folículos aspirados eram pequenos (2 a 6mm), (GIBBONS *et al.*,(1994), VOS *et al.*, (1994) BOLS *et al.*, (1996B), SENEDA *et al.*, (2001) GARCIA *et al.*, (1998).

Diante do exposto Bols *et al.*, (1997) citado por Fernandes (2002), ressalta que, apesar dos folículos maiores que 5mm serem aspirados mais facilmente, folículos pequenos parecem disponibilizar maior número de oócitos. A relação inversa entre o maior diâmetro folicular e a taxa de recuperação de oócitos, tem sido justificada por alterações morfológicas no CCO de acordo com Bols *et al* (1998), viscosidade do fluido folicular por Goodhand *et al* (1999), e quantidade de material a

ser aspirado e pressão intrafolicular por Seneda, (1999). Desta forma, um aspecto a ser considerado seria a aspiração realizada em um momento que folículos de menor diâmetro estivessem em maior número, conforme sugerido por HASHIMOTO *et al.* (1999) e SENEDA (2001).

2.3 Endocrinologia do ciclo estral

De acordo com Hafez (2004), ao atingir a puberdade, a fêmea desenvolve um padrão rítmico de eventos fisiológicos que promovem mudanças no comportamento, alterações morfológicas no sistema reprodutor e no restante do corpo. Estas modificações ocorridas são cíclicas e contínuas, podendo ser interrompidas quando o animal estiver no período gestacional, com deficiência e ou distúrbio hormonal ou alguma condição patológica. As mudanças comportamentais são mais fáceis de serem observadas do que as morfológicas, a principal mudança comportamental é quando o animal apresenta receptividade sexual o que é conhecido como período de cio ou estro. Devido existir apenas um período de cio ou estro em cada ciclo, conseqüentemente a seqüência de eventos que ocorre entre o período de dois estros sucessivos é chamada de ciclo estral.

O ciclo estral é regulado por mecanismos endócrinos e neuroendócrinos que são os hormônios hipotalâmicos, as gonadotropinas produzidas pela adenohipófise e os esteróides secretados pelos ovários. O controle da secreção das gonadotropinas durante o ciclo estral exige um delicado balanço entre as complexas interações hormonais. Núcleos hipotalâmicos secretam GnRH, que através de um sistema circulatório especial, chamado sistema porta hipotalâmico-hipofisário, estimulam a adenohipófise a secretar o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH), que na corrente circulatória promovem a síntese de estrógeno e progesterona pelos ovários. Estes dois últimos exercem influência, através de mecanismos de feedback positivo ou negativo, diretamente na hipófise ou no hipotálamo, tornando possível a continuidade dos eventos cíclicos que caracterizam o ciclo estral (HAFEZ, 2004).

2.4 Desenvolvimento Folicular

Segundo Martins (2007), o desenvolvimento folicular em bovinos ocorre em um padrão de ondas, assim sendo, cada onda de crescimento folicular é composta por um grupo de folículos pequenos que são recrutados (emergência folicular) e iniciam uma fase de crescimento comum por cerca de três dias. Destes, apenas um único folículo continua seu desenvolvimento o que se denomina de folículo dominante, enquanto os outros sofrem parada do crescimento e regressão de tamanho o que denomina folículos subordinados. O fenômeno da divergência folicular. Após a divergência, e na presença de altas concentrações de progesterona, provoca uma redução na liberação de LH, com isso o folículo dominante torna-se anovulatório. Em contra partida, neste momento começa o processo de atresia e perda da dominância, o que levará a um início de uma nova onda de crescimento folicular de acordo com Ginther *et al.*, (1989) e Webb *et al.*; (1999). Ressalta Fortune *et al.*; (2004) que o folículo dominante presente no momento da regressão luteínica culmina na ovulação.

Segundo Peter *et al.* (1975), a formação do “pool” de folículos primordiais começa durante a vida fetal e se completa ao nascimento. O desenvolvimento folicular é contínuo durante toda a vida reprodutiva da fêmea, começando assim que os folículos primordiais são formados e só termina quando o “pool” de folículos é liberado. O processo de crescimento de um folículo primordial é contínuo, até que este sofra ovulação ou torne-se atrésico. Geralmente a maioria dos folículos em crescimento sofre atresia em qualquer estágio de desenvolvimento, sendo apenas 0.1 - 0.2% dos folículos primordiais que se desenvolve até a ovulação (IRELAND, 1987).

Martins (2007), ressalta que há diferenças entre a dinâmica folicular de *Bos taurus* e *Bos indicus*. Uma das particularidades observadas entre zebuínos e taurinos corresponde ao número de ondas de crescimento folicular durante o ciclo estral. Estudos realizados mostram que animais da raça Holandesa demonstraram predominância de duas e três ondas de crescimento folicular por ciclo estral de acordo com Sávio *et al.* (1988); Fortune(1988); Ginther *et al.*, (1989); e Wolfenson *et al.*, (2004). Sobretudo, em zebuínos estudos apresentam maior incidência de ocorrência de 3 ondas foliculares, podendo ser observada a presença de até 4 ondas de crescimento folicular por ciclo estral de acordo com RHODES *et al.*, (1995); FIGUEIREDO *et al.*, (1997); VIANA *et al.*, (2000).

Martins (2007), observa que além da diferença no número de ondas, existem trabalhos que descrevem que fêmeas *Bos indicus* recrutam maior número de folículos por onda de crescimento folicular que fêmeas *Bos taurus* ($33,4 \pm 3,2$ vs. $25,4 \pm 2,5$; CARVALHO *et al.*, 2007). Isso pode influenciar diretamente na eficiência da técnica de transferência de embriões e de OPU-PIV, indicando vantagem em fêmeas zebuínas sobre taurinas. Boni *et al.*, (1997), confirma esta afirmativa e ressalta que existem relatos de que o número de folículos recrutados por onda de crescimento folicular apresenta diferenças entre indivíduos, e essa característica possui alta repetibilidade durante a vida reprodutiva da fêmea.

De acordo com as características morfológicas os folículos ovarianos podem ser classificados em três grupos: primordiais onde o oócito é circundado por uma camada de células epiteliais; em crescimento onde duas ou mais camadas de células da granulosa em volta do oócito e vesicular onde há presença de uma cavidade central - antro - com o oócito envolto por um agrupamento de células da granulosa chamado de "cumulus oophorus" (PINEDA, 1989).

O padrão de crescimento e desenvolvimento folicular durante o ciclo estral tem sido extensivamente estudado segundo Gong e Webb, (1996). Através de estudos histológicos, Rajakoski (1960); Smeaton e Robertson, (1971) e Ireland (1987) relataram que os folículos crescem durante todo o ciclo estral até atingirem a ovulação, este desenvolvimento ocorre sob a forma de ondas. Trabalhos recentes, usando aparelho de ultra-sonografia, demonstram achados e mostraram que há duas ou três ondas de desenvolvimento folicular durante o ciclo estral como descreve Sirois e Fortune (1988); Sávio *et al.*, (1988).

Cada onda é caracterizada pelo crescimento simultâneo de cinco a sete folículos antrais de um "pool" de folículos >5mm, sendo que um destes cresce mais rapidamente enquanto os outros regridem. Esse folículo continua seu crescimento até atingir o diâmetro de aproximadamente 15mm, permanecendo com este tamanho por dois a três dias antes da regressão, quando então se inicia uma nova onda de desenvolvimento. Se a fase de crescimento coincide com a luteólise, o folículo sofre uma rápida maturação pré-ovulatória e a ovulação (HAFEZ, 2004).

2.5 Colheita de Oócitos

Segundo Gonsalves *et al* (2002), a obtenção de oócitos pode ser a partir de punção folicular ou dissecação folicular (quando o número de ovários é reduzido), em ovários provenientes de abatedouros ou, *in vivo*, por laparotomia ou laparoscopia ou ultra-sonografia via transvaginal.

Ramos *et al* (2007), ressalta ainda que, a uma maior disponibilização de oócitos quando os animais são submetidos a tratamentos hormonais com somatotropina bovina recombinante (rbst), que tem apresentado efeito no crescimento folicular em vacas, Gong *et al.*, (1991, 1993); De La Sota *et al.*, (1993); Lucy *et al.*, (1993). A bST aumenta a população de folículos em animais de origem européia, Gong *et al.*, (1991, 1993, 1996, 1997); De La Ramos *et al.* Sota *et al.*, (1993); Webb *et al.*, (1994); Kirby *et al.*, (1997a,b); Bols *et al.*, (1998) e em vacas Nelore, Carter *et al.*, (1998); Buratini Jr. *et al.*, (1999). Crystal *et al.* (1997) demonstraram que o número de folículos com diâmetro de 3 a 5 mm e de 6 a 9 mm é maior em vacas tratadas com bST em relação àquelas não tratadas e relataram que o efeito deste hormônio seria primeiramente na fase de recrutamento do crescimento folicular, não sendo afetadas a seleção de folículos grandes e a taxa de ovulação. Bols *et al.* (1998) completa que, embora o recrutamento de folículos tenha aumentado antes da aspiração folicular em animais submetidos a tratamentos com rbST, o número e a qualidade dos ovócitos, assim como o número de blastocistos cultivados *in vitro* não foi influenciado.

Para Gonsalves *et al* (2002), o oócito pode ter o seu potencial de maturação, fecundação e capacidade de desenvolvimento embrionário observado pela (CCO) células do cumulus oócito. Morfologicamente, os oócitos que possuem maior potencial de viabilidade devem apresentar ooplasma homogêneo com granulações finas de coloração marrom e completamente envolvidas por várias camadas de células do cumulus dispostas de forma compacta. Enfatiza entretanto, que há grandes variações quanto aos padrões morfológicos de qualidade de oócito entre as espécies. Por exemplo, oócitos viáveis de camundongo apresentam o ooplasma claro, quase sem granulações, enquanto que em eqüinos, suínos e cães, observa-se ooplasma escuro e as granulações podem apresentar-se de forma heterogênea. Várias classificações morfológicas têm sido adotadas para selecionar oócitos bovinos na tentativa de identificar os de maior viabilidade. Está sendo apresentada abaixo uma adaptação da proposição de (LONERGAN, 1992).

Quadro1- Classificação oocitária de acordo com a composição do cumulus oophorus segundo Lonergan (1992).

QUALIDADE OOCITÁRIA	DESCRIÇÃO
Grau I	Células do <i>cumulus</i> compactadas, contendo mais de três camadas de células.
Grau II	Células do <i>cumulus</i> compactadas parcialmente presentes em volta do oócito ou rodeando completamente o ócito, com menos de três camadas celulares.
Grau III	Células do <i>cumulus</i> , com apenas uma camada de células.
Sem <i>cumulus</i>	Ausência de camadas de células do <i>cumulus</i> .
Expandido	Células do <i>cumulus</i> expandidas.
Atrésicos	Células do <i>cumulus</i> em regressão celular.
Degenerado	Oócitos com sinais de degeneração

Fonte: FERRAZ, 2008.

2.6 Maturação

A maturação *in vitro* varia em períodos de 18 a 24 horas em 5% de CO₂ em ar e umidade saturada, as condições de cultivo *in vitro* são monitoradas constantemente e manipuladas para melhorar a capacitação do oócito após sua retirada do ambiente natural do folículo. São adicionados alguns fatores de crescimento, como gonadotrofinas e esteróides aos diferentes meios de maturação. (GONÇALVES *et al*, 2008).

Observado por Alves *et al*, (2001), apesar da diferença entre os mais variados tipos de protocolos para maturação *in vitro* de oócitos bovinos, existe a igualdade sobre a suplementação do meio de maturação com LH ou suplementação com LH e

FSH, ou ainda, a associação entre hormônios gonadotróficos e esteróides (Montagner, 1999) também tem sido implantada em função da especificidade de ação que cada hormônio possui tanto para aumentar a porcentagem de oócitos que completam a meiose quanto para aumentar a capacidade de fecundação e de desenvolvimento até estádios de blastocisto. É comprovado que a suplementação do meio de maturação de oócitos com FSH induz a um aumento transitório do AMPc (Richard, 1980) que pode causar um retardamento a retomada do processo de meiose, razão pela qual vários grupos de estudos têm utilizado alta concentração de LH e baixa de FSH.

Descrito por Gonçalves *et al* (2007), para que o oócito esteja com capacidade de ser fecundado e posteriormente de se desenvolver até a fase de blastocisto, este precisa ser maturado e, durante essa fase, este sofrer diversas transformações morfológicas tanto em seu citoplasma quanto em seu núcleo. Logo enfatiza o autor que:

Durante todo o seu desenvolvimento, o oócito se encontra no estágio diplóteno da prófase I ou estágio de vesícula germinativa (VG). *In vivo*, o reinício da meiose ou maturação tem início após o pico pré-ovulatório de LH durante o estro e, *in vitro*, a retirada do oócito do contato com as células foliculares é suficiente para dar início ao processo de maturação nuclear. A maturação nuclear do oócito compreende a progressão do estágio diplóteno da primeira prófase meiótica até a fase de metáfase II (MII). Em bovinos, o período de maturação varia de 18 a 24 horas em atmosfera controlada contendo 5% de CO₂ em ar e umidade saturada. *In vitro*, diferentes condições de cultivo e protocolos já foram testados para a maturação de oócitos, vários meios de maturação, tais como fluido sintético de oviduto e meio de cultivo tecidual 199 (TCM 199), têm sido utilizados. O TCM199 é o meio mais difundido entre os laboratórios de produção *in vitro*, sendo, geralmente, suplementado com soro fetal bovino (SFB), FSH, LH, piruvato e antibiótico, entretanto existem variações entre os diferentes protocolos de PIV.

De acordo com Eppig (2001); Blondin *et al.*, (2002); Fair, (2003); Lequarre *et al.*,(2005) citados por Gonçalves *et al* (2007), oócitos adquirem progressivamente a capacidade de completar a maturação nuclear, e citoplasmática, sendo assim adquirem a capacidade de suportar o desenvolvimento embrionário até a fase final de crescimento folicular. A maioria dos oócitos coletados para PIV está dentro de pequenos folículos antrais e, apesar de competentes para o reinício da meiose, apresentam baixa capacitação para o desenvolvimento embrionário. Seneda (2008) confirma está afirmativa, completando que a competência do oócito obtido pela aspiração folicular transvaginal parece não ser influenciada pelo tamanho do folículo, mas o mesmo não ocorre em relação à taxa de recuperação, que demonstrou ser

significativamente superior para folículos menores ou iguais a 4 mm. *In vivo*, a capacitação é adquirida no período do desenvolvimento folicular devido às mudanças moleculares e estruturais desenvolvidas no oócito durante esse período, o que o torna apto para suportar as fases iniciais do desenvolvimento embrionário, Hyttel *et al.*,(1997). Em consequência, oócitos oriundos de folículos grandes são mais capacitados para o desenvolvimento embrionário que oócitos oriundos de folículos pequenos, Lonergan *et al.*, (1994b); Pavlok *et al.*, (1992); Bastos *et al.*, (2005). Entretanto, o tamanho folicular não parece ser único responsável pela total capacitação dos CCOs segundo Humblot *et al.*, (2005). Oócitos coletados 6 horas após o pico pré-ovulatório de LH e maturados *in vitro*, apresentam uma elevada taxa de desenvolvimento embrionário, semelhante à oócitos obtidos *in vivo* (BLONDIN *et al.*, 2002).

Segundo Gonçalves *et al.*; (2002), Inibidores do reinício da meiose têm sido utilizados com intenção de aumentar o tempo de maturação do citoplasma *in vitro* e consequentemente melhorar a capacitação dos oócitos durante a maturação. Assim, para o autor supracitado:

O oócito, no interior do folículo, está envolto por células da granulosa, formando assim um complexo cumulus-oócitos (CCO). O conjunto de células próximas da zona pelúcida, que estão em íntimo contato com o oócito por junções intercomunicantes é denominado de corona radiata. Essas células do cumulus têm função diferenciada daquelas presentes no mural do folículo em consequência do seu íntimo contato com o oócito. Substâncias reguladoras produzidas pelo oócito têm função importante na atividade das células do cumulus e, da mesma maneira, componentes dessas células somáticas têm participação ativa no mecanismo de crescimento e maturação dos oócitos. Apesar das células do cumulus não serem essenciais para maturação dos oócitos, melhores resultados de maturação, fecundação são alcançados na presença desse tipo celular, fato que evidencia a importância das células do cumulus na maturação do oócito *in vitro*.

Para Gonçalves *et al.*, (2002) são de grande importância as características vista macroscopicamente do folículo para determinar a capacidade de maturação nuclear e citoplasmática do oócito. O mesmo ressalta que oócitos provenientes de folículos menores que 2 mm de diâmetro, geralmente não são competentes para reiniciarem a meiose, entretanto uma grande percentagem de folículos maiores do que 8 mm já estão em processo de atresia ou apresentam oócitos em processo de maturação, destaca-se que em todos os casos, a qualidade dos oócitos é comprometida. Portanto, deve-se considerar a diferença entre folículos dominantes e

subordinados que em estudos relatam ter influência sobre a capacidade do oócito em desenvolver até a clivagem e sustentar o desenvolvimento embrionário.

Oócitos oriundos de folículos um pouco antes do pico ovulatório e liberação do hormônio luteinizante (LH) têm maior capacidade de desenvolvimento até blastocisto do que aqueles com diâmetro entre 2 e 6 mm. Provavelmente, a permanência do oócito no folículo desde a divergência folicular até a ovulação é de fundamental importância para completar o fenômeno denominado de capacitação do oócito. Na prática, os folículos entre 2 e 8 mm têm sido utilizados para maturação *in vitro* em decorrência do número disponível no ovário e da dificuldade de determinar os oócitos que estão capacitados antes da fecundação. Métodos eficazes para capacitação de oócitos *in vitro* devem ser desenvolvidos para incrementar os índices de produção de embriões (GONÇALVES *et al.*, 2002).

A maturação do oócito, envolvendo as mudanças nucleares e citoplasmáticas, está relacionada a uma variedade de mudanças estruturais e bioquímicas que tornam o gameta feminino apto a ser fecundado e ter o desenvolvimento embrionário subsequente. O indicador mais provável da completa maturação nuclear e citoplasmática é a capacidade do oócito ser fecundado e desenvolver até embrião (GONÇALVES *et al.*, 2002).

Há uma larga variedade de meios que são utilizados para maturação *in vitro* de oócitos, entretanto, a maioria dos laboratórios usam, como meio base, o TCM-199 com sais de EARLE (GONÇALVES *et al.*, 2002).

2.7 Fecundação *in vitro*

Para Varago *et al* (2008), os laboratórios, durante o processo de fecundação *in vitro* em bovinos usa-se sêmen congelado. Entretanto, após o descongelamento do sêmen, é necessário selecionar os espermatozoides vivos e que tenham capacidade para fecundar o oócito. Esta seleção é realizada na maioria das vezes pela separação em gradiente de Percoll, segundo Galli e Lazzari, (1996), embora existam outros sistemas que possam ser utilizados como o “swim-up” ou o lavado espermático.

O percoll é composto por partículas de sílica coloidal coberto com polivinilpirrolidona, preparado em diferentes concentrações para formar um gradiente

descontínuo de duas ou três fases (90, 45 e 30%) para separação espermática (GONÇALVES *et al.*, 2002, apud VARAGO *et al.*, 2008).

2.8 Cultivo *in vitro*

Segundo Varago *et al.* (2008), o entendimento do processo de fecundação em mamíferos, meios capazes de favorecer o crescimento embrionário até o estágio de blastocisto começaram a ser desenvolvidos. Em 1967, um primeiro trabalho demonstrou que zigotos de rata evoluíam até o estágio de duas células embrionárias na presença de lactato e piruvato Whittinham e Biggers, (1967). Um pouco mais tarde, Whitten e Biggers (1968), tiveram resultados que o desenvolvimento embrionário em meio simples, sem o adicionamento de substâncias macromoleculares que simulasse a substâncias materna, entretanto, durante o cultivo, muitos embriões cessarão o desenvolvimento entre 2 e 16 células dependendo da espécie abordada. Anos mais tarde esta parada do desenvolvimento foi denominada de bloqueio do desenvolvimento embrionário, que corresponde até uma resposta embrionária aos efeitos adversos no cultivo ou a carências do sistema de produção materno no momento da transição do genoma para o embrionário Barnes e Eystone, (1990) e Petters, (1992). Smith *et al.*, (1995) completa dizendo que, na espécie bovina, os embriões sofrem bloqueio no estágio de oito células.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cuidados éticos

Foram tomados os seguintes cuidados éticos:

Assinatura do termo de permissão para entrada nas propriedades (ANEXO A).

Termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO B)

3.2 Animais

Foram utilizadas 13 vacas da raça Gir (*Bos taurus indicus*), com idade entre 5 e 8 anos, com escore corporal entre 3 e 4 (sendo 1 = muito magra e 5 = gorda, segundo Ferreira et al., 1999), a aspiração folicular foi feita em intervalos de 15 dias durante 1 mês, ou seja 2 vezes, e após, puncionados com 30 dias. Não houve administração de tratamento hormonal nos animais. Os animais estavam em piquetes irrigados, de grama Tifton durante um período do dia e estabulados o restante do dia comendo silagem de milho e ração balanceada para controle leiteiro.

Foi feita avaliação física e ginecológica de todos os animais antes das punções foliculares para avaliar a fase do ciclo estral em que as vacas estavam.

As aspirações foliculares foram feitas entre os meses de junho e julho de 2010. As mesmas foram denominadas de Tempo 1, Tempo 2 e Tempo 3, onde o tratamento 1; n=(13) foi a primeira aspiração, o tratamento 2; n=(13) foi a aspiração feita com intervalo de 15 dias após o tratamento 1, e o tratamento 3 n=(13) foi a aspiração feita com intervalo de 30 dias após o tratamento 2.

3.3 Local

O experimento foi realizado na Fazenda Juá, que possui um laboratório adequado para a seleção e classificação dos oócitos. A Fazenda Juá tem como principal finalidade a disseminação de genética com a venda permanente de tourinhos e embriões, está localizada no município de Arcos – Minas Gerais. Arcos localiza-se a uma latitude 20°17'29" sul e a uma longitude 45°32'23" oeste, estando a uma altitude de 740 metros.

3.4 Procedimentos

As punções foliculares foram realizadas por um mesmo técnico, foi realizada utilizando-se de um ultra-som Chison 8100 VET com transdutor microconvexo de 5 MHz (UST 974-5) conectado a guia de biópsia acoplada com 18 G. A pressão de vácuo foi obtida com uma bomba WTA, ajustada entre 80 a 90 mmHg.

Para evitar movimentos abruptos, desconforto e movimentos peristálticos que possam causar lesões no animal, foi feita anestesia epidural, 5 mL de Lidocaína a 2%.

Para evitar contaminações foi feita uma assepsia na região do ânus e vulva. Em seguida foi feita à manipulação transretal, para que os ovários fossem posicionados para facilitar a punção e obtenção dos oócitos e para uma boa visualização na tela do aparelho de ultra-som, o ovário foi palpado para inspeção e isolado de outros tecidos que poderiam atrapalhar a visualização ou até mesmo causar lesões acidentais, após esta verificação o transdutor acoplado a guia de biópsia e agulha foi introduzido pelo canal da vagina, e, os folículos a serem aspirados foram posicionados no percurso da agulha e apresentados na tela do ultra-som e quando a agulha se aproximou do folículo a ser aspirado, com o auxílio da bomba de vácuo o folículo foi aspirado, o mesmo procedimento foi repetido em todos os folículos visíveis de cada ovário.

No final do procedimento a agulha e o sistema que liga a agulha a bomba de vácuo foi lavada com meio de recebimento dos oócitos composto de soro fetal bovino acrescido de 5,0 UI/mL de heparina sódica e 50 mg/mL de Gentamicina

O material aspirado foi levado ao laboratório da fazenda em tubos em temperatura adequada, no laboratório foi feita a transferência deste material para filtro de colheita de embriões e lavado com a mesma solução utilizada na aspiração.

Após lavado foi transferido para placa de Petri para ser feita a seleção, contagem e seleção dos oócitos. Os oócitos foram classificados de acordo com o número de camadas de células do cumulus em graus I, II e III (GI, GII e GIII), oócitos sem cumulus (s/c), expandidos (exp), degenerados (deg) e atrésicos (atr), segundo Lonergan, (1992). Os oócitos considerados viáveis foram classificados como GI, GII e GIII, lavados e transportados em criotubos contendo meio de maturação em banho Maria a 35°C.

No laboratório os oócitos passaram por novas lavagens e em seguida transferidos para placas de Petri e conduzidos à maturação *in vitro* (MIV) por 24 horas. Após esse processo foram conduzidos a fertilização *in vitro* onde permaneceram por 18 a 20 horas, todos os oócitos foram fecundados com o mesmo sêmen e da mesma partida da central de sêmen, para não haver influência no resultado e posteriormente após o tempo de fecundação foram transferidos para o cultivo *in vitro* (CIV) onde permaneceram por 6 a 8 dias, no 6 a 7 dia os embriões já desenvolvidos foram rastreados e avaliados em mórula, blastocisto, blastocisto em expansão e blastocisto eclodido, (LINDNER E WRIGHT-JR, 1983).

3.5 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado do tipo cross-over 2x2. Todos os animais foram submetidos a todas as aspirações foliculares, objetivando evitar efeitos individuais no resultado.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo mostra os resultados obtidos de oócitos totais, oócitos viáveis, oócitos inviáveis, embriões e taxa de prenhes, os embriões e taxa de prenhes foram analisados apenas para dar continuidade nos resultados.

A tabela 1 mostra os valores reais de oócitos aspirados em cada tempo onde foram divididos em oócios totais, oócitos viáveis e oócitos inviáveis.

Tabela 1- Valores reais de oócitos aspirados em cada tempo (Tempo 1 n=(13) foi a primeira aspiração, o tempo 2; n=(13) foi a aspiração feita com intervalo de 15 dias após o tempo 1, e o tempo 3 n=(13) foi a aspiração feita com intervalo de 30 dias após o tempo 2).

GRUPOS	OÓCITOS		
	TOTAIS	VIÁVEIS	INVIÁVEIS
T1	338	182	156
T2	334	208	126
T3	286	130	156

Os resultados da avaliação dos oócitos são mostrados na Tabela 2, onde pode ser observado o número real de oócitos viáveis que foram classificados em grau I (GI), grau II (GII) e grau III (GIII) de acordo com a quantidade de camadas de células do cumulus, sendo que oócitos de grau I são aqueles que apresentam melhor qualidade. A tabela também mostra a quantidade de oócitos inviáveis que foram classificados, em: oócitos sem cumullus (s/c), oócitos com cumullus expandido (c/exp.), oócitos com cumullus degenerado (c/deg.) e oócitos atrésicos.

Tabela 2- Classificação de oócitos bovinos da raça Gir, em números reais de acordo com as células do *cumulus oophorus* em: s/c (sem cumulus), c/ Exp. (cumulus expandido), c/ deg. (cumulus degenerado) e c/ atrs. (cumulus atrésicos).

CLASSIFICAÇÃO DOS OÓCITOS									
GRUPOS	VIÁVEIS			OÓCITOS VIÁVEIS TOTAIS	S/C	C/ EXP.	C. DEG.	ATRÉSICO	OÓCITOS INVIÁVES TOTAL
	GI	GII	GIII						
T1	23	90	69	182	17	27	45	67	156
T2	27	96	83	208	31	39	35	21	126
T3	13	61	56	130	28	34	41	53	156

No T1 o número total de oocitos viáveis foi de 182, sendo que destes, 23 foram classificados como oocitos de grau 1 (GI), 90 como GII e 69 como GIII, o número de oócitos inviáveis total foi de 156. Estes foram classificados em: sem cumulos (17), com cumulus expandido (27), com cumulus degenerado (45) e 67 oocitos atrésicos.

No T2 o número total de oocitos viáveis foi de 208, o maior dos três grupos, onde 27 foram classificados como GI, 96 como GII e 83 como GIII, o número de oócitos inviáveis total foi de 126 o menor número dos três grupos onde foram classificados em 31 sem cumullus, 39 com cumullus expandido, 35 com cumullus degenerado e 21 oócitos atrésicos.

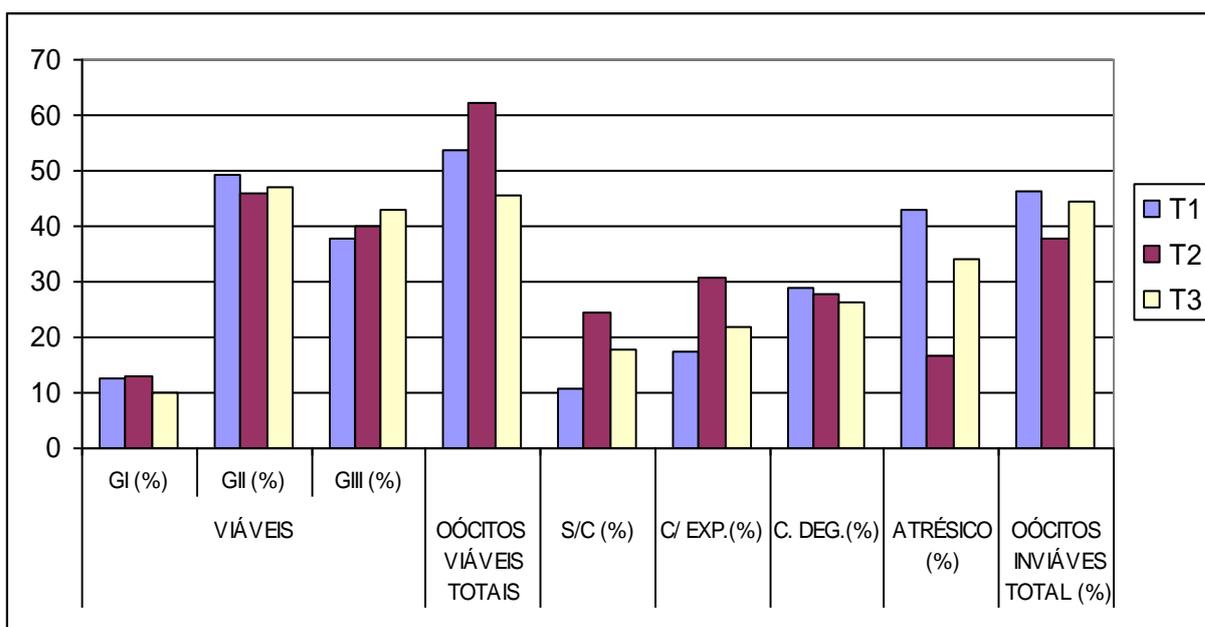
No T3 o total de oocitos viáveis foi de 130, no qual, 13 foram classificados como GI, 61 como GII e 56 como GIII, o número de oócitos inviáveis total foi de 156 e a classificação seguiu-se da seguinte forma: 28 sem cumullus, 34 com cumullus expandidos, 41 com cumullus degenerado e 53 oocitos atrésicos.

Os resultados do T2 que mostram menor quantidade de oócitos aspirados, porém maior taxa de embriões e prenhez em relação aos outros grupos, podem sugerir concordando com Seneda (2002), que a taxa de recuperação de oócitos é pior quando os foliculos puncionados são maiores que 6mm, e há uma melhor recuperação dos mesmos quando oriundos de foliculos pequenos entre 2 a 6mm. No caso do T2 a taxa de recuperação foi maior, sugerindo que os folículos neste grupo eram de menor diâmetro.

O melhor resultado do T2 em relação aos outros demonstra que existe efeito positivo entre o intervalo entre aspirações, provavelmente, resultando em menores alterações no recrutamento folicular e conseqüentemente no número de folículos disponíveis para OPU. Contudo não há na literatura o período certo entre aspirações para obter melhores resultados.

No grupo T3, um fator sugestivo para a menor quantidade de oócitos pode ser um maior número de folículos de maior diâmetro, devido ao maior intervalo de dias entre aspirações como encontrado também por Bols *et al.*, (1997), onde relata que apesar de folículos maiores serem mais fáceis de puncionar, a aspiração de folículos menores parece disponibilizar melhor qualidade de oócitos.

Gráfico 1- Classificação de oócitos bovinos da raça Gir, em porcentagem de acordo com as células do cumulus oophorus em: s/c (sem cumulus), c/ Exp. (cumulus expandido), c/ deg. (cumulus degenerado) e c/ atrs. (cumulus atresicos).



Arquivo pessoal

O presente trabalho mostra recuperação de oócitos que foram classificados como inviáveis (Tabela 1). A presença de número significativo desses elementos demonstra que há ineficiência no processo de colheita ou algum problema no decorrer da maturação oocitária. Esses problemas podem ser justificados devido a relação inversa do maior diâmetro folicular e da taxa de recuperação de ovócitos, como alterações morfológicas no CCO, Bols *et al.*, (1998), viscosidade do fluido

folicular, Goodhand *et al.*, (1999), quantidade de material a ser aspirado e pressão intrafolicular (SENEDA, 1999).

Um aspecto a ser considerado seria fazer as punções foliculares no momento que houvesse maior numero de folículos de menor tamanho, para haver um a melhor recuperação dos oócitos.

Tabela 2- Classificação de oócitos bovinos da raça Gir, em porcentagem de acordo com as células do cumulus oophorus em: s/c (sem cumulus), c/ Exp. (cumulus expandido), c/ deg. (cumulus degenerado) e c/ atrs. (cumulus atrésicos).

CLASSIFICAÇÃO DOS OÓCITOS									
GRUPOS	VIÁVEIS			OÓCITOS VIÁVEIS TOTAIS (%)	S/C (%)	C/ EXP.(%)	C. DEG.(%)	ATRÉSICO (%)	OÓCITOS INVIÁVES TOTAL (%)
	GI (%)	GII (%)	GIII (%)						
T1	12,6	49,4	37,9	53,8	10,8	17,3	28,8	42,9	46,2
T2	12,9	46,1	39,9	62,2	24,6	30,9	27,7	16,6	37,7
T3	10	46,9	43	45,4	17,9	21,7	26,2	33,9	44,6

A tabela 2 mostra os valores em porcentagem a sua utilização se justifica para melhor visualização dos resultados. Sendo que no T1 os valores de oócitos viáveis grau I (GI) foram de 12,6 %, oócitos grau II (GII) 49,4 %, oócitos grau III (GIII) 37,9 %. No T2 os valores de oócitos viáveis grau I (GI) foram de 12,9 %, oócitos grau II (GII) 46,1 %, grau III (GIII) 39,9 %. No T3 os valores de oócitos viáveis grau I (GI) foram de 10 %, oócitos grau II (GII) 46,9 %, oócitos grau III (GIII) 43 %.

A porcentagem de de oócitos inviáveis no T1 foi de 46,2 %, no T2 foi de 37,7 % e no T3 de 44,6 %.

Tabela 3. Média de oócitos totais, oócitos viáveis, embriões e taxa de prenhez de vacas doadoras de embriões da Fazenda Jua, obtidos em diferentes periodos de aspiração folicular.

TRATAMENTOS	CLASSIFICAÇÃO			TAXA DE
	OÓCITOS	OÓCITOS	EMBRIÕES (média)	

	TOTAIS (média)	VIÁVEIS (média)		PRENHEZ (média)
	26	14	6	2,53
T1(n=13)	(n=338)	(n=182)	(n=78)	(n=33)
	25,6	16	6,3	2,7
T2(n=13)	(n=334)	(n=208)	(n=82)	(n=36)
	22	10	4	1,75
T3(n=13)	(n=286)	(n=130)	(n=52)	(n=23)

Os embriões foram transferidos para as receptoras com 7 dias de cultivo, estas passaram por exames ultra-sonográficos com 36 dias de gestação para detectar as prenheses.

No tratamento 1n=(13) a média de oócitos totais no grupo foi de 26,00, de oócitos viáveis 14,00, de embriões 6,00, e taxa de prenhez de 2,50.

No tratamento 2n=(13) a média do grupo de oócitos totais foi de 26,5, de oócitos viáveis de 16,00, de embriões de 6,3e de taxa de prenhez de 2,8.

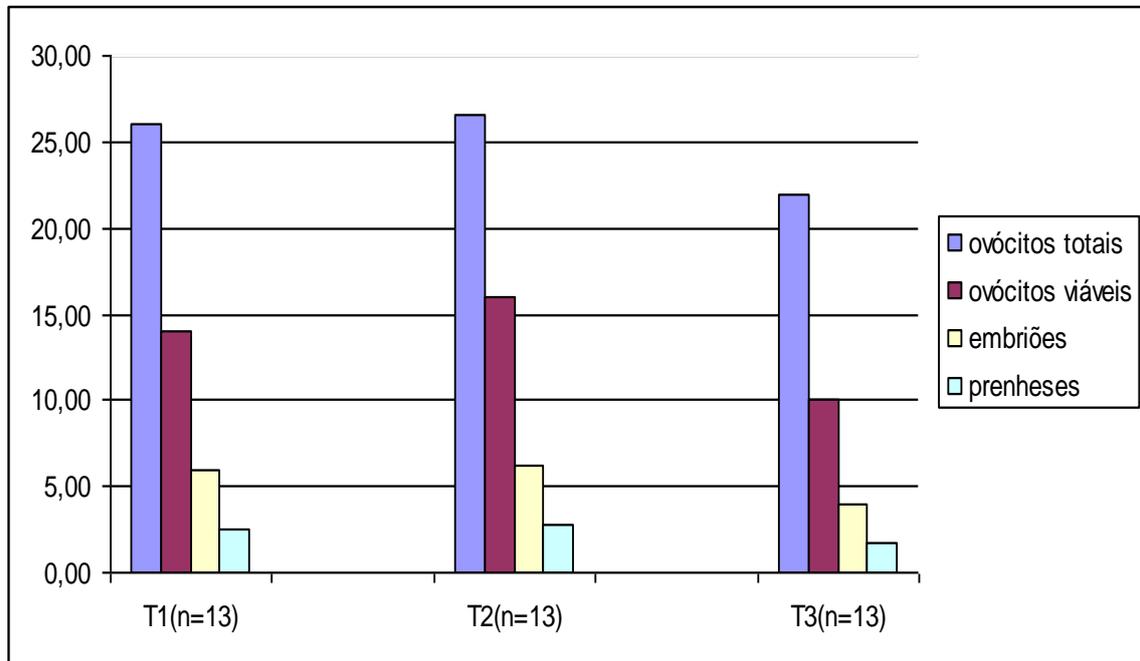
No tratamento 3n=(13) a média do grupo de oócitos totais foi de 22,00, de oócitos viáveis de 10,00, de embriões de 4,00 e de taxa de prenhez de 1,75.

Entre os tratamentos 1 e 2, não houve diferença significativa entre a média de oócitos totais, oócitos viáveis, embriões e taxa de prenhez, entretanto no tratamento 3 a média de todas as classificações citadas acima foram inferiores.

Como ressalta Bols *et al* (1995, 1996, 1997) e Seneda (2001), a técnica de de aspiração folicular transvaginal guiada por ultra-som (OPU), tem se mostrado mais eficiente na produção de embriões comparando com a TE, embora com maior custo por embrião, entretanto a técnica OPU pode resultar em baixa taxa de recuperação de oócitos devido a vários fatores como: comprimento do bisel da agulha, pressão do vácuo, visualização pela freqüência do transdutor, a condição fisiológica da doadora, considerando-se peso, raça, idade e a própria variação individual, são alguns dos aspectos biológicos que interferem na OPU.

Ainda ressalta Viana *et al* (2005), que as características físicas do ultra-som, como a resolução e formação de imagem permitem somente a visualização de folículos maiores que 2mm e na fase antral, concluíram que estes folículos são uma pequena fração em um todo mais de grande importância na qualidade dos oócitos.

Gráfico 2. Média de oócitos totais, oócitos viáveis, embriões e taxa de prenhez de vacas doadoras de embriões da Fazenda Jua, obtidos em diferentes períodos de aspiração folicular.



Oócitos recuperados sem estimulação hormonal da doadora e com frequência de punção de uma vez/semana têm qualidade inferior aos oócitos coletados duas vezes/semana na opinião de (GOODHAND *et al.* 1999).

Os resultados do presente experimento mostram que no grupo 1 e 2 houve uma tendência de maior número de oócitos totais, oócitos viáveis, embriões e na taxa de prenhez entre os períodos de aspiração.

O tempo entre as aspirações não foi fator preponderante para aumentar a qualidade dos oócitos mesmo que no grupo T1 e T2 tenham resultados um pouco melhores, mas no entanto aspirações repetidas, em intervalos pequenos podem causar danos aos oócitos como diminuição das células do cumulus, ruptura da zona pelúcida, baixa produção de embriões e também pode causar danos ao animal como atresia de ovários, alteração na dinâmica folicular e até perda funcional total dos mesmos.

Outros autores não observaram diferença na utilização de diferentes períodos entre aspirações na quantidade de oócitos, no número de folículos visualizados, no número de folículos aspirados, no número de oócitos recuperados, e na taxa de recuperação entre animais em aspirações feitas uma ou duas vezes por semana,

(GIBBONS *et al.*, 1994; BROADBENT., *et al* 1997; GARCIA e SLAHEDDINE., 1998).

A literatura sobre o assunto ainda está insuficiente em informações, ao contrário, trabalhos da mesma natureza com objetivos diferentes como trabalhos referenciando pesquisa de tratamentos hormonais, há grandes variações dos resultados apresentados por diversos autores e não apresentam um padrão na metodologia da coleta e das respostas à estimulação exógena, com isso a técnica ainda é muito onerosa, não é feita na prática e ainda é uma técnica complicada e com poucos profissionais qualificados para realizá - la.

5- CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, pode-se dizer que os objetivos delineados neste estudo foram alcançados, porém o período entre as aspirações não foi um fator preponderante na qualidade dos oócitos. No entanto aspirações contínuas em períodos curtos podem causar danos ao animal e não sendo às vezes compensatório pelo alto custo da técnica utilizada.

Mas como ainda é uma técnica não muito difundida, e com poucas referências na literatura necessita de mais estudos, para obter resultados mais precisos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES J.D.A.R., et al, **Altas concentrações de FSH-p na maturação In vitro de oócitos Bos indicus**, Ciência Rural, Santa Maria, v.31, n.4, p.645-649, 2001.

BARNES FL, Eyestone WH. **Early cleavage and the maternal zygotic transition in bovine embryos**. *Theriogenology*, v.33, p.141-152, 1990.

Bastos GM, Gonçalves PBD, BordignonV. **Development and DNA damage in parthenogenetically activated bovine embryos produced from oocytes derived from small and large follicles**. *Biol Reprod*, v.72, p.143, 2005. Abstract.

Blondin P, Bousquet D, Twagiramungu H, Barnes F, Sirard MA. **Manipulation of Follicular Development to Produce Developmentally Competent Bovine Oocytes**. *Biology of Reproduction*, v.66, p.38-43, 2002.

BOLS, P.E.J.; YSEBAET, M.T.; LEIN, A. et al. **Effect of longterm treatment with bovine somatotropin on follicular dynamics and subsequent oocyte and blastocyst yield in OPU-IVF program**. *Theriogenology*, v.49, p.983-995, 1998.

BOLS, P.E.J.; VANDENHEEDE, J.M.M.; VAN SOOM, A.; KRUIF, A. **Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow: new disposable needle guidance system**. *Theriogenology*, v. 43, p.677-687, 1995.

BOLS, P.E.J.; VAN SOOM, A.; YSEBAERT, M.T.; VANDENHEEDE, J.M.M.; KRUIF, A. **Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes**. *Theriogenology*, v.45, p.359, 1996a. (Abstract)

BOLS, P.E.J.; VAN SOOM, A.; VANROOSE, G.; KRUIF, A. **Transvaginal oocyte pick-up in infertile Belgium Blue donor cows: preliminary results**. *Theriogenology*, v.45, p. 59, 1996b. (Abstract)

BOLS, P.E.J.; YSEBAERT, M.T.; VAN SOOM, A.; KRUIF, A. **Effects of needle tip bevel an aspiration procedure on the morphology and developmental capacity bovine compact cumulus oocyte complexes**. *Theriogenology*, v.47, p.1221-1236, 1997.

BORGES A. M. , TORRES C. A. A., JÚNIOR V. R. R., RUAS J. R. M., CARVALHO G. R., **Desenvolvimento Folicular no Pós-Parto de Vacas da Raça Gir Tratadas com Acetato de Buserelina (GnRH) ou Gonadotrofina Coriônica Humana (hCG)**, R. Bras. Zootec., v.33, n.6, p.1396-1404, 2004

BUNGARTZ, L.; LUCAS-HAHN, A.; RATH, D.; NIEMANN, H. **Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without**

gonadotropin pretreatment and in different reproductive stages. *Theriogenology*, v.43, p.667-675, 1995.

BURATINI Jr., J.; PRICE, C.A.; BÓ, G.A. et al. Os efeitos do bST e da ablação do folículo dominante sobre o desenvolvimento folicular. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.27, p.147-170, 1999.

CALLESEN, H.; GREVE, T.; CHRISTENSEN, F. **Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes.** *Theriogenology*, v.27, p.217, 1987. (Abstract)

CARVALHO, J. B. P.; CARVALHO, N. A. T.; REIS, E. L.; NICHI, M.; SOUZA, A. H.; BARUSELLI, P. S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, 2007. (submetido para publicação).

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

CARTER, J.A.; PARANAGUÁ, H.N.; PARANAGUÁ, H.F.N. et al. The effect of rbST on follicle populations of Nelore heifers during the dry season in Brazil. **Theriogenology** , v.49, p.342, 1998.

CRYSTAL, J.K.; SMITH, M.F.; KEISLER, D.H. et al. Follicular function in lactating dairy cows treated with sustained-release bovine somatotropin. **Journal of Dairy Science** , v.80, p.273-285, 1997.

De LA SOTA, R.L.; LUCY, M.C.; STAMPLES, C.R. et al. Effects of recombinant bovine somatotropin (sometribove) on ovarian function in lactating and nonlactating dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.1002-1013, 1993.

DODE M.A.N.; SILVA A.E.D.F.; MARTINS C.F.; PIMENTEL C.A.; UCARIC.E.S.N.; MELO N.S.S.; RUMPF R.; SOUSA R.V. Curso de andrologia. **Empresa brasileira de pesquisa agropecuária, Embrapa recursos genéticos e biotecnologias, Ministério da Agricultura, pecuária e abastecimento.** Brasília DF. 2004.

Eppig JJ. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*. v.122, p.829-38, 2001.

Fair T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.203- 216, 2003.

FERRAZ M. L., Efeitos do intervalo entre aspirações foliculares e do tratamento com somatotropina bovina recombinante na população folicular e na produção *in vitro* de embriões bubalinos. São Paulo, 2008.

FERREIRA, A.M.; TORRES, C.A.A.; SILVA, J.F.C. **Peso para a recuperação da atividade ovariana luteal cíclica em vacas leiteiras mestiças em anestro.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.34, p.481-485, 1999.

FERNANDES C. B. , **ASPIRAÇÃO FOLICULAR TRANSVAGINAL GUIADA POR ULTRA-SOM EM BOVINOS E EQÜINOS**, Monografia apresentada à Disciplina Seminários I do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu., 2002.

FIGUEIREDO, R. A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L.; SOLER, J. M. P. Ovarian follicular dynamics in nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 1489-1505, junho, 1997.

FONSECA J.F., SILVA J.M. F., PINTO A. N., PALHARES M.S., **Estádios de desenvolvimento embrionário de vacas zebuínas superovuladas.** Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.53, n.6, p.671-676, 2001.

FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; YANG, M. Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. In: International Congress on Animal Reproduction, 15, 2004, Porto Seguro. **Proceedings...**Porto Seguro. Animal Reproduction Science, 2004, v. 82-83, p. 109-126.

Galli C, Lazzari G. **Practical aspects of IVM/IVF in cattle.** *J Reprod Sci*, v.42, p.371-379, 1996.

GARCIA, J.M.; ESPER, C.R.; RODRIGUES, C.F.M.; DAYAN, A.; SENEDA, M.M.; AVELINO, K.B.; PUELKER, R.Z. **In vitro production (IPV) of bovine embryos: different procedures.** Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS, v.26, p.281, 1998. (Resumo)

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.

GIBBONS, J.R.; BEAL, W.E.; KRISHER, R.L.; FABER, E.G.; PEARSON, R.E.; GWAZDAUSKAS, 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.

GINTHER, O. J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J. P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, p. 223-230, 1989.

GONG, J.G.; BRAMLEY, T.A.; WILMUT, I. et al. **Pretreatment with recombinant bovine somatotropin enhances the superovulatory responses to FSH in heifers.** Theriogenology, v.45, p.611-622, 1996.

GONG, J.G.; BRAMLEY, T.A.; WEBB, R. **The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian follicular growth and development in heifers.** Journal of Reproduction and Fertility, v.97, p.247-254, 1993.

GONG, J.G.; BRAMLEY, T.A.; WEBB, R. **The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular populations and peripheral hormones.** Biology of Reproduction, v.45, p.941-949, 1991.

GONG, J. G. & WEBB, R. **Control of ovarian follicle development in domestic ruminants: Its manipulation to increase ovulation rate and improve reproductive performance.** *An. Breed. Abst.* v. 64, n. 3, p.195 -204, 1996.

GONÇALVES P.B.D., M.H. BARRETA, L.C. SIQUEIRA, A.Q. ANTONIAZZI **Biotecnologias da Reprodução Animal in vitro de embriões bovinos.** Ciênc. vet. tróp., Recife-PE, v. 11, suplemento 1, p.135-138, abril, 2008.

GONÇALVES *et al.* **Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte,** Rev. Bras Reprod Anim, Belo Horizonte, v.31, n.2, p.212-217, abr./jun. 2007. Disponível em www.cbra.org.br. Acesso em 12/07/2010.

GONSALVES PBD, Visintin JA, Oliveira MAL. **Produção in vitro de embriões.** In: Gonsalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal.* São Paulo, SP: Varela, 2002. p.195-226.

HAFEZ, B. **Reprodução Animal**, 7.ed., Barueri, S.P.: Manole, p. 513, 2004.

HASHIMOTO, S.; TAKAKURA, R.; KISHI, M.; SUDO, T.; MINAMI, N.; AMADA, M. **Ultrasound - guided follicle aspiration: effect of the frequency of a linear Transvaginal probe on the collection of bovine oocytes.** Theriogenology, v.52, p.131-138, 1999.

HASLER, J.F.; HENDERSON, W.B.; HURTGEN, P.J.; JIN, Z.Q.; McCAULEY, A.D.; MOWER, S.A.; NEELY, B.; SHUEY, L.S.; STOKES, J.E.; TRIMMER, S. A. **Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results.** Theriogenology, v.43, p.141-152, 1995.

Humblot P, Holm P, Lonergan P, Wrenzycki C, Lequarre AS, Joly CG, Herrmann D, Lopes A, Rizos D, Niemann H, Callesen H. **Effect of stage of follicular growth during superovulation on developmental competence of bovine oocytes.** *Theriogenology*, v.63, p.1149-1166, 2005.

Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. **Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle.** *Theriogenology*, v.47, p.23-32, 1997.

IRELAND, J. J. **Control of follicular growth and development.** *J. Reprod. & Fert. Supplem.* v. 34, p.39-54, 1987.

KIRBY, C.J.; SMITH, M.F.; KEISLER, D.H. et al. Follicular function in lactating dairy cows treated with sustained-release bovine somatotropin. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.273-285, 1997a.

KIRBY, C.J.; WILSON, S.J.; LUCY, M.C. Response of dairy cows treated with somatotropin to a luteolytic dose of prostaglandin F2 alfa. **Journal of Dairy Science**, v.80, p.286-294, 1997b.

Lequarre AS, Vigneron C, Ribaucour F, Holm P, Donnay I, Bies-Tran R, Callesen H, Mermillod P. **Influence of antral follicle size on oocyte characteristics and embryo development in the bovine.** *Theriogenology*, v.63, p.841-59, 2005.

LONERGAN, P., MONAGHAN, P. RIZOS, D. et al. Effect of follicle size on bovine oocyte quality and developmental competence following oocyte maturation, fertilization and culture *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 37, p. 48-53, 1994.

Lonergan P, Carolan C, Mermillod P. Development of bovine embryos in vitro following oocyte maturation under defined conditions. *Reprod Nutr Dev*, v.34, p.329-339, 1994b.

LONERGAN, P. **Studies in the in vitro maturation, fertilization and culture of bovine follicular oocytes.**1992. 157f. Tese (PhD). National University of Ireland, 1992.

LOONEY, C.R.; LINDSEY, B.R.; GONSETH, C.L.; JOHNSON, D.L. **Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows.** *Theriogenology*, v.41, p.67- 72, 1994.

LUCY, M.C.; De LA SOTA, R.L.; STAMPLES, C.R. et al. Ovarian follicular populations in lactating dairy cows treated with recombinant bovine somatotropin (sometribove) or saline and fed diets differing in fat content and energy. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.1014-1027, 1993.

MALARD P.F.; PEIXER M.A.S.; MARQUES JUNIOR A.P.; RUMPF R. **Índice de recuperação e qualidade de ovócitos de bezerras Nelore, superovuladas e não superovuladas, de dois a três meses de idade.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. Vol.53, n.6, Belo Horizonte 2001.

MARTINS C. M., **Diferentes protocolos de superovulação com inseminação Artificial em tempo fixo em *Bos taurus* e *Bos indicus*,** Dissertação (mestrado) Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2007.

MATTHEWS, L.; PETERSEN, H.; VAN BEEK, K. **Use of linear ultrasound transducer for commercial application of transvaginal oocyte recovery.** *Theriogenology*, v.43, p.275, 1995. (Abstract)

MEINTJES, M.; BELLOW, M.S.; BROUSSARD, J.R.; PAUL, J.B.; GODKE, R.A. **Transvaginal aspiration of oocytes from hormone - treated pregnant beef for in vitro fertilization.** *Journal of Animal Science*, v.73, p.967-974, 1995a.

MEINTJES, M.; BELLOW, M.S.; PAUL, J.B.; BROUSSARD, J.R.; LI, L.Y.; PACCAMONTI, D.; EILTS, B.E.; GODKE, R.A. **Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval from cyclic and pregnant horse and pony mares for *in vitro* fertilization.** *Biol. Reprod.*, v.1 p.281-292, 1995b.

MONTAGNER, M.M. **Produção *in vitro* de embriões bovinos com meios ongelados, hepes e retinol.** Santa Maria – RS, 1999. 68p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, 1999.

Pavlok A, Lucas-Hahn A, Niemann H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol Reprod Dev*, v.31, p.63-67, 1992.

PETERS, H.; BYSKOV, A. G.; HIMMELSTEIN-BRAW, R. and FABER, M. **Follicular growth: the basic event in the mouse and human ovary.** *J. Reprod. Fert.*, v. 45, p. 559-566, 1975.

PETTERS RM. **Embryo development *in vitro* to the blastocyst stage in cattle, pigs and sheep.** *Anim Reprod Sci*, v.28, 415-421, 1992.

PIETERSE, M.C.; VOS, P.L.A.M.; KRUIP, T.A.M.; WURTH, Y.A.; VAN BENEDEN, T.H.; WILLEMSE, A.H.; TAVERNE, M.A.M. **Repeated transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up in ECG-treated cows.** *Theriogenology*, v.37, p.273, 1992. (Abstract)

PIETERSE, M.C.; KAPPEN, K.A.; KRUIP, A.M.; TAVERNE, M.A.M. **Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning ovaries.** *Theriogenology*, v.30, p.751-756, 1988.

PINEDA, M. H. **Female Reproductive System** In: McDONALD, L. E. *Veterinary endocrinology and reproduction*. 4th. Ed., Lea & Febiger, Philadelphia, 1989.

RAJAKOSKI, E. **The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical and left-right variations.** *Acta Endoc. (Suppl.)*, v. 52. P. 1-68, 1960.

RAMOS A. A., FERREIRA A. M., SÁ W. F., VIANA J. H. M., CAMARGO L. S. A., POLISSENI J., MARC HENRY M., **Efeito da somatotropina na população folicular, recuperação de oócitos e produção *in vitro* de embriões em vacas Gir.**, *R. Bras. Zootec.*, v.36, n.2, p.380-386, 2007.

RENESTO A., **Associação das biotécnicas: aspiração folicular guiada por ultrasonografia e superovulação na produção *in vitro* e *in vivo* de embriões bovinos,** 2004.

RICHARDS, J.S. **Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation.** *Physiol Rev*, v.60, n.1, p.51-89, 1980.

RICK, G.; HADELER, K.G.; LEMME, E.; LUCAS -HAHN, A.; RATH, D.; SCHINDLER, L.; NIEMANN, H. **Long-term ultrasound guided ovum pick- up in heifers from 6 to 15 months of age.** *Theriogenology*, v.45, p.356, 1996. (Abstract)

RODRIGUES, J. L. **Transferência de Embriões Bovinos - Historico e Perspectivas Atuais.** *Revista Brasileira De Reprodução Animal*, v. 25, n. 2, p. 102-107,2001.

SAMPAIO, I. B.M., **Estatística aplicada à experimentação animal.** 3. ed. Belo Horizonte, 2007. 265p.

SAVIO, J. D.; KEENAN, L.; BOLAND, M, P. and ROCHE, J. F. **Pattern of growth of dominant follicles during the oestrus cycle of heifers.** *J. Reprod. Fert.*, v.83, p. 663-671, 1988.

SENEDA M. M., **Aspiração Folicular In Vivo: Metodologia, Eficiência e Seqüelas.** <http://www.bioembryo.com.br/noticias.php?cat=1&subcat=2&id=174> 2008. acesso em 25/08/2010.

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. 57p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

SENEDA, M.M. **Aspectos técnicos e biológicos da obtenção *in vitro* de ovócitos bovinos.** 2001.76p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciência Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

SENEDA M. M. ; Esper C. R. ; Garcia J. M. ; Andrade E. R.; **Aspectos técnicos e biológicos da obtenção de oócitos bovinos: revisão de literatura;** *Semina: Ciências Agrárias, Londrina*, v. 23, n. 1, p. 101-110, jan./jun. 2002.

SIROIS, J. & FORTUNE, J. E. **Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography.** *Biol. Reprod.*, v.39, p.308-317, 1988.

SMEATON, T. C. & ROBERTSON, H. A. **Studies on the growth and atresia of Graafian follicles in the ovary of the sheep.** *J. Reprod. Fert.*, v.25, p.243-252, 1971.

SMITH LC, MEIRELLES FV, BUSTIN M, CLARKE HJ. **Assembly of somatic histone H1 onto chromatin during bovine early embryogenesis.** *J Exp Zool*, v.273, p.317-326, 1995.

STUBBINGS, R.B.; WALTON, J.S. **Effect of ultrasonically- guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in holstein cows.** *Theriogenology*, v.43, p.705-712, 1995.

THIBIER, M. **The IETS statistics of embryo transfers in livestock in the world for the year 1999: A new record for bovine in vivo-derived embryos transferred.** Embryo Transfer Newsletter, v. 18, p. 24-28, 2000.

VARAGO F. C. , MENDONÇA L. F., LAGARES M. A., **Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução**, Rev Bras Reprod Anim, Belo Horizonte, v.32, n.2, p.100-109, abr./jun. 2008. Disponível em www.cbpa.org.br, acesso em 12/09/2010.

VAN DER SCHANS, A.; VAN DER WESTERLAKEN, L.A.J.; DE WIT, A.A.C.; **EYESTONE, W.M.; DE BOER, H.A. Ultrasound-guided transvaginal collection of oocytes in the cow.** Theriogenology, v.35, p.288, 1991. (Abstract)

VIANA J.H.M., NASCIMENTO A. A., PINHEIRO N., FERREIRA A. M., CAMARGO L. S. A., SÁ W. F., MARQUES A. P., **Caracterização de seqüelas subseqüentes à punção folicular em bovinos** Pesq. Vet. Bras. vol.23 no.3 Rio de Janeiro July/Sept. 2003.

VIANA, J. H. M.; FERREIRA, A. M.; SÁ, W. F.; CAMARGO, L. S. A. Follicular dynamics in zebu cattle. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 12, p. **2501-2509, dezembro, 2000.**

VOS, P.L.M.; De LOS, F.A.M.; PIETERSE, M.C.; BEVERS, M.M.; TAVERNE, M.A.M.; DIELEMAN, S.J. **Evaluation of transvaginal ultrasound -guided follicle puncture to collect and follicular fluids at consecutive times relative to the preovulatory LH surge in eCG/PG treated cows.** Theriogenology, v.41, p.829-840, 1994.

WEBB, R.; GONG, J.G.; BRAMLEY, T.A. Role of growth hormone and intrafollicular peptides in the control of follicle development in cattle. **Theriogenology**, v.41, p.25-30, 1994.

WHITTINGHAM DG, BIGGERS JD. **Fallopian tube and early cleavage in the mouse.** *Nature*, v.213, p.942, 1967.

WHITTEN WK, BIGGERS JD. **Complete development *in vitro* of pre-implantation stages of the mouse in a simple chemically defined medium.** *J Reprod Fertil*, v.17, p.399-401, 1968.

ANEXO A- Carta ao Proprietário

Formiga (MG), ___ de _____ de 2009

Ilmo. Sr.

DD. Proprietário _____

Formiga - MG

Senhor Proprietário.

Meu nome é _____,
estudante do _____ período do Curso de Medicina Veterinária do Centro
Universitário de Formiga – MG (UNIFOR-MG). Para a conclusão do curso
mencionado em _____ de 2010, um dos requisitos parciais é a realização
de um Trabalho Monográfico ou normalmente como é conhecido, um Trabalho de
Conclusão de Curso (TCC).

Minha área de investigação é a

Na literatura

Na formulação da situação problema estamos perguntando...?

A importância desse estudo refere-se à...

Destacamos que, na possibilidade de desenvolver tal estudo, todos os
cuidados éticos serão considerados em sua metodologia, com seu consentimento
livre e esclarecido.

Para quaisquer outras informações que julgar necessárias, meu orientador é o
Prof. _____, telefone (_____) _____-

E-mail: _____, UNIFOR-MG.

No aguardo, renovo protestos de elevada estima e consideração.

Atenciosamente,

Aluno do _____ Período – Medicina Veterinária
UNIFOR-MG

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título da Pesquisa: “.....”
Nome do (a) Pesquisador (a) Responsável:
.....
Nome demais participantes:.....

Natureza da pesquisa: *o Sr. (sra.) está sendo convidada (o) a autorizar a participação de seu(s) animal(is) nesta pesquisa que tem como finalidade (explicação rápida dos objetivos propostos, em linguagem acessível ao proprietário).*

1. Identificação do(s) animal(is): (identificar espécie, sexo, raça, quantidade, nome ou número de registro (se for o caso)).
2. Envolvimento na pesquisa: *ao participar deste estudo o Sr. (Sra.) permitirá que o (a) pesquisador (a) (explicar os procedimentos que serão realizados no animal). O Sr. (Sra.) tem liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo para o seu animal. Sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa através do telefone do (a) pesquisador (a) do projeto e, se necessário através do telefone da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).*
3. Sobre os dados necessários: (se houver, especificar os dados que serão coletados, o modelo do questionário deverá ser apresentado em anexo ao protocolo).
4. Riscos e desconforto: *a participação nesta pesquisa não traz complicações legais. (especificar aqui possíveis riscos e desconfortos gerados durante a pesquisa ou depois, como consequência dela, e procedimentos para saná-los). Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Princípios Éticos na Experimentação Animal segundo o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e à Lei Federal 11794, de 08 de outubro de 2008.*
5. Confidencialidade: *todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente os pesquisadores terão conhecimento dos dados.*
6. Benefícios: *esperamos que este estudo traga informações importantes sobre (definição de resultados esperados), de forma que o conhecimento que será construído a partir desta pesquisa possa (...), o pesquisador se compromete a divulgar os resultados obtidos.*

7. Pagamento: o Sr. (Sra.) não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação (explicar claramente quais custos ficarão por conta da pesquisa e quais ficarão a cargo do proprietário, gerados por procedimentos de rotina não inclusos na pesquisa, se for o caso).

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto preencha, por favor, os itens que se seguem:

Consentimento Livre e Esclarecido

Tendo em vista os itens acima apresentados, eu, de forma livre e esclarecida, manifesto meu consentimento em participar da pesquisa.

Nome do Proprietário (CPF/RG)

Assinatura do Proprietário

Assinatura do Pesquisador

Data: _____.

TELEFONES

Pesquisador:

Orientador:

Coordenação do Curso: