



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA - BOTUCATU
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
18618-000 - Botucatu - SP - Rubião Júnior - Fone / Fax: (14) 6802-6249 / 6802-6326

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.

Aluna de Mestrado: Claudia Barbosa Fernandes

Professores Responsáveis: Prof^a. Dr^a. Maria Denise Lopes

Prof. Dr. Sony Dimas Bicudo

Botucatu – SP

2002

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas.....	03
1 Introdução e Objetivos.....	04
2 Revisão de Literatura.....	06
2.1 Aspectos Gerais da OPU.....	06
2.2 Aspectos Técnicos da OPU.....	07
2.3 Aspectos Biológicos da OPU.....	10
3 Vantagens e Desvantagens da OPU.....	15
4 Considerações Finais.....	16
5 Referências Bibliográficas.....	17

LISTA DE ABREVIATURAS

CIV = Cultivo *In vitro*

CCO = Complexo *Cumulus Oophorus*

ECG = Gonadotrofina Coriônica Equina

FIV = Fertilização *In vitro*

FSH = Hormônio Folículo Estimulante

G = Gauge

GC = Grânulos Corticais

GIFT = Transferência Intrafalopiana de Gametas

IA = Inseminação Artificial

LH = Hormônio Luteinizante

MIV = Maturação *In vitro*

OPU = Aspiração Folicular Transvaginal guiada por Ultra-som

SO = Superovulação

TE = Transferência de Embriões

ZP = Zona Pelúcida

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Ao nascimento a fêmea bovina possui cerca de 0,5 milhão de folículos nos ovários, os quais, gradualmente deixam seu estado de dormência e iniciam o desenvolvimento para folículos antrais. Uma vez recrutada uma população de folículos, ocorre a ovulação ou atresia, sendo que quase todos os folículos recrutados sofrem atresia. Isto pode ser demonstrado calculando-se que um animal ciclando normalmente num período de 15 anos irá ovular menos de 300 ovócitos (ovulando a cada 21 dias ou 17,4 vezes ao ano, multiplicando por 15 = 260 ovulações) dentre o número total de folículos (0,5 milhões) existentes ao nascimento (ERICKSON, 1996). Isto sem contar o período de gestação dos animais, ou seja, metade da vida reprodutiva.

Pela monta natural ou inseminação artificial (IA) pode-se obter apenas um produto por vaca por ano, portanto, novas biotecnologias foram desenvolvidas para acelerar os processos de melhoramento genético. Assim sendo, com o advento da superovulação (SO) e posterior transferência de embriões (TE), foi possível obter em média a produção de 25 embriões ao ano, totalizando cerca de 100 embriões na vida reprodutiva de uma vaca (SAUMANDE et al., 1984).

Kruip et al., (1994), estudaram a eficácia da aspiração folicular transvaginal guiada por ultra-som (OPU) em vacas leiteiras e de corte, obtendo uma média de 8,0 ovócitos colhidos por sessão, sendo que 16% desenvolveram-se embriões transferíveis após maturação, fertilização e cultivo *in vitro* (MIV/FIV/CIV) com uma taxa de gestação de 40% a 50% (NIBART et al., 1995). Baseado no número médio de ovócitos colhidos por sessão, é possível transferir dois embriões/semana/vaca, resultando em um bezerro.

Atualmente as pesquisas têm sido realizadas para incrementar a produtividade na exploração das espécies domésticas, e isto tem sido verificado em modificações na nutrição, manejo sanitário e reprodutivo (BOLS et al., 1997). Na espécie bovina o aproveitamento racional dos gametas já é possível através da TE, inicialmente cirúrgica, e posteriormente adaptada para uma técnica não invasiva (GREVE et al., 1977), podendo triplicar o número de descendentes na vida reprodutiva da fêmea bovina (BOLS et al., 1997).

A TE tem algumas restrições, como: patologias ovarianas, tubáricas e uterinas que bloqueiem a coleta dos embriões (BOLS et al., 1996b); relato de cistos ovarianos,

endometrites e lesões iatrogênicas pós coletas (BAK et al., 1989), e as terapias hormonais podendo comprometer a fertilidade da doadora (MEINTJES et al., 1995a), além da variabilidade de respostas ao estímulo hormonal exógeno (BOLS et al., 1997).

A produção *in vitro* de embriões tem sido utilizada como uma alternativa para aumentar o número de descendentes, primeiramente a partir de ovários de matadouro, com o inconveniente do desconhecimento do estado de saúde, do padrão hormonal e também com a impossibilidade de repetir a técnica (PIETERSE et al., 1988).

A aspiração folicular transvaginal guiada por ultra-som (OPU) apresentou-se como uma alternativa na recuperação de ovócitos de fêmeas com limitações reprodutivas (infertilidade extra-ovariana), e sua aplicação mostrou-se mais ampla quando utilizada em fêmeas saudáveis e animais pré-puberes, produzindo quatro vezes mais embriões em relação a TE (KRUIP et al., 1994), embora com maior custo por embrião (RODRIGUES & GARCIA, 2000).

O evidente crescimento da OPU contribuiu para sinalizar pontos críticos ao maior desenvolvimento da técnica, como o alto custo dos equipamentos, a alta variabilidade nas taxas de recuperação de ovócitos e o reduzido número de protocolos de gonadotrofinas eficientes.

Hoje a OPU no Brasil tem sido utilizada com sucesso por instituições dedicadas a pesquisa, assim como pela iniciativa privada na recuperação de ovócitos para produção *in vitro* de embriões bovinos.

As fêmeas eqüinas têm na OPU uma alternativa para suprir a necessidade de reprodução de éguas subfêrteis, com patologias reprodutivas e histórico de insucesso com a TE. Devido aos resultados da FIV em eqüinos serem ruins, os ovócitos recuperados normalmente são utilizados em biotecnologias como a transferência intrafalopiana de gametas (GIFT).

O presente seminário tem como objetivo, expor as diferentes metodologias para a OPU, incluindo os aspectos envolvidos, vantagens e desvantagens nas espécies bovina e eqüina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS DA OPU

Técnicas para o aproveitamento de ovócitos de fêmeas bovinas, como a laparoscopia transvaginal (REINCHENBACH et al., 1993) e a laparoscopia paralombar (LAMBERT et al., 1983) são técnicas trabalhosas, nas quais podem ocorrer fibroses e aderências ovarianas pós cirúrgicas (LOONEY et al., 1994). Outra técnica proposta para recuperação de ovócitos é citada por Hinrichs et al. (1990); trata-se da colpotomia, na qual a mão do operador manipula os ovários através de uma incisão intravaginal, pressionando-os contra a parede abdominal por onde a agulha de punção é introduzida, com riscos de peritonite e evisceração.

A obtenção de ovócitos bovinos com o auxílio da ultra-sonografia foi relatada pela primeira vez por Callensen et al. (1987), através da manipulação transretal e posicionamento dos ovários dorso-lateralmente na cavidade abdominal (fossa paralombar), viabilizando a visualização com um transdutor de 3.5 MHz posicionado sobre a pele, e a introdução da agulha capaz de puncionar os folículos. Um ano mais tarde Pieterse et al. (1988), descreveram a aspiração folicular via transvaginal através da ultra-sonografia, que tornou viável o aproveitamento de ovócitos bovinos, sem as limitações dos procedimentos existentes até então.

Após avaliações, a técnica mostrou-se simples e inócua, viabilizando a recuperação, maturação e fertilização de ovócitos imaturos, podendo ser repetida várias vezes em um mesmo animal (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 & WALTON; 1995).

Palmer et al. (1987) foram os primeiros a descrever uma técnica de OPU com a égua em estação, onde o operador segurava o ovário pelo reto guiando a agulha através do flanco até atingir o folículo. Os primeiros milímetros de fluido folicular eram reinjetados para desprender o ovócito da parede folicular e o folículo era então lavado com 20ml de Dulbecco's PBS acrescido de heparina. O índice de recuperação de ovócitos relatado neste trabalho pioneiro foi de 63%.

McKinnon et al. (1987) relataram excelentes índices de recuperação (71,4%) utilizando um trocater e uma agulha de 9,8mm para aspirar folículos pré-ovulatórios de éguas através do flanco. Procedimento semelhante foi descrito por Hinrichs et al. (1991) com índices de recuperação de 73%. Neste caso, foi adicionada à técnica de aspiração pelo flanco uma incisão na parede cranial da vagina, a qual permitia ao operador introduzir sua mão na cavidade peritoneal e segurar o ovário diretamente contra o trocater.

O primeiro grupo de pesquisadores que descreveram a OPU em éguas foi Bruck et al. (1992). Baseados na mesma idéia utilizada em programas humanos e bovinos eles utilizaram, para aspirar folículos pré-ovulatórios, um transdutor em forma de dedo conectado a um aparelho de ultra-som que mostrava em sua tela a linha de punção. Uma agulha com lúmen único foi conectada a uma seringa de 50ml, a qual foi utilizada para lavar a cavidade folicular três vezes com Dulbecco's PBS. Quatro folículos foram aspirados e um ovócito foi coletado.

É impossível se comparar índices de recuperação de ovócitos entre os diferentes grupos de pesquisadores, pois as técnicas utilizadas são extremamente diferentes e uma série de aspectos influenciam os resultados.

2.2 ASPECTOS TÉCNICOS DA OPU

As várias técnicas para obtenção de ovócitos possuem considerável impacto sobre a quantidade e a morfologia dos complexos *Cumulus oophorus* (CCO's), e conseqüentemente sobre a competência para o desenvolvimento ovocitário (BOLS et al., 1997).

Segundo Bols et al. (1995) as agulhas longas específicas para aspiração folicular, apresentam custo elevado e perdem o gume rapidamente, prejudicando a recuperação dos ovócitos; já agulhas hipodérmicas descartáveis de 18 e 19 Gauge (G) permitem boa taxa de recuperação, preservando a qualidade dos ovócitos. Diâmetros maiores que 19G relacionavam-se a maiores taxas de recuperação comparado as agulhas de menor diâmetro. No entanto, o sistema que viabiliza o uso de agulhas descartáveis possui maior número de conexões, obstáculos capazes de reter os ovócitos (BOLS et al., 1997).

O comprimento do bisel da agulha e a taxa de recuperação de ovócitos foram analisados por BOLS et al. (1997), concluindo que ao contrário das expectativas, a melhor

taxa de recuperação e a melhor qualidade dos ovócitos é obtida com a utilização do bisel longo.

Em bovinos a utilização de agulhas com lúmen simples é possível porque o folículo é apenas aspirado, diferente dos eqüinos, nos quais Brogliatti & Adams (1996), relataram que as agulhas de lúmen duplo tendem a aumentar a taxa de recuperação de ovócitos devido à facilidade em lavar o folículo puncionado com a solução de recuperação.

A pressão de vácuo é estritamente relacionada com a agulha utilizada; há uma grande variação entre os trabalhos, com valores de 40 a 400mmHg (BOLS et al., 1996a), embora isto deva ser considerado com reservas, já que todo o sistema (comprimento e diâmetro de conexões, altura do equipamento de vácuo e diâmetro da agulha) pode 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 assim há variações consideráveis, de 4,4 a 40 ml de água/minuto (VOS et al., 1994; BUNGARTZ et al., 1995; RICK et al., 1996).

Bols et al. 1995, obtiveram maiores taxas de recuperação por folículos aspirados usando agulhas mais espessas (18G), independente da pressão de vácuo. Houve um maior número de ovócitos recuperados com o aumento da pressão de vácuo, porém ocorreu uma diminuição na quantidade de células do *cumulus* mais compactas.

A freqüência do transdutor constitui-se em uma variável importante no processo de recuperação dos ovócitos (HASHIMOTO et al. 1999). Há citações de freqüências 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; MATTEWS 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 Haschimoto et al. (1999) obtiveram resultados satisfatórios com este equipamento.

No trabalho realizado por Seneda (2001) foi comparada a utilização de um ultrassom Aloka SSD-500V com transdutor convexo de 5.0 MHz e um Pie Medical 485 com transdutor linear de 6.0 MHz. O transdutor convexo foi acondicionado em um dispositivo do próprio fabricante para aspiração transvaginal, enquanto o dispositivo para o transdutor

linear foi especialmente delineado para o trabalho (Ceafepe Tecnologia Veterinária, Ltda.), como ilustrado nas figuras 1 e 2.

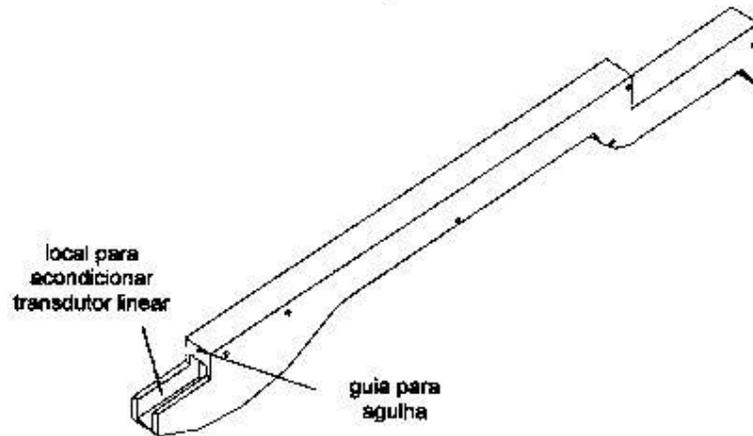


FIGURA 1. Apresentação de esquema ilustrando o suporte para transdutor linear (Ceafepe Tecnologia Veterinária, Ltda.).

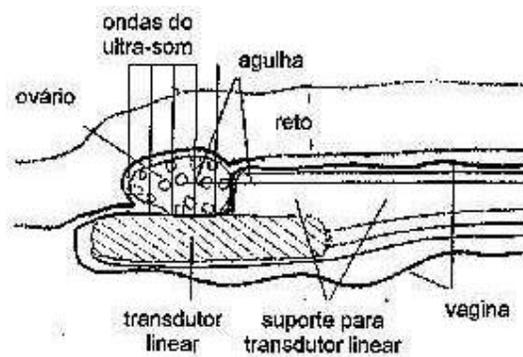


FIGURA 2. Esquema ilustrativo da aspiração folicular realizada com transdutor linear acondicionado ao suporte (Ceafepe Tecnologia Veterinária, Ltda.).

O valor médio de folículos aspirados foi de 12,4 para o transdutor convexo, número significativamente superior ao encontrado para o transdutor linear, que foi de 7,8. No entanto, não houve diferenças entre o número médio de ovócitos obtidos, 5,4 para o transdutor convexo e 4,6 para o linear. O suporte permitiu que o ovário fosse pressionado contra o transdutor em sentido vertical, havendo assim grande redução na mobilidade no momento da punção. Esta é a provável justificativa para uma maior eficiência do transdutor linear quanto a recuperação de ovócitos (SENEDA, 2001).

Nibart et al. (1995), demonstraram que qualquer que seja o sistema de visualização e de punção folicular, não interfere nas taxas de recuperação de ovócitos. Hill (1995), realizou aspirações foliculares sem o auxílio de ultra-som, utilizando-se apenas da palpação retal e obteve média de 6,2 ovócitos recuperados por doadora.

A taxa de recuperação de ovócitos imaturos aumenta, se a coleta for repetida no animal por um período de vários meses (KRUIP et al., 1994). A aspiração repetida duas vezes por semana produz um aumento considerável no número de folículos visíveis (16,2 versus 7,0) e de ovócitos recuperados (12,2 versus 5,2) (REICHEMBACH et al., 1994).

2.3 ASPECTOS BIOLÓGICOS DA OPU

A condição fisiológica da doadora, considerando-se peso, raça, idade e a própria variação individual, são alguns dos aspectos biológicos que interferem na OPU assim como em outras biotecnologias.

Enquanto ovócitos de éguas velhas tendem a ter pior qualidade, Katska & Smorag (1984), trabalhando com ovários bovinos de matadouro, não encontraram diferenças na qualidade dos ovócitos entre animais jovens (a partir de 18 meses) e senis (até 17 anos), embora tenham notado redução na produção de gametas nos animais mais velhos. Animais pré-puberes têm mostrado reduzida competência de seus ovócitos em atingir o estágio de blastocisto (REVEL et al., 1995), embora Armstrong et al. (1994) tenham conseguido resultados animadores com bezerras de apenas três semanas de idade através de estímulo gonadotrófico.

Quanto à condição corporal, animais subnutridos são doadores de ovócitos com menor capacidade de desenvolvimento (LOPEZ RUIZ et al. 1996), assim como animais

submetidos a situações de estresse também são doadores de ovócitos menos competentes (SENEDA et al., 2000).

Poucos estudos têm relatado variações entre as raças, divergindo de Dominguez (1995) e Dayan et al. (1999) que mostraram maior recuperação de ovócitos viáveis de fêmeas da raça Nelore.

A taxa de recuperação pode ser influenciada pelas terapias gonadotróficas (PIETERSE et al., 1992; MEINTJENS, et al., 1995a), frequência de realização da técnica (GIBBONS et al., 1994), fase do ciclo estral (VOS et al., 1994), pressão de vácuo e tipo de agulha (BOLS et al., 1996b), tamanho do folículo (SENEDA et al., 2001), além da experiência do operador (GARCIA et al., 1998). Um ponto em comum destes artigos foi a menor recuperação de ovócitos quando havia predomínio de grandes folículos no momento da aspiração, fato observado também em ovários de matadouro por LONERGAN et al. (1994), ao constatarem taxas de recuperação maiores quando os folículos aspirados eram pequenos (2 a 6mm) em comparação aos maiores de 6mm.

Apesar dos folículos maiores que 5mm serem aspirados mais facilmente (BOLS et al., 1997), a aspiração de folículos pequenos parece disponibilizar maior número de ovócitos para o cultivo. A justificativa entre a relação inversa do maior diâmetro folicular e da taxa de recuperação de ovócitos tem sido justificada de diversas formas, 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). Desta forma, um aspecto a ser considerado seria a aspiração realizada em um momento que predominassem folículos de menor diâmetro, conforme sugerido por Hashimoto et al. (1999) e Seneda (2001). Considerando a possibilidade de alteração do diâmetro folicular por estímulos hormonais, a modificação nos protocolos de terapias gonadotróficas poderia contribuir neste sentido. Outra possibilidade seria a restrição do crescimento folicular, por meio de sessões de aspiração com intervalos de três e quatro dias, conforme sugerido por Gibbons et al. (1994) quando demonstraram maior número de folículos recrutados após cada aspiração. Este procedimento mostrou-se interessante por dispensar gonadotrofinas exógenas, mas exigiu o dobro de aspirações para um mesmo número de folículos aspirados, quando em comparação ao estímulo hormonal (RODRIGUES & GARCIA, 1998; SAUVÉ, 1998). Apesar do maior número de folículos visualizados com o estímulo gonadotrófico, o número de ovócitos por sessão mostrou-se proporcionalmente menor ao esperado (LOONEY et al., 1994; RODRIGUES & GARCIA, 1998; GOODHAND et al., 1999), possivelmente pelo maior diâmetro dos folículos no

momento da aspiração (SENEDA et al., 2000). Há considerável variação nos protocolos de estímulo hormonal precedendo a aspiração folicular. A literatura apresenta trabalhos preconizando o melhor dia de punção folicular como sendo quatro (BUNGARTZ et al., 1995; GOODHAND et al., 1996), cinco (BORDIGNON et al., 1996; PUELKER et al., 1999) e mesmo seis dias (MEINTJES et al., 1995b) após o início da aplicação do FSH. Estes trabalhos apresentaram predominância de folículos grandes (até 19mm), sendo a maioria com diâmetro maior ou igual a 10mm.

No equino a relação anatômica do ovócito com a parede do folículo interfere com a eficiência dos métodos de coleta de ovócitos utilizados tanto *in vivo* como *in vitro* comprometendo as taxas de recuperação. Na égua o folículo apresenta uma camada de células da teca logo abaixo da junção do *cumulus* com a parede folicular. Uma das características anatômicas desta estrutura é a presença de processos celulares emitidos pelas células da granulosa para o interior da camada de células tecais. Desta forma, os processos das células da granulosa, bem como a posição da camada de células tecais e a estrutura do componente polissacarídeo desta funcionam como uma ancora do CCO à parede folicular (HAWLEY et al., 1995).

Em éguas o índice de recuperação de ovócitos é mais alto (78% versus 43%) em folículos menores que 30mm e pré-ovulatórios (maiores de 35mm) devido ao afrouxamento das junções entre as células do *cumulus* e a parede folicular durante o aumento dos níveis de Hormônio Luteinizante (LH) ou a aplicação exógena deste hormônio 24 a 36 horas antes da ovulação (GOUDET et al., 1997).

Seneda (2001) trabalhou com a aplicação de uma dose única de FSH nas fêmeas bovinas, submetendo-as a aspiração nos dias um e três pós aplicação. A utilização de FSH facilitou o manejo operacional e as taxas de recuperação foram estatisticamente semelhantes nos dois momentos de aspiração. Quanto a disponibilização de estruturas para a FIV, o grupo que recebeu FSH e foi aspirado no dia um apresentaram um ovócito a mais em relação aos animais aspirados no dia três. Dependendo do número de amostras e do potencial genético das doadoras, pode-se considerar esta diferença biológica.

A fase reprodutiva tem sido alvo de diversos estudos para apontar um momento mais favorável à realização da OPU. Bols et al. (1997) observaram que ovócitos apresentam diferentes capacidades de desenvolvimento, conforme a fase do ciclo estral em que são coletados. Um número maior de embriões foi obtido após cultivo de ovócitos recuperados entre os dias 14 e 16 do ciclo estral, segundo Machatkova et al. (1995). No entanto, trabalhando com ovários de abatedouro, Smith et al. (1995) analisaram a

dominância folicular, relatando que a produção *in vitro* de embriões não era afetada pela presença ou ausência do folículo dominante. Assey et al. (1994) analisaram a ultra-estrutura de ovócitos recuperados de folículos dominantes e subordinados, e relataram degenerações prematuras no ovócito dominante, embora Rhodes et al. (1997) não tenham constatado diferenças na competência para o desenvolvimento entre ovócitos obtidos de folículos dominantes ou folículos subordinados.

As relações entre dinâmica e atresia folicular também têm sido estudadas, com relatos de presença de ovócitos saudáveis em folículos claramente atrésicos (KRUIP & DILEMAN, 1982). Um leve grau de atresia folicular parece mesmo ter um efeito benéfico ao ovócito destinado a FIV, segundo Wurth & Kruip (1992). O efeito inibitório da maturação do ovócito seria mais eficaz estando a parede folicular perfeitamente íntegra, enquanto o folículo levemente atrésico deixaria de exercer este efeito, favorecendo a maturação *in vitro*.

Segundo Meintjes et al. (1995a) vacas gestantes podem ser submetidas à técnica no primeiro trimestre de gestação, porém Sauve (1998) considera sem prejuízos as aspirações realizadas até o sexto mês de prenhez. A melhor qualidade (GRIMES & IRELAND, 1987; HAZELEGER et al., 1995) e a maior competência (BOEDIONO et al., 1995) foram relatadas quando a punção foi realizada na fase luteínica ou progestacional, embora resultados opostos tenham sido mostrados por Thonon et al. (1993) e Dayan et al. (1999).

Éguas prenhes são uma fonte adicional de ovócitos (MEINTJES et al., 1995b). Ginther e Bergfelt (1992) descreveram a ocorrência de ondas foliculares durante o início da gestação na égua, podendo estas serem periódicas ou esporádicas, ocorrendo ondas principais (maior folículo $\geq 35\text{mm}$) em algumas éguas, e ondas secundárias (maior folículo $< 35\text{mm}$) em outras. A recuperação de ovócitos de éguas prenhes parece ser mais alta quando comparado a éguas controle. Goudet et al. (1998) relatam índices de recuperação de ovócitos de 54% em éguas prenhes versus 47% em éguas ciclando. Meintjes et al. (1995b) obtiveram 75% de recuperação de ovócitos em éguas prenhes versus 42,9% no grupo controle (folículos pré-ovulatórios). Onze aspirações foram realizadas por égua num período de 44 dias (entre os dias 22 a 66 de gestação) com um máximo de sete ovócitos recuperados por sessão. Em um segundo estudo (MEINTJES et al., 1997), as aspirações foliculares foram realizadas até os 150 dias de gestação. O número médio de aspirações por égua foi 7,6 e o número médio de ovócitos obtidos foi de 18,9 por égua. Os autores concluíram que cerca de 2,5 ovócitos podem ser coletados a cada sete a dez dias em éguas

prenhes. Foi estimado que 19 ovócitos poderiam ser coletados de uma mesma égua durante os dias 21 a 150 de gestação, comparado com 12 coletados durante 130 dias em éguas ciclando, sem estímulo hormonal.

Os ovócitos recuperados de animais submetidos a estímulo gonadotrófico e consequentemente aspirados nos dias um (primeiro grupo) e no dia três (segundo grupo) pós aplicação foram avaliados quanto a ultra-estrutura por Seneda (2001). A ZP apresentou-se bem caracterizada nos dois grupos, evidenciando que, sob este aspecto, folículos antrais de menor diâmetro (grupo aspirado um dia pós-aplicação) possuem ovócitos semelhantes aos de folículos maiores (aspirados três pós-aplicação). No entanto, em ovócitos do primeiro grupo notou-se a presença de microvilos e processos celulares da granulosa na ZP, achados compatíveis com a formação recente desta estrutura, enquanto que no segundo grupo tais estruturas estavam ausentes. Conforme descrição de Fleming & Saake (1972), o ovócito aumenta sua atividade interna e diminui sua dependência das células da granulosa quando se aproxima o instante de retomar a meiose. Quanto a este aspecto os ovócitos do segundo grupo encontravam-se num estágio de desenvolvimento discretamente mais adiantado em relação aos do primeiro grupo.

3. VANTAGENS E DESVANTAGENS DA OPU

Vantagens:

A produção *in vitro* de embriões pode tornar-se uma alternativa a técnica de TE, por não utilizar hormônios, evitando assim os efeitos nocivos à fertilidade do animal e ainda aumentar o número de embriões por doadora (GIBBONS et al., 1994; KRUIP et al., 1994).

Desvantagens:

Além das grandes variações dos resultados apresentados por diversos autores e de não haver um padrão na metodologia da coleta e das respostas à estimulação exógena, a técnica ainda é muito onerosa.

BOLS et al. (1995), descreveram que as agulhas são um dos equipamentos descartáveis mais caros do processo de aspiração. Elas são de difícil esterilização e após algumas sessões tornam-se rombas e afiá-las não seria uma alternativa viável. Este grupo tentou, com êxito, o uso de agulhas descartáveis, porém novos estudos devem ser feitos para aumentar as taxas de recuperação.

No estudo de Snel-Oliveira et al. (2002) bezerras pré-puberes foram submetidas a tratamento hormonal e posterior OPU e seus ovários avaliados histopatologicamente, evidenciando lesões histológicas que podem ser consideradas um efeito direto da intervenção devido a micro-traumas (fibrose capsular e possível atresia folicular patológica), ou à conseqüências secundárias (atresia folicular conseqüente de uma inibição da ovulação) sugerindo que alterações patológicas, quando em grande número, podem alterar a função fisiológica dos ovários.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Para grandes animais a técnica da OPU parece ser simples, não invasiva, repetível e eficiente. Hoje a aspiração comercial é utilizada somente para bovinos, porém pode ser um importante aliado na reprodução de éguas inférteis. O custo da tecnologia pode ser justificado pelo valor individual do animal.

A tecnologia favorece o maior número de embriões, menor intervalo entre gerações com conseqüente melhor aproveitamento dos animais (senis e prenhes), animais que não respondem a SO, seja por anomalias adquiridas ou por serem refratárias a SO, produtos obtidos de animais com problemas reprodutivos ou a utilização de animais mortos.

A aspiração folicular e fertilização *in vitro* vêm apresentando-se como uma forma alternativa para a produção de embriões a partir de ovócitos oriundos de vacas com diversas características reprodutivas. É uma técnica recente, e que deve apresentar uma acentuada evolução nos próximos anos, apresentando-se como uma alternativa eficiente na produção de embriões de alto valor genético. É importante ressaltar que esta técnica não substitui outras técnicas (como a TE), mas sim, junto a elas, pode melhorar a eficiência reprodutiva destes animais, e acima de tudo atuar no melhoramento genético do rebanho bovino.

Considerando-se as informações conclui-se que pesquisas de ordem técnica e biológica poderiam contribuir para o incremento da OPU, aumentando a eficiência do procedimento e disponibilizando mais ovócitos para os procedimentos de produção *in vitro* de embriões.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- ARMSRTONG, D.T.; IRVINE, B.J.; EARL, C.R.; McLEAN, D.; SEAMARK, R.F. Gonadotropins stimulations regimens for follicular aspiration and in vitro embryo productions from calf oocytes. **Theriogenology**, v.42, p.1227-1236, 1994.
- ASSEY, R.J.; HYTTEL, P.; KANUYA, N. Oocyte struture in dominant and subordinate follicles in zebu cattle (*Bos indicus*). **Anat. Embryol.**, v.190, p.461-468, 1994.
- BAK, A.; GREVE, T.; SCHMIDT, M. Effect of super ovulation on reproduction. **Theriogenology**, v.31, p.196, 1989. (Abstract)
- BOEDIONO, A.; RAJAMAHENDRAN, R.; SAHA, S.; SUMANTRI, C.; SUZUKI, T. Effect of the presence of a CL in the ovary on oocyte number, cleavage rate and blastocyst production in vitro in cattle. **Theriogenology**, v.43, p.169, 1995. (Abstract)
- BOLS, P.E.J.; VANDENHEEDE, J.M.M.; VAN SOOM, A.; KRUIF, A. Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow: new disposable needle guindance 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 vacum 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.
- BOLS, P.E.J.; YSEBAERT, M.T.; LEIN, A.; CORYN, M.; VAN SOOM, A.; KRUIF, A. Effects of long-term treatment with bovine somatotropin on follicular dynamics and subsequent oocyte and blastocyst yield in na OPU-IVF program. **Theriogenology**, v. 49, p.983-995, 1998.
- BORDIGNON, V.; MORIN, N.; DUROCHER, J.; BOUSQUET, D.; SMITH, L.C. Effect of GnRH injection on recovery rate, meiotic synchronization and developmental competence of oocytes aspirated from superestimulated heifers. **Theriogenology**, v.45, p.352, 1996. (Abstract)
- BROGLIATTI, G.M.; ADAMS, G.P. Ultrasound guided transvaginal oocyte collection in prepubertal calves. **Theriogenology**, v.45, p.1163, 1996.
- BRÜCK, I.; RAUN, K.; SYNNESTVEDT, B.; GREVE, T. Follicle aspiration in the mare using a transvaginal ultrasound-guided technique. **Equine Vet. J.**, v.24, p.58-59, 1992.
- 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.
- CALLESEN, H.; GREVE, T.; CHRISTENSEN, F. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. **Theriogenology**, v.27, p.217, 1987. (Abstract)

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023** informação e documentação – Referênciais – Elaboração. Rio de Janeiro, 2000. 22p.

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.

DAYAN, A.; WATANABE, M.R.; LOBO, R.B.; FRANCESCHINI, P.H.; WATANABE, Y.F. A influência da condição ovariana na aspiração folicular e produção *in vitro* de embriões em raças zebuínas. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.27, p.226, 1999. (Resumo)

DOMINGUEZ, M.M. Effect of body condition, reproductive status and breed on follicular population and oocyte quality in cows. **Theriogenology**, v.43, p.1405-1418, 1995.

ERICKSON, B.H. Development and senescence of postnatal bovine ovary. **J. Anim. Sci.**, v.25, p.800, 1996.

FLEMING, W.N.; SAAKE, R.G. Fine structure of the bovine oocyte from the mature Graafian follicle. **Journal of Reproduction and Fertile**, v.47, p.203-213, 1972.

FUKUI, Y.; SAKUMA, Y. Maturation of bovine oocytes cultured *in vitro*: relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of cumulus cells. **Biology of Reproduction**, v.22, p.669-673, 1980.

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)

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.; BERGFELT, D.R.. Associations between concentrations and major and minor follicular waves in pregnant mares. **Theriogenology**, v.38, p. 807-821, 1992.

GOODHAND, K.L.; BROADBENT, P.J.; HUTCHINSON, R.; WATT, G. *In vivo* oocyte recovery and *in vitro* embryo production in cattle pre-treated with FSH, progestogen and estradiol. **Theriogenology**, v.45, p.355, 1996. (Abstract)

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.

GOUDET, G.; BEZÁRD, J.; DUCHAMP, G.; GÉRARD, N.; PALMER, E. Equine oocyte competence for nuclear and cytoplasmic *in vitro* maturation: effect of follicular size and hormonal environment. **Biol. Reprod.**, v.57, p.232-245, 1997.

GOUDET, G.; LECLERQ, L.; BEZÁRD, J.; DUCHAMP, G.; GUILLAUME, D.; PALMER, E. Chorionic gonadotropin secretion is associated with an inhibition of follicular growth and an improvement on oocyte competence for *in vitro* maturation in the mare. **Biol. Reprod.**, v.58, p.760-768, 1998.

GREVE, T.; LEHN-JENSEN, H.; RASBECH, N.O. Non-surgical recovery of bovine embryos. **Theriogenology**, v.7, p.239-250, 1977.

GRIMES, R.W.; IRELAND, J.J. Relationship of macroscopic appearance of the surface of bovine ovarian follicles, concentration of steroids in follicular fluid and maturation of oocytes *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.35, p.725-732, 1987.

HASHIMOTO, S.; TAKAKURA, R.; KISHI, M.; SUDO, T.; MINAMI, N.; YAMADA, 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.

HAWLEY, L.R.; ENDERS, A.C.; HINRICHS, K.. Comparison of equine and bovine oocyte-cumulus morphology within the ovarian follicle. **Biol. Reprod.**, v.1, p.243-252, 1995.

HAZELEGER, N.L.; HILL, D.J.; STUBBINGS, R.B.; WALTON, J.S. Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential in vitro. **Theriogenology**, v.43, p.509-522, 1995.

HILL, B.R. A simple method of transvaginal follicle aspiration. **Theriogenology**, v.41, p.235, 1995.

HINRICHS, K.; KENNEY, D.F.; KENNEY, R.M. Aspiration of oocyte from mature and immature preovulatory follicles in the mare. **Theriogenology**, v.34, p.107-112, 1990.

KATSKA, L.; SMORAG, Z. Number and quality of oocyte in relation to age of cattle. **Animal Reproduction Science**, v.7, p.451-460, 1984.

KRUIP, Th. A.M.; DIELEMAN, S.J. Macroscopic classification of bovine follicles and its validation by micromorphological and steroid biochemical procedures. **Reproduction Nutrition and Development**, v.22, p.465-473, 1982.

KRUIP, T.H.; BONI, R.; WURTH, Y.A.; ROELOFSEN, M.W.M.; PIETERSE, M.C. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. **Theriogenology**, v.42, p.675-684, 1994.

LAMBERT, R.D.; BERNARD, C.; RIOUX, J.E.; BÉLAND, R.; D'AMOURS, D.; MONTREUIL, A. Endoscopy in cattle by the paralumbar route: technique for ovarian examination and follicular aspiration. **Theriogenology**, v.20, p.149-161, 1983.

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

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.

LOPEZ RUIZ, L.; ALVAREZ, N.; NUNEZ, I.; MONTES, I.; SOLANO, R.; FUENTES, D.; PEDROSO, R.; PALMA, G.A.; BREM, G. Effect of body condition on the developmental competence of IVM/ IVF bovine oocytes. **Theriogenology**, v.45, p.292, 1996. (Abstract)

MACHATKOVA, J.E.; PETILIKOVA, J.; DVORACEK, V. Developmental competence of bovine embryos derived from oocytes collected at various stages of the estrous cycle. **Theriogenology**, v.44, p.801-810, 1995.

McKINNON, A.O.; WHEELER, M.B.; CARNEVALE, E.M.; SQUIRES, E.L. Oocyte transfer in the mare: preliminary observations. **Eq. Vet. Sci.**, v. 6, p.306-309, 1987.

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. Trans vaginal ultrasound-guided oocyte retrieval from cyclic and pregnant horse and pony mares for *in vitro* fertilization. **Biol. Reprod.**, v.1 p.281-292, 1995b.

MEINTJES, M.; GRAFF, K.J.; PACCAMONTI, D.; EILTS, B.E.; PAUL, J.B.; THOMPSON, D.L.; KEARNEY, M.T.; GODKE, R.A. Effects of follicular aspiration and flushing, and the genotype of the fetus on the circulating progesterone levels during pregnancy in the mare. **Eq. Vet. J.**, v.25, p.25-32, 1997.

NIBART, M.; SILVA PEIXER, M.; THUARD, J.M.; DURANT, M.; GUYADER-JOLY, C.; PONCHON, S.; MARQUANT-LE GUIENE, B.; HUMBLLOT, P. Embryo production by OPU and IVF in dairy cattle. In: RÉUNION A. E. T. E., 11, 1995, Hannover. **Proceedings...** Hannover, 1995. p.216.

PALMER, E.; DUCHAMP, G.; BEZÁRD, J.; MAGISTRINI, M.; KING, W.A.; BOUSQUET, D.; BETTERIDGE, K.J. Non-surgical recovery of follicular fluid and oocytes of mares. **J. Reprod. Fertil.**, v.35, p. 689-690, 1987.

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.

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)

PUELKER, R.Z.; ESPER, C.R.; AVELINO, K.B.; VANTINI, R.; RODRIGUES, C.F.M.; GARCIA, J.M. Avaliação do método de sincronização da onda folicular de vacas submetidas a estimulação com FSH para a produção *in vitro* de embriões. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.27, p.278, 1999. (Resumo)

REICHENBACH, H.D.; WIEBKE, N.H.; BESENFELDER, U.H.; MÖDL, J.; BREM, G. Transvaginal laparoscopic guided aspiration of bovine follicular oocytes: preliminary results. **Theriogenology**, v.39, p.295, 1993. (Abstract)

REICHENBACH, H.D.; WIEBKE, N.H.; MÖDL, J.; ZHU, J.; BREM, G. Laparoscopy through the vaginal fornix of cows for the repeated aspiration of follicular oocytes. **J. Rep. Fertil.**, v.101, p.547, 1994.

REVEL, F.L.; MERMILLOD, P.; PEYNOT, N.; RENARD, J.P.; HEYMAN, Y. Low developmental capacity of *in vitro* matures and fertilized oocytes from calves compared with that of cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.103, p.115-120, 1995.

RHODES, F.M.; PETERSON, A.J.; JOLLY, P.D.; McMILLAN, W.H.; DONNINSON, M.; LEDGARDE, A.; PARTON, G.; HALL, D. R. Bovine ovarian follicle and oocyte characteristics after emergence of the first follicular wave. **Theriogenology**, v.47, p.149, 1997. (Abstract)

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, C.F.M.; GARCIA, J.M. The application of ultrasound guided follicular aspiration in cattle. In: XII REUNIÃO ANUAL DA SBTE, 26, 1998, Atibaia. **Anais...** Atibaia: São Paulo, 1998. p.156-159.

RODRIGUES, C.F.M.; GARCIA, J.M. Fecundação *in vitro*: aplicação comercial. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.28, p.186-187, 2000.

SAUMANDE, J.; PROCUREUR, R.; CHUPIN, D. Effect of injection time and anti-PMSG antiserum on ovulation rate and quality of embryos in superovulated cow. **Theriogenology**, v.21, p.727, 1984.

SAUVÉ, R. Ultrasound guided follicular aspiration and *in vitro* fertilization. In: XIII REUNIÃO ANUAL DA SBTE, 26, 1998, Atibaia. **Anais...** Atibaia: São Paulo, 1998. p.141-145.

SENEDA, M.M. **Aspiração folicular transvaginal guiada pela ultra-sonografia. Efeito do diâmetro do folículo sobre a recuperação, qualidade e competência do ócito 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.; VANTINI, R. Effect of follicle size on recovery, quality, and developmental competence of oocytes obtained *in vitro*. In: 14th INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 1., 2000. Stockholm. **Proceedings...** Sweden, 2000. p.62-65.

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

SMITH, L.C.; OLIVEIRA-ANGEL, M.; GROOME, N.P.; BHATIA, B.; PRICE, C.A. Oocyte quality in small antral follicles in the presence or absence of a large dominant follicle in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.106, p.193-199, 1995.

SNEL-OLIVEIRA, M.V.; TURY, E.; PEREIRA, D.C.; MALAGOLI Jr., D.; NASCIMENTO, N.V.; SANTOS, E.S.; RUMPF, R. Histopathological ovum pick-up (OPU) in nelore prepubertal calves. **Theriogenology**, v.57, p.687, 2002. (Abstract)

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.

THONON, F.; ECTORS, F.J.; DELVAL, A.; FONTES, R.S.; TOUATI, K.; BECKERS, J.F. *In vitro* maturation, fertilization and developmental rates of bovine oocytes connected with the reproductive status of the donor. **Theriogenology**, v.39, p.330, 1993. (Abstract)

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)

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.

WURTH, U.A.; KRUIP, Th. A.M. Bovine embryo production *in vitro* after selection of the follicles and oocytes. In: 12th INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 1., 1992, **Proceedings...** 1992. p.387-389.