

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
NUCLEO DE ESTUDOS EM CIÊNCIA ANIMAL
EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA -
AMAZÔNIA ORIENTAL
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

ALYSSON JORGE DE OLIVEIRA SOUSA

**AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE ASPIRAÇÃO OVOCITÁRIA TRANSVAGINAL
(*OVUM PICK UP*) E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DA RAÇA NELORE
(*Bos taurus indicus*) ORIUNDOS DE DOADORAS COM ALTERAÇÕES DA
FERTILIDADE.**

Belém

2008

ALYSSON JORGE DE OLIVEIRA SOUSA

**AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE ASPIRAÇÃO OVOCITÁRIA TRANSVAGINAL
(OVUM PICK UP) E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DA RAÇA NELORE
(*Bos taurus indicus*) ORIUNDOS DE DOADORAS COM ALTERAÇÕES DA
FERTILIDADE.**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental, Universidade Federal Rural da Amazônia.

Área de concentração: Produção Animal
Orientador: Prof. Dr. Otávio Mitio Ohashi.

Belém

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) –
Biblioteca Centro de Ciências Agrárias / UFPA, Belém-PA

Sousa, Alysson Jorge de Oliveira

Avaliação da técnica de aspiração ovocitária transvaginal (Ovum Pick Up) e produção in vitro de embriões da raça nelore (*Bos taurus indicus*) oriundos de doadoras com alterações da fertilidade / Alysson Jorge de Oliveira Sousa; orientador, Otávio Mitio Ohashi. - 2007.

Dissertação (Mestrado) – Curso de Mestrado em Ciência Animal, Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural, Núcleo de Estudos em Ciência Animal, Universidade Federal do Pará, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental, Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2003.

1. Zebu - Reprodução. 2. Fertilização in vitro. I. Título.

CDD 22. Ed. 636.208245

ALYSSON JORGE DE OLIVEIRA SOUSA

**AVALIAÇÃO DA ASPIRAÇÃO OVOCITÁRIA TRANSVAGINAL (*OVUM PICK UP*)
E PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES ZEBUÍNOS (*Bos taurus indicus*)
ORIUNDOS DE DOADORAS COM ALTERAÇÕES DA FERTILIDADE.**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental, Universidade Federal Rural da Amazônia.
Área de Concentração: Produção Animal.

Data da Aprovação: Belém – PA, 11 de setembro de 2003.

Orientador: Prof. Dr. Otávio Mitio Ohashi.

Departamento de Biologia, UFPA.

Prof. Dr. Haroldo Francisco Lobato Ribeiro

Deptº de Patologia e Méd. Veterinária Preventiva, UFRA.

Profª. Drª. Diva Anelie de Araujo Guimarães

Curso de Mestrado em Ciência Animal, UFPA.

Profª. Drª. Hilma Lucia Tavares Dias

Curso de Mestrado em Ciência Animal, UFPA.

À *DEUS*, por minha vida e por
minha família.

À minha futura esposa,
*ALESSANDRA KARLLA GUEDES
ALVES*, pelo incondicional apoio,
enorme incentivo e imensa
paciência.

Aos meus pais, *ANA CLEIDE* e
JORGE, pelo carinho, amizade,
exemplo de nunca desistir frente as
dificuldades, pois com sacrifícios
proporcionaram-me os estudos e
minha profissão.

AGRADECIMENTOS

Especialmente aos meus amigos Prof^a. M. Sc. *ADRIANA NOVAES DOS REIS* e ao Biólogo e aluno de Pós-graduação da UFPA *MOYSÉS DOS SANTOS MIRANDA*, pelo apoio incondicional, orientações, sugestões e, sobretudo pela confiança nestes mais de cinco anos de amizade.

Ao Prof. Dr. *OTÁVIO MITIO OHASHI* pela oportunidade de tê-lo como orientador.

Aos diretores da CEBRAN Prof. M. Sc. *ALUÍSIO OTÁVIO ALMEIDA DA SILVA* e Prof. M. Sc. *JOSÉ SILVA DE SOUSA*, estimados amigos e colegas, pelo apoio e incentivo que sempre recebi e acima de tudo pela grande amizade.

Aos meus eternos amigos e colegas de turma *DÉBORA MARA COSTA DE OLIVEIRA*, *GUSTAVO GÓES CAVALCANTE* e *JEAN PACHECO LEÃO* pelo imenso incentivo e confiança em todos estes anos de vida profissional.

Aos amigos *JURUPYTAN VIANNA DA SILVA* e Dr^a. *HILMA LUCIA TAVARES DIAS* pelo apoio, principalmente nos momentos mais difíceis.

Ao Prof. M. Sc. *RAIMUNDO PARENTE DE OLIVEIRA* pelo apoio competente no encaminhamento das análises estatísticas da dissertação.

Aos amigos do Lab/FIV – UFPA, *CÁSSIA*, *ROSEMAR*, *PATRÍCIA*, *FLÁVIA* E *MARCELA* pelo apoio e confiança.

Ao Sr. *MARCOS MARCELINO DE OLIVEIRA* próspero criador da região, por acreditar em um projeto desenvolvido por pesquisadores da região.

Aos funcionários da CEBRAN: *RENATO*, Sr. *MÜLLER*, *NILSON*, *ANANIAS (BICUDO)*, *(PEZÃO)* E *PEDRO*, pelo grande auxílio nos momentos em que foi preciso.

Ao *RAIMUNDO* (Barba), gerente da Fazenda Santa Isabel, por todo o empenho em colaborar com os diversos projetos desenvolvidos.

A Técnica Agrícola *LUCILENE* e Auxiliar de laboratório *MARIA AUXILIADORA* pela amizade, incentivo e auxílio.

Ao *TIO ZECA*, um dos responsáveis pela minha opção profissional, pelo apoio que sempre recebi, mas acima de tudo pela nossa grande amizade.

A minha família especialmente à *ANA CLEIDE, JORGE, ANDERSON, GEISA, ANA JÚLIA, ANA LAURA, JULIETA E ALESSANDRA KARLLA*, razões da minha passagem nesta vida.

Ao CNPq por ter concedido bolsa de mestrado.

Aos colegas da Pós-Graduação pela amizade e apoio nas noites mal dormidas que passamos.

Agradeço sinceramente a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, ajudando a superar os obstáculos e apoiando de forma incondicional nos momentos mais difíceis

Aos animais que doaram resignados para que um dia, quem sabe, com sua ajuda a ciência possa acrescentar mais uma simples página na sua interminável jornada.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 01: Tratamentos utilizados na técnica de aspiração ovocitária transvaginal p33
- Tabela 02: Média de ovócitos obtidos através de dois tipos de pressões de sucção p39
- Tabela 03: Ovócitos obtidos com a utilização de dois calibres de agulha distintos p40
- Tabela 04: Média de ovócitos colhidos de vacas com cistos ovarianos (grupo I) e sem (grupo II) p40
- Tabela 05: Efeito do calibre da agulha e pressão de sucção na média de ovócitos aspirados ambos os grupos testados p41
- Tabela 06: Efeito do calibre da agulha e pressão de sucção na média de ovócitos viáveis aspirados p42
- Tabela 07: Viabilidade (%) dos ovócitos colhidos nos diferentes tratamentos (tipo de pressão e agulha) p42
- Tabela 08: Produção embrionária de vacas com problemas de fertilidade submetidas a técnica de Ovum Pick Up/Produção In Vitro..... p43

SUMÁRIO

	p.
1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	17
2.1. OBJETIVO GERAL	17
2.2. OBJETIVO ESPECÍFICO	17
3. REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1. ASPIRAÇÃO FOLICULAR BOVINA	19
3.1.1. Fatores não patológicos que interferem na aspiração folicular	20
3.1.1.1. Fatores biológicos	20
3.1.1.2. Fatores técnicos	22
3.1.2. Fatores patológicos que interferem na aspiração folicular	25
3.1.2.1. Alterações reprodutivas em animais submetidos a diversos tratamentos hormonais	26
4. MATERIAL E MÉTODO	31
4.1. ANIMAIS UTILIZADOS	31
4.2. HISTÓRICO REPRODUTIVO	31
4.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	32
4.4. ASPIRAÇÃO FOLICULAR TRANSVAGINAL (<i>OVUM PICK UP</i>) ..	33

4.5. PRODUÇÃO “ <i>In Vitro</i> ” DE EMBRIÕES (PIV)	34
4.5.1. Maturação “<i>in vitro</i>” (MIV)	34
4.5.2. Cultura das Células da Granulosa (CG)	34
4.5.3. Fertilização <i>in vitro</i>	35
4.5.4. Cultivo embrionário	36
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
5. RESULTADOS	38
6. DISCUSSÃO	44
6.1. ASPIRAÇÃO OVOCITÁRIA TRANSVAGINAL (OPU)	44
6.1.1. Influência da presença de cistos ovarianos	46
6.1.2. Influência da pressão de aspiração	46
6.1.3. Influência do tipo de agulha	49
6.1.4. Interação entre os diversos tratamentos (pressão e agulha) nos diferentes grupos	49
6.2. PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES	50
7. CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
ANEXOS	64

RESUMO

Este experimento teve como objetivo avaliar a possibilidade da utilização de fêmeas zebuínas de elevada qualidade genética, com problemas de fertilidade, adquiridos após um programa de transferência convencional de embriões, como doadoras de ovócitos em um programa de Ovum Pick Up e Produção *In Vitro* de embriões. Fêmeas da raça Nelore (n=16) (*Bos taurus indicus*), com idade média de 11 anos e 7 meses, foram submetidas às mesmas condições de ambiente, alimentação e manejo. Estes animais foram retirados do programa de T.E. por apresentarem problemas de fertilidade (cistos ovarianos, infecções genitais, mucometra e alguns casos de repetições de cio sem causa aparente). Os animais foram divididos em dois grupos conforme o tipo de patologia: GRUPO I (n=08) composto por animais que apresentaram patologias ovarianas (cistos) e GRUPO II (n=08) formado por animais com patologias extra ovarianas, ambos os grupos foram submetidos à aspiração folicular (OPU) utilizando dois tipos de agulhas (21G ½; 19G ½) e pressões (55 e 70mmHg) divididos em quatro tratamentos (T1 = 55/21G½; T2 = 55/19G½; T3 = 70/21G½ e T4 = 70/19G½), posteriormente os ovócitos submeteram-se a PIV. Foram realizadas 149 aspirações e colhidos 879 ovócitos ($5,9 \pm 4,88$) onde GRAU I = 16%; GRAU II = 43%; GRAU III = 21% e GRAU IV = 20%. As médias de ovócitos colhidos no GRUPO I foram (T1 = $7,06 \pm 5,10$; T2 = $7,00 \pm 3,64$; T3 = $10,60 \pm 6,51$ e T4 = $2,78 \pm 2,59$) para os animais pertencentes ao GRUPO II obteve-se (T1 = $4,90 \pm 4,47$; T2 = $2,93 \pm 3,05$; T3 = $6,11 \pm 4,11$ e T4 = $2,70 \pm 2,00$). Para as médias de ovócitos viáveis os resultados foram os seguintes: (T1 = $4,35 \pm 3,01$; T2 = $4,88 \pm 2,96$; T3 = $6,87 \pm 3,91$ e T4 = $1,89 \pm 1,90$) para o GRUPO I e (T1 = $2,70 \pm 2,22$; T2 = $1,92 \pm 1,98$; T3 = $3,47 \pm 2,27$ e T4 = $2,00 \pm 1,05$) para o GRUPO II. Neste experimento foram levados à PIV 538 ovócitos dos quais 161 (32,85%) clivaram e 65 (13,26%) resultaram em Mórula ou Blastocistos. A análise estatística dos resultados não demonstrou diferença significativa entre os grupos quanto a colheita ovocitária. Quando analisada somente a pressão de sucção, foi observado que o tipo de agulha está diretamente relacionado a pressão da bomba de vácuo. Os melhores resultados foram obtidos com o tratamento T3 = 70/21G½, além disso pode-se observar que as melhores médias de ovócitos colhidos foram as obtidas no grupo de animais que apresentaram cistos ovarianos (GRUPO I). Desta forma, concluímos neste

experimento que a utilização da técnica de OPU/PIV é uma alternativa de grande utilidade no prolongamento da vida reprodutiva de animais zebuínos com alterações na fertilidade.

Palavras – Chave: Aspiração folicular, Fertilização *IN Vitro*, Zebuínos.

ABSTRACT

The objective of this experiment was evaluate the possibility of the use of zebu cattle females with raised genetic quality presenting problems of fertility, acquired after a program of conventional transference of embryos, as oocyte donors in a program of *Ovum Pick Up* and *In Vitro* embryo production. Sixteen females of Nelore breed (*Bos taurus indicus*) with average age of 11 years and 7 months, had been submitted to the same conditions of environment, feeding and management. These animals were removed of the program of embryo transfer due fertility problems (ovarian cysts, genital infections and some cases of repeat breedings). The animals had been divided in two groups in agreement the type of pathology: Group I (n=08) formed by animals that had presented ovarians pathologies (cysts) and GROUP II (n=08) formed by animals with extra-ovarians pathologies, both groups had been submitted to aspiration follicular (OPU) using two types of needles (21G ½; 19G ½) and pressures (55 e 70mmHg). The two groups were divided in four treatments (T1 = 55/21G½; T2 = 55/19G½; T3 = 70/21G½ e T4 = 70/19G½) and after oocytes collection they were submitted to IVP. In this work, 149 aspirations were realised and 879 oocytes were collected ($5,9 \pm 4,88$) GRADE I = 16%; GRADE II = 43%; GRADE III = 21% e GRADE IV = 20%. The averages of oocytes collected in Group I were (**T1** = $7,06 \pm 5,10$; **T2** = $7,00 \pm 3,64$; **T3** = $10,60 \pm 6,51$ and **T4** = $2,78 \pm 2,59$) and the second group (GROUP II) (**T1** = $4,90 \pm 4,47$; **T2** = $2,93 \pm 3,05$; **T3** = $6,11 \pm 4,11$ and **T4** = $2,70 \pm 2,00$). For the averages of viable oocytes, the results had been the following ones (**T1** = $4,35 \pm 3,01$; **T2** = $4,88 \pm 2,96$; **T3** = $6,87 \pm 3,91$ and **T4** = $1,89 \pm 1,90$) for GROUP I and (**T1** = $2,70 \pm 2,22$; **T2** = $1,92 \pm 1,98$; **T3** = $3,47 \pm 2,27$ and **T4** = $2,00 \pm 1,05$) for GROUP II. In this experiment, 538 oocytes had been taken to the IVP, 161 (32,85%) of these oocytes had clived and 65 (13,26%) had resulted in Morula or Blastocysts. The statistics analysis of the results did not demonstrate significant difference in the oocyte number of the different groups, caused for the suction pressure. It was observed that the type of needle is related of pressure of the vacuum bomb, the best results were finding with T3 treatment, moreover It can be observed through these findings that the best averages of oocytes collected had been gotten in the group of animals that had presented ovarians cysts (GROUP I),

We concluded in this experiment that the use of OPU/IVF technique is an great option in the prolongation of the reproductive life in problems zebu cattle.

Key – Words: Ovum Pick Up, In Vitro Fertilization, Zebu Cattle.

1. INTRODUÇÃO:

Atualmente o setor agropecuário responde por 7,4% do PIB nacional (IBGE, 2001), o que faz deste setor um importante aliado econômico do país. Segundo dados da FAO (2001) o Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, com aproximadamente 176 milhões de cabeças.

O zebu têm elevada tolerância ao clima tropical, boa resistência aos endo e ecto parasitas, estrutura física que lhe proporciona facilidade e locomoção, além de excelente habilidade materna (HILL, 1996), entretanto estes animais ainda apresentam baixa produtividade na sua grande maioria. Por este motivo há necessidade de se buscar novas técnicas, que auxiliem no desenvolvimento desta produtividade, fazendo da pecuária uma atividade cada vez mais rentável. Por conseguinte, resultando no aumento da oferta de proteína animal no mercado, a preços acessíveis a qualquer classe social contribuindo desta forma, para o desenvolvimento econômico e social do país.

Diversas alternativas podem ser utilizadas em busca do melhoramento do rebanho, uma delas é a melhoria genética desses animais, ou seja, a busca da disseminação em larga escala de animais de qualidade superior.

Ao longo dos anos foram criadas e aperfeiçoadas várias biotecnologias aplicadas à reprodução animal, como inseminação artificial e transferência convencional de embriões que aumentam a capacidade reprodutiva de vacas e novilhas de alto valor zootécnico, resultando em um aumento do número de indivíduos geneticamente superiores e possibilitando diminuir o intervalo entre gerações, através da obtenção de mais descendentes por gerações (WAGTENDONK – DE – LEEUW *et al.* 2000).

A possibilidade de retirada de ovócitos de doadoras vivas através da aspiração folicular transvaginal com o auxílio do ultra-som (*Ovum Pick-Up* – OPU) e o aprimoramento do processo de produção *in vitro* (PIV) de embriões, aumentaram as possibilidades de aproveitamento das vacas de reconhecido valor genético maximizando a utilização dessas fêmeas (CALLENSEN; GREVE; CHISTENSEN, 1987).

Através desta técnica é possível produzir embriões pré-sexados e embriões ou zigotos em vários estágios de desenvolvimento, para os estudos de transgênese e clonagem.

Uma das grandes vantagens da coleta de oócitos e da PIV dos mesmos é que não há a necessidade de superestimular as fêmeas, atividade esta que diminui muito a vida reprodutiva das doadoras (BOUSQUET *et al.*, 1999). Outra vantagem é que a coleta dos oócitos pode ser feita até duas vezes por semana, em fêmeas de varias idades, até mesmo as pré-púberes ou gestantes (gestação inicial) sem problema algum para a doadora (GALLI *et al.*, 2001). Segundo Kruij *et al.* (1994) uma vaca saudável pode ser submetida a colheita embrionária convencional por 3 a 4 vezes ao ano, com uma média de 5 embriões viáveis produzidos por colheita o que ao final de um ano resultará em no máximo 20 embriões viáveis ao ano. Quando são submetidos animais saudáveis à colheita de ovócitos, através da técnica de OPU, duas vezes por semana são recuperados ovócitos suficientes para produzir dois embriões por semana, ou seja, usando esta técnica por seis meses pode ser obtido quase 50 embriões, o que torna uma técnica muito mais vantajosa (KRUIP *et al.* 1994). Além disso, a OPU possui bastante utilidade na terapia de vacas com cistos ovarianos, onde se punciona todo o conteúdo cístico através da via transvaginal (GALLI *et al.*, 2001). Recentemente, também tem sido sugerido o uso da PIV para avaliar o potencial reprodutivo de touros, já que com o uso esta técnica vários ovócitos podem ser fertilizados (simultaneamente) com sêmen de dois ou mais reprodutores, avaliando assim as melhores taxas de fertilização (BOUSQUET *et al.*, 1999).

No entanto uma dos maiores ganhos obtidos com o advento da técnica de colheita ovocitária no animal vivo é a obtenção filhos de fêmeas de elevada genética que apresentam dificuldades de produzir descendentes através das técnicas convencionais de reprodução, por possuírem problemas que comprometam a fertilidade como cistos ovarianos, hidrossalpinge, aderência ovariana ou comprometimento do ciclo ovariano natural como no caso de fêmeas oriundas de programas de transferência de embriões convencional que foram submetidas a vários processos de superovulação. Infertilidades estas que culminariam com a redução da vida reprodutiva do animal e finalmente no seu descarte e abate (BOLS *et al.*, 1996).

Apesar dos avanços obtidos, a produção *in vitro* de embriões ainda apresenta algumas limitações, tais como: baixos índices de produção de blastocistos, a menor viabilidade dos oócitos obtidos de bezerras em relação aos de vacas e novilhas, e o custo final do embrião, que é em torno de 2 a 3 vezes mais alto

do que um embrião de transferência embrionária convencional (T.E.) Portanto, mais pesquisas são necessárias no sentido de aumentar os índices de produção e, dessa forma, reduzir os custos. Além disso, os fatores que influenciam a competência dos oócitos oriundos de animais muito jovens precisam ser elucidados, para que estes possam ser utilizados, com sucesso, em programas de aspiração folicular e produção *in vitro* de embriões.

2. OBJETIVOS:

2.1. OBJETIVO GERAL:

- Avaliar a possibilidade da utilização de matrizes zebuínas oriundas de um programa de transferência de embriões convencional apresentando problemas de fertilidade, como doadoras de ovócitos em um programa de OPU/PIV.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar a qualidade e quantidade dos ovócitos obtidos de doadoras com fertilidade comprometida;
- Verificar a influência do tipo de agulha e da intensidade de pressão de sucção na aspiração ovocitária transvaginal (OPU);
- Determinar a influência da presença de folículos císticos na taxa de recuperação oocitária bem como na qualidade dos ovócitos recuperados;
- Avaliar a produção de embriões a partir de ovócitos oriundos de fêmeas com alterações na fertilidade, adquiridas em programa de transferência embrionária convencional.

3. REVISÃO DE LITERATURA:

Desde o século XIX buscou-se criar técnicas que viabilizassem o cultivo e o desenvolvimento embrionário *In vitro* (SCHENK, 1880 *apud* GORDON, 1994). Mais de um século se passou desde os primeiros estudos, desde então se ampliaram os conhecimentos da técnica e foram desenvolvidos novos meios de cultivo até que em 1981 nasceu o primeiro bezerro oriundo de fertilização *In vitro* (BRACKETT *et al.*, 1982). Desde então esta técnica teve avanços consideráveis fazendo com que, atualmente, apresente grande utilidade na produção de grande número de embriões usados para pesquisa ou para produção comercial (GORDON, 1994).

Apesar dos diversos avanços conseguidos nos últimos anos no campo da produção embrionária *In vitro* (PIV). Diversos autores demonstram que os resultados obtidos através desta técnica ainda são pequenos, onde com número de blastocistos varia de 30 a 40% do total de ovócitos encaminhados para a MIV (ECKERT ; NIEMANN, 1996; MASSIP *et al.*, 1996; GOFF ; SMITH, 1998; KRISHER *et al.*, 1999; THOMPSON, 1999; BAVISTER, 2000).

Algumas pesquisas têm comparado as características morfológicas e funcionais dos embriões produzidos *In vitro* daqueles recuperados de fêmeas superovuladas (*in vivo*), e tais comparações têm revelado claramente diferenças na natureza do processo de compactação, na morfologia e nas dimensões da massa celular interna (MCI) dos blastocistos, na menor atividade metabólica das células embrionárias e na sobrevivência do embrião após processos de criopreservação, bem como, no desenvolvimento retardado dos embriões em cultivo *In vitro* (CIV), quando comparados com embriões que se desenvolvem *in vivo*, possivelmente porque as condições *In vitro* não são idênticas, às do ambiente uterino (GOFF; SMITH, 1998; KHURANA; NIEMANN, 2000). Isto é justificado pelo fato do desenvolvimento do blastocisto ser influenciado pela composição estágio-específico do meio de cultura.

3.1. ASPIRAÇÃO FOLICULAR BOVINA:

Grande parte das pesquisas que contribuíram para o desenvolvimento e aperfeiçoamento da técnica tem sido realizadas com ovários de vacas sacrificadas em abatedouros, apesar de serem uma importante fonte de ovócitos, geralmente são provenientes de animais sem valor econômico (BOLS *et al.* 1996b).

Pieterse *et al.* (1988), modificaram a técnica de punção folicular transvaginal (OPU) até então utilizada somente em reprodução humana (LOPATA *et al.* 1974) *apud* (BOLS *et al.* 1996b), esta técnica compreende no uso de uma agulha introduzida pela vagina, e que os folículos a serem puncionados são visualizados na tela do ultra-som, pode-se então a partir desta técnica realizar a coleta de ovócitos em animais (bovinos) vivos por repetidas vezes, abrindo assim, novos caminhos para multiplicação de animais de interesse econômico, superando os índices da TE clássica, em se tratando da produção de bezerros/vaca/ano (GOODHAND *et al.*, 1997; WAGTENDONK-DE-LEEuw *et al.*, 2000).

Este método de aspiração *in vivo* associado à FIV, é ainda de fundamental importância para produzir embriões de vacas prenhes, de vacas que não respondem à superovulação ou ainda de animais portadores de patologias reprodutivas adquiridas, senis ou pré-púberes, em todos estes casos esses animais podem ser utilizados em sessões de aspiração folicular semanais, sem causar transtornos para o ciclo estral ou para a prenhez (BOUSQUET *et al.*, 1999). Como observado por Lacaze *et al.* (1997), que obtiveram 14,5 ovócitos por semana, sendo realizadas duas aspirações a cada semana; dos quais 13,5 foram fertilizados ao utilizarem a técnica de punção transvaginal com auxílio do ultra-som.

Alguns autores fazem uso da laparotomia como técnica para obter ovócitos através do procedimento cirúrgico. Santl *et al.* (1998) compararam os resultados de ovócitos obtidos através da técnica de punção transvaginal com a técnica cirúrgica e observaram que o número de ovócitos recuperado ficou em torno de $(3,3 \pm 2,7; \text{ultra-som})$ e $(2,7 \pm 2,1; \text{cirúrgica})$, resultando não somente na melhor performance da técnica de punção transvaginal com auxílio do ultra-som como também padronizando como a técnica de eleição para aspiração folicular em bovinos e bubalinos.

Santl *et al.* (1998) descrevem que o método da laparoscopia permite acesso limitado dos ovários e envolvem traumas consideráveis, impedindo coletas freqüentes, e diminuindo a vida útil da doadora.

Outra grande vantagem na utilização da técnica de OPU foi observada por Dolman *et al.* (1995), onde mesmo depois de repetidas aspirações, não houve alteração na resposta superovulatória aplicada aos mesmos animais quando o intervalo entre a última aspiração e a recuperação embrionária foi de 4 a 7 semanas, o que demonstra que animais submetidos a punção folicular podem ser ainda aproveitados na transferência de embriões (T.E.) convencional.

3.1.1. Fatores não patológicos que interferem na aspiração folicular:

A eficiência da aspiração folicular em bovinos tem eficiência de 30 a 60% segundo Ward *et al.* (2000), sendo variável e dependente de fatores inerentes aos animais como: categoria animal (bezerras, novilhas e vacas), raças (taurinas e zebuínas), status reprodutivos (ciclando, gestante e pós-parto), condição corporal ou variável de acordo com protocolos estabelecidos pelo técnico como: a utilização ou não de pré-tratamento hormonal dos animais, a pressão exercida pela bomba de sucção, o diâmetro da agulha utilizada e a própria perícia do técnico (KRUIP *et al.*, 1994; GALLI ; LAZZARI, 1996; SCHMIDT *et al.*, 1996; BOLS, 1997; BROADBENT *et al.*, 1997; BOUSQUET *et al.*, 1999; GUYADER – JOLY *et al.*, 2000; PEREZ *et al.*, 2000; BLONDIN *et al.*, 2002; FERRÉ *et al.*, 2002 e REIS *et al.*, 2002).

Diversos outros autores relataram a influência da pressão exercida pela bomba de sucção e do diâmetro da agulha, na qualidade dos ovócitos recuperados (HASLER *et al.*, 1995; FRY *et al.*, 1997 e WARD, *et al.*, 2000).

3.1.1.1. Fatores biológicos:

Lansbergen *et al.* (1995), observaram que o número de ovócitos recuperados sofre extrema variação individual, ou seja, mesmo em indivíduos com semelhante estado de carne, apresentando-se na mesma fase do ciclo estral, recebendo a mesma alimentação entre outros fatores, existe este tipo de variação.

Para Bols ; Kruif (1997) esta é certamente uma das causas mais importantes desta grande variação da técnica de OPU em bovinos.

É conhecimento da maioria dos técnicos, como citado anteriormente, a influência da condição corporal na performance reprodutiva, entretanto poucos são os estudos que correlacionam a condição nutricional com a qualidade ovocitária (DOMINGUEZ, 1995 ; LOPEZ RUIZ *et al.* 1996).

Lopez Ruiz *et al.* (1996), coletaram “*pós-mortem*”, ovários de vacas muito magras (condição corporal igual a 1) e de vacas apresentando condição normal (condição corporal 3). Após a aspiração dos folículos com diâmetro compreendendo de 2 a 6 mm e realização dos procedimentos de maturação e fertilização “*In vitro*”, a taxa de ovócitos clivados e blastocistos provenientes de vacas subnutridas foi menor do que no grupo de animais com nutrição adequada, o que levou a conclusão de que a diminuição do escore corporal influencia diretamente na taxa de desenvolvimento ovocitário.

A variação na qualidade ovocitária, e sua relação com a condição corporal foi também comprovada por Dominguez (1995), que observou um aumento na proporção de ovócitos normais (ovócito com citoplasma homogêneo, zona pelúcida intacta e completo revestimento de células do *cumulus*) diretamente correlacionado ao aumento na condição corporal, outro dado observado foi o aumento do número de folículos pequenos nas doadoras que apresentaram condição corporal entre 3, 4, ou 5 (obesas) em relação às vacas com condição entre 1 (muito magras) e 2.

A raça é outro fator que influencia na taxa de aspiração folicular conforme foi observado por Dominguez (1995) quando comparou animais taurinos (europeus) com zebuínos (Indianos) encontrando nos primeiros um maior número de folículos grandes (> 10 mm) que facilitam a visualização através do ultra-som e conseqüentemente melhoram a eficiência da aspiração folicular.

Poucos são os relatos da utilização da técnica de punção folicular em zebuínos, por isso a maioria dos achados se dá em *Bos taurus taurus*. No entanto, Manik; Singla; Palta (2003) realizaram um experimento com animais *Bos taurus indicus*, onde colheram uma média de $4,0 \pm 0,5$ ovócitos.

As médias obtidas por Garcia; Salaheddine (1998) e Goddhand *et al.* (1999), que realizaram experimentos semelhantes na espécie *Bos taurus taurus*, encontraram valores de $5,4 \pm 3,7$ e $5,6 \pm 1,8$ ovócitos respectivamente. O que

demonstra valores menores para os zebuínos quando comparados com os taurínos, entretanto pode-se observar um grande potencial das fêmeas desta última espécie como doadora de ovócitos em um programa de produção *In vitro* de embriões.

Uma das vantagens do uso da técnica de OPU é que esta pode ser utilizada independente da idade, já que este sempre foi um fator limitante da aplicação de biotecnologias reprodutivas que visem a maximização da produção, pois até então, era impossível realizar uma técnica reprodutiva em animais pré-púberes ou em animais senis, com isso a aspiração folicular *In vivo* via transvaginal em animais jovens vem sendo atualmente muito utilizada, entretanto em diversos casos estes experimentos mostraram-se menos eficientes que quando realizados em animais adulto (BOLS ; KRUIF, 1997 e D'OCCHIO, 1998).

3.1.1.2. Fatores técnicos:

Um dos meios mais utilizados para melhorar a taxa de coleta de ovócitos é o uso de aplicações hormonais, inúmeros autores relataram os efeitos causados pela estimulação hormonal com gonadotrofinas na aspiração folicular em fêmeas submetidas a sessões de *Ovum Pick up* (De LOOS *et al.*, 1991; BUNGARTZ *et al.*, 1995; BORDIGNON *et al.*, 1997).

Stubbings ; Walton (1995) ao compararem o número de folículos puncionados em animais tratados ou não com FSH purificado, observaram que não existiu diferença significativa na taxa de colheita ovocitária entre os dois grupos. Discordando com estes resultados Van Soom, Bols ; De Kruif (1995) obtiveram em vacas inférteis uma média de 6 embriões por doadora após estimulação hormonal enquanto que no grupo não estimulado, os autores obtiveram apenas 1,3 embriões por doadora.

Lacaze *et al.* (1997) compararam a aspiração folicular, de vacas estimuladas com FSH purificado e de animais sem estimulação hormonal, os autores observaram que as médias de ovócitos recuperados, fertilizados e clivados não apresentaram diferença estatística entre os dois grupos respectivamente (15,1; 14,8 e 2,1 ; 13,8; 12,3 e 1,8), com estes dados os autores demonstraram que a administração de hormônios antes das sessões de OPU, não melhorou nem

quantitativa nem qualitativamente os índices de colheita de ovócitos em bovinos obtidos neste experimento.

Goodhand *et al.* (1999) fazendo uso do FSH obtiveram taxa por doadora de 8,9 ovócitos. Goodhand *et al.* (2000) utilizaram ainda outros tipos de hormônios, além do FSH os autores testaram o efeito de progestágenos e estrógenos, obtendo uma taxa menor, 5,9 ovócitos por animal.

Lonergan *et al.* (1994), relataram a existência de uma correlação positiva entre o diâmetro do folículo e a qualidade dos ovócitos que estão contidos neles. Discordando destes resultados Blondin *et al.* (1996) observaram que a estimulação hormonal eleva o tamanho dos folículos pré-existent e que este fator não é suficiente para conferir a qualidade necessária para o desenvolvimento embrionário. Discordando destes resultados, coincidindo com os achados de Blondin; Guibault; Sirard *et al.* (1997) que encontraram ovócitos de excelente qualidade quando o período entre a pré-estimulação com FSH-P e a aspiração folicular foi maior que 48h.

Tanto o comprimento e diâmetro da agulha, quanto a pressão de sucção utilizada na punção folicular são comumente estudados com o objetivo de se obter um melhor número de ovócitos viáveis recuperados, assim como uma melhor qualidade dos ovócitos obtidos, na tentativa de preservar as células do *cumulus* (BOLS *et al.* 1996b ; BOLS ; KRUIF, 1997), as quais possuem comprovada função através das suas conexões com o próprio ovócito via canais que penetram na zona pelúcida, sendo muito importantes para a nutrição e o crescimento do ovócito, além da sua participação no momento da fertilização aumentando as taxas de penetração espermática uma vez que participa da indução do mecanismo de capacitação (COX, HORMAZÁBAL ; SANTA MARÍA, 1993; CHIAN; OKUDA ; NIWA, 1995 e LIU *et al.*, 1995).

Por estes motivos, quando ocorre a remoção do *cumulus* antes da fertilização há uma diminuição substancial nos índices de embriões clivados (ZHANG *et al.*, 1995). Assim, a morfologia externa e a qualidade das células do *cumulus* são os principais fatores determinantes da qualidade do ovócito, utilizando-se para esta avaliação apenas o estereomicroscópio ou em alguns casos a microscopia ótica.

O critério de seleção bastante utilizado foi estabelecido em 1989 por De Loos *et al. apud* Bols ; Kruif (1997) observado no Anexo I. Os autores

consideraram que os ovócitos de boa qualidade eram aqueles que se apresentaram em várias camadas de células do *cumulus* completas e compactas, citoplasma homogêneo e finamente granuloso (HAZELEGER *et al.*, 1995; SIRAD ; BLONDIN, 1996; GANDOLFI *et al.*, 1997 e HINRICHS ; WILIAMS, 1997).

Hashimoto *et al.* (1999) realizaram um experimento buscando observar os efeitos da pressão de sucção e do diâmetro da agulha na colheita de ovócitos de boa qualidade, os autores observaram que estes fatores influenciam significativamente na recuperação de ovócitos viáveis, neste mesmo experimento os autores concluíram que as condições de punção realizada em animais de matadouro não são necessariamente as mesmas que devem ser aplicada na aspiração *in vivo*.

Bols *et al.* (1996b) observaram que a pressão de vácuo exercida pela bomba de aspiração, normalmente expressa em milímetro de mercúrio (mm/Hg) ou em alguns casos em mililitro de água por minuto (ml/min) irá depender dos dispositivos utilizados (diâmetro e comprimento da agulha) para punção folicular e, quanto maior for a pressão de sucção exercida maior será o número de ovócitos desnudos obtidos, e conseqüentemente menor a taxa de clivagem.

Uma simples mudança no diâmetro da agulha em conjunto com a pressão da bomba de sucção, também pode afetar a morfologia do complexo cumulus ovócito (CCO). Bols *et al.* (1996b) verificaram que as maiores taxas de recuperação foi com a agulha de maior diâmetro, entretanto os ovócitos obtidos com esta agulha foram na sua maioria desnudos. De posse destes achados os autores recomendam o uso de uma pressão de vácuo moderada e o uso de agulhas finas para obtenção do máximo número de ovócitos com grande quantidade de células do cumulus.

O intervalo entre as sessões de OPU é outro fator técnico que influencia tanto na qualidade quanto na quantidade dos ovócitos obtidos. Na técnica de punção folicular busca-se puncionar todos os folículos maiores que 2–3 mm de diâmetro, com isso forçará o desenvolvimento de novos folículos com este diâmetro (HANENBERG ; VAN WAGTENDONK-DE-LEEuw, 1997).

A partir desta teoria Hanenberg ; Van Wagtendonk-De-Leeuw (1997), encontraram um aumento significativamente maior de complexos *cumulus* ovócitos em animais que foram puncionados com intervalo de 7 dias, entretanto quando comparados com animais que foram puncionados com intervalo de 3 ou 4 dias, os autores observaram que os ovócitos com melhor revestimento das células do

cumulus, foram os que afetaram significativamente a taxa de blastocistos (19,7% para intervalo de 3 dias e 13,5% para intervalos de 7 dias).

Para auxiliar no momento da punção folicular Merton *et al.*, (2003) recomendam que a resolução do equipamento deve ser nítida o suficiente para se observar folículos maiores de 2 mm.

Outro fator observado que altera as taxas de colheita de ovócitos é o número de técnicos que realizam a punção folicular (LANSBERGEN *et al.*, 1995). Na técnica de punção folicular, assim como em qualquer técnica que envolva perícia individual, sempre haverá variação dos resultados quando as sessões de OPU forem realizadas por dois ou mais técnicos, pois a sensibilidade e a experiência são dois fatores que contribuem para a variação na taxa de recuperação (MERTON *et al.*, 2003).

3.1.2. Fatores patológicos que interferem na aspiração folicular:

A técnica de OPU permite a recuperação de ovócitos de vacas com diversos problemas de fertilidade, fato este que no passado fatalmente culminaria na exclusão destes animais de programas de reprodução (BOLS *et al.* 1996a).

Bols *et al.* (1996a), realizaram a coleta de ovócitos em vinte doadoras recém saídas de um programa de transferência de embriões convencional e que apesar de um histórico de boa produção embrionária, apresentaram nas últimas colheitas através do método não cirúrgico, uma baixa recuperação embrionária, sendo que em três destas vacas foram detectadas alterações no aparelho genital (aderência e hidrossalpinge) através da palpação retal.

Estes mesmos autores obtiveram uma média de folículos puncionados de 4,4 dos quais recuperaram 2,1 ovócitos que resultaram em 0,4 blastocistos levando-os a concluir que a técnica de OPU/PIV é uma alternativa para a utilização, em programas de reprodução de vacas de alto valor genético que apresentam problemas de fertilidade (BOLS *et al.* 1996a).

Hasler *et al.* (1995), realizaram um experimento com 155 vacas inférteis, com média de idade de 8 anos, as causas de infertilidade foram diversas como: bloqueio dos ovidutos, aderências nas fímbrias, cistos ovarianos crônicos, baixa resposta superovulatória e um caso de histerectomia. Estes autores

puncionaram os animais 78 vezes e obtiveram uma média de 4,9 ovócitos por sessão, dos quais 4,1 foram aproveitados para MIV. Após a transferência de 2268 embriões frescos, 1220 (53,8%) gestações foram obtidas.

Takagi *et al.* (1998) realizaram um experimento onde buscaram avaliar a influência de folículos císticos e suas concentrações de hormônios esteróides na recuperação e morfologia dos ovócitos além de avaliar a maturação *in vitro* dos mesmos. Os autores observaram que a presença de cistos foliculares não influenciou na recuperação, morfologia e maturação dos ovócitos colhidos neste experimento.

Recentemente, Faber *et al.* (2003), realizaram um levantamento dos resultados de OPU-FIV em vacas com problemas de fertilidade no período de 1992 a 2002, perfazendo um total de 6606 sessões de punção folicular em 1584 doadoras, onde foram obtidos 50429 ovócitos que resultaram em uma média de 7,63 ovócitos e 1,16 embriões por sessão. De acordo com os autores estes dados confirmam a viabilidade da utilização desta técnica em animais com problemas de fertilidade. Quando observado os seus resultados somente na subespécie *indicus* os autores obtiveram 13,9 ovócitos por sessão, sendo neste experimento, a espécie *Bos taurus indicus* a que melhor apresentou os resultados de colheita ovocitária.

3.1.2.1. Alterações reprodutivas em animais submetidos a diversos tratamentos hormonais.

Diversos são os tratamentos hormonais utilizados na técnica de múltipla ovulação e transferência embrionária (MOET) e sincronização, no entanto estão entre os mais utilizados os progestágenos (acetato de melengestrol – MGA, implantes subcutâneos de Norgestomet e dispositivos intravaginais com Progesterona) (BARROS *et al.*, 2000, BÓ, 2000).

Nogueira *et al.* (2000), utilizaram implantes intravaginais de progesterona (P_4) em vacas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) com o intuito de evitar o pico pré-ovulatório de LH em um programa de MOET. Utilizando o hormônio citado anteriormente em conjunto com estrógeno é possível evitar o crescimento do folículo dominante, desta maneira a associação de um progestágeno com o estradiol (E_2) em qualquer momento do ciclo estral, induzem o crescimento sincrônico de uma

nova onda folicular, por isso este protocolo é muito utilizado em programas de transferência embrionária (BÓ *et al.*, 1994; BÓ *et al.*, 1995a; BÓ *et al.*, 1995b e TRIBULO *et al.*, 1995).

No fato referido anteriormente Roberson *et al.* (1989) alguns anos antes já haviam evidenciado que a progesterona inibe a freqüência de pulsos de LH e que o estradiol age principalmente inibindo a amplitude dos pulsos.

Experimentos posteriores foram realizados comprovando o papel da progesterona na diminuição da freqüência de pulsos de LH (KOHRAM *et al.*, 1999). Estes autores submetem animais à punção folicular e posterior introdução de implantes intravaginais de (P₄) objetivando manter as concentrações luteais deste hormônio, posteriormente estes animais receberam doses de FSH purificado. As concentrações de LH foram mensuradas antes e após a introdução do implante onde os autores observaram uma queda significativa de $9,5 \pm 0,7$ pulsos/12h para $5,2 \pm 0,4$ pulsos/12h após o início do tratamento superovulatório.

Segundo Wehrman *et al.* (1993), a simples presença de folículos dominantes no início do processo de superovulação contribuem na formação de folículos ovarianos císticos, já que estes estão em estado de desenvolvimento mais avançado que os folículos recentemente recrutados, por essa razão estes primeiros podem secretar 17 β -estradiol suficiente para estimular a onda pré-ovulatória de LH, antes dos demais folículos estarem aptos a responder esta onda pré-ovulatória, conseqüentemente alguns folículos falham em ovular desenvolvendo assim esta patologia que resulta em baixas taxas de concepção (SANCHEZ *et al.*, 1993; SAVIO *et al.*, 1993 e WEHRMAN *et al.*, 1993).

Corroborando com achados anteriores, Borromeo *et al.* (1996) observaram o papel da progesterona como promotor da formação folicular cística e relataram que 76% dos folículos que se desenvolveram na presença de concentrações intermediárias de (P₄) formaram cistos foliculares.

A alta variabilidade na resposta do indivíduo à estimulação de gonadotrofina é um dos maiores problemas no sucesso comercial da transferência de embriões convencional (HAHN, 1992 e ARMSTRONG, 1993), sem contar que diversos autores constataram que o tratamento superovulatório, realizado com o objetivo de maximizar a produção embrionária em programas de T.E. é responsável por inúmeros casos de alterações genitais e endócrinas (CALLENSEN, GREVE ; HYTTEL, 1987; DONALDSON, 1985 e GOFF, 1986). Corroborando com estes

achados Dorn *et al.* (1991); Hahn (1992) e Kafi; Mc Gowan (1997), acrescentam que o estímulo superovulatório depois de seguidos tratamentos, tem sua resposta ovariana reduzida nas doadoras de um programa de T.E. convencional.

Ao administrar gonadotrofinas exógenas pode ser observada anomalia no desenvolvimento folicular, na ovulação e no transporte espermático. Resultando assim em distúrbios do processo de fertilização e/ou desenvolvimento embrionário, o que gera um aumento da taxa de recuperação de estruturas não fertilizadas e embriões de baixa qualidade (KAFI; MC GOWAN,1997).

Várias pesquisas procuraram observar a relação do aumento da concentração de FSH no organismo em relação à liberação de LH pela hipófise, utilizando soluções purificadas de FSH com baixa quantidade de LH, os resultados obtidos confirmaram que a freqüência do pulso de LH diminuiu de 6,4 em 8 horas nos animais não estimulados para 2,4 pulsos em 8 horas nos animais que receberam hormônio. Desta forma foi observado grande efeito inibitório do FSH purificado (BEN JEABRA; CARRIÉRE; PRICE, 1994 e PRICE *et al.*, 1999).

Fator como estes anteriormente descritos levam a conclusão de que ambas as drogas citadas, quando utilizadas em protocolos de superovulação, podem suprimir a secreção endógena do hormônio luteinizante (BEN JEABRA; CARRIÉRE; PRICE, 1994; ROBERGE, RIEGER ; RAWLINGS, 1995 e PRICE *et al.*, 1999).

Os cistos foliculares, estruturas que apresentam diâmetro maior que 25 mm (NASCIMENTO; SANTOS, 1997) ou maior que 17 mm conforme Silvia *et al.* (2002). São comuns em doadoras submetidas a protocolos de superovulação, como também observado por Maciel; Gustafsson; Rodriguez-Martinez (1992) que realizaram experimento em 20 novilhas, onde 25% apresentaram cistos foliculares depois de repetidos tratamentos superovulatórios.

Estas estruturas também podem originar-se de infecções uterinas, conforme observado por Bosu; Peter (1987) e Peter *et al.* (1989) *apud* Wiltbank (1999), que relataram os efeitos da infusão intrauterina com endotoxinas aumentando os níveis séricos de cortisol e bloqueando a onda de LH com conseqüentemente ocorre uma falha na ovulação, com isso os autores sugerem que uma infecção uterina pode causar a formação de cistos foliculares em alguns casos.

O valerato de estradiol, um estrógeno de meia vida longa, encontrado no mercado muito utilizado em protocolos de sincronização de cio, é um componente

que, segundo Carrière; Amaya; Lee (1995) pode causar doença ovariana cística, estes autores observaram através da ultra-sonografia, a dinâmica folicular após o uso do valerato de estradiol, e relataram a indução de diferentes formas de cistos ovarianos nos animais testados.

Outro problema causado pelo estradiol foi demonstrado por Dieleman *et al.* (1993) que observaram que altas concentrações de E₂, freqüentemente encontradas nos fluídos foliculares bem antes da ovulação, podem causar alterações da maturação e fertilização, conseqüentemente levando a um distúrbio no desenvolvimento inicial do ovócito.

O ambiente endócrino associado com a formação e manutenção dos folículos ovarianos císticos foram estudados por Hamilton *et al.* (1995), que induziram cistos foliculares com doses elevadas de progesterona e estradiol durante 7 dias e observaram que as vacas que apresentaram cistos tiveram maior concentração de LH que as vacas que ovularam normalmente. Cook *et al.* (1991) e Sílvia *et al.* (2002), explicam que isto ocorre em virtude do aumento tanto da freqüência quanto da amplitude do pulso de LH. Calder *et al.*, (2001) observaram que os cistos foliculares ovarianos possuem elevados níveis de RNAm que codifica os receptores de LH nas células da granulosa.

Diversos pesquisadores tem observado os ovários de vacas com cistos foliculares, através de repetidas palpções retais e análises com auxílio do ultra-som, que as estruturas ovarianas císticas são dinâmicas, podendo ser observadas novas ondas de crescimento folicular na presença de folículos císticos (COOK *et al.*, 1990; COOK *et al.*, 1991; HAMILTON *et al.*, 1995; GARVERICK, 1997 e GÜMEN *et al.*, 2002). Partindo deste princípio Takakgi *et al.* (1998) compararam os ovócitos obtidos de ovários de animais com cisto folicular e de fêmeas com ovário normal, e verificaram que o número de ovócitos obtidos, sua morfologia e taxa de maturação não apresentaram diferenças significativas quando na presença ou ausência de cistos foliculares.

Kafi; Mc Gowan (1997), explicam que uma ovulação prematura e conseqüentemente o desenvolvimento de cistos luteínicos causam uma liberação de progesterona anormal, e que possivelmente é resultante de um processo de superovulação anterior a transferência embrionária.

Outro tipo de apresentação hormonal, muito utilizada na superovulação de animais submetidos à indústria de transferência de embriões é aquela que

contém LH em proporções iguais às de FSH, no entanto, é conhecido que altas dosagens de LH nas drogas utilizadas para superovulação apresentam um efeito deletério no número de ovócitos e embriões produzidos (BOLAND, GOULDING ; ROCHE, 1991).

A ocorrência de folículos anovulatórios luteinizados é outra anormalidade que pode acometer fêmeas doadoras de um programa de transferência embrionária, prejudicando a resposta superovulatória (KAFI ; MC GOWAN, 1997).

Sabe-se que a junção útero-tubárica é um importante sítio de reserva espermática nas fêmeas (LARSSON, 1988). A partir destes achados Hyttel *et al.* (1991), estudaram o transporte espermático no oviduto de vacas com ovulação simples e compararam com vacas superovuladas, onde observaram que 75% das fêmeas superovuladas não apresentaram sítio de reserva espermática definido, fato este que pode prejudicar a fertilização, o que pode resultar no aumento de estruturas não fertilizadas em uma coleta de embriões convencional.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1. ANIMAIS UTILIZADOS:

O experimento foi realizado em uma fazenda, localizada no município de Ipixúna do Pará situado à 230 Km de Belém no período de agosto/2002 a maio/2003.

Foram utilizadas dezesseis fêmeas *Bos taurus indicus* pertencentes à raça nelore de diferentes idades (média de 11 anos e 7 meses), apresentando bom estado corporal, mantidas em regime de pastejo rotacionado em piquetes de capim braquiário (*Brachiaria brizantha*) e capim quicúio (*Brachiaria humidicola*), além de água e sal mineral *ad libitum*.

Todas as fêmeas que participaram do experimento foram submetidas aos cuidados profiláticos de rotina, como as vacinações periódicas contra febre aftosa, leptospirose, além de aplicação de drogas para controle de ecto e endoparasitas e apresentaram resultado negativo ao teste de soro-aglutinação rápida (rosa bengala) para brucelose e para prova de inoculação intradérmica para tuberculose.

4.2. HISTÓRICO REPRODUTIVO:

Todas as fêmeas utilizadas neste experimento apresentaram elevado valor genético sendo oriundas de um programa de transferência de embriões convencional e neste, apresentaram um bom histórico de produção embrionária colhidas através da técnica não cirúrgica. Estes animais foram estimulados hormonalmente diversas vezes (média $3,3 \pm 1,6$) antes de serem utilizadas no programa de produção "In vitro" de embriões. Os hormônios utilizados foram: o Folículo estimulante (FSH) em conjunto com o hormônio luteinizante (LH) na razão de 1:1 ou em alguns casos utilizou-se somente o FSH-P, em alguns deste animais foi realizada sincronização do ciclo estral com estrógeno e implante intravaginal de liberação de progesterona (CIDR®).

Estas doadoras foram retiradas do programa de T.E convencional por demonstrarem problemas de fertilidade observados após várias tentativas de concepção através da inseminação artificial ou monta natural. Foi encontrado na metade (oito) dos animais utilizados neste experimento, a presença de cistos ovarianos através do exame de palpação retal, já na outra metade observou-se outras patologias uterinas e/ou vaginais como infecções genitais inespecíficas, mucometra além de casos de repetições de cio com causa indeterminada.

4.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL:

Os animais foram divididos em dois grupos conforme a origem do problema de fertilidade; onde o Grupo I compreendeu animais com patologias ovarianas, sendo observado a presença dos cistos foliculares e o Grupo II foi composto por animais que apresentaram diversas outras causas de baixa fertilidade com sede em outros órgãos do sistema genital ou por causa desconhecida (repetição de cios). Animais de ambos os grupos foram submetidos a aspirações foliculares semanais onde foram testados dois tipos de pressão de sucção, graduado na bomba de vácuo, e dois calibres e agulha, sendo obedecido o sistema internacional onde: agulha 40x08 (21G ½) e 40x10 (19G ½), conforme tabela abaixo:

Tabela 1 - Tratamentos utilizados na técnica de aspiração ovocitária transvaginal.

	<i>Tratamento</i>	Grupo I (c/cisto)	Grupo II (s/cisto)
	1	55/21G ½	55/21G ½
<i>Pressão (mmHg)/ Agulha</i>	2	55/19G ½	55/19G ½
	3	70/21G ½	70/21G ½
	4	70/19G ½	70/19G ½

4.4. ASPIRAÇÃO FOLICULAR TRANSVAGINAL (*OVUM PICK UP*):

As fêmeas doadoras após contenção em brete apropriado, receberam 1,5ml Cloridrato de Acepromazina como tranquilizante, para posteriormente serem submetidas à anestesia peridural intercoccígea (entre a segunda e terceira vértebras coccígeas) para facilitar a manipulação dos ovários através do reto, para isso foram administrados de 2 a 4 ml de Cloridrato de Lidocaína 2%.

A vulva e o períneo foram lavados e desinfetados para em seguida introduzir via transvaginal o sistema de punção conforme descrito por Bols, (1997). Este sistema é composto de uma guia de agulha conectado a um tubo plástico¹, para armazenamento dos ovócitos recém coletados, contendo Solução Tampão Salina Fosfatada a 37°C (Phosphated Buffered Saline – PBS) suplementado com 10% de soro fetal bovino, heparina (70 UI/ml) e antibióticos (penicilina e gentamicina), este tubo plástico era interligado a uma bomba de sucção para aspirar o líquido folicular e, por conseguinte o ovócito contido nele, o sistema de punção foi acoplado a um aparelho de ultra-som² com transdutor setorial ajustado na frequência de 7,5 MHz. O sistema foi introduzido por toda a extensão da vagina até bem próximo da cérvix para em seguida serem puncionados todos os folículos visualizados ao ultra-som (> 4 mm de diâmetro).

O conteúdo dos tubos foi filtrado em filtro coletor de embrião³ (poro 75µm), para em seguida serem colocados em placa de petri⁴ e então realizada a procura e captura com o auxílio de um estereomicroscópio⁵ (40X a 100X), em fluxo laminar⁶. Em seguida estes ovócitos foram classificados conforme critério estabelecido por De Loos *et al.* (1989) conforme observado no Anexo I.

Os dados colhidos neste experimento são correspondentes a resultados obtidos por apenas um técnico.

¹ FALCON 2074

² PIE-MEDICAL, *Scanner 200 vet*, Maastricht, Holanda.

³ MILIPORE

⁴ CORNING

⁵ NIKON SMZ 800

⁶ VECO

4.5. PRODUÇÃO “*In Vitro*” DE EMBRIÕES (PIV).

4.5.1. Maturação “*in vitro*” (MIV)

Os ovócitos foram selecionados para a MIV, de acordo com o número e a morfologia das camadas de células do *cumulus oophorus* e com o aspecto do citoplasma conforme estabelecido por Leibfried; First (1979), sendo aproveitados os ovócitos que apresentaram de 1 a 3 camadas de células do *cumulus* (grau II) ou estas bem compactas (grau I), e o aspecto do citoplasma homogêneo.

Os ovócitos selecionados foram lavados e incubados em meio de MIV (Meio 199 suplementado com bicarbonato de sódio⁷, 10% de soro fetal bovino (SFB), 50 µg/ml de penicilina, 50 µg/ml de gentamicina, 0,5 µg/ml de FSH⁸, 5,0 µg/ml de LH⁹, 1 µg/ml de 17-β estradiol e piruvato). A incubação foi realizada em placas de petri de poliestireno de 35mm de diâmetro com gotas de 100 µl de meio de MIV sob óleo mineral estéril, em estufa¹⁰ com atmosfera a 5% de CO₂, temperatura de 38,5° C e elevada umidade.

4.5.2. Cultura das Células da Granulosa (CG):

Foi utilizado para o co-cultivo dos embriões as células oriundas do *cumulus oophorus* dos ovócitos que aderiram à placa de cultivo durante a MIV e formarem uma monocamada. O meio de MIV foi substituído por meio de cultivo embrionário CR2 acrescido de glicina, alanina, 10% de SFB, albumina sérica bovina (BSA), penicilina e gentamicina. O objetivo de cultivar as células da camada da granulosa é de servir de suporte para o desenvolvimento embrionário (GORDON, 1994)

⁷ MERCK

⁸ Folltropin-V (Vetrepharm)

⁹ Lutropin-V (Vetrepharm)

¹⁰ Forma Scientific

4.5.3. Fertilização *in vitro*:

Na fertilização *in vitro* foi utilizado sêmen congelado. Para separar o sêmen dos crioprotetores utilizou-se o método de gradientes descontínuos de percoll. O procedimento consistiu em descongelar a palheta de sêmen em água a 39 - 40°C durante 30 segundos e lavar em 3ml de TL-sêmen por centrifugação a 800g durante 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi homogeneizado, colocado cuidadosamente sobre a coluna (4ml) do gradiente de percoll (45 e 90%) e centrifugado durante 10 minutos. Duas lavagens posteriores foram realizadas em 3 ml de TL-sêmen por centrifugação durante 10 minutos para remoção dos resíduos de percoll e crioprotetores.

Após as lavagens, a concentração espermática foi ajustada para 10⁶ espermatozoides/ml para posteriormente o sêmen ser colocado em gotas (80µl) de meio de FIV (TL-STOCK suplementado com heparina, penicilamina, hipotaurina, epinefrina e BSA) com a finalidade de capacitar os espermatozóides. Após 24 horas de MIV, os oócitos foram lavados em H-BSA e em meio de FIV posteriormente foram colocados nas gotas de FIV já contendo os espermatozóides capacitados.

Os ovócitos permaneceram incubados junto com os espermatozóides por 18 a 24 horas, quando então serão submetidos a sucessivas pipetagens para a retirada das células do *cumulus* restantes e dos espermatozóide aderidos à zona pelúcida.

4.5.4. Cultivo embrionário:

Os ovócitos foram transferidos para gotas de cultivo (50µl), já contendo a monocamada de CG e meio de cultivo CR2 em grupos de no máximo 20 ovócitos por gota, onde permaneceram por oito dias, até alcançarem os estágio de mórula e blastocisto. A renovação do meio foi realizada 96 horas após o início do cultivo, com o acréscimo de mais 50µl de meio CR2 à gota de cultivo, e a cada 48 horas até o oitavo dia de cultivo, com retirada de 50µl e acréscimo de mais 50µl de meio.

4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Os resultados obtidos neste experimento foram analisados através do teste de Análise de variância (ANOVA), para determinar a interação entre os grupos, com nível de significância 5%. O teste Student Newman-Keuls (SNK) foi utilizado para comparação das médias obtidas e verificar a significância estatística entre as mesmas. Para isso foi utilizado o Programa NTIA versão 4.2.1. (EMBRAPA, 1995).

5 . RESULTADOS:

Os animais pertencentes aos dois grupos experimentais tiveram respostas satisfatórias, quando avaliada a quantidade média de ovócitos colhidos, apesar de ter sido observada uma grande variação na quantidade de ovócitos colhidos por animal.

Neste experimento foi aspirado um total de 879 ovócitos, em 149 aspirações, perfazendo uma média geral de $5,9 \pm 4,88$ ovócitos colhidos por aspiração folicular. O elevado desvio padrão explica a grande variação individual existente nos números de ovócitos aspirados através desta técnica.

Os ovócitos encontrados resultaram nas seguintes proporções: 137 (16%) apresentaram Grau I, a maior parte 379 (43%) ovócitos foram classificados como Grau II, 185 (21%) Grau III e 178 (20%) Grau IV, como pode ser melhor visualizado na Figura 2.

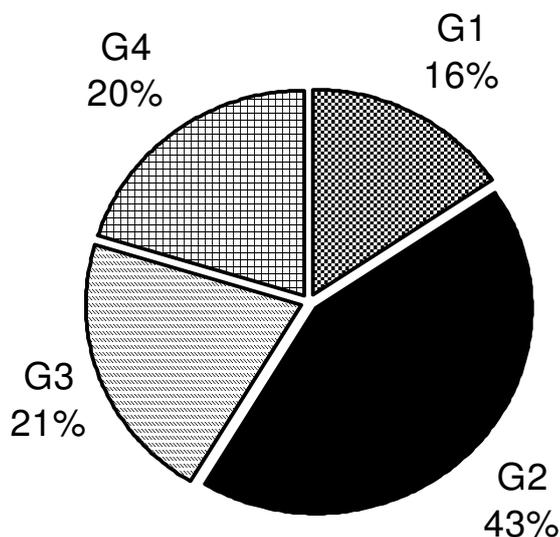


Figura 1 - Porcentagem de ovócitos puncionados de fêmeas Nelore com alterações na fertilidade, classificados qualitativamente segundo De Loos *et al.* (1989).

Os resultados da análise de variância, obtidas neste experimento encontram-se no Anexo 2, este teste demonstrou que o calibre da agulha influenciou significativamente ($p < 0,05$) na colheita ovocitária (total e viáveis) estando diretamente ligada a pressão na qual a mesma é utilizada, além disso pode ser observada a grande diferença na média de ovócitos colhidos entre os grupos testados (Grupo I e II).

A pressão de sucção da bomba de vácuo, não teve influência ($p > 0,05$) na aspiração ovocitária de vacas com fertilidade comprometida, quando analisada isoladamente, nas pressões de 55 mmHg e 70 mmHg, como demonstrado na Tabela 02.

Tabela 02 – Média de ovócitos das vacas Nelore obtidos através de dois tipos de pressões de sucção.

Ovócitos (média/DP)	Pressão de aspiração (mmHg)	
	55	70
Viáveis	3,57 ± 2,81 ^a	3,89 ± 3,26 ^a
Desnudos	1,10 ± 1,35 ^a	1,34 ± 1,34 ^a
Geral	5,75 ± 4,60	6,17 ± 5,38

Não houve diferença significativa nas médias ($P < 0,05$), pelo teste SNK.

A influência entre o tipo de agulha utilizada e a colheita ovocitária pode ser observada na Tabela 03. Observou-se ao contrário da pressão de sucção da bomba de OPU, o tipo de agulha influenciou significativamente na aspiração ovocitária onde foi observado as maiores médias com o uso da agulha de menor calibre (21G ½).

Tabela 03 – Ovócitos obtidos das vacas Nelore com a utilização de dois calibres de agulha distintos.

Ovócitos (média/DP)	Tipo de Agulha	
	21G ½ 0,8mm	19G ½ 1,0mm
Viáveis	4,06 ± 3,10 ^a	2,92 ± 2,57 ^b
Desnudos	1,39 ± 1,46 ^c	0,78 ± 1,00 ^d
Geral	6,74 ± 5,24	4,24 ± 3,55

Letras sobrescritas diferentes indicam diferença nas médias (P<0,05), pelo teste SNK.

Quando a média de ovócitos colhidos a partir de fêmeas com cistos foliculares foi comparada com a média obtida das fêmeas que apresentaram outros problemas de fertilidade (Grupo I e Grupo II, respectivamente), não levando em consideração os diferentes tratamentos ao qual estes animais foram submetidos (tipo de agulha e pressão de sucção) foi observado uma diferença significativa (p<0,05) na média de ovócitos viáveis colhidos entre os grupos, onde a melhor média obtida pertenceu aos animais do Grupo I (Tabela 4).

Tabela 04 – Média de ovócitos colhidos de vacas Nelore com cistos folicular (grupo I) e sem (grupo II).

Ovócitos (média/DP)	Grupos	
	I (c/cisto)	II (s/cisto)
Viáveis	4,68 ± 3,35 ^a	2,67 ± 2,11 ^b
Desnudos	1,12 ± 1,33 ^c	1,26 ± 1,38 ^c
Geral	7,24 ± 5,29	4,54 ± 4,02

Letras sobrescritas diferentes indicam diferença nas médias (P<0,05), pelo teste SNK.

Ao analisar as diferentes interações, entre pressão de sucção e tipo de agulha, utilizadas neste experimento, observou-se que houve uma interferência altamente significativa (p<0,01) na colheita ovocitária destes animais não somente na média total de ovócitos como na média de ovócitos viáveis observados.

As melhores médias foram obtidas quando a punção foi realizada com agulha 21G ½ associada à pressão de 70mmHg independente do grupo (I ou II) na qual este animal estava inserido, entretanto ao comparar as médias dos dois grupos neste mesmo tratamento (70mmHg/21G ½) observou-se um aumento significativo nas médias de ovócitos colhidos dos animais com presença de cistos ovarianos (Grupo I) (Tabela 5).

Tabela 05 - Efeito do calibre da agulha e pressão de sucção na média de ovócitos aspirados ambos os grupos testados.

Pressão aspiração (mmHg)	Médias de Ovócitos			
	Grupo I (c/cisto)		Grupo II (s/cisto)	
	21G ½	19G ½	21G ½	19G ½
55	7,06 ± 5,10 ^{Aa}	7,00 ± 3,64 ^{Ac}	4,90 ± 4,47 ^{Db}	2,93 ± 3,05 ^{Ed}
70	10,60 ± 6,51 ^{Be}	2,78 ± 2,59 ^{Cg}	6,11 ± 4,11 ^{Df}	2,70 ± 2,00 ^{Eg}

Letras maiúsculas sobrescritas diferentes dentro de um mesmo grupo;

Letras minúsculas sobrescritas diferentes pertencentes ao mesmo tratamento em diferentes grupos apresentam diferença significativa ($P < 0,05$), pelo teste SNK.

A análise dos resultados, dos animais pertencentes ao grupo II, demonstrou que a pressão de sucção não interferiu ($p > 0,05$) na aspiração ovocitária, não ocorrendo o mesmo com os animais do grupo I, devido a grande diferença estatística observada em seus números, tornando esta extremamente dependente do tipo de agulha na qual a mesma é realizada em animais deste grupo (Tabela 5). Quando utilizada a agulha do tipo 19G ½ obteve-se maior média de ovócitos com a bomba de vácuo calibrada para pressão de 55mmHg quando utilizada a agulha 20G ½, os melhores resultados foram obtidos com a pressão 70mmHg.

Observou-se neste experimento uma tendência de que ao utilizar agulhas do calibre maior (19G ½) deve-se diminuir a pressão de sucção, e deve-se aumentá-la quando é utilizada um menor calibre de agulha para obter-se uma maior quantidade de ovócitos por colheita em animais que apresentaram cistos foliculares.

A influência da agulha e pressão, além da presença de cisto ovarianos influenciou da mesma forma também na aspiração de ovócitos considerados viáveis para a realização da FIV conforme pode ser observado na tabela abaixo. (Tabela 6).

Tabela 06 - Efeito do calibre da agulha e pressão de sucção na média de ovócitos viáveis aspirados.

Pressão de aspiração (mmHg)	Médias de Ovócitos Viáveis			
	Grupo I (c/cisto folicular)		Grupo II (s/cisto folicular)	
	21G ½	19G ½	21G ½	19G ½
55	4,35 ± 3,01 ^{Aa}	4,88 ± 2,96 ^{Ac}	2,70 ± 2,22 ^{Db}	1,92 ± 1,98 ^{Dd}
70	6,87 ± 3,91 ^{Be}	1,89 ± 1,90 ^{Cg}	3,47 ± 2,27 ^{Df}	2,00 ± 1,05 ^{Dg}

Letras maiúsculas sobrescritas diferentes dentro de um mesmo grupo;

Letras minúsculas sobrescritas diferentes pertencentes ao mesmo tratamento em diferentes grupos apresentam diferença significativa ($P < 0,05$), pelo teste SNK.

A ANÁLISE DO PERCENTUAL DE OVÓCITOS VIÁVEIS ASPIRADOS NESTE EXPERIMENTO CONFIRMA A INFLUÊNCIA DA AGULHA E DA PRESENÇA DE CISTO OVARIANO NO NESTES DADOS (TABELA 7), ENTRETANTO INDICA A MAIOR PORCENTAGEM DE OVÓCITOS VIÁVEIS É OBSERVADA AO UTILIZAR UMA AGULHA DO TIPO 19G ½ EM PRESSÃO DE 70MMHG. OS RESULTADOS COM AGULHA 21G ½ FORAM OS QUE APRESENTARAM OS MENORES TAXAS DE COLHEITA DE OVÓCITOS VIÁVEIS.

Tabela 07 – Viabilidade (%) dos ovócitos colhidos de vacas Nelore nos diferentes tratamentos (tipo de pressão e agulha).

Pressão de aspiração (mmHg)	% de Ovócitos Viáveis			
	Grupo I		Grupo II	
	21G ½	19G ½	21G ½	19G ½
55	66,9	66,2	51,1	71,4
70	63,6	71,2	59,1	84,8

OS RESULTADOS SÃO EXPRESSOS EM PORCENTAGEM RELATIVA AO NÚMERO DE OVÓCITOS VIÁVEIS SOBRE A QUANTIDADE TOTAL DE OVÓCITOS COLHIDOS NESTE EXPERIMENTO.

DOS OVÓCITOS COLHIDOS NESTE EXPERIMENTO 538 FORAM SUBMETIDOS A MATURAÇÃO E FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* E 161 (32,85%) CLIVARAM, DESTES 65 (40,37%) RESULTARAM EM MÓRULA OU BLASTOCISTO NO 6º OU 7º DIAS DE CULTIVO EMBRIONÁRIO, O

QUE INDICA QUE APENAS 13,26% DOS OVÓCITOS INICIALMENTE SUBMETIDOS A FERTILIZAÇÃO *IN VITRO*, RESULTARAM EM ESTRUTURAS EMBRIONÁRIAS TRANSFERÍVEIS (MÓRULA OU BLASTOCISTO), ESTES DADOS PODEM SER MELHOR VISUALIZADOS NA TABELA 8 A SEGUIR:

TABELA 08 – PRODUÇÃO EMBRIONÁRIA DE VACAS NELORE COM PROBLEMAS DE FERTILIDADE SUBMETIDAS A TÉCNICA DE OPU/PIV.

	Ovócitos Clivados (%)	Mórula/Blastocisto (%)
I (c/cisto)	66,67	67,69
II(s/cisto)	33,33	32,31
Geral	32,85	13,26

6 . DISCUSSÃO:

6.1. ASPIRAÇÃO OVOCITÁRIA TRANSVAGINAL (OPU):

Neste experimento todos os folículos visíveis foram puncionados. De acordo com Dode *et al* (2000) o tamanho do folículo não influencia na capacidade dos ovócitos de reiniciar e completar meiose e de clivar após maturação e fecundação *in vitro*, desta forma desconsiderou-se que determinados folículos tenham a preferência no momento da punção.

A média de ovócitos por aspiração obtida neste experimento ($5,9 \pm 4,88$) ficou abaixo dos resultados obtidos na espécie *Bos taurus taurus*, como pode ser observado em Lacaze *et al.* (1997) que obtiveram 7,2 ovócitos por aspiração, Bousquet *et al.* (1999) com média de $9,5 \pm 5,6$; Galli *et al.* (2001) com 9,9 ovócitos por aspiração; Faber *et al.* (2003) com média de 7,63 ovócitos e Merton *et al.* (2003) que obtiveram 7,9 ovócitos por animal.

Entretanto esta média foi semelhante à encontrada por Goodhand *et al.* (2000), que aspiraram 5,9 ovócitos em média, com a diferença que estes autores utilizaram uma associação do hormônio folículo estimulante como agente auxiliar para promover o desenvolvimento folicular (BUNGARTZ *et al.*, 1995 e BORDIGNON *et al.*, 1997) o que resulta em uma maior quantidade de ovócitos colhidos, quando comparados com animais submetidos a aspiração folicular sem estímulo exógeno de hormônios (De LOOS *et al.*, 1991; LONERGAN *et al.* 1994; VAN SOOM; BOLS; DE KRUIF, 1995; BLONDIN *et al.* 1996; BLONDIN; GUIBAULT; SIRARD *et al.* 1997; BROADBENT *et al.*, 1997; BLONDIN *et al.* 2002 e REIS *et al.* 2002).

A média deste estudo foi superior a obtida por Manik, Singla e Palta (2003) ($4,0 \pm 0,5$) que também realizaram a aspiração folicular em animais pertencentes a subespécie *indicus* e maiores também que as obtidas por Garcia; Salaheddine (1998) ($5,4 \pm 3,7$) e Goodhand *et al.* (1999) ($5,6 \pm 1,8$) com pesquisas realizadas em taurinos mesmo sabendo que estes últimos apresentam uma quantidade significativamente maior de folículos que os bovinos da subespécie *Bos taurus indicus* (DOMINGUEZ, 1995).

Quando comparados com animais que apresentavam um histórico de problemas reprodutivos, as médias encontradas neste experimento foram superiores aos estudos realizados por; Hasler *et al.* (1995) (média de 4,1); Bols *et al.* (1996a) (média de 2,1) e Bols; Van Soom; De Kruif, (1997) (média de 3,1) que utilizaram esta técnica para aumentar a viabilidade reprodutiva em vacas *Bos taurus taurus*.

O elevado desvio padrão encontrado nas médias de ovócitos colhidos comprovam a grande variação individual, que sofrem os índices de aspiração folicular nesta espécie, corroborando com estes achados Bousquet *et al.* (1999); Lansbergen *et al.* (1995) e Bols; Kruif (1997) encontraram grande variação individual na subespécie *Bos taurus taurus*. Os autores citam ainda que estes números diminuem após repetidas colheitas da mesma doadora. Estes resultados não foram observados neste experimento, já que não houve uma diminuição significativa da quantidade de ovócitos puncionados ao longo das sessões de aspiração folicular.

Foi observada uma boa taxa de aspiração ovocitária de todas a fêmeas testadas neste experimento, o que indica que os problemas de fertilidade apresentados anteriormente não comprometeram a produção ovocitária, de acordo com Hasler *et al.* (1995); Bols *et al.* (1996a); Bols; Van Soom; De Kruif (1997) e Faber *et al.* (2003) em trabalhos publicados anteriormente.

Acredita-se que os problemas de fertilidade apresentados pelos animais testados foram gerados, devido ao estímulo hormonal recebido por um longo período de tempo e/ou curtos intervalos entre duas superovulações consecutivas (DONALDSON, 1985; CALLENSSEN, GREVE ; HYTTEL, 1987; GOFF, 1986; DIELEMAN *et al.* 1993; SANCHEZ *et al.*, 1993; SAVIO *et al.*, 1993).

Como observado na literatura, o hormônio FSH influencia negativamente, quando em elevadas concentrações, na secreção endógena de LH pela hipófise, levando a supressão desta e conseqüentemente impedindo a ovulação, (DONALDSON, 1985; CALLENSSEN, GREVE ; HYTTEL, 1987; GOFF, 1986; DIELEMAN *et al.* 1993; SANCHEZ *et al.*, 1993; SAVIO *et al.*, 1993; BEN JEABRA, CARRIÉRE ; PRICE, 1994; ROBERGE, RIEGER ; RAWLINGS, 1995 e PRICE *et al.*, 1999) ou até mesmo afetando o transporte espermático e, por conseguinte interferindo no momento da fertilização (HYTTEL *et al.* 1991), conseqüentemente estes fatores irão interferir na vida útil da doadora dentro de um programa de transferência de embriões convencional (DORN *et al.* 1991; HAHN 1992 e KAFI ; MC GOWAN 1997).

Falhas causadas pelo início do tratamento superovulatório em um determinado momento que não seja o ideal, ou seja, com a presença de folículo dominante (comumente gerado pela detecção errônea do cio) podem ser responsáveis pela formação de folículos ovarianos persistentes e posteriormente cistos foliculares (WEHRMAN *et al.* 1993 e CARRIÈRE, AMAYA ; LEE, 1995).

A presença de um ou mais cistos ovarianos são comuns em animais estimulados hormonalmente, pertencentes a programas de transferência embrionária como foi observado no histórico dos animais que participaram deste experimento e relatado por diversos autores (MACIEL, GUSTAFSSON ; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 1992 e KAFI ; MC GOWAN, 1997) estes achados comumente são acompanhados de infecções uterinas devido a fatores já observados anteriormente (BOSU ; PETER, 1987).

6.1.1. Influência da presença de cistos ovarianos:

A presença destas estruturas císticas nos ovários das doadoras influenciou significativamente no aumento das médias de ovócitos viáveis em todos os tratamentos testados neste experimento (média Grupo I = $4,68 \pm 3,35$ e Grupo II = $2,67 \pm 2,11$ ovócitos viáveis), estes achados discordam dos obtidos por Takagi *et al.* (1998a) que após comparar a aspiração folicular de vacas *Bos taurus taurus* com a presença de cistos e vacas sem cistos ovarianos, relataram que presença de cistos foliculares não influenciou significativamente na recuperação ovocitária.

Da mesma forma Hasler *et al.* (1995) e Faber *et al.* (2003) demonstraram que, o número de ovócitos oriundos de animais com problemas de fertilidade não era influenciado pela presença de estruturas ovarianas císticas alguns autores relatam ainda, a presença de ondas de crescimento folicular nos ovários com estruturas ovarianas císticas, indicando que os cistos ovarianos não influenciam a dinâmica folicular inicial (COOK *et al.*, 1990; COOK *et al.*, 1991; HAMILTON *et al.*, 1995; GARVERICK, 1997 e GÜMEN *et al.*, 2002).

Ainda são poucos os relatos existentes, correlacionando a presença de cistos ovarianos com o aumento ou diminuição de ovócitos colhidos através da técnica de OPU, até o momento não se obteve explicações na literatura para o aumento significativo no número de ovócitos aspirados de ovários císticos

encontrado neste experimento, acredita-se que as fêmeas que desenvolveram cistos ovarianos eram animais de melhor histórico reprodutivo, fator este que elevaria sua resposta individual, entretanto mais pesquisas são necessárias para verificar realmente a influência da presença dos cistos na melhoria da colheita ovocitária através da técnica de OPU/FIV na subespécie *indicus*.

6.1.2. Influência da pressão de aspiração:

A média de ovócitos colhidos e de ovócitos viáveis neste experimento, não sofreu variação estatística ($P>0,05$) da pressão de sucção quando observada isoladamente. Estes achados discordam dos obtidos anteriormente por Bols *et al.* (1996b) que realizaram experimento com variações de pressão entre 50 e 130 mmHg; Fry *et al.* (1997) que testaram a aspiração folicular nas pressões de 25, 50, 75 e 100 mmHg e Galli *et al.* (2001) que desenvolveram um estudo analisando a influência da pressão de sucção compreendida entre 40 e 115 mmHg na aspiração ovocitária. Estes autores obtiveram maior quantidade de ovócitos a medida que elevou-se a pressão de sucção.

Fry *et al.* (1997) e Galli *et al.* (2001) relatam ainda que com o aumento da pressão eleva-se também a quantidade de ovócitos desnudos colhidos e diminuem a quantidade de ovócitos viáveis para serem submetidos a produção *In vitro* de embriões.

Acredita-se que a pressão de sucção utilizada na técnica de OPU é o fator que influencia em maior grau na qualidade dos ovócitos, sendo esta uma desvantagem da utilização de elevadas pressões de sucção na técnica de OPU, pois as mesmas podem ser responsáveis pela maioria das perdas de células do *cumulus* que acontecem após a sucção dos ovócitos (FRY *et al.* 1997 e GOODHAND, *et al.* 1997).

Neste experimento a utilização da pressão de 70 mmHg aumentou o número total de ovócitos recuperados, mas em compensação aumentou a porcentagem de ovócitos desnudos ou com poucas células do *cumulus* conforme resultados encontrados anteriormente por Bols *et al.* (1996b), Bols *et al.* (1997) e Lansbergen *et al.* (1995).

É de enorme importância que as células do *cumulus* estejam presentes após a aspiração, já que estas células apresentam grande participação na nutrição e crescimento ovocitário além de sua participação como indutor do mecanismo de capacitação espermática no processo de fertilização, o que torna fundamental a sua presença no momento da

fertilização (COX, HORMAZÁBAL ; SANTA MARÍA, 1993; CHIAN, OKUDA ; NIWA, 1995 e LIU *et al.*, 1995; ZHANG *et al.*, 1995).

Em um recente estudo Ward *et al.* (2000) observaram que pressões de sucção acima de 50mmHg são responsáveis por efeitos adversos, comprometendo a qualidade ovocitária. No entanto através dos resultados obtidos neste estudo observou-se que além da qualidade, a quantidade de ovócitos colhidos e outro fator influenciado pela pressão de sucção a qual é utilizada na técnica de OPU. Além disso, foi observado também que esta pressão de sucção está intimamente relacionada a o tipo de agulha utilizada para esta colheita corroborando com Ward *et al* (2000).

Bols *et al.* (1996b) propuseram que as células do *cumulus* podem ser perdidas através de forças mecânicas causadas pelo processo de aspiração, principalmente em casos nos quais as células do *cumulus* estiverem expandidas, o que facilita a remoção das mesmas ao redor dos ovócitos, além disso, ovócitos com células do *cumulus* expandidas, são indicativo de maturidade elevada dos ovócitos podendo estar até mesmo degenerado, o que de qualquer forma comprometeria a PIV posteriormente.

A ação mecânica de retirada destas células pode ser confundida em casos onde o ovócito originalmente possui poucas células do *cumulus* indicando que estas células pode ter originado-se de folículos pré-antrais ou antrais com isso possuem uma capacidade limitada de desenvolvimento. O que de qualquer forma irá diminuir os índices de fertilização e produção embrionária (AZELEGER *et al.*, 1995; BOLS *et al.* 1996b; SIRAD ; BLONDIN, 1996; GANDOLFI *et al.*, 1997).

Finalmente, existe ainda um outro caso em que as forças mecânicas da pressão podem eliminar as células do *cumulus*, realmente influenciando nas taxas de maturação e clivagem em um programa de PIV é o caso quando o ovócito possui uma quantidade normal de células do *cumulus*, sendo estas capazes de desenvolverem-se normalmente, mas devido à pressão elevada às células do *cumulus* são removidas mecanicamente comprometendo o desenvolvimento destes ovócitos (HAZELEGER *et al.*, 1995; BOLS *et al.* 1996b; SIRAD ; BLONDIN, 1996; GANDOLFI *et al.*, 1997 e HINRICHS ; WILIAMS, 1997).

Da mesma forma Manik; Singla; Palta (2003) puncionaram folículos de zebuínos (*Bos taurus indicus*) com bomba de vácuo calibrada em pressão de 90mmHg. Os autores relataram que esta pressão poderia ser responsável pela retirada das células do *cumulus* dos ovócitos colhidos, o que resultaria em uma classificação ovocitária errônea após a colheita dos mesmos.

6.1.3. Influência do tipo de agulha:

O tipo de agulha utilizada na técnica de *Ovum pick up*, apresentou um importante papel na recuperação tanto de ovócitos de modo geral quanto de ovócitos viáveis quando este é analisado separadamente. Neste experimento quando se modificou o diâmetro da agulha utilizada de 21G ½ para 19G ½ houve uma redução significativa dos ovócitos aspirados. Estes resultados são inversos aos conseguidos por Bols *et al.* (1996b) e Lansbergen *et al.* (1995) que afirmam que quanto maior o calibre da agulha maior será a proporção de ovócitos colhidos, com a utilização de agulha de menor calibre ocorre a perda se não do ovócito, das células do *cumulus*.

Entretanto a influência do calibre da agulha utilizada na colheita ovocitária quando analisada isoladamente, apresenta resultados variados conforme demonstrados por Fry *et al.* (1997) ao comparar a quantidade de ovócitos puncionados com agulhas do tipo 17G e 20G.

A maior proporção de ovócitos coletados utilizando a agulha de menor calibre (21G ½) foi semelhante à encontrada por Hashimoto *et al.* (1999) os autores afirmam que o diâmetro de 0,45mm observado na agulha do tipo 21G já é largo o suficiente para a colheita de ovócitos bovinos, não necessitando buscar a utilização de agulhas mais grossas, entretanto observaram que a utilização de agulha com calibre maior facilitou a sua manipulação no momento da aspiração folicular por esta ser mais rígida.

Fry *et al.* (1997) afirmam ainda que a praticidade e maior facilidade de manipulação ocasionada pelo uso da agulha de maior diâmetro, pode contribuir em alguns casos para melhorar a performance da colheita de ovócitos, o que não foi observado através dos resultados observados neste experimento.

6.1.4. Interação entre os diversos tratamentos (pressão e agulha) nos diferentes grupos.

Quando observada somente a quantidade de ovócitos viáveis ($3,68 \pm 2,98$), as médias de ovócitos obtidas neste experimento foram inferiores aos encontrados na literatura, como em Bousquet *et al.* (1999) que obtiveram uma média de $9,5 \pm 5,6$ ovócitos viáveis por colheita em animais taurinos.

A maior média de ovócitos viáveis encontradas neste experimento ($6,87 \pm 3,91$) foi obtida utilizando-se agulhas do tipo 21G ½ e pressão de sucção de 70mmHg. Estes achados concordam com os observados na literatura, onde diversos autores explicam que provavelmente isso ocorre, porque com a agulha mais fina o fluido folicular e o ovócito são aspirados com menor turbulência, no interior do sistema, que em operações realizadas com agulhas de diâmetro maiores que podem ocasionar assim a perda do ovócito e das células do *cumulus* (BOLS *et al.* 1996b; BOLS *et al.* 1997 e LANSBERGEN *et al.* 1995).

Quando a pressão foi diminuída para 55mmHg a maior média de ovócitos foi obtida com a utilização da agulha do tipo 19G ½, comprovando a íntima relação existente entre o tipo de agulha e a pressão da bomba de vácuo, sobre a quantidade de ovócitos aspirados através da técnica de OPU (BOLS *et al.* 1996b; BOLS *et al.* 1997 e LANSBERGEN *et al.* 1995).

6.2. PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES:

Neste experimento apenas 29,93% dos ovócitos que foram submetidos à FIV clivaram, estes dados estão bem abaixo dos 78,6% obtidos por Bousquet *et al.* (1999); 64,4% de clivagem encontrados por Galli *et al.* (2001) e dos 58,1% obtidos por Santl *et al.* (1998) em taurinos, próximo do intervalo entre 30 a 40% de eficiência encontrada por Eckert ; Niemann (1996); Massip *et al.* (1996); Goff ; Smith (1998); Krisher *et al.* (1999); Thompson (1999); Bavister (2000), e superiores quando comparados com Kruip *et al.* (1994) que obtiveram taxa de clivagem de 16%.

É importante observar que estas médias citadas na literatura estão relacionadas com embriões de animais taurinos e que comprovadamente estes levam um grande vantagem sobre os zebuínos no que diz respeito a produção embrionária (BARROS ; NOGUEIRA, 2001).

A taxa de mórulas ou blastocistos de 40,37% encontradas neste experimento foram superiores a de 27,1% obtidas por SantL *et al.* (1998) em animais *Bos taurus taurus*. A maior porcentagem de embriões produzidos em animais pertencentes ao Grupo I concordam com os achados de Takagi *et al.* (1998b), onde observaram que os fluídos retirados de folículos císticos possuem a capacidade de auxiliar na maturação dos ovócitos bovinos. Entretanto Takagi *et al.* (1998a) observaram que a presença de cistos foliculares nos ovários de vacas submetidas a OPU/PIV não influenciou na taxa de maturação.

7. CONCLUSÕES

- OS NÚMEROS OBTIDOS NESTE EXPERIMENTO DEMONSTRARAM QUE A UTILIZAÇÃO DAS TÉCNICAS DE OPU/PIV SÃO SATISFATÓRIAS NA RAÇA NELORE. APRESENTANDO GRANDE UTILIDADE NO PROLONGAMENTO DA VIDA REPRODUTIVA ÚTIL DE MATRIZES COM ALTERAÇÕES ADQUIRIDAS QUE INTERFEREM NA FERTILIDADE.
- DE ACORDO COM OS RESULTADOS OBTIDOS NESTE EXPERIMENTO, OBSERVOU-SE QUE A UTILIZAÇÃO DAS TÉCNICAS DE OPU/PIV SÃO VIÁVEIS EM VACAS NELORE COM PROBLEMAS REPRODUTIVOS.
- O TIPO DE AGULHA À SER UTILIZADA ESTÁ DIRETAMENTE LIGADA A PRESSÃO DE SUCÇÃO NA QUAL SERÁ PROCEDIDA A TÉCNICA.
- AS MELHORES MÉDIAS DE ASPIRAÇÃO OVOCITÁRIA FORAM CONSEGUIDAS UTILIZANDO-SE A AGULHA DE MENOR CALIBRE (21G ½) EM CONJUNTO COM A MAIOR PRESSÃO TESTADA (70MMHG). ESTES ACHADOS SÃO APLICADOS TAMBÉM PARA A OBTENÇÃO DA MAIOR QUANTIDADE DE OVÓCITOS VIÁVEIS.
- VERIFICOU-SE QUE O TIPO DE AGULHA QUE MENOS CAUSOU DANOS AO OVÓCITO, NESTE EXPERIMENTO, FOI A DO TIPO (19G ½). POIS APRESENTOU MAIOR PROPORÇÃO DE OVÓCITOS VIÁVEIS COLHIDOS COM ESTE TIPO DE AGULHA.
- NESTE EXPERIMENTO A PRESENÇA DE CISTOS FOLICULARES INFLUENCIOU SIGNIFICATIVAMENTE NA QUANTIDADE DE OVÓCITOS COLHIDOS. ALÉM DISSO, OBSERVOU-SE MENOR QUANTIDADE DE OVÓCITOS VIÁVEIS COLHIDOS DOS ANIMAIS PERTENCENTES A ESTE GRUPO.
- NO PRESENTE TRABALHO A OCORRÊNCIA DE CISTOS FOLICULARES INFLUENCIARAM NA QUANTIDADE DE OVÓCITOS VIÁVEIS COLHIDOS. SENDO OBSERVADO QUE VACAS NELORE COM CISTO FOLICULAR, APRESENTARAM MENOR QUANTIDADE DE OVÓCITOS VIÁVEIS.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ARMSTRONG, D. T. Recent advances in superovulation of cattle. **Theriogenology**, Elsevier, v.39, p. 7-24, 1993.

BARROS, C. M. ; NOGUEIRA, M. F. G. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, Elsevier, v. 56, p. 1483 – 1496, 2001.

BARROS, C. M.; FERNANDES, P.; NOGUEIRA, M. F. G. Controle farmacológico do ciclo estral e superovulação em Zebuínos de corte. **Resumo de Palestra**, Simpósio sobre Controle Farmacológico do ciclo estral em ruminantes, São Paulo, 31 de maio à 2 de junho de 2000, Fundação da Faculdade de medicina veterinária e zootecnia, USP, 2000, p. 158-189.

BAVISTER, B.D. Interactions between embryos and the culture milieu. **Theriogenology**, Elsevier, v. 53, p. 619-626, 2000.

BEN JEABRA, M. K.; CARRIÉRE, P. D.; PRICE, C. A. Decreased pulsatile LH secretion in heifers superovulated with eCG or FSH. **Theriogenology**, Elsevier, v. 42, p. 685-694, 1994.

BLONDIN, P.; et al. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. **Biology of reproduction**, v. 66, p. 38-43, 2002.

BLONDIN, P.; et al. Superovulation can reduce the developmental competence of bovine embryos, **Theriogenology**, Elsevier, v. 46, p. 1191-1203, 1996.

BLONDIN, P.; GUIBAULT, L. A.; SIRARD, M. A. The time interval between FSH-P administration and slaughter can influence the developmental competence of beef heifer oocytes. **Theriogenology**, Elsevier, v. 48, p. 803-13, 1997.

BÓ, G. A. Sincronización de celos para programas de inseminación artificial y transferencia de embriones bovinos, **Resumo de Palestra**, Simpósio sobre Controle Farmacológico do ciclo estral em ruminantes, São Paulo, 31 de maio à 2 de junho de 2000, Fundação da Faculdade de medicina veterinária e zootecnia, USP, 2000, p. 35-60.

BÓ, G. A.; et al. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and estradiol in cattle. **Animal Reproduction Science**, Elsevier, v. 39, p. 193-204, 1995a.

BÓ, G. A.; et al. Exogenous control of follicular development in cattle, **Theriogenology**, Elsevier, v. 43, p. 31-40, 1995b.

BÓ, G. A.; et al. Follicular wave dynamics after estradiol-17 β treatment of heifers with or without a progestogen implant. **Theriogenology**, Elsevier, v. 41, p. 1555-1569, 1994.

BOLAND, M.P.; GOULDING, D.; ROCHE, J. F. Alternative gonadotropins for superovulation in cattle. **Theriogenology**, Elsevier, v. 35, p. 5-17, 1991.

BOLS, P. E. J.; KRUIF, A. de, Bovine oocyte retrieval: which follicles to puncture?, 1997, 241p. **Summary of thesis** (Doctor in de Diergeneeskundige Wetenschappen), Faculteit Diergeneeskunde Universiteit Gent, Salisburylaan, p. 21- 48, 1997.

BOLS, P. E. J. Transvaginal ovum pick-up in the cow: technical and biological modifications. **Summary of thesis** (Doctor in de Diergeneeskundige Wetenschappen), Faculteit Diergeneeskunde Universiteit Gent, Salisburylaan, 1997, 228p.

BOLS, P. E. J.; VAN SOOM, A.; DE KRUIF, A. The use of transvaginal ovum pick-up: first OPU calves born in belgium. **Summary of thesis** (Doctor in de Diergeneeskundige Wetenschappen), Faculteit Diergeneeskunde Universiteit Gent, Salisburylaan, p. 141-152, 1997.

BOLS, P. E. J.; et al. Transvaginal oocyte pick-up in infertile Belgian Blue donor cows: preliminary results, **Theriogenology**, Elsevier, v. 45, p. 359, 1996a. (abstract).

BOLS, P. E. J.; et al, A. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes, **Theriogenology**, Elsevier, v. 45, p. 1001 – 1014, 1996b.

BORDIGNON, V.; et al. GnRH improves the recovery rate and the in vitro developmental competence of oocytes obtained by transvaginal follicular aspiration from superstimulated heifers, **Theriogenology**, Elsevier, v.48, p.291-298, 1997.

BORRAMEO, V.; et al. Growth hormone but not prolactin concentrations in the fluid of bovine ovarian cysts are related to the cystic stage of luteinization, **Theriogenology**, Elsevier, v.46, p. 481- 481, 1996.

BOSU, W. T. K.; PETER, A. T. Evidence for a role of intrauterine infections in the pathogenesis of cystic ovaries in postpartum dairy cows, **Theriogenology**, Elsevier, v. 28, p. 725- 736, 1987, (abstract).

BOUSQUET, D.; et al. In vitro embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. **Theriogenology**, Elsevier, v. 51, p. 59 – 70, 1999.

BRACKETT, B.G.; et al. Normal development following in vitro fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, v. 27, n. 1, p. 147-158, 1982.

BROADBENT, P. J.; et al. Effect of frequency of follicle aspiration on oocyte yield and subsequent superovulatory response in cattle, **Theriogenology**, Elsevier, v.47, p.1027-1040, 1997.

BUNGARTZ, L.; et al. Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotropin pretreatment and in different reproductive stages, **Theriogenology**, Elsevier, v. 43, p.667-675, 1995.

CALDER, M. D.; et al. Dominant bovine ovarian follicular cysts express increased levels of messenger RNAs for luteinizing hormone receptor and 3β -hydroxysteroid dehydrogenase 4, 5 isomerase compared to normal dominant follicles. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 471-476, 2001.

CALLENSEN, H.; GREVE, T. ; CHISTENSEN, F. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. **Theriogenology**, Elsevier, v.27, p.217, 1987.

CALLENSEN, H.; GREVE, T.; HYTTEL, P. Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle, v. 25, p. 71-86, 1986.

CARRIÈRE, P. D.; AMAYA, D.; LEE, B. Ultrasonography and endocrinology of ovarian dysfunctions induced in heifers with estradiol valerate, **Theriogenology**, Elsevier, v. 43, p. 1061- 1076, 1995.

CHIAN, R. C.; OKUDA, K.; NIWA, K. Influence of cumulus cells on in vitro fertilization of bovine oocytes derived from in vitro maturation, **Animal Reproduction Science**, Elsevier, v. 38, p.37- 48, 1995.

COOK, D. L.; et al. Secretory patterns of LH and FSH during development and hypothalamic and hypophyseal characteristics following development of steroid-induced ovarian follicular cysts in dairy cattle, **Journal of reproduction and fertility**, v. 91, p. 19-28, 1991.

COOK, D. L.; et al. Fate and turnover rate of ovarian follicular cysts in dairy cattle. **Journal of reproduction and fertility**, v. 90, p. 37-46, 1990.

COX, J. F.; HORMAZÁBAL, J.; SANTA MARÍA, A. Effect of the cumulus on in vitro fertilization of bovine matured oocytes, **Theriogenology**, Elsevier, v. 40, p. 1259 – 1267, 1993.

D'OCCHIO, M. J. Superstimulation of ovarian follicular growth with FSH, oocyte recovery, and embryo production from zebu (*Bos Indicus*) calves: effects of treatments with a GnRH agonist or antagonist, **Theriogenology**, Elsevier, v.49, p.1317-1329, 1998.

De LOOS, F. A. M.; et al. Follicular and oocyte maturation in cows treated for superovulation, **Theriogenology**, Elsevier, v. 35, p. 537-546, 1991.

De LOOS, F. A. M.; et al. Morphology of immature bovine oocytes. **Gamete Research**, v. 24, p. 197-204,1989.

DIELEMAN, S. J.; et al. PMSG/anti-PMSG in cattle: a simple and efficient superovulatory treatment?, **Theriogenology**, Elsevier, v. 39, p. 25-41, 1993.

DODE, M. A. N, et al. O. Efeito do tamanho do folículo na maturação nuclear e citoplasmática de ovócitos de fêmeas zebuínas, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 207-214, 2000.

DOLMAN, D. F.; et al, Effect of frequency of follicle aspiration on subsequent superovulation response in cattle, **Theriogenology**, Elsevier, v.43, p. 200, 1995. (Abstract).

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

DONALDSON, L. E. LH and FSH profiles at superovulation and embryo prouction in the cow, v. 23, p. 441-447, 1985.

DORN, C. G.; et al. Repeated, short interval superovulation in virgin heifers. **Theriogenology**, Elsevier, v.35, p. 302, 1991. abstract.

ECKERT, J. ; et al. In vitro maturation, fertilization and culture to blastocysts of bovine oocytes in protein-free media. **Theriogenology**, Elsevier, v. 43, p. 1211-1225, 1996.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), **Programa NTIA versão 4.2.1**. CTI:Campinas – SP, out. 1995.

FABER, D. C.; et al. Commercialization of animal biotechnology, **Theriogenology**, Elsevier, v.59, p.125-138, 2003.

FAO, Livestock numbers and products. Roma, 2001, Seção: Dados estatísticos. Disponível em: <<http://apps.fao.org/page/collections?subset=agriculture>>. Acesso em 12 dez. 2001.

FERRÉ, L. B.; et al. In vitro embryo production and pregnancy rates from problem and pregnant in cyclic cows by transvaginal ovum pick-up. **Theriogenology**, Elsevier, v. 57, p. 664, 2002.

FRY, R.C.; et al. The collection of oocytes from bovine ovaries. **Theriogenology**, Elsevier, v.47, p. 977-987, 1997.

GALLI, C.; LAZZARI, G. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. **Animal Reproduction Science**, Elsevier, v.42, p. 371-379. 1996.

GALLI, C.; et al. Embryo production by ovum pick up from live donors. **Theriogenology**, Elsevier, v. 55, p. 1341-1357, 2001.

GANDOLFI, F.; et al. The *in vitro* developmental competence of bovine oocytes can be related to the morphology of the ovary. **Theriogenology**, Elsevier, v.48, p. 1153 – 1160, 1997.

GARCIA, A.; SALAHEDDINE, M. Effects of repeated ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and subsequent follicular development. **Theriogenology**, Elsevier, v. 50, p. 575-585, 1998.

GARVERICK, H. A. Ovarian follicular cysts in dairy cows, **Journal of dairy science**, v. 80, p. 995 – 1004, 1997.

GOFF, A. K.; GREVE, T.; BOUSQUET, D. ; KING, W. A. Progesterone and luteinizing hormone profiles in heifers used as oocyte donors. **Theriogenology**, Elsevier, v. 26, p. 577-586, 1986.

GOFF, A.K. ; SMITH, L.C. Effect of steroid treatment of endometrial cells on blastocyst development during co-culture. **Theriogenology**, Elsevier, v. 49, p. 1021-1030, 1998.

GOODHAND, K. L.; et al. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors treated with progestagen, oestradiol and FSH. **Animal Reproduction Science**, Elsevier, v. 63, p.145-158, 2000.

GOODHAND, K. L.; et al. In vivo embryo recovery vs. in vivo oocyte recovery and in vitro embryo production: embryo yields and pregnancy rates in cattle. **Theriogenology**, Elsevier, v. 47, p.161, 1997.(abstract)

GOODHAND, K. L.; et al. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following FSH treatment. **Theriogenology**, Elsevier, v. 51, p. 951-961, 1999.

GORDON, I. **Laboratory Production of Cattle Embryos** (J Persley, ed.) CAB International, 1994.

GÜMEN, A.; et al. A GnRH/LH surge without subsequent progesterone exposure can induce development of follicular cysts. **Journal of dairy science**, V.85, p.43 – 50, 2002.

GUYADER-JOLY, C.; et al. Sources of variation of blastocyst production in a commercial ovum pick-up, in vitro embryo production program in dairy cattle. **Theriogenology**, Elsevier, V. 53, p.355, 2000.

HAHN, J. Attempts to explain and reduce variability of superovulation. **Theriogenology**, Elsevier, v.38, p. 269-275, 1992.

HAMILTON, S. et al. Characterization of ovarian follicular cysts and associated endocrine profiles in dairy cows. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 890 – 898, 1995.

HASHIMOTO, S.; et al. Ultrasound-guided follicle aspiration: The collection of bovine cumulus oocytes complexes from ovaries of slaughtered or live cows. **Theriogenology**, Elsevier, v. 51, p.757-765, 1999.

HASLER, J. F.; et al. Production freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. **Theriogenology**, Elsevier, v. 43, p. 141-152, 1995.

HAZELEGER, N. L.; et al. Relationship of morphology and follicular fluid environment of bovine oocytes to their developmental potential *in vitro*. **Theriogenology**, Elsevier, v.48, p. 509-522, 1995.

HILL, I. D. Precocidade: o caminho do lucro, **Revista brasileira de reprodução animal**, v. 20, p.99 – 105, 1996.

HINRICHS, K.; WILIAMS, K. A. Relationship among oocyte-cumulus morphology, follicular atresia, initial chromatin configuration, and oocyte meiotic competence in the horse. **Biology of Reproduction**, v. 57, p. 377-384, 1997.

HYTTEL, P; et al. Oocyte maturation and sperm transport in superovulated cattle, **Theriogenology**, Elsevier, v.35, p. 91-107, 1991.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2001, Seção:Idicadores conjunturais (agropecuária) Dados estatísticos. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em 12 ago. 2003.

KAFI, M; MCGOWAN, M. R. Factors associated with variation in the superovulatory response of cattle. **Theriogenology**, Elsevier, v.48, p. 137-157, 1997.

KHURANA, N.K.; NIEMANN, H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/ blastocyst formation of bovine embryos. **Theriogenology**, Elsevier, v. 54, p. 741-756, 2000.

KOHRAM, H.; et al. Alterations of LH release with delay of the LH surge affect embryo production in heifers superovulated with FSH, **Theriogenology**, Elsevier, v.51, p., 1999.

KRISHER, R.L.; LANE, M.; BAVISTER, B.D. Development competence and metabolism of bovine embryos cultured in semi-defined and defined culture media. **Biology of Reproduction**, n. 60, p. 1345-1352, 1999.

KRUIP, Th. A. M.; et al. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. **Theriogenology**, Elsevier, v.42, p.675-684, 1994.

LACAZE, S; et al. Centralized in vitro embryo production after ultrasound guided bovine oocyte collection: effects of parity and superovulation treatment. **Theriogenology**, Elsevier, v. 47, p.161, 1997. (abstract)

LANSBERGEN, L. M. T. E.; et al. Factors affecting ovum pick up in cattle, **Theriogenology**, Elsevier, v. 43, p.259, 1995.(Abstract)

LARSSON, B. **Distribution of spermatozoa in the bovine genital tract after artificial insemination: with special reference to the time and site of semen deposition and morphology of inseminated spermatozoa.** Swedish university of agricultural sciences: Uppsala, Sweden, 1988, 57p.

LIU, Y.; et al. The importance of cumulus cells on the in vitro production of bovine oocytes, **Theriogenology**, Elsevier, v. 43, p. 267, 1995, (abstract).

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

LOPATA, A.; et al. Collection of human oocytes at laparoscopy and laparotomy. **Fertility Sterility**, v. 25, 1975, p. 1030-1038.

LOPEZ RUIZ, L.; et al. Effect of body condition on the developmental competence of IVM/IVF bovine oocytes. **Theriogenology**, Elsevier, v. 45, p. 292. 1996. (Resumo)

MACIEL, M.; GUSTAFSSON, H.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Ovarian dynamics in superovulated heifers after embryo collection, **Congress Proceedings v.3**, 12th international congress on animal reproduction the Hague, netherlands, august 23rd – 27th1992 p. 1154.

MANIK, R. S.; SINGLA, S. K.; PALTA, P. Collection of oocytes through transvaginal ultrasound-guided aspiration of follicles in indian breed of cattle. **Animal Reproduction Science**, Elsevier, v. 76, p. 155-160, 2003.

MASSIP, A.; et al. Calving outcome following transfer of embryos produced in vitro in different conditions. **Animal Reproduction Science**, Elsevier, v. 44, p. 1-10, 1996.

MERTON, J. S.; et al. Factors affecting oocyte and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry, **Theriogenology**, Elsevier, v.59, p. 651-674, 2003.

NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R de L. Patologias de ovário. In: NASCIMENTO, E. F. ; SANTOS, R de L. **Patologia da reprodução dos animais domésticos**, 1^o Ed. p. 22-28, 108p. 1997.

NOGUEIRA, M. F. G.; et al. Embryo Recovery and pregnancy rates after delay of ovulation and fixed-time insemination in superstimulated nelore cows. **Theriogenology**, Elsevier, v. 53, p. 505, 2000. (abstract).

PEREZ, O.; et al. Ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery from FSH-treated post-partum beef cows. **Theriogenology**, Elsevier, v. 53, p.364, 2000.

PETER, A. T.; BOSU, W. T. K.; DE DECKER, R. J. Suppression of preovulatory luteinizing hormone surge in heifers after intrauterine infusions of Escherichia coli endotoxin. American journal of Veterinary Research, v. 50, p. 368-373, 1989 *apud*

WILTBANK, M. C. A new classification system for anovulatory conditions, III curso Novos enfoques na produção e Reprodução de Bovinos, Botucatu, 11 a 13 de março de 1999, **Anais**, Botucatu: Pfizer p. 12-24, 1999.

PIETERSE, M. C.; et al. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries, **Theriogenology**, Elsevier, v. 30, p. p. 751-762, 1988.

PRICE, C. A. Superovulatory treatments do not alter pulsatile LH secretion in ovariectomized cattle. **Theriogenology**, Elsevier, v. 43, p. 543-549, 1995.

PRICE, C. A.; et al. Effects of superovulation on endogenous LH secretion in cattle, and consequences for embryo production. **Theriogenology**, Elsevier, v.51, p. 37-46, 1999.

REIS, A.; et al. Embryo production using defined oocyte maturation and zygote culture media following repeated ovum pick-up (OPU) from FSH-stimulated Simmental heifers. **Animal Reproduction Science**, Elsevier, v. 72, p. 137-151, 2002.

ROBERGE, S.; RIEGER, D.; RAWLINGS, N. C. Periovulatory LH, FSH, and steroid hormone profiles in superovulated and unstimulated Holstein heifers. **Theriogenology**, Elsevier, v. 44, p. 59-70, 1995.

ROBERSON, M. S.; et al. Luteinizing hormone secretion and corpus luteum function in cows receiving two levels of progesterone. **Biology of Reproduction**, V. 41, p. 997-1003, 1989.

SANCHEZ, T.; et al. Pregnancy rate is greater when the corpus luteum is present during the period of progestin treatment to synchronize time of estrus in cows and heifers. **Biology of Reproduction**, v. 49, 1102-1107, 1993.

SANTL, B.; et al. Comparison of ultrasound-guided vs laparoscopic transvaginal ovum pick-up (OPU) in Simmental heifers. **Theriogenology**, Elsevier, v. 50, p. 89 – 100. 1998.

SAVIO, J. D.; et al. Effects of induction of low plasma progesterone concentrations with a progesterone-releasing intravaginal device on follicular turnover and fertility in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 98, p. 77-84, 1993.

SCHENK, S.L. Das saugthierei kunstlick befrucht ausserhalb des mutterthieres. Mitt. Embr. Inst. K.K. Univ. Wien, v. 1, p. 107. 1880 *apud* GORDON, I. Laboratory Production of Cattle Embryos (J Persley, ed.) **CAB International**, 1994.

SCHMIDT, M.; et al. Pregnancies, calves and calf viability after transfer of in vitro produced bovine embryos. **Theriogenology**, Elsevier, v. 46, p. 527-539, 1996.

SILVIA, W. J.; et al. Ovarian follicular cysts in dairy cows: An abnormality in folliculogenesis, **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 167-177, 2002.

SIRAD, M. A.; BLONDIN, P. Oocyte maturation and IVF in Cattle. **Animal Reproduction Science**, Elsevier, v. 42, p. 417-426, 1996.

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

TAKAGI, M.; et al. Oocyte quality of small antral follicles coexisting with cystic follicles in the ovaries of the cow, **Animal Reproduction Science, Elsevier**, v.51, p. 195-203, 1998a.

TAKAGI, M.; et al. Evaluation of fluids from cystic follicles for in vitro maturation and fertilization of bovine oocytes, **Theriogenology**, Elsevier, v. 50, p. 307-320, 1998b.

THOMPSON, J.G. Cultura in vitro de embriões bovinos: novas técnicas e conseqüências pós-transferência. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, v. 27, n. 1, p. 133-146, 1999 (Supplement).

TRIBULO, H. E.; et al. Estrus synchronization in cattle with estradiol-17 β and CIDR-B vaginal devices, **Theriogenology**, Elsevier, v. 43, p.340, 1995, (abstract).

VAN SOOM, A.; BOLS, P. E. J. ; DE KRUIF, A. Improved results in IVF-treatment of sterility patients by careful selection of bulls and by stimulation of cows with FSH before slaughter, **Reproduction in Domestic Animals**, v. 3, p. 67, 1995, (abstract).

WAGTENDONK – DE – LEEUW, A. M.; et al. Effects of different reproduction techniques: AI, MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. **Theriogenology**, Elsevier, v. 53, p. 575-597, 2000.

WARD, F.A.; et al. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production in vitro using ovum pick-up technology, **Theriogenology**, Elsevier, v.53, p. 433-446, 2000.

WEHRMAN, M. E.; et al. Increasing exogenous progesterone during synchronization of estrus decreases endogenous 17 β -estradiol and increases conception in cows. **Biology of Reproduction**, v.49, p.214-220, 1993.

ZHANG, L.; et al. Cumulus cell function during bovine oocytes maturation, fertilization and embryo development in vitro, **Molecular Reproduction Development**, v. 40, p. 338 – 344, 1995.

Anexo 01 – Classificação ovocitária segundo De LOOS *et al.* (1989).

Tipo Ovócito	Descrição
Grau I	<ul style="list-style-type: none">- Revestido com várias camadas de <i>cumulus</i> compacto- Ovoplasma homogêneo- COC claro e transparente
Grau II	<ul style="list-style-type: none">- Revestido com várias camadas de <i>cumulus</i> compacto- Ovoplasma menos homogêneo que anterior com alguns pontos escuros na periferia dos ovócitos- COC levemente escuro e menos transparente
Grau III	<ul style="list-style-type: none">- Revestimento de <i>cumulus</i> menos compacto- Ovoplasma irregular com vários pontos escuros- COC mais escuro que os de grau I e II
Grau IV	<ul style="list-style-type: none">- Revestimento de <i>cumulus</i> expandido- Ovoplasma irregular com vários pontos escuros- COC escuro e irregular

Anexo 02 – Variâncias e teste de significância obtidas para as variáveis de ovócito, ovócitos desnudos, ovócitos viáveis, % viáveis e % clivagem.

Fonte de variação	GL	Variâncias				
		Ovócitos (média total)	Ovócitos Desnudos	Ovócitos Viáveis (média viáveis)	% Viáveis	% clivagem
Presença de Cisto (C)	1	10,9048**	0,0678 ^{NS}	8,4415**	463,2812 ^{NS}	1378,0282 ^{NS}
Pressão de Sucção (P)	1	0,1691 ^{NS}	0,3543 ^{NS}	0,3041 ^{NS}	582,3914 ^{NS}	45,6033 ^{NS}
Calibre da Agulha (A)	1	7,8952**	2,0255**	2,5938*	5327,5637**	1528,2984 ^{NS}
Interação (C) e (P)	1	0,3230 ^{NS}	0,0351 ^{NS}	0,1927 ^{NS}	850,4027 ^{NS}	654,9842 ^{NS}
Interação (C) e (A)	1	0,1291 ^{NS}	0,8415 ^{NS}	0,0289 ^{NS}	3020,3581*	4272,6787*
Interação (P) e (A)	1	6,8735**	0,1175 ^{NS}	3,8472**	628,8921 ^{NS}	1617,2642 ^{NS}
Interação (C), (P) e (A)	1	3,4418*	0,0253 ^{NS}	2,4155*	97,5188 ^{NS}	85,5758 ^{NS}
Resíduo	138	0,6807	0,2250	0,4084	647,0084	1070,8313
Média Geral		5,90	1,19	3,68	64,29	34,02
Coeficiente de Variação (%)		34,76	39,60	33,33	40,78	94,20

NS = não significativo, $p \geq 0,05$

* = significativo à 5%, $p < 0,05$

** = significativo à 1%, $p < 0,01$

Anexo 03 – Substâncias utilizadas na Produção *in vitro* de embriões.

Substância	Laboratório	Número
SFB	GIBCO	BRL 1043-028
Penicilina	SIGMA	P-7794
Gentamicina	SIGMA	G-1264
17-β estradiol	SIGMA	E-2758
Piruvato	SIGMA	P-3662
Óleo Mineral	SIGMA	M-8410
Glicina	SIGMA	G-6388
Alanina	SIGMA	A-7627
BSA	SIGMA	A-6003
Percoll	SIGMA	P-4937
Heparina	SIGMA	H-3149
Penicilamina	SIGMA	P-4875
Hipotaurina	SIGMA	H-1364
Epinefrina	SIGMA	E-4250
CaCl ₂ 2H ₂ O	SIGMA	C-7902
KCl	SIGMA	P-5405
KH ₂ PO ₄	SIGMA	P-5655
MgCl ₂	SIGMA	M-2393
MgSO ₄ 7H ₂ O	SIGMA	M-2643
NaCl	SIGMA	S-5886
NaHCO ₃	SIGMA	S-4019
NaH ₂ PO ₄	SIGMA	S-5011
Vermelho Fenol	SIGMA	P-5530
Ácido Purúvico	SIGMA	P-3662
Meio 199	SIGMA	M-2154
Ácido Lático (60%)	SIGMA	L-4263

Anexo 04 – Protocolo de preparo da solução de PBS.

- TAMPÃO SALINO FOSFATADO (PBS)

Componentes	1000ml
NaCl	8,0000g
KCl	0,2000g
KH ₂ PO ₄	0,2000g
Na ₂ HPO ₄	2,1600g
H ₂ O Milli-Q	1000ml
AUTOCLAVAR	
Penicilina	0,0300g
Estreptomicina	0,0500g

Anexo 05 – Protocolo de preparo das soluções utilizadas na Produção *in vitro* de embriões.

- MEIO DE LAVAGEM antes da MIV (H - 199)

Componentes	10 mL	30 mL
TCM - 199 (HEPES)	9 mL	27 mL
SFB	1 mL	3 mL
Piruvato	20 µL	60 µL
Penicilina	50 µL	150 µL
Gentamicina	50 µL	150 µL

Obs.: - Ajustar o pH para 6.9 a 7.2 e filtrar em Millipore de 0,22 µm.

- Levar à estufa de CO₂, com a tampa fechada, para equilibrar a temperatura.

- MEIO DE MATURAÇÃO (B - 199)

Componentes	5 mL	10 mL
TCM – 199 (Bicarbonato)	4,5 mL	9 mL
SFB	0,5 mL	1 mL
Piruvato	10 µL	20 µL
Penicilina	25 µL	50 µL
Gentamicina	25 µL	50 µL
FSH	50 µL	100 µL
LH	50 µL	100 µL
	FILTRAR 0,22 µm	
Estradiol	5 µL	10 µL

Obs.: - Ajustar o pH para 7.8 a 7.9 e filtrar em Millipore de 0,22 µm antes de acrescentar o estradiol.

- Levar à estufa de CO₂ com a tampa semi-aberta, por no mínimo 2 h, para equilibrar pH e temperatura.

- MEIO DE CULTIVO (CR2)

Componentes	5 mL	10 mL
CR2 Stock	4,4 mL	8,8 mL
SFB	0,5 mL	1 mL
Alanina Stock	50 µL	100 µL
Glicina Stock	50 µL	100 µL
Penicilina	25 µL	50 µL
Gentamicina	25 µL	50 µL
BSA	0,0150 g	0,0300 g

Obs.: - Filtrar em Millipore de 0,22 µm e levar à estufa de CO₂, por no mínimo 2 h, para equilibrar pH e temperatura.

- MEIO DE LAVAGEM (H - BSA)

Componentes	5 mL	10 mL
TCM - 199 (HEPES)	5 mL	10 mL
BSA	0,0150 g	0,0300 g
Piruvato	10 µL	20 µL
Penicilina	25 µL	50 µL
Gentamicina	25 µL	50 µL

Obs.: - Ajustar o pH para 6.9 a 7.2 e filtrar em Millipore de 0,22 µm.

- Levar à estufa de CO₂, com a tampa fechada, para equilibrar a temperatura.

- TL STOCK

Componentes	Concentração (mM)	100 mL
NaCl	114	0,6660 g
KCl	3,22	0,0240 g
MgCl ₂ . 6 H ₂ O	0,5	0,0100 g
NaH ₂ PO ₄	0,34	0,0041 g
NaHCO ₃	25	0,2100 g
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	2	0,0300 g
Ácido Láctico 60%	16	143 µL
Vermelho de Fenol <i>Stock</i>	-	~ 0,5 mL
H ₂ O Milli-Q (q.s.p.)	-	100 mL

Obs.: - Ajustar o pH para 7.4 antes de acrescentar o vermelho de fenol stock.

- Filtrar em Millipore de 0,22 µm e conservar a 4° C por 15 dias.

- TL SÊMEN

Componentes	Concentração (mM)	100 mL
NaCl	99,6	0,5820 g
KCl	3,08	0,0230 g
MgCl ₂ . 6 H ₂ O	0,4	0,0080 g
NaH ₂ PO ₄	0,29	0,0035 g
NaHCO ₃	25	0,2100 g
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	2	0,0300 g
Ácido Láctico 60%	35	310 µL
Hepes - Ácido	99,6	0,2380 g
Vermelho de Fenol <i>Stock</i>	-	~ 0,5 mL
H ₂ O Milli-Q (q.s.p.)	-	100 mL

Obs.: - Ajustar o pH para 7.4 antes de acrescentar o vermelho de fenol stock.

- Filtrar em Millipore de 0,22 µm e conservar a 4° C por 15 dias.

- SOLUÇÃO DE PERCOLL 90%

Componentes	4 mL
PERCOLL	3600 μ L
SOLUÇÃO 10 X	400 μ L
CaCl₂ - 1M	8 μ L
MgCl₂ - 0,1M	15,6 μ L
ÁCIDO LÁCTICO 60%	14,8 μ L
NaHCO₃	0,0084 g

Obs.: - Centrifugar por 5 minutos na marca 2 da centrífuga.

- SOLUÇÃO DE PERCOLL 45%

Componentes	2 mL
PERCOLL 90%	1 mL
TL STOCK	1 mL

- COLUNA DE PERCOLL (45/90%)

Componentes	4 mL
PERCOLL 90%	2 mL
PERCOLL 45%	2 mL

Obs.: - Colocar em um tubo de centrífuga a solução de Percoll a 45% e em seguida adicionar cuidadosamente a solução de Percoll a 90%.