INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO AMAZONAS

CAMPUS MANAUS ZONA LESTE

CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

LAIS ALMEIDA GOMES

TÉCNICA DE ASPIRAÇÃO FOLICULAR GUIADA POR ULTRASSOM (Ovum Pick Up – OPU) EM BOVINOS E EQUINOS: REVISÃO DE LITERATURA

MANAUS – AM

2021

LAIS ALMEIDA GOMES

TÉCNICA DE ASPIRAÇÃO FOLICULAR GUIADA POR ULTRASSOM (Ovum Pick Up – OPU) **EM BOVINOS E EQUINOS: REVISÃO DE LITERATURA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso Superior de Medicina Veterinária, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Campus Manaus Zona Leste, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo de Souza Amaral

MANAUS – AM

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

G633t Gomes, Lais Almeida.
Técnica de aspiração folicular guiada por ultrassom (ovum pick up – opu) em bovinos e equinos: revisão de literatura. / Lais Almeida Gomes. -- Manaus, 2021.
31f.; il : color, 30 cm

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas – Campus Manaus Zona Leste, Curso de Medicina Veterinária, 2021.

Orientador: Prof. Rodrigo de Souza Amaral.

1. Biotecnologias. 2. Coleta de oócitos. 3. Melhoramento genético. I. Amaral, Rodrigo de Souza. II. Título.

CDD – 636.213 08926

Elaborada por Diego Leonardo de S. Fonseca – CRB 11/828

LAIS ALMEIDA GOMES

TÉCNICA DE ASPIRAÇÃO FOLICULAR GUIADA POR ULTRASSOM (Ovum Pick Up – OPU) EM BOVINOS E EQUINOS: REVISÃO DE LITERATURA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso Superior de Medicina Veterinária, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Campus Manaus Zona Leste, como requisito para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo de Souza Amaral

Aprovado em 24 de setembro de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. RODRIGO DE SOUZA AMARAL

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM)

Profa. Me. FERNANDA AMARANTE MENDES DE OLIVEIRA

Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM)

Med. Vet. MAYARA FONSECA FERREIRA

Universidade Estadual Paulista (UNESP-BOTUCATU)

MANAUS – AM

2021

Aos meus pais, irmãos e amigos pelo incentivo constante.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas (IFAM), pela oportunidade e o privilégio da realização do curso de Medicina Veterinária.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Rodrigo de Sousa Amaral, por me aceitar como sua orientada, pela amizade, confiança, incentivo, ensinamentos, por transmitir tranquilidade e segurança em meio às minhas preocupações profissionais.

Aos professores do IFAM, pela transmissão do conhecimento, pelos esforços em garantir o nosso aprendizado e preocupações em nos fazer bons médicos veterinários.

Aos lugares onde tive a oportunidade de realizar estágio, pelos momentos de aprendizado, por possibilitar que eu pudesse praticar a veterinária e pela contribuição com o meu desenvolvimento profissional.

Aos amigos que fiz durante a graduação pelos apoios mútuos, por dividirem essa experiência, e pôr tornarem tudo mais leve e suportável, em especial Jamires e Ananda, que fazem parte do grupo de pessoas mais valiosas que tenho ao meu lado.

Aos amigos da biotecnologia (Edson, Adriane), pelo incentivo, por embarcarem nos meus projetos e ideias relacionadas a aliar nossas áreas de conhecimento.

A minha família, por entender, me apoiar, financiar meus estágios fora do estado, me sustentar em grande parte do tempo da graduação para que eu pudesse frequentar as aulas, e por me aturarem falando de vaca e de cabra o tempo todo em casa.

A Deus, que possibilitou tudo.

RESUMO:

A pecuária nacional obtém contínuo e rápido desenvolvimento econômico com o avançar das técnicas de biotecnologias reprodutivas. Estas permitem o aumento da produção de animais que possuem características de alto interesse ao mercado. A aspiração folicular guiada por ultrassom (Ovum Pick Up - OPU) é uma biotécnica bastante utilizada em grandes animais com o intuito de acelerar o melhoramento genético no rebanho. Essa consiste na obtenção de oócitos de fêmeas com alto valor agregado, para que possam ser utilizados para a produção de embrião em laboratório e disseminação rápida de genética específica. As éguas e vacas são os animais em que a técnica tem sido mais explorada e tem gerado excelentes resultados para a produção. As etapas pertencentes à técnica de aspiração folicular *in vivo* consistem em seleção das fêmeas doadoras dos oócitos e preparação prévia, organização do material e equipamentos no dia da aspiração, anestesia e assepsia, procedimento de aspiração, cuidados pós aspiração, e rastreamento e seleção dos oócitos coletados. A maioria desses passos são realizados tanto em equinos como em bovinos. Porém, tendo em vista as particularidades fisiológicas e reprodutivas dentre essas duas espécies, as etapas acontecem de formas diferentes. Este trabalho tem como objetivo descrever a biotécnica reprodutiva de OPU, apresentar as etapas do processo, ressaltando as diferenças metodológicas que são adotadas para a utilização dessa técnica tanto em bovinos como em equinos.

Palavras-chave: Biotecnologias. Coleta de oócitos. Melhoramento genético.

ABSTRACT:

The national cattle raising obtains continuous and rapid economic development with the advancement of reproductive biotechnology techniques. These allow the possibility of increasing the production of animals that have characteristics of high interest. Ultrasound-guided follicular aspiration (Ovum Pick Up - OPU) is a widely used biotechnique in large animals with the aim of genetic improvement in the herd. This consists of obtaining oocytes from females with high added value, so that they can be used for the production of embryos in the laboratory and for the rapid dissemination of specific genetics. Mares and cows are the animals in which the technique has been most explored and has generated excellent results. The steps pertaining to the in vivo follicular aspiration technique consist of selection of oocyte donor females and prior preparation, organization of material and equipment on the day of aspiration, anesthesia and asepsis, aspiration procedure, post aspiration care, and oocyte tracking and selection collected. Most of these steps are performed in both horses and cattle. However, in view of the physiological and reproductive particularities between these two species, the steps take place in different ways. This work aims to describe the reproductive biotechnique of OPU, present the stages of the process, highlighting the methodological differences that are adopted for the use of this technique in both cattle and horses.

Keywords: Biotechnologies. Oocyte collection. Genetical enhancement.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema das estruturas ovarianas em vacas e éguas. 13
Figura 2 - Guia de aspiração 16
Figura 3 - Sistema montado para aspiração folicular 17
Figura 4 - Materiais usados a campo na aspiração folicular 18
Figura 5 - Aspiração folicular em vacas 20
Figura 6 - Lavagem de folículo ovariano em égua 21
Figura 7 - Oócitos bovinos (A) e equinos (B) 22

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 10

2. HISTÓRICO DA TÉCNICA DE OPU 11

3. MORFOFISIOLOGIA OVARIANA EM VACAS E ÉGUAS 12

4. ASPIRAÇÃO FOLICULAR GUIADA POR ULTRASSONOGRAFIA (OVUM PICK UP – OPU) EM ÉGUAS E VACAS 15

4.1 Princípios básicos da técnica 15

4.2 Seleção e preparo das fêmeas 15

4.3 Material para aspiração 15

4.4 Anestesia e Assepsia 18

4.5 Aspiração 20

4.6 Procedimentos pós – aspiração 21

4.7 Rastreamento e seleção dos oócitos 22

4.8 Frequência de aspiração e riscos do procedimento 23

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS 25

6. REFERÊNCIAS 26

1. INTRODUÇÃO

A pecuária nacional obtém continuamente um rápido desenvolvimento econômico com o avançar das técnicas de biotecnologias reprodutivas (VELOSO NETO et al., 2014; MELLO et al., 2016). Estas permitem o aumento da produção de animais que possuem características de alto interesse ao mercado (GONÇALVES et al., 2007, LUEDKE et al., 2019). Um dos maiores objetivos na pecuária é a produção em maior quantidade e em pouco tempo, de animais considerados superiores geneticamente, seja por seu fornecimento produtivo (carne, leite) ou seu desempenho esportivo (rodeio, hipismo). Dessa forma, esses animais são encaminhados para a reprodução e os procedimentos de coleta de gametas, tanto em machos como em fêmeas, para produção de embrião *in vitro* em larga escala, tem ajudado a disseminar a implementação de melhoramento genético nos rebanhos das propriedades (RODRIGUES, 2006; GONÇALVES et al., 2007).

No caso das fêmeas, a técnica mais utilizada em equinos e em bovinos para a obtenção de oócitos de animais vivos para a produção *in vitro* de embrião (PIVE) é conhecida como aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom - Ovum Pick Up – OPU (RODRIGUES, 2006; CARNEIRO, 2016). Esta biotécnica reprodutiva permite que seja coletado vários oócitos de uma só vez por fêmea, em qualquer fase que ela se encontre do ciclo estral, e por conseguinte, gerar um grande aproveitamento genético deste animal (GONÇALVES, et.al., 2007; OLIVEIRA, 2014). Além disso, quando a técnica é realizada de forma adequada não há ocorrência de prejuízo fisiológico ou morfológico à fêmea, e esta pode ser fonte de genética de alto valor por muitos anos (VANDERWALL et.al., 2002; VIANA et.al., 2004).

A OPU em bovinos e equinos obedece o mesmo princípio e praticamente as mesmas etapas no procedimento. Contudo, as etapas dessa colheita possuem métodos diferentes a serem realizados entre essas duas espécies, devido às particularidades fisiológicas e anatômicas, como por exemplo: diferenças do ciclo estral, na organização das estruturas ovariana e comportamento folicular, na sensibilidade à anestesia, necessidade de maiores preocupações antes e pós-técnica, dentre outros.

Portanto, o conhecimento do funcionamento e das diferenças reprodutivas entre as éguas e as vacas é de extrema importância para o manejo da técnica de aspiração por OPU e garantir o sucesso na obtenção e na qualidade dos oócitos, assim como preservar a longevidade da vida reprodutiva dessas fêmeas. Este trabalho tem como objetivo descrever a biotécnica reprodutiva de OPU, apresentando as etapas do processo e ressaltando as diferenças metodológicas que são adotadas para a utilização dessa técnica tanto em bovinos como em equinos.

2. HISTÓRICO DA TÉCNICA DE OPU

Antes do surgimento da técnica de OPU nos animais, os oócitos de vacas e éguas eram aspirados e coletados por meio de procedimentos como a colpotomia, laparotomia ou com a inserção transcutânea de agulha pelo flanco guiada com ultrassom (VOGELSANG et al., 1986; PALMER et. al., 1987), procedimentos desfavoráveis por serem cirúrgicos, invasivos e por causa das complicações, tempo e custo (LUEDKE F.E. et al.,2019). Em equinos, a aspiração folicular transcutânea foi a técnica que permitiu pela primeira vez que os oócitos fossem recuperados com as éguas em estação, utilizando a palpação retal para posicionamento do ovário na direção do flanco, tendo o seu primeiro relato no ano de 1987 (PALMER et al., 1987).

A técnica de aspiração folicular por punção vaginal guiada por ultrassom foi primeiramente desenvolvida para ser utilizada em mulheres em procedimentos de fertilização *in vitro* (LENZ et al., 1987). Um ano depois, Pieterse e Kappen (1988) conseguiram adaptar a técnica e aplicá-la em bovinos, publicando o primeiro relato da realização de aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia em vacas. Este se tornou rapidamente um procedimento de sucesso devido às técnicas anteriores utilizadas para a coleta de oócitos de vacas serem consideradas bastante invasivas e traumáticas (VOGELSANG et al., 1986). Dessa forma, no início da década de 90, a introdução dessa técnica, juntamente com a produção *in vitro* de embriões, gerou a expectativa no aumento da produção de fêmeas bovinas para a reprodução (RENESTO, 2004). Em éguas, a aspiração folicular por punção vaginal começou a ser utilizada no início da década de 90, com o surgimento do primeiro relato descrevendo sobre a utilização dessa técnica em éguas cíclicas em 1992 (BRUCK et.al., 1992), o qual apesar de conseguir recuperar um oócito de quatro folículos aspirados, a técnica se mostrou segura, prática e rápida nesses animais, e desde então o método tem sido aprimorado (RODRIGUES, 2007).

Em 1993, no Brasil surgiu o primeiro bezerro produzido *in vitro*, e o nascimento dos primeiros produtos oriundos da associação da tecnologia de aspiração folicular guiada por ultrassonografia com a fertilização *in vitro* ocorreu no ano de 1996, sendo marcos históricos para a PIVE (PEIXER et al., 1997). Estes se tornaram pontos de partida para a ascensão da PIVE associada à técnica de aspiração folicular guiada por ultrassonografia no país (PEIXER et al., 2006).

Em 2017 foi o período em que a tecnologia de PIVE juntamente com a aspiração folicular se tornou consolidada, onde a quantidade de embriões bovinos produzidos *in vitro* ultrapassaram a taxa dos embriões *in vivo* (VIANA, et al., 2012), sendo utilizada como técnica de eleição

também em animais de raças taurinas, e para aptidão leiteira (VIANA et al., 2012; GONÇALVES E VIANA, 2019).

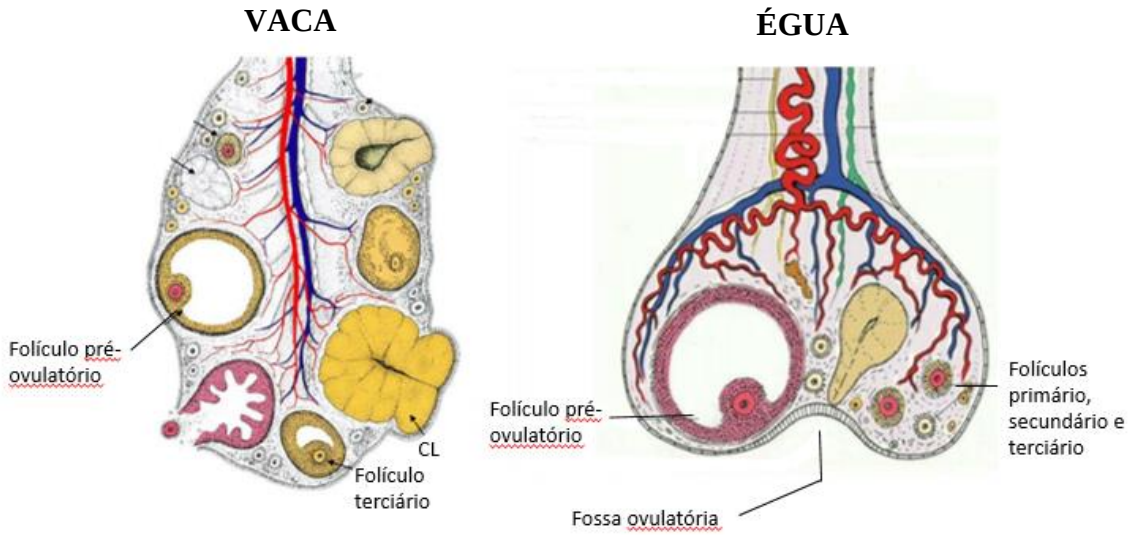
3. MORFOFISIOLOGIA OVARIANA EM VACAS E ÉGUAS

Para a aplicação da técnica de aspiração folicular guiada por ultrassom é obrigatório o conhecimento sobre o funcionamento anatômico e fisiológico reprodutivo das fêmeas. Deve-se entender sobre quais estruturas podem ser encontradas nos ovários e o funcionamento de sua dinâmica folicular para compreender quais os eventos responsáveis pelo crescimento folicular e produção de oócitos (HAFEZ & HAFEZ, 2004). Dessa forma, pode-se identificar os momentos adequados para a aplicação da técnica, visando o período de melhor aproveitamento folicular e respeitando o ciclo reprodutivo da fêmea.

Os ovários são órgãos de consistência densa, localizados na cavidade abdominal com funções principais de produzir gametas feminino e hormônios (SENGER, 2004). O formato e tamanho dos ovários variam de acordo com a espécie animal e com a fase do ciclo estral. Em bovinos os ovários tem formato de amêndoas enquanto que em equinos tem formato de feijão devido a presença da fossa ovulatória (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

A organização do ovário consiste na divisão em duas regiões conhecidas como córtex e medula, que possuem diferenças morfológicas entre vacas e éguas (Figura 1). Nas vacas o córtex se localiza na região mais externa do ovário, onde se encontra a população de folículos e o corpo lúteo, enquanto que a medula fica na região central onde estão inseridos os nervos e vasos sanguíneos e linfáticos (SENGER, 2004). Nas éguas, a medula ovariana e córtex apresentam posicionamento reverso ao das vacas, onde medula se localiza na região mais externa e córtex na interna (SENGER, 2004). Além disso, a ovulação nas éguas acontece em um local exclusivo do ovário (fossa ovulatória), enquanto que nas vacas a ovulação pode acontecer de forma aleatória em qualquer região do córtex. Outra diferença é em relação a palpação das estruturas ovariana em éguas, sendo possível a palpação de folículos por via retal, porém, não do corpo lúteo devido a tendência dessa estrutura de crescer adentrando o ovário depois de formada e não ficar proeminente como acontece em vacas (SENGER, 2004). A identificação dessas estruturas que se encontram no ovário, seja por palpação ou ultrassonografia retal, pode determinar a fase reprodutiva em que a fêmea se encontra (SENGER, 2004).

Figura 1 - Esquema das estruturas ovarianas em vacas e éguas.



Fonte: Konig e Liebich (2004)

O processo de formação dos folículos ovarianos nas fêmeas se inicia no período fetal (terço inicial da gestação) com a multiplicação das células germinativas. A fêmea bovina nasce com média de 100.000 folículos primordiais no ovário (FERREIRA et.al., 2004), enquanto que a equina tem cerca de 40.000 (ULIANI, 2012), os quais ficam em estado quiescente com os oócitos em estágio de diplóteno da prófase I. A capacidade de liberação desses gametas surge na puberdade, que devido ao estímulo hormonal, há a possibilidade da ovulação, com a formação de um ciclo luteínico normal (HAFEZ & HAFEZ, 2004). A produção e liberação de hormônios reprodutivos nesses animais levará ao desenvolvimento dos folículos até a ovulação. Há diversos elementos que afetam o período de início da puberdade nas fêmeas. Em bovinos, a puberdade acontece em uma média de animais com 15 meses de idade, enquanto que em equinos é por volta de dois anos. Porém, este período pode variar bastante, dependendo da estrutura corporal do animal, peso, raça, manejo nutricional, e estação do ano no caso de equinos (MCKINNON & VOSS, 1993; HAFEZ & HAFEZ, 2004).

As vacas e éguas são fêmeas poliéstricas, porém, as vacas de período contínuo e as éguas são sazonais de dias longos (HAFEZ & HAFEZ, 2004). Ambas as espécies possuem a fase de ciclo estral com duração em média de 21 dias, que pode ser dividido em fase folicular e fase luteal (SENGER, 2004). A fase folicular se caracteriza pelo momento em que há elevada liberação de hormônios gonadotróficos (FSH, LH), além de GnRH, e alta produção de estradiol pelas células da granulosa, induzindo os sinais de cio. Além da receptividade sexual, nessa fase

acontece o crescimento e desenvolvimento folicular e termina com a ovulação (SENGER, 2004). A fase luteal se inicia a partir do processo de ovulação e consiste na formação e desenvolvimento do corpo lúteo, o qual secreta progesterona, preparando o ambiente uterino do animal para uma possível gestação. Caso contrário, acontece a liberação de prostaglandina pelo útero, ocasionando luteólise e permitindo que os hormônios do hipotálamo e hipófise sejam liberados em maior quantidade para iniciar novo recrutamento folicular e ciclo estral (HAFEZ & HAFEZ, 2004; SENGER, 2004). Nas vacas a fase folicular dura em média 5 dias e a fase luteal 16 dias (HAFEZ & HAFEZ, 2004) Nas éguas a fase folicular tem em média 7 dias, porém, pode haver grande variabilidade de duração, devido aos folículos serem bastante sensíveis ao fotoperíodo. A fase luteal é mais regular com duração entre 14 e 15 dias (SENGER, 2004).

Nas vacas, a cada ciclo estral há crescimento de 2 a 3 ondas foliculares, onde em cada uma há o recrutamento de cerca de 10 a 50 folículos, que vão crescendo em conjunto até a seleção e ovulação de somente um deles (FERREIRA et.al., 2004; OLIVEIRA et al., 2010). Este se caracteriza por ser o folículo dominante, o qual, além de ter a capacidade de liberar um oócito, também impede que os outros folículos cresçam e ovulem, e portanto, entram em atresia. Nas éguas, o ciclo estral contem de uma a duas ondas em formação (GINTHER, 2000), que são classificadas em ondas maiores (folículos dominantes e subordinados) e ondas menores (ausência de folículos dominantes) (OLIVEIRA et al., 2010). Durante a emergência folicular, cerca de 7 a 11 folículos crescem em paralelo até um deles alcançar primeiramente 20 mm, se tornando folículo dominante na maioria das vezes (GINTHER, 2000).

Os folículos que são puncionados e aspirados no processo de OPU são aqueles que tiveram a formação do liquido folicular (antro) e por isso, possíveis de ver por ultrassonografia. Esses consistem em folículos antrais, com tamanho de cerca de 2 a 3 mm (FERREIRA et.al., 2004, VIANA E BOLS, 2005). O diâmetro do folículo pré-ovulatório em animais *Bos indicus* é de 11 a 13 mm e em *Bos taurus* é de 15 a 20 mm. Em equinos, o folículo pré-ovulatório atinge um diâmetro com uma média de 45 mm, podendo variar de 35 a 60 mm (GINTHER, 2000).

4. ASPIRAÇÃO FOLICULAR GUIADA POR ULTRASSONOGRAFIA (OVUM PICK UP – OPU) EM ÉGUAS E VACAS

4.1 Princípios básicos da técnica

A aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU) é uma técnica que conta com o auxílio de ultrassonografia com o uso de uma sonda microconvexa, a qual é acoplada à guia de aspiração juntamente com a agulha, para direcionar a punção folicular no ovário e coletar os oócitos (STROEBECH et al., 2015). O procedimento envolve várias etapas que consistem basicamente em: seleção das fêmeas doadoras dos oócitos e preparação prévia das mesmas, organização do material e equipamentos no dia da aspiração, anestesia e assepsia, procedimento de aspiração, cuidados pós aspiração, e rastreamento e seleção dos oócitos coletados.

4.2 Seleção e preparo das fêmeas

Na espécie bovina, além das vacas cíclicas, é possível obter oócitos viáveis por essa técnica em novilhas a partir de 6 meses de idade, em vacas gestantes até o terço inicial da gestação, em fêmeas idosas e com duas a três semanas após parto (GONÇALVES et.al., 2007; SILVA, et.al., 2021). Nas éguas, a técnica de aspiração folicular também é um método não invasivo que pode ser realizada em fêmeas pré-puberes e em fase inicial de gestação, além das éguas cíclicas (VIANA & BOLS, 2005). Em ambas as espécies, pode ser utilizada em qualquer fase do ciclo estral, não sendo obrigatoriamente dependente da utilização de hormônios para estímulo de crescimento folicular (VIANA & BOLS, 2005; LUEDKE, et.al., 2019). Geralmente, as fêmeas de alto valor genético a serem utilizadas no processo de OPU para PIVE são previamente avaliadas para se conhecer a dinâmica folicular e decidir se há necessidade de algum tipo de tratamento hormonal para gerar maior quantidade e qualidade de oócitos, fato mais comum na espécie equina (DIESEL, 2010; MIYAUCHI, 2011). Porém, a hormonioterapia é um procedimento opcional e na maior parte das vezes, se as fêmeas estiverem saudáveis e se for respeitado o período de descanso entre as coletas de oócito, há resultados satisfatórios sem a realização desse tratamento (LUEDKE, et.al., 2019).

4.3 Material para aspiração

Os principais materiais necessários para a realização do procedimento de aspiração folicular, independente da espécie animal, consistem em: aparelho de ultrassom, transdutor de ultrassom transvaginal microconvexa, guia de aspiração folicular, bomba de vácuo, garrafas ou tubos com

solução de lavagem (tampão fosfato salino -PBS, soro fetal bovino, heparina e antibiótico) a 37°C, mangueira de vácuo, linha, rolha e agulha de aspiração (ORTIS & FOSS, 2013).

O ultrassom para aspiração folicular tem que ser de boa resolução para fornecer uma imagem nítida do ovário. Porém, o tipo de sonda utilizada é um dos fatores que mais interfere na coleta de oócitos por punção transvaginal. O transdutor setorial é o mais recomendado devido a possuir melhor alcance no manuseio dos ovários, maior área de digitalização e maior visualização de folículos pequenos, principalmente se tiver 7.5MHz de frequência (DIESEL, 2010).

A guia de aspiração folicular, é o instrumento com encaixe em seu interior para a sonda microconvexa e para o mandril com a linha e a agulha de aspiração. A linha de aspiração, que passa por dentro do mandril e sai no final da guia é conectada à rolha de aspiração que se encontra encaixada no tubo onde cairá o conteúdo folicular aspirado (Figura 2).

Figura 2 - Guia de aspiração

Fonte: Arquivo pessoal (2021)

A bomba de vácuo deve ter capacidade de manter uma pressão negativa regulada, a qual vai influenciar extremamente na qualidade dos oócitos a serem coletados (DIESEL, 2010). O excesso de vácuo, apesar de aumentar a taxa de recuperação dos oócitos, pode acabar retirando as células do cumulus em volta deles (WARD et al., 2000), visto que essas são bastante importantes para a nutrição oocitária durante o processo de maturação. Portanto, regular o nível de pressão e a calibragem desse equipamento é muito importante para a maior qualidade dos oócitos. Em bovinos a pressão de vácuo geralmente é regulada de 60 a 80mmHg (MYAUCHI, 2011; MARIANO, et al., 2015), gerando em média uma vazão de aspiração de 13 a 15 mL/minuto (PEIXER, et.al., 2006). Em equinos, pressões negativas de até 300mmHg tem resultados positivos para a recuperação de oócitos (RODRIGUES, 2006), mas em geral a

pressão de 150mmHgm (vazão de 20mL/minuto) são mais utilizadas e suficiente para boa obtenção dos oócitos (FRANCO, 2006; RODRIGUES, 2006). As bombas a vácuo utilizadas para aspiração geralmente vem com sistema de aquecimento, mantidas em temperatura controlada (37°C), e com espaços para encaixar os tubos a serem utilizados em doadoras na fila de aspiração (Figura 2). Para a geração do vácuo, a bomba de vácuo é acoplada à mangueira de aspiração, que por sua vez é acoplada à rolha de aspiração encaixada no tubo de coleta dos oócitos.

Figura 3. Sistema montado para aspiração folicular

Fonte: Arquivo pessoal (2021)

A guia de aspiração é acoplada a agulha que vai puncionar os folículos, sendo uma por doadora (PEIXER, et.al., 2006). O calibre da agulha utilizada possui alto nível de interferência na OPU. Existem diferenças entre autores quanto a preferência das agulhas, o que pode ser relacionado também com a pressão de vácuo aplicada na aspiração (FRY et.al., 1997). Em bovinos, o que mais é relatado é o uso de agulhas de 18G, independente da pressão (BOLS, et. al., 1996, DIESEL, 2010) enquanto que em éguas a agulha utilizada geralmente é agulha de calibre duplo (12G, 14G ou 16G) para aumentar a taxa de recuperação, tendo em vista que se deve lavar e injetar solução de recuperação para que o oócito se desprenda da parede folicular com mais facilidade (RODRIGUES, 2006; KLOKNER et.al., 2017). Agulhas com diâmetros maiores são preferíveis devido a captação maior de quantidade de oócitos e menor comprometimento nas células do cumulus ao redor do oócito (BOLS, et al., 1996; FRY et al., 1997).

Além desses equipamentos, outros materiais que são utilizados no procedimento de aspiração folicular em animais vivos são: álcool 70% (utilizado para fazer a desinfecção), gel neutro (a

ser usado na sonda microconvexa para auxiliar na formação da imagem), fármacos e seringas (para os procedimentos anestésicos), camisa sanitária para a guia de aspiração, tubo coletor com solução de lavagem e ficha de anotação (identificação do animal - registro e nome, hora da aspiração e observações como por exemplo, se o animal está gestante, presença de corpo lúteo, cisto ou aderência, e sinais de cio) (Figura 3). O tubo coletor onde são depositados os oócitos provenientes da aspiração possuem em seu interior uma solução de PBS, adicionado de compostos de heparina (5,0 UI/Ml), antibiótico (gentamicina 50mg/mL) e 1% de soro fetal bovino (DIESEL, 2010; MARIANO et.al., 2015). O soro fetal bovino evita que haja aderência dos CCOs à parede da linha de aspiração). É importante que todas as soluções e equipamentos que tiverem algum tipo de contato com o oócito sejam mantidos a uma temperatura aproximada de 36ºC a 38°C (SÁ, 2010; OLIVEIRA et al., 2014).

Figura 4 - Materiais usados a campo na aspiração folicular

Fonte: Arquivo pessoal (2021)

4.4. **Anestesia e Assepsia**

A contenção física e química são fatores bastante importantes que influenciam no resultado da técnica de aspiração (RODRIGUES, 2006). Dessa forma, as fêmeas devem estar bem contidas em tronco de contenção e deve ser realizada uma boa sedação, pois movimentos bruscos durante

a técnica podem causar acidentes como perfurações indevidas e riscos ao animal e ao operador, além de comprometer a técnica e o sistema de aspiração. (SÁ, 2012)

Desta forma, após a contenção do animal, é realizada a retirada manual das fezes do reto. Posteriormente, a região vulvar e períneo devem ser higienizados com água, sabão neutro e desinfetadas com álcool 70%, e secas com papel toalha, a fim de se evitar contaminações (MARIANO, et.al., 2015). A cauda deve ser fixada lateralmente para não entrar em contato com a região limpa e nem atrapalhar no momento de aspiração (MACIEL, 2020).

Em vacas é realizada a anestesia epidural utilizando lidocaína 2%, aplicada na articulação sacro caudal, no espaço sacrococcígeo (OLIVEIRA et al., 2014). O objetivo da anestesia é evitar o desconforto do animal e movimentos peristálticos durante o emprego da técnica de OPU, facilitando a manipulação pelo técnico e impedindo um possível trauma ao animal (BALL & PETTERS, 2006; MIYUCHI, 2011). A anestesia para esse procedimento em geral é realizada com o volume de 5 mL (MARIANO, et al., 2015). Porém, pode variar bastante entre as fêmeas bovinas, de acordo com o tamanho e temperamento do animal (OLIVEIRA et al., 2014) entre os volumes de 2 a 5 mL (DIESEL, 2010).

O protocolo de anestesia para uso em éguas a serem aspiradas varia bastante entre os estudos publicados. Os fármacos mais utilizados para tal são detomidina, lidocaína, acepromazina e xilazina (RODRIGUES, 2006). De acordo com o primeiro relato realizando a técnica em éguas, estas foram sedadas com detomidina (1mg/100Kg) e propantelina bromida (12 mg/100Kg) IV (BRUCK, et.al., 1992). A partir ~~daí~~, surgiram vários protocolos de sedação que associam anestésico sistêmico (0,45mg/Kg de xilazina IV) com anestesia peridural (4 mL Lidocaína 2%) 10 minutos antes da aspiração (FRANCO, 2006). Outros utilizam somente anestesia epidural com 5mL de lidocaína 2% (KLOKNER et al., 2017). Associações de anestésicos sistêmicos como cloridrato de xilazina e tartarato de butorfanol (RODRIGUES, 2006) ou cloridrato de xilazina e cloridrato de detomidina (SÁ, 2012) também tiveram sucesso na produção, conforto e segurança para o animal e operador. Além da propantelina bromida, medicamentos como a butilescapolamina e sulfato de atropina geralmente são utilizados para relaxamento da musculatura retal e diminuição do peristaltismo (BRUCK et al., 1992; COUTINHO DA SILVA, 2002; SÁ, 2012).

4.5 Aspiração

Para iniciar a aspiração, a palpação retal é realizada para localização de cada ovário, e por conseguinte, o ovário deve ser posicionado de forma que seja encostado na direção da parede do fundo vaginal para que a imagem seja melhor visualizada pelo aparelho de ultrassom e assim, haja maior facilidade na aspiração dos folículos (MIYUCHI, 2011; MARIANO et.al., 2015) A sonda transvaginal acoplada a guia de aspiração e ligada a um sistema de vácuo é inserida até o fundo do saco vaginal e posicionada no fórnix vaginal, direcionada para o ovário a ser aspirado (DIESEL, 2010, SÁ, 2012, FRANCO et al., 2014). A agulha de aspiração na ponta da guia atravessa o tecido vaginal e adentra o ovário, o qual é manipulado por via transretal para que os folículos possam ser puncionados e aspirados um a um e o líquido folicular ser recuperado juntamente com os oócitos (GOUVEIA et al., 2011, SÁ, 2012).

Figura 5 - Aspiração folicular em vacas

Fonte: Arquivo pessoal (2021)

Em vacas são aspirados preferencialmente, os folículos com diâmetro de 2 – 8 mm (MARIANO, et.al., 2015; PEIXER et.al., 2018). Os folículos com tamanhos maiores que 8 mm é indicativo que já entraram em atresia ou ultrapassaram a fase de metáfase II, impossibilitando a maturação *in vitro* desses oócitos em laboratório (SILVA, et.al., 2021). A agulha perfura os folículos, e em seguida, devido à pressão negativa do vácuo adicionado, o líquido folicular juntamente com os oócitos são sugados para dentro da agulha, percorrendo a linha de aspiração (sistema) e depositando, portanto, o conteúdo no tubo com solução de lavagem, o qual depois será enviado ao laboratório para rastreamento dos oócitos (SILVA, et.al., 2021).

O procedimento de aspiração de equinos caso seja realizado de forma semelhante em bovinos resulta em uma baixa taxa de recuperação e de qualidade oocitária (ALM et al., 1997), devido à forte aderência do oócito na parede folicular nesses animais (HAWLEY et al., 1995), principalmente nos folículos imaturos (LANDIM-ALVARENGA et al., 2008). As células do cumulus penetram na região das células da teca, dificultando a sua liberação da parede folicular pela técnica de aspiração simples (HINRICHS et al., 1990). Dessa forma, umas das técnicas utilizadas para desgrudar o oócito da parede e aumentar sua taxa de recuperação é a realização de escarificações na parede do folículo, passando o bisel da agulha por toda a parede do folículo juntamente com lavagens contínuas de cinco a dez vezes com solução de lavagem, de forma que a infusão da solução e a aspiração seja realizada com um fluxo continuo (MACIEL, 2020; SÁ, 2012). No caso de folículos pré-ovulatórios, por se encontrarem próximo à ovulação, a turbulência causada pelo lavado já pode ser suficiente para a sua recuperação (HAFEZ & HAFEZ, 2000). O implemento dessa técnica causa significativo aumento no tempo de obtenção desses oócitos em equinos (HINRICHS et al., 1990).

Figura 6 - Lavagem de folículo ovariano em égua

Fonte: Arquivo Pessoal (2021)

4.6 Procedimentos pós – aspiração

Por se tratar de um procedimento um pouco mais demorado em éguas, e por se tratarem de animais mais sensíveis fisiologicamente, estas recebem uma atenção maior após a realização do procedimento de aspiração folicular, como realização de antiinflamatórios IV (flunixin

meglumine) antes e 24 horas após a aspiração, e administração diária de antibiótico IM (enrofloxacina) por até 3 dias (SÁ, 2012). Após o procedimento de aspiração, as éguas devem ser observadas e mantidas em repouso e em jejum por cerca de duas horas para que não venha a ter problemas provenientes do uso do sedativo, como complicações gastrointestinais devido a diminuição do peristaltismo (MACIEL, 2020).

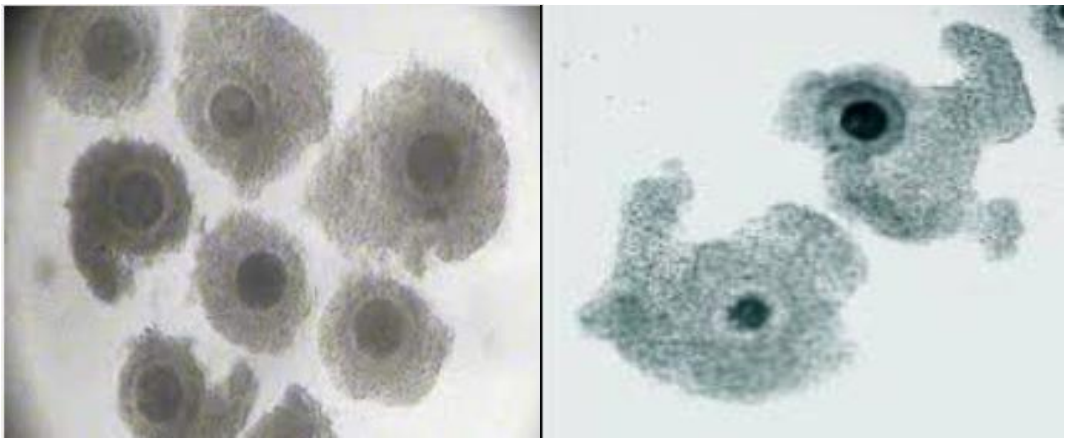
As vacas, por sua vez, não necessitam de maiores cuidados após o procedimento de aspiração folicular e podem retornar ao manejo habitual da propriedade.

4.7 Rastreamento e seleção dos oócitos

Assim que finaliza a aspiração de uma fêmea, o tubo coletor com os oócitos dever ser levado imediatamente ao laboratório para a realização da busca e classificação dos oócitos, de acordo com a quantidade de células do cumulus e integridade do citoplasma e núcleo (CURCIO, 2006; IETS, 2013)

Na prática, o oócito tem seu potencial de maturação, fecundação e capacidade de desenvolvimento embrionário estimado em parte pela aparência do complexo cumulus oophorus - CCO (CHAVES et al., 2010). Morfologicamente, os oócitos com maior potencial de viabilidade devem apresentar ooplasma homogêneo, com granulações finas, coloração amarronzada, e estar completamente envolvido por várias camadas de células do cumulus dispostas de forma compacta (GOUVEIA et al., 2011).

Figura 7 - Oócitos bovinos (A) e equinos (B)



Fonte: (PENITENTE-FILHO, et al., 2014) e (CURCIO et al, 2006)

Os oócitos selecionados são colocados em meio de maturação, dentro de criotubos, que serão levados até o laboratório dentro de meios de transporte específicos, na temperatura de 36ºC (RENESTO et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2014).

Além das características individuais da fêmea (genética, idade, categoria, escore) e sua forma de manejo (bem estar, nutrição), a média de oócitos obtidos pode sofrer influência de fatores como a fase do ciclo estral em que ela se encontra (COOK et.al., 1993), e quais materiais e parâmetros foram adotados, como por exemplo o nível da pressão, tipo de agulha, protocolo de sedação, controle hormonal e experiência do operador (RODRIGUES et.al., 2006; SÁ, 2012).

Em bovinos, é conhecido que as raças zebuínas produzem melhor taxa de recuperação de oócitos que as raças taurinas (MYAUCHI, 2011), por possuírem mais folículos na onda folicular. Sem tratamento hormonal, a produção de oócitos totais obtidos pela técnica em vacas das raças Gir e Holandesa é em média de 17 e 11, respectivamente (PONTES et al., 2009). Já em equinos, de acordo com Blanco (2008), a taxa de obtenção de folículos imaturos citada pela literatura apresenta variações entre 6 a 48%. Essa variação se dá por fatores relacionados às dificuldades na implementação da técnica nessa espécie, por não ser ainda tão bem padronizada e utilizada na rotina, como acontece em bovinos.

4.8 Frequência de aspiração e riscos do procedimento

As aspirações em fêmeas bovinas podem ser realizadas a partir de intervalos bem curtos - 2 vezes por semana, sem danos ao animal (BONI et.al., 1997; GALI et.al., 2001; VIANA et.al., 2004). Essa frequência é utilizada como preferência por fornecer maior quantidade de folículos e qualidade de oócitos que são gerados pela emergência de nova onda folicular surgida logo após processo de aspiração anterior (DIESEL, 2010), não dando tempo para formação de folículos dominante e atrésicos (GALLI et al., 2001). Porém, as aspirações comerciais são realizadas em intervalos de 15 dias (DIESEL, 2010).

Em equinos, os cuidados com o intervalo de aspiração são maiores (CARNEIRO, 2016). Ao contrário dos bovinos, o que se demonstra nesses animais é que quanto menor o intervalo entre aspirações, menor a quantidade de oócitos recuperados (DUCHAMP et al., 1995; BRUCK et.al., 1997), e maior o risco de formação de abscessos (BOGH et al., 2003). Dessa forma, os resultados positivos para ótima recuperação de oócitos e boa segurança na fertilidade da fêmea acontece utilizando a frequência de aproximadamente 15 dias (CARNEIRO, 2016)

Em bovinos, vários trabalhos relatam que não há ocorrência de riscos significativos causados na vida reprodutiva das fêmeas, mesmo quando aspiradas duas vezes por semana por vários

meses seguidos (BONI et.al., 1997; GALI et.al., 2001; VIANA et.al., 2004). Outros descrevem, em novilhas pré-púberes, a ocorrência de fibroses, aderências de fimbrias e atresia folicular forçada devido a ocorrência de micro lesões no estroma, sendo que o acúmulo destas pode afetar o funcionamento do ovário e a vida reprodutiva da fêmea (SNEL-OLIVEIRA et.al., 2002).

De acordo com Franco (2006), os impactos da OPU causados à fertilidade da espécie equina ainda não são bem conhecidos por ser uma técnica que se encontra em fase de desenvolvimento e padronização nessa espécie. Assim, os dados sobre a influência na vida reprodutiva desses animais ainda são bem controversos. Alguns relatos na literatura apresentam que não houve ocorrência de danos causados à fertilidade de éguas na realização da técnica de aspiração folicular, com o protocolo utilizando anti-inflamatórios e antibióticos após o procedimento (SÁ, 2012). Assim como, não afetou a possibilidade delas emprenharem após serem submetidas a técnica (MARI et.al., 2005). Porém, outros autores relatam sobre a presença de áreas de hemorragias e aderências nos ovários de éguas pós-mortem após aspiração (BRACHER, 1993), assim como sinais clínicos relacionados a complicações na região do ovário (WEBER, 2001), e hemorragias internas devido a perfurações de vasos causado por agulha no momento da aspiração (WANDERWALL et.al., 2002).

Existem muitos fatores de decisão no procedimento de aspiração que irão influenciar na ocorrência de riscos relacionados à técnica. Por exemplo, com o objetivo de pegar maior quantidade de folículos nas éguas, geralmente se busca os que são menores que 35mm. Estes folículos se encontram aprofundados no estroma ovariano e os oócitos estão mais aderidos ao folículo. Este fato deixa o procedimento mais dificultoso, doloroso, demorado e desconfortável tanto para o animal quanto para o aspirador (BLANCO, 2008). Portanto é muito importante que se planeje o procedimento manejando outras variáveis que possam minimizar as complicações, como a aspiração na fase mais favorável do ciclo estral, operador experiente, boa sedação, e nível de pressão da bomba a vácuo e agulha adequados (RODRIGUES, 2006).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica de aspiração folicular possibilitou o aproveitamento genético em fêmeas, que até então era inviáveis, como a coleta que pode ser realizada em animais pré-puberes, fêmeas gestantes ou em pós-parto, contribuindo, dessa forma, para a diminuição do intervalo entre as gerações. Além disso, fêmeas com alto potencial genético porém com problemas para gestação agora possuem a oportunidade de gerar descendentes por meio da coleta de seus oócitos.

A OPU é uma técnica cuja eficiência exige aperfeiçoamento, mão de obra qualificada e metodologia utilizada que interferem na quantidade e qualidade dos oócitos recuperados, e por consequência nas probabilidades da produção e desenvolvimento embrionário. Desta forma, apesar da técnica já estar bem sedimentada para aplicação em bovinos, é observado que adaptações e conhecimento aprofundado dos aspectos morfofisiológicos reprodutivos são necessários ao aplicá-la em outra espécie, como em equinos.

REFERÊNCIAS

ALM, H. et al. Comparison of differents methods for the recovery of horse oocytes. **Equine Veterinary Journal Supplements**, v. 25, p. 47-50, 1997.

BALL, P. J. H.; PETERS, A. R. Fertilização, Concepção e Gestação. In: **Reprodução em Bovinos**. São Paulo: Editora Roca, 2006 3.ª ed. p. 53-62.

BOLS, P. E. J. et al. Effects of aspiration vacum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. **Theriogenology,** v. 45, p. 1001-1014, 1996.

BONI R. et al. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. **Theriogenology** 48:277-289, 1997.

BRACHER, V. Repeated transvaginal ultrasound guided follicle aspiration in the mare. **Equine Vet J**., v. 15, p. 75-78, 1993.

BRUCK, I. et al. Repeated transvaginal oocyte aspiration in unstimulated and FSH-treated mares. **Theriogenology,** 47, 1157-1167, 1992.

CARNEIRO, G.F. Produção in vivo e *in vitro* de embriões em equinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim**., Belo Horizonte, v.40, n.4, p.158-166, 2016.

CHAVES, R.N. Sistemas de cultivo *in vitro* para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos. **Rev. Bras. Reprod. Anim**., Belo Horizonte, v.34, n.1, p.37-49, 2010.

COOK, N.L. et al. Repeated transvaginal folicular aspiration in cyclic mares. **Theriogenology**, Los Altos, v. 39, p.204, 1993.

COUTINHO DA SILVA, M.A. et al. Use of fresh, cooled and frozen sêmen during gameta intrafallopina transfer in mares. **Theriogenology**, Los Altos, v.58, p. 763-766, 2002.

CURCIO, B.R. et al. recuperação de oócitos eqüinos com cumulus oophorus compacto por curetagem da parede folicular. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 4, p. 417-422, 2006.

DIESEL, T. O. **Efeito da estimulação ovariana na quantidade e qualidades de ovócitos obtidos por aspiração folicular transvaginal em novilhas nelore.** 2010, 81 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animal) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, Brasília, 2010.

DUCHAMP G, et.al. Oocyte yield and the consequences of puncture of all follicles larger than 8 millimetres in mares. **Biol Reprod,** v.1, p.233-241, 1995.

FERREIRA, A. M. et al. População Folicular Ovariana Durante o Ciclo Estral em Vacas da Raça Gir. **R. Bras. Zootec**., v.33, n.6, p.1689-1694, 2004.

FRANCO, V.C.L. **Fertility of Criollo Mares After Follicular Aspiration.** 2006. 41f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

FRY, R.C. et al. Collection of oocytes from bovine ovaries. **Theriogenology**, v.47, p.967-977, 1997.

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

GINTHER, O. J. Selection of the dominant follicle in cattle and horses. **Anim Reprod Sci**, v.60, p.61-79, 2000.

GONÇALVES, P. B. D. et al. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 212-217, 2007.

GOUVEIA, F. **A produção *in vitro* de embriões Bovinos**. Dissertação em Ciência Animal, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília (UnB), 2011.

HAFEZ; E.S.E.; HAFEZ, B. **Reproduction in farm animals.** Ed. Manole, 7ª edição, Baltimore, EUA, 74 p. 2000.

HAFEZ, E.J.E. & HAFEZ. B. **Reprodução animal.** 7ª ed., Editora Manole, Barueri-SP, p.148-182, 2004.

HAWLEY, L.R.; et al. Comparison of equine and bovine oocytecumulus morphology within the ovarian follicle. **Biology of Reproduction,** v.52, n.1, p.243- 252, 1995.

HINRICHS, K., et.al. Aspiration of oocytes from mature and immature preovulatory follicles in the mare. **Theriogenology**, 34, 107-112, 1990.

IETS. **International Embryo Technology Society Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals**, 2013.

KONIG, H.E.; LIBICH, H.G. **Anatomia dos animais domésticos: Texto e atlas colorido**. Porto Alegre: Artmed, v.2, p. 205-206, 2004.

LANDIM-ALVARENGA, F.C. et al. New assisted reproductive technologies applied to the horse industry: successes and limitations. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v.5, p.67-82, 2008.

LENZ, S. et al. Transvaginal recovery of oocytes for *in vitro* fertilization using vaginal ultrasound. **Journal of *in vitro* fertilization and embryo transfer**, v.4, n.1, p. 51-55, 1987.

LUEDKE, F. E. et al. Aspectos da produção *in vitro* de embriões bovinos no Brasil – revisão. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha,** v. 25, n. 1/2, p. 120-132, 2019.

MACIEL, J.T. **Sincronização da onda ovulatória por meio de aspiração folicular e tratamento com o GnRH.** 95p. 2020. Dissertação. (mestrado em ciências veterinárias) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2020.

MARI, G. et al. Fertility in the mare after repeated transvaginal ultrasound-guided aspirations. **Animal Reproduction Science**, vol. 88, p. 299- 308, 2005.

MARIANO, R. S. G. et.al. Aspiração folicular em ruminantes – revisão de literatura. **Revista Investigação**, 14(6):46-53, 2015.

MCKINNON, A.O.; VOSS, J.L. **Equine Reproduction.** Malvern: Lea & Febiger, 1137pp., 1993.

MELLO, R. R. C. et al. Produção *in vitro* (PIV) de embriões em bovinos. **Rev. Bras. Reprod. Anim**., Belo Horizonte- MG, v.40, n.2, p.58-64, 2016.

MIYAUCHI, T. M. **Protocolos hormonais de preparação de doadoras bovinas para produção de embriões *in vitro.*** 2011. 64 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas, 2011.

OLIVEIRA, A.P. et al. Dinâmica folicular ovariana comparativa entre as espécies bovina e equina1. **PUBVET**, Londrina, V. 4, N. 8, Ed. 113, Art. 763, 2010.

OLIVEIRA, C. et al. Biotécnicas da Reprodução em Bovinos. **3º Simpósio "Biotécnicas da Reprodução em Bovinos",** Juiz de ForaMG, p. 31-42, 2014.

ORTIS H., FOSS R. Effect of potential oocyte transport protocols on blastocyst rates after intracytoplasmic sperm injection in the horse. **Equine Vet J Suppl.** Dec;(45):39-43, 2013.

PALMER, E. et al. Non-surgical recovery of follicular fluid and oocytes of mares. **J. Reprod. Fertil,** v. 35, p. 689-690, 1987.

PEIXER, M.A.S. et al. Produção de embriões e gestações a partir de ovócitos recuperados por ultra-sonografia em fêmeas bovinas superovuladas. **In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões**, 1997.

PEIXER, P.F. et al. Produção *in vitro* de embriões bovinos. **Revista Espacios,** vol. 39, n. 16. P.2, 2018.

PENITENTE-FILHO, J. M. et al. Influence of Dominant Follicle and Corpus luteum on Recovery of Good Quality Oocytes for In vitro Embryo Production in Cattle. **British Biotechnology** Journal, v. 4, n. 12, p. 1305-1312, 2014.

PIETERSE, M.C.; KAPPEN, K.A. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries, **Theriogenology**, V. 30, Issue 4, 1988.

PONTES, J.H.F.; et al. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and *in vitro* methods in the same Nelore (Bos indicus) donor cows. **Theriogenology**, v.71, n.4, p.690-697, 2009.

RENESTO A. **Associação das Biotécnicas: Aspiração Folicular Guiada por UltraSonografia e Superovulação na Produção *in vitro* e in vivo de Embriões Bovinos**. 59p. 2004. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Universidade Estadual de São Paulo - UNESP, Jaboticabal, 2004.

RODRIGUES, R. **Aspiração folicular por via transvaginal guiada por ultra-som em equinos.** Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária). Porto Alegre: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

SÁ, M. A. F. **Avaliação de diferentes pressões negativas nas aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom sobre a recuperação oocitária em éguas**. 2012. 46f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Patologia e Ciencias Clinicas) – Instituto de Veterinária. Universidae Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica – RJ, 2012.

SILVA, A. E. Aspiração folicular em bovinos – revisão. **Revista Sinapse Múltipla**, V.10, n.1, p.28-30, 2021.

SENGER, P.L. **Pathways to Pregnancy and Parturition** - 2 Ed. Pullman: Current Conception, 2004.

SNEL-OLIVEIRA, M. V. et al. Histopathological lesions in the ovaries after ultrasound guided transvaginal ovum pick up (OPU) in Nelore prepubertal calves. **Theriogenology**, Iowa, v. 57, n. 1, p.167, 2002.

STROEBECH, L. et al. *In vitro* production of bovine embryos: revisiting oocyte development and application of systems biology. **Animal reproduction**, 12, 465-472, 2015.

ULIANI, R.C. **Estudo das características foliculares avaliadas através da ultrassonografia modo-b e doppler colorido de éguas jovens e idosas e sua relação com agente indutor e momento da ovulação.** 2012. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2012.

VANDERWALL, D.K. Severe internal hemorrhage resulting from transvaginal intrasound guides follicle aspiration in mare. **J of Equine Vet Science,** v. 22, p. 84-86, 2002.

VELOSO NETO, H.F. et al. Parâmetros que afetam a taxa de prenhez de receptoras bovinas de embriões produzidos *in vitro***. Medicina Veterinária**, Recife, v.8, n.3, p.31-35, 2014.

VIANA, J.H.M., et al., Short intervals between ultrasonographically-guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominat follicles in the Gir brees (Bos indicus) of cattle. **Animal Reproduction Science,** v. 84, p.1-12, 2004.

VIANA, J. H. M.; BOLS, P. E. J. Variáveis biológicas associadas a recuperação de complexos cumulus-oócito por aspiração folicular. **Acta Scientiae Veterinariae,.** V.33, p. 1-4, 2005

VIANA, J. et al. Features and perspectives of the Brazilian *in vitro* embryo industry. **Animal Reproduction**, v. 9, n. 1, p. 12-18. 2012

VOGELSANG, M.M. et al. Recovery of equine folicular oocytes by surgical and non surgical techniques. **Theriogenology**, v.25, 208, 1986.

WARD, F.A. et al. Factors affecting recovery and quality of ooytes for bovine embryo production *in vitro* using Ovum-Pick Up Technology. **Theriogenology**, v.54, p.433-446, 2000.

WEBER, J.A. et al. Induction of luteolysis in mares by ultrasound guides intraluteal treatment with $PGF_2\alpha$. **Theriogenology,** v.55, p. 1769-1776, 2001.