

OVUM PICK UP EM BOVINOS: CONSIDERAÇÕES TÉCNICAS

Marcelo Marcondes Seneda e Wanessa Blaschi

Departamento de Clínicas Veterinárias
Centro de Ciências Agrárias – UEL
Londrina, PR, 86051-990 (mseneda@uel.br)

RESUMO

A indústria da tecnologia de embriões sofreu uma importante mudança nos últimos anos, com o advento da produção *in vitro* de embriões (PIV). A técnica é utilizada em vários países, mas é no Brasil que se verifica um número surpreendente de embriões gerados a partir deste método. Dentre os principais aspectos relacionados a esta expressiva disseminação da técnica, pode-se apontar o domínio da PIV por laboratórios privados e a crescente valorização da raça Nelore. Vacas Nelore apresentam um melhor rendimento na produção de embriões com a PIV em relação à TE, de forma que muitos criadores têm feito opção pela PIV, buscando mais rapidez na produção de descendentes de vacas de linhagens superiores. A primeira etapa da PIV é a obtenção *in vivo* dos oócitos, através da técnica de aspiração folicular transvaginal, ou OPU (ovum pick up). A OPU tem sido estudada por diversos grupos e importantes melhorias foram implementadas, objetivando aumentar a eficiência e reduzir o investimento inicial para realização da técnica. Modificações no aparato de aspiração, adaptações de equipamentos de vácuo, utilização de gonadotrofinas e controle da dinâmica folicular são exemplos de mudanças observadas tanto na área acadêmica como na iniciativa privada. O presente artigo trata dos aspectos técnicos de maior interesse no procedimento de obtenção *in vivo* dos oócitos na espécie bovina.

INTRODUÇÃO

Embora a TE continue sendo amplamente utilizada, o aproveitamento dos oócitos bovinos ganhou novo impulso em 1982, quando Brackett et al. [1] relataram o nascimento do primeiro bezerro obtido pela produção *in vitro* (PIV) de embriões. A PIV de embriões, tem sido utilizada desde então com perspectivas promissoras, tendo viabilizado nascimento de expressivo número de produtos desde 1996 [2]. Se a aspiração folicular apresentou-se viável para fêmeas com limitações reprodutivas, sua aplicação mostrou-se mais ampla quando utilizada em fêmeas saudáveis, produzindo, no mínimo, quatro vezes mais embriões em relação à TE [3], embora com maior custo por embrião [4]. Para reduzir os custos pertinentes aos procedimentos *in vitro*, diversos trabalhos foram descritos com o intuito de incrementar a técnica. Segundo Bols [5] os principais fatores a serem analisados reúnem-se nos aspectos biológicos e os de ordem técnica, abordados a seguir.

VARIÁVEIS TÉCNICAS

As variáveis técnicas constituem o método de obtenção dos oócitos e este possui considerável impacto sobre a quantidade e a morfologia dos complexos *cumulus oophorus*, e conseqüentemente sobre a competência para o desenvolvimento [6].

Agulhas para aspiração folicular

Inicialmente, a aspiração era realizada apenas com agulhas longas (55 cm), produzidas especificamente para aspiração folicular [7]. Posteriormente, propôs-se a substituição por agulhas hipodérmicas descartáveis, pois as agulhas descritas inicialmente apresentavam custo elevado e perdiam o gume rapidamente, prejudicando a recuperação dos oócitos [8]. Em relação às agulhas longas, devido ao preço, é comum observar-se que uma mesma agulha seja utilizada para vários animais. Com a perda do gume, o bisel apresenta menor capacidade de penetrar o ovário, obrigando o operador a utilizar mais força durante a punção. Nesta situação, há dois aspectos desfavoráveis. O primeiro e mais grave é a possibilidade de danos ao estroma ovariano, especialmente naqueles animais submetidos repetidas vezes à técnica. O segundo aspecto refere-se à pior recuperação de oócitos. À medida que a agulha vai se tornando romba, aumentam as possibilidades de ocorrer uma ruptura abrupta do folículo almejado, ao invés de uma perfuração rápida e precisa. Esta ruptura abrupta poderia dificultar a captação do oócito do interior do folículo, reduzindo a eficiência da técnica.

Considerando estes aspectos críticos da agulha longa, Bols et al. [6] demonstraram a viabilidade da utilização de agulhas hipodérmicas descartáveis de 18 e 19 Gauge (G) e 50 mm de comprimento. As agulhas com diâmetros maiores de 18 G relacionaram-se a maiores taxas de recuperação embora com maior percentual de oócitos desnudos, além de maiores danos ao estroma e maior quantidade de sangue no líquido aspirado. Já as agulhas de diâmetro menor que 19 G apresentam índices reduzidos de recuperação de oócitos, possivelmente pela lentidão da aspiração do líquido folicular, no momento da punção.

Uma vez verificada a possibilidade de utilização de agulhas hipodérmicas, buscou-se avaliar a relação entre o comprimento do bisel da agulha e a taxa de recuperação de oócitos [6]. Estes autores acreditavam que o bisel curto seria mais eficiente, pela maior facilidade de ser introduzido rapidamente no interior do folículo. Contrariando as expectativas, os autores relataram melhor recuperação e qualidade de oócitos quando agulhas de bisel longo foram utilizadas. A provável justificativa seria o gume mais afiado do bisel longo, permitindo uma penetração rápida e precisa no interior do folículo, dificultado o extravasamento do conteúdo folicular. A melhor eficiência das agulhas de bisel longo constituiu aspecto bastante favorável, já que estas são mais baratas e facilmente adquiridas, quando em comparação com as de bisel curto.

Em relação ao comprimento, as agulhas hipodérmicas de 50 mm possuem restrita distribuição no mercado, mas são perfeitamente substituíveis pelas de 40 mm. Portanto, em relação às agulhas hipodérmicas descartáveis, as opções mais viáveis no mercado nacional seriam as agulhas 40mmx9 e 40mmx10. Considerando seu preço irrisório, torna-se perfeitamente possível utilizar uma agulha por vaca, ou mesmo uma por ovário, naqueles animais que apresentarem maior número de folículos para aspiração. Desta forma, o procedimento de recuperação dos oócitos pode ser realizado com mínimos danos ao estroma ovariano.

Geração de vácuo para obtenção dos oócitos

Estreitamente relacionado com a agulha utilizada encontra-se a pressão de vácuo [9]. Estes autores relacionaram que baixas pressões, como 50 mm Hg, foram pouco eficientes para a aspiração, enquanto que pressões maiores como 120 mm Hg danificavam o revestimento do *cumulus oophorus*. Há uma grande variação entre os trabalhos, com valores de 40 a 400 mm Hg [10], embora isto deva ser considerado com reservas, já que todo o sistema (comprimento e diâmetro de conexões, altura do equipamento de vácuo, diâmetro da agulha) pode influenciar na pressão de vácuo final.

Para quantificar a pressão negativa de forma mais real, sugere-se mensurar o vácuo em volume de fluido por minuto. Mesmo assim, há variações consideráveis, de 4,4 a 40 ml de água/minuto [7,11-13]. O intervalo entre 10 a 20 ml de fluido por minuto tem sido o mais utilizado atualmente, sendo pertinente que a aferição seja readequada a cada procedimento. As bombas de vácuo descritas inicialmente – Handle Cook – foram especialmente designadas para a obtenção de oócitos em vacas [7]. Tais equipamentos possuem grande estabilidade na pressão de vácuo, permitindo considerável eficiência na recuperação dos oócitos. Um aspecto desfavorável é seu custo elevado, fator que motivou a busca de bombas de vácuo alternativas. Verifica-se atualmente a utilização alternativa de bombas de aspiração odontológicas, de fluidos endotraqueais, além de bombas de infusão controlada. Todos estes equipamentos prestam-se à geração de vácuo, embora as variações na capacidade de gerar pressão negativa possam comprometer a quantidade e qualidade dos oócitos.

Transdutor ultra-sonográfico

A frequência do transdutor constitui-se em variável importante no processo de recuperação dos oócitos [14]. Há citações de frequências de 3.5 MHz [15], 7.5 MHz [16], 5.0 MHz [17] e 6.5 MHz [12]. A maioria dos autores cita a utilização de transdutores convexos ou setoriais para a aspiração folicular transvaginal [10,18-21], com poucos relatos de transdutores lineares [14,22]. No entanto, o transdutor linear é bastante difundido na área de reprodução em grandes animais [23-27] e a sua utilização para a aspiração folicular transvaginal foi demonstrada com sucesso [28]. O principal aspecto desfavorável da aspiração com o transdutor linear refere-se ao espaço limitado entre o transdutor e a agulha. A restrição de espaço impede que todas as regiões do ovário sejam puncionadas, mesmo modificando-se o posicionamento da gônada. É evidente que os transdutores do tipo convexo propiciam um procedimento mais rápido e facilitado. No entanto, a versatilidade do transdutor linear deve sempre ser considerada quando a utilização do ultra-som não for exclusiva para OPU. Neste caso, é possível a obtenção de resultados satisfatórios sem a necessidade de aquisição de outro transdutor.

VARIÁVEIS BIOLÓGICAS

Os aspectos biológicos da aspiração folicular possuem dados contraditórios, que podem ser considerados pela complexidade da questão, pois resultados de aspiração apresentados na literatura possuem aspectos de comparação difícil, como diferentes raças, equipamentos, habilidade do operador, estado corporal dos animais, etc.. Todo trabalho deve ser analisado com a natural ressalva em razão das particularidades de cada procedimento.

Variações individuais entre doadoras

A condição fisiológica da doadora, considerando-se peso, raça, idade e a própria variação individual, tem merecido atenção em diversos artigos. Katska & Smorag [29], trabalhando com ovários de matadouro, não encontraram diferenças na qualidade dos oócitos entre animais jovens (a partir de 18 meses) e senis (até 17 anos), embora tenham notado redução na produção de gametas nos animais mais velhos. Relatos de oócitos de qualidade inferior em animais senis são frequentes. Looney et al. [18] relataram a possibilidade de aspiração folicular nos animais bastante jovens, e Brogliatti & Adams [30] obtiveram oócitos de bezerras com apenas 6 semanas de idade com a utilização de um transdutor adequado. No entanto, os animais pré-púberes têm

mostrado reduzida competência de seus oócitos para chegar até blastocisto [31], embora Armstrong et al. [32] tenham conseguido resultados animadores com bezerras de apenas três semanas de idade através do estímulo gonadotrófico. Parece haver um consenso quanto à condição corporal, em que animais subnutridos seriam doadores de oócitos com menor capacidade para desenvolverem-se até blastocisto [33], e há indícios de que animais submetidos à situações de estresse também seriam doadores de oócitos menos competentes [34].

Em relação à variação individual, o aspecto mais interessante refere-se à raça. Animais da raça Nelore, ou vacas zebuínas em geral apresentam normalmente um maior número de folículos recrutados por onda, em comparação com vacas de raças européias [35-36]. Esta particularidade viabilizou um crescimento bastante rápido da PIV no Brasil, uma vez que a disseminação da PIV e a maior valorização da raça Nelore ocorreram de forma simultânea. Embora a TE continue sendo largamente utilizada em animais da raça Nelore, a PIV viabiliza maior número de embriões em um mesmo período de tempo (Nonato Jr. & Seneda, dados não publicados).

Atualmente, a aspiração folicular tem sido realizada em momentos aleatórios do ciclo estral. Os resultados de campo têm mostrado que a qualidade dos oócitos não se altera com função da fase do ciclo estral. No entanto, o número de folículos disponíveis para a aspiração apresenta considerável variação, sendo o início de onda o momento mais favorável para a recuperação, pelo maior número de folículos e pela melhor eficiência de captação dos oócitos, de acordo com Seneda et al. [37].

Utilização de gonadotrofinas e taxa de recuperação de oócitos

A competência do oócito obtido pela aspiração folicular transvaginal parece não ser influenciada pelo tamanho do folículo, mas o mesmo não ocorre em relação à taxa de recuperação. Este parâmetro consiste no número de oócitos recuperados após punção de 100 folículos [7] e já foi demonstrado que folículos menores viabilizam recuperação oocitária mais eficiente [37]. A taxa de recuperação pode ser influenciada pelas terapias gonadotróficas [19,38]. Pieterse et al. [38] realizaram a aspiração folicular três dias após estímulo gonadotrófico com PMSG e relataram aumento do número e tamanho de folículos, e pior taxa de recuperação de oócitos. Pieterse et al. [39] e Goodhand et al. [40] relataram melhor recuperação quando predominavam folículos pequenos no ovário e menos oócitos por sessão quando havia predomínio de folículos maiores que 6 mm. Resultados análogos foram descritos por Seneda et al. [37], ao compararem folículos < 4 mm e > 4 mm. A relação inversa entre maior diâmetro folicular e taxa de recuperação de oócitos por sessão tem sido justificada de diversas formas, como alterações morfológicas no complexo *cumulus oophorus* [20], viscosidade do fluido folicular [40] e quantidade de material a ser aspirado e pressão intrafolicular [41]. Apesar dos folículos maiores que 5 mm serem aspirados mais facilmente [5], a aspiração de folículos pequenos mostrou-se mais eficiente quanto à captação dos oócitos [37]. Assim, a estratégia mais eficiente para associar utilização de FSH e presença de folículos pequenos é controlar o período de crescimento folicular, conforme relatado por Seneda et al. [36]. Apesar de relatos da utilização de FSH em animais zebuínos [42], é importante ressaltar que a aplicação de gonadotrofinas tem acontecido principalmente em vacas de raças européias. Os animais Bos indicus apresentam naturalmente maior número de folículos por onda, e talvez por este motivo o FSH tenha tido um impacto menor no crescimento folicular e conseqüente disponibilização de oócitos para a produção de embriões (Nonato Jr & Seneda, dados não publicados)

PERSPECTIVAS

Contrariando certo ceticismo inicial, a PIV atualmente é uma biotécnica consolidada, com expressivo número de animais nascidos por este procedimento, particularmente no Brasil. Embora os procedimentos de maturação e desenvolvimento *in vitro* ainda apresentem aspectos críticos a serem superados, a obtenção dos oócitos apresenta-se razoavelmente bem estabelecida. Os principais desafios para maior disseminação da aspiração folicular são o alto custo dos equipamentos e a dedicação necessária ao treinamento da técnica. Maior padronização na recuperação dos oócitos será obtida com a aplicação de protocolos de sincronização do estro, visando a realização da aspiração em momentos mais propícios. Finalizando, consideramos a permuta de informações acadêmicas e aplicadas como sendo etapa essencial para superação dos atuais entraves e a conquista de melhores resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] BRACKETT, B.G., BOUSQUET, D., BOICE, M.L., DONAWICK, W.J., EVANS, J.F., DRESSEL, M.A. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, v. 101, p. 147-158, 1982.
- [2] GALLI, C., LAZZARI, G. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 371-379, 1996.
- [3] KRUIP, T.A.M., BONI, R., WURTH, Y.A., ROELOFSEN, M.W.M., PIETERSE, M.C. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. **Theriogenology**, v. 42, p. 675-684, 1994.
- [4] RODRIGUES, C.F.M., GARCIA, J.M. Fecundação *in vitro*: aplicação comercial. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.28, n.1, p. 186-187, 2000
- [5] BOLS, P.E.J. **Transvaginal ovum pick-up in the cow: technical and biological modifications**. 1997. 227p. Thesis (PhD). Faculty of Veterinary Medicine, University of Ghent, Belgium, 1997(a)
- [6] BOLS, P. E. J., YSEBAERT, M.T., VAN SOOM, A., KRUIF, A. Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity bovine compact cumulus oocyte complexes. **Theriogenology**, v. 47, p. 1221-1236, 1997.
- [7] PIETERSE, M. C., KAPPEN K. A., KRUIP, Th.A.M., TAVERNE, M.A.M. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. **Theriogenology**, v. 30, n. 04, p. 751-762, 1988.
- [8] BOLS, P. E. J., VANDENHEEDE, J.M.M., VAN SOOM, A., KRUIF, A. Transvaginal ovum pick-up (OPU) in the cow: new disposable needle guidance system. **Theriogenology**, v. 43, p. 677-687, 1995.
- [9] BOLS, P.E.J., VAN SOON, A., VANROOSE, G., KRUIF, A. Transvaginal oocyte pick-up in infertile Belgium Blue donor cows: preliminary results. **Theriogenology**, v. 45, p. 359, 1996a. (Abstract)
- [10] BOLS, P. E. J., VAN SOOM, A., YSEBAERT, M.T., VANDENHEEDE, J.M.M., KRUIF, A. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 45, p. 1001-1014, 1996.
- [11] VOS, P.L.A.M., de LOS, F.A.M., PIETERSE, M.C., BEVERS, M.M., TAVERNE, M.A.M., DIELEMAN, S.J., Evaluation of transvaginal ultrasound-guided follicle puncture to collect and follicular fluids at consecutive times relative to the preovulatory LH surge in eCG/PG treated cows. **Theriogenology**, v. 41, p. 829-840, 1994.
- [12] BUNGARTZ, L., LUCAS-HAHN, A., RATH, D., NIEMANN, H. Collection of oocytes from cattle via follicular aspiration aided by ultrasound with or without gonadotropin pretreatment and in different reproductive stages. **Theriogenology**, v. 43, p. 667-675, 1995.
- [13] RICK, G., HADELER, K.G., LEMME, E., LUCAS-HAHN, A., RATH, D., SCHINDLER, L., NIEMANN, H. Long-term ultrasound guided ovum pick-up in heifers from 6 to 15 months of age. **Theriogenology**, v. 45, p. 356, 1996. (Abstract).

- [14] HASHIMOTO, S., TAKAKURA, R., KISHI, M., SUDO, T., MINAMI, N., YAMADA, M. Ultrasound-guided follicle aspiration: effect of the frequency of a linear transvaginal probe on the collection of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 52, p. 131-138, 1999.
- [15] CALLESEN, H., GREVE, T., CHRISTENSEN, F. Ultrasonically guided aspiration of bovine follicular oocytes. **Theriogenology**, v. 27, p. 217, 1987. (Abstract).
- [16] VAN DER SCHANS, A. VAN DER WESTERLAKEN, L.A.J., DE WIT, A.A.C., EYESTONE, W.M., DE BOER, H.A. Ultrasound-guided transvaginal collection of oocytes in the cow. **Theriogenology**, n. 35, p. 288, 1991. (Abstract).
- [17] HASLER, J. F., HENDERSON, W.B., HURTGEN, P.J., JIN, Z.Q., McCAULEY, A.D., MOWER, S.A., NEELY, B., SHUEY, L.S., STOKES, J.E., TRIMMER, S.A. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. **Theriogenology**, v.43, p. 141-152, 1995.
- [18] LOONEY, C. R., LINDSEY, B.R., GONSETH, C.L., JOHNSON, D.L. Commercial aspects of oocyte retrieval and in vitro fertilization (IVF) for embryo production in problem cows. **Theriogenology**, v. 41, p. 67-72, 1994.
- [19] MEINTJES, M., BELLOW, M.S., BROUSSARD, J.R., PAUL, J.B., GODKE, R.A. Transvaginal aspiration of oocytes from hormone-treated pregnant beef for in vitro fertilization. **Journal of Animal Science**, v. 73, p. 967-974, 1995.
- [20] BOLS, P.E.J., YSEBAERT, M.T., LEIN, A., CORYN, M., VAN SOOM, A., KRUIF, A., Effects of long-term treatment with bovine somatotropin on follicular dynamics and subsequent oocyte and blastocyst yield in an OPU-IVF program. **Theriogenology**, v. 49, p. 983-995, 1998.
- [21] CARLIN, S.K., GARST, A.S., TARRAF, C.G., BAILEY, T.L., MCGILLIARD, M.L., GIBBONS, J.R., AHMADZADEH, A., GWAZDAUSKAS, F.C. Effects of ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on oocyte recovery and hormonal profiles before and after GnRH treatment. **Theriogenology**, v. 51, p. 1489-1503, 1999.
- [22] MATTHEWS, L.; PETERSEN, H.; VAN BEEK, K. Use of linear ultrasound transducer for commercial application of transvaginal oocyte recovery. **Theriogenology**, v. 43, p. 275, 1995. (Abstract).
- [23] SIANANGAMA, P.C. & RAJAMAHENDRAN R. Effect of hCG administration on day 7 of the estrous cycle on follicular dynamics and cycle length in cows. **Theriogenology** v.45, n.3, p. 583-592, 1996.
- [24] BARUSELLI, P.S. , MUCCIOLO, R.G. , VISINTIN, J.A. , VIANA, W.G. , ARRUDA, R.P. , MADUREIRA, E.H., OLIVEIRA, C.A., MORELO-FILHO, J.R. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Theriogenology** v.47, n.8, p. 1531-1547, 1997.
- [25] FIGUEIREDO, R.A. BARROS, C.M., PINHEIRO, O. L. SOLER, J.M.P. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology** v.47, n.8, p.1489-1505, 1997.
- [26] LEYVA, V. BUCKRELL, B.C.; WALTON, J.S. Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous progestagen. **Theriogenology** v.50, n.3, p. 395-416, 1998.
- [27] DICKIE, M. C. PATERSON, ANDERSON, J. L. M.; BOYD, J. S. Determination of corpora lutea numbers in Booroola - Texel ewes using transrectal ultrasound. **Theriogenology** v.51, p. 1209-1224, 1999.
- [28] SENEDA, M. M.; ESPER, C. R.; GARCIA, J. M.; ANDRADE, E. R.; BINELLI, M.; OLIVEIRA, J. A.; NASCIMENTO, A. B. Efficacy of linear and convex transducers for ultrasound-guided transvaginal follicle aspiration. **Theriogenology** v.59, p. 1435-1440, 2003.
- [29] KATSKA L, SMORAG, Z., Number and quality of oocytes in relation to age of cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 7, p. 451-460, 1984.
- [30] BROGLIATTI, G. M., ADAMS, G. P. Ultrasound-guided transvaginal oocyte collection in prepubertal calves. **Theriogenology**, v.45, p. 1163-1176, 1996.
- [31] REVEL, F.L., MERMILLOD, P., PEYNOT, N., RENARD, J.P., HEYMAN, Y. Low developmental capacity of in vitro matures and fertilized oocytes from calves compared with that of cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.103, p. 115-120, 1995
- [32] ARMSTRONG, D. T., IRVINE, B.J., EARL, C.R., McLEAN, D., SEAMARK, R.F. Gonadotropins stimulations regimens for follicular aspiration and in vitro embryo productions from calf oocytes. **Theriogenology**, v. 42, p. 1227-1236, 1994.

- [33] LOPEZ RUIZ, L., ALVAREZ, N., NUNEZ, I., MONTES, I., SOLANO, R., FUENTES, D., PEDROSO, R., PALMA, G.A., BREM, G. Effect of body condition on the developmental competence of IVM/IVF bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 45, p. 292, 1996. (Abstract).
- [34] SENEDA, M.M., ESPER C.R., GARCIA, J.M. VANTINI, R. Effect of follicle size on recovery, quality, and developmental competence of oocytes obtained in vitro. **Abstracts of 14th International Congress on Animal Reproduction, Stockholm, Sweden** v.01, p.62-62, 2000a
- [35] DAYAN, A.; WATANABE, M. R.; WATANABE, Y. F. Fatores que interferem na produção comercial de embriões FIV. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**. V. 28, n. 1, p. 181-185, 2000.
- [36] SENEDA, M.M.; ESPER; C.R., ANDRADE; E.R., GARCIA; J.M., OLIVEIRA; J.A. Shorter interval between fsh administration and follicle aspiration increases efficiency of oocyte recovery, **Theriogenology**, v. 57, p. 684, 2002. (Abstract).
- [37] SENEDA, M.M.; ESPER, C.R., GARCIA, J.M., VANTINI, R.; OLIVEIRA, J.A. Relationship between follicle size and ultrasound-guided transvaginal oocyte recovery. **Animal Reproduction Science**, v. 67, p. 37-43, 2001.
- [38] PIETERSE, M.C., VOS, P.L.A.M., KRUIP, T.A.M., WURTH, Y.A., VAN BENEDEN, T.H., WILLEMSE, A.H., TAVERNE, M.A.M. Repeated transvaginal ultrasound-guided ovum pick-up in ECG-treated cows. **Theriogenology**, v. 37, p. 273, 1992. (Abstract).
- [39] PIETERSE, M. C., VOS, P.L.A.M., KRUIP, T.A.M., WURTH, Y.A., VAN BENEDEN, T.H., WILLEMSE, A.H., TAVERNE, M.A.M. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 35, n. 01, p. 19-24, 1991.
- [40] GOODHAND, K.L., WATT, R.G., STAINES, M.E., HUTCHINSON, J.S.M., BROADBENT, P.J. In vivo oocyte recovery and in vitro embryo production from bovine donors aspirated at different frequencies or following fsh treatment. **Theriogenology**, v. 51, p. 951-961, 1999.
- [41] SENEDA, M.M. **Aspiração folicular transvaginal guiada pela ultra-sonografia. Efeito do diâmetro do folículo sobre a recuperação, qualidade e competência do oócito para o desenvolvimento in vitro**. 1999. Dissertação (Mestrado em Patologia Animal). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal, 1999, 57 p.
- [42] NONATO JUNIOR, I.; PONTES, J. H. F.; ERENO JUNIOR, J. C.; BLASCHI, W.; UVO, S.; OLIVEIRA, J. A.; SENEDA, M.M. FSH prior follicle aspiration: comparison between two gonadotropins to *in vitro* embryo production. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 513, 2003. (Abstract).