



INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS  
DA VIDA E DA NATUREZA (ILACVN)  
BIOTECNOLOGIA

**AVALIAÇÃO DA TAXA DE RECUPERAÇÃO DE OVÓCITOS BOVINOS OBTIDOS  
POR ASPIRAÇÃO FOLICULAR DE OVÁRIOS ORIUNDOS DE ABATEDOURO**

**VICTORIA MARÍA BARRETO JARA**

FOZ DO IGUAÇU

2020



INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS  
DA VIDA E DA NATUREZA (ILACVN)  
BIOTECNOLOGIA

**AVALIAÇÃO DA TAXA DE RECUPERAÇÃO DE OVÓCITOS BOVINOS OBTIDOS  
POR ASPIRAÇÃO FOLICULAR DE OVÁRIOS ORIUNDOS DE ABATEDOURO**

**VICTORIA MARÍA BARRETO JARA**

Trabalho de Conclusão de Curso II apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade da Integração Latino-Americana como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Sanely Lourenço da Costa Caliman

FOZ DO IGUAÇU

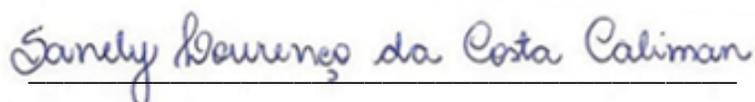
2020

**VICTORIA MARIA BARRETO JARA**

**AVALIAÇÃO DA TAXA DE RECUPERAÇÃO DE OVÓCITOS BOVINOS OBTIDOS  
POR ASPIRAÇÃO FOLICULAR DE OVÁRIOS ORIUNDOS DE ABATEDOURO**

Trabalho de Conclusão de Curso II  
apresentado ao Instituto Latino-  
Americano de Ciências da Vida e da  
Natureza da Universidade da Integração  
Latino-Americana como requisito parcial  
para obtenção do título de Bacharel em  
Biotecnologia.

**BANCA EXAMINADORA**



Orientador (a): Profa. Dra. Sanelly Lourenço da Costa Caliman

UNILA



Prof. Dr. Emílio César Martins Pereira

UFMT



Prof. Dr. Kelvinson Fernandes Viana

UNILA

Foz do Iguaçu, 10 de julho de 2020.

## TERMO DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

Nome completo do autor(a): Victoria Maria Barreto Jara

Curso: Biotecnologia

Tipo de Documento

<input checked="" type="checkbox"/> graduação	<input type="checkbox"/> artigo
<input type="checkbox"/> especialização	<input checked="" type="checkbox"/> trabalho de conclusão de curso
<input type="checkbox"/> mestrado	<input type="checkbox"/> monografia
<input type="checkbox"/> doutorado	<input type="checkbox"/> dissertação
	<input type="checkbox"/> tese
	<input type="checkbox"/> CD/DVD – obras audiovisuais
	<input type="checkbox"/> _____

Título do trabalho acadêmico: AVALIAÇÃO DA TAXA DE RECUPERAÇÃO DE OVÓCITOS BOVINOS ORIUNDOS POR ASPIRAÇÃO FOLICULAR DE OVÁRIOS DERIVADOS DE ABATEDOURO

Nome do orientador (a): Sanelly Lourenço da Costa Caliman

Data da Defesa: \_\_10\_\_/\_07\_\_/\_2020\_\_

### Licença não-exclusiva de Distribuição

O referido autor(a):

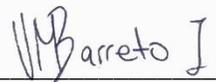
a) Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que o detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.

b) Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo do documento entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não a Universidade Federal da Integração Latino-Americana, declara que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato ou acordo.

Na qualidade de titular dos direitos do conteúdo supracitado, o autor autoriza a Biblioteca Latino-Americana – BIUNILA a disponibilizar a obra, gratuitamente e de acordo com a licença pública Creative Commons Licença 3.0 Unported.

Foz do Iguaçu, 10 de julho de 2020.



Assinatura do Responsável

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus pela oportunidade de estudar em uma Universidade de qualidade e fora do meu país o curso que eu gosto.

Agradeço fortemente aos meus pais pelo suporte, pelo carinho e compreensão em momentos de estresse, por acreditaram em mim desde o começo e me impulsarem a continuar e nunca desistir dos meus sonhos diante as dificuldades, me mantiveram forte e deram tudo de si mesmos para que eu pudesse chegar até aqui.

Aos meus irmãos Esteban, Jose Mario, Ana, Priscila e Juan Pablo pela paciência e incondicional apoio durante esses anos de estudo, por cuidarem de mim e do Santiago sempre que eu precisasse.

Ao Santiago, meu querido filho, que com muito amor e ternura esteve comigo durante estes 5 anos de faculdade, pela compreensão nos meus tempos de estudo, por estar me acompanhando durante as aulas sendo o melhor filho do mundo para que eu pudesse concluir o curso com maior tranquilidade.

À minha professora orientadora Sanely pela constante orientação durante este trabalho, pelos conselhos para me manter forte durante o curso, pela paciência e tranquilidade que me brindou.

Agradeço aos professores Dr. Emilio Pereira e Dr. Kelvinson Viana pela participação da banca avaliadora.

À técnica do laboratório de produção de embriões da UFMG Eliane Beatriz, ao professor Alan pela oportunidade do estágio, à professora Carla pela orientação de Iniciação científica.

Às minhas amigas Thais e Lourdes pelos constantes conselhos, bons desejos e boas energias durante esse trajeto, por me apoiarem desde o começo e acreditarem em mim até quando eu não conseguia.

Aos professores, colegas e amigos do curso, principalmente a minha colega de estudos Karina pelo acompanhamento e constante apoio durante as disciplinas cursadas.

E por último agradeço a cada pessoa que fez parte da minha formação, que me impulsou a continuar em frente, e me acompanhou nessa trajetória direta ou indiretamente.

JARA, Victoria Maria Barreto. **AVALIAÇÃO DA TAXA DE RECUPERAÇÃO DE OVÓCITOS BOVINOS POR ASPIRAÇÃO FOLICULAR DE OVARIOS ORIUNDOS DE ABATEDOURO**. 2020. 54. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2020.

## RESUMO

O sucesso na produção de bovinos é altamente dependente da capacidade reprodutiva das fêmeas de bovinos, diversos fatores podem influenciar ou interferir na reprodução animal. O uso de biotécnicas e tratamentos hormonais tais como a inseminação artificial (IA) e a produção *in vitro* de embriões (PIVE) contribuem significativamente para bovinocultura ao elevar a possibilidade de produção de bezerros geneticamente superiores a partir de doadoras com alta capacidade genética e com um considerável valor agregado. O objetivo desse trabalho foi avaliar a qualidade, morfologia e classificação dos ovócitos recuperados mediante aspiração folicular de ovários provenientes de abatedouros. Foram realizadas quatro coletas com média de 30 ovários por coleta e recuperados 661 ovócitos que foram classificados de acordo com a qualidade. Os melhores ovócitos, considerados viáveis foram separados e foi analisada a expansão das células do *cumulus* após 24 horas de cultivo em meio de maturação *in vitro* suplementado com hCG e FSH. Na última coleta foi recuperada uma maior quantidade de ovócitos quando comparada com as coletas anteriores. A recuperação de ovócitos de grau I nas coletas encontra-se em torno de 42,56 a 55,08%, destacando-se a segunda coleta com um total de 55,08% de ovócitos grau I. Observou-se que a qualidade dos ovócitos não se manteve a mesma em todas as coletas. A porcentagem de ovócitos grau I se manteve a mesma quando comparada com os demais graus de qualidade. Os resultados da avaliação da expansão das células do *cumulus* variam em torno de 78,79 a 93,31% nas diferentes coletas, não foi encontrada associação entre as coletas e a taxa de expansão, a mesma se manteve em todas as coletas. A efetividade da expansão das células do *cumulus* e a diferença na morfologia e qualidade dos ovócitos de grau I e demais graus de qualidade encontrados por coleta indicam que a aplicação dos mesmos para PIVE é de grande interesse na área de pesquisa a partir do aproveitamento do abate nos frigoríficos.

**Palavras-chave:** Reprodução; Ovócito; PIVE; Taxa de Recuperação.

JARA, Victoria Maria Barreto. **EVALUATION OF THE RECOVERY RATE OF BOVINE OOCYTES BY FOLLICULAR ASPIRATION OF OVARIES FROM SLAUGHTERHOUSE.** 2020. 54. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2020.

### **ABSTRACT**

Success in cattle production is highly dependent on the reproductive capacity of female cattle, several factors can influence or interfere with animal reproduction. The use of biotechniques and hormonal treatments such as artificial insemination (AI) and in vitro embryo production (IVEP) contribute significantly to cattle raising by increasing the possibility of producing genetically superior calves from donors with high genetic capacity and with a considerable added value. The objective of this work was to evaluate the quality, morphology and classification of the oocytes recovered by follicular aspiration of ovaries from slaughterhouses. Four collections were made with an average of 30 ovaries per collection and 661 oocytes were recovered and classified according to quality. The best oocytes, considered viable, were separated and the cumulus cell expansion was analyzed after 24 hours of culture in in vitro maturation medium supplemented with hCG and FSH. In the last collection, a greater number of oocytes was recovered when compared to the previous collections. The recovery of grade I oocytes in the collections is around 42.56 to 55.08%, highlighting the second collection with a total of 55.08% of grade I oocytes. It was observed that the quality of the oocytes did not remain the same in all collections. The percentage of grade I oocytes remained the same when compared with the other grades of quality. The results of the cumulus cell expansion evaluation vary from 78,79 to 93,31% in the different collections, no association was found between the collections and the expansion rate, this one was maintained in all collections. The effectiveness of the expansion of cumulus cells and the difference in the morphology and quality of grade I oocytes and other quality grades found by collects indicate that their application for IVEP is of great interest in the research area to take advantages of the slaughter of cattle in slaughterhouses.

**Key words:** Reproduction; Oocyte; PIVE; Recovery Rate.

JARA, Victoria Maria Barreto. **EVALUACIÓN DE LA TASA DE RECUPERACIÓN DE OVÓCITOS BOVINOS POR ASPIRACIÓN FOLLICULAR DE LOS OVARIOS ORIUNDOS DE MATADEROS**. 2020. 54. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2020.

## RESUMEN

El éxito en la producción de ganado depende en gran medida de la capacidad reproductiva de las hembras bovinas, varios factores pueden influir o interferir con la reproducción animal. El uso de biotecnologías y tratamientos hormonales como la inseminación artificial (IA) y la producción *in vitro* de embriones (PIVE) a la cría de ganado al aumentar la posibilidad de producir terneros genéticamente superiores a partir de donantes con alta capacidad genética y con un considerable valor añadido. El objetivo de este trabajo fue evaluar la calidad, la morfología y la clasificación de los ovocitos recuperados por aspiración folicular de ovarios provenientes de mataderos. Se realizaron cuatro colectas con un promedio de 30 ovarios por colecta y se recuperaron 661 ovocitos y se clasificaron según su calidad. Los mejores ovocitos, considerados viables se separaron y se analizó la expansión de las células del *cumulus* después de 24 horas de cultivo en medio de maduración *in vitro* suplementado con hCG y FSH. En la última colecta, se recuperó una mayor cantidad de ovocitos en comparación con las colectas anteriores. La recuperación de ovocitos de grado I en las colecciones es de alrededor del 42,56 a 55,08%, destacando la segunda colección con un total de 55,08% de ovocitos de grado I, se observó que la calidad de los ovocitos no permaneció igual en todas las colectas. El porcentaje de ovocitos de grado I se mantuvo igual en comparación con los otros grados de calidad. Los resultados de la evaluación de expansión de las células del *cumulus* varían de 78,79 a 93,31% en las diferentes colectas, no se encontró asociación entre las colecciones y la tasa de expansión, lo mismo se mantuvo en todas las colecciones. La efectividad de la expansión de las células del *cumulus* y la diferencia en la morfología y la calidad de los ovocitos de grado I y otros grados de calidad encontrados en las colectas indican que su aplicación para la PIVE es de gran interés en el área de investigación para aprovechar la faena en los frigoríficos.

**Palabras clave:** Reproducción; Ovocito; PIVE; Tasa de recuperación.

## Lista de Figuras

**Figura 1** – Protocolo de aspiração folicular. A – Ovário bovino contendo folículos. B – Aspiração dos folículos no ovário com agulha e seringa apropriados. C – Fluido folicular aspirado. D – Rastreamento dos ovócitos.

**Figura 2** – Classificação dos ovócitos. A – Placa utilizada para classificação dos ovócitos. B – Ovócitos de grau I. C – Ovócitos grau II. D – Ovócitos Grau III. E – Ovócitos grau IV. F – Ovócitos grau V.

**Figura 3** – Complexo *cumulus*-ovócito apresentando *cumulus* expandido.

## Lista de Gráficos

**Gráfico 1** – Número de folículos aspirados de acordo com as coletas.

**Gráfico 2** – Porcentagem da qualidade ovocitária em de graus de I à V.

**Gráfico 3** – Porcentagem da qualidade ovocitária do grau I e demais graus de qualidade.

**Gráfico 4** – Taxa de expansão das células do *cumulus* por coleta.

## **Lista de Tabelas**

**Tabela 1** – Parâmetros descritivos dos dados das coletas

**Tabela 2** – Classificação e número de ovócitos recuperados durante as coletas.

**Tabela 3** – Porcentagem de CCOs com expansão por coleta.

## Lista de Abreviaturas e Siglas

CCO – Complexo *cumulus*-ovócito

CG – Grânulos corticais

FIV – Fertilização *in vitro*

FSH – Hormônio Folículo Estimulante

hCG - Gonadotrofina coriônica humana

IA – Inseminação Artificial

IATF – Inseminação artificial em tempo fixo

ILACVN – Instituto de Ciências da Vida e da Natureza

LAV – Meio de lavagem

LH – Hormônio Luteinizante

MAPK – Proteína quinase ativada por mitogênio

MI – Metáfase I

MII – Metáfase II

MIV – Maturação *in vitro*

MPF – Fator de promoção da mitose

OMI – Oocyte maturation inhibitor

OPU – Ovum pick up

PIVE – Produção *in vitro* de embriões

SFB – Soro fetal bovino

TCM – Tissue Culture Medium

UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana

VG – Vesícula germinativa

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1. CAPACIDADE REPRODUTIVA DA FÊMEA BOVINA .....	14
1.2. FISILOGIA OVARIANA .....	15
1.3. OOGÊNESE EM BOVINOS .....	16
1.3.1. Complexo <i>cumulus</i> -ovócito.....	17
1.3.2. Maturação dos ovócitos.....	17
1.4. FOLICULOGÊNESE EM BOVINOS.....	19
1.4.1. Ondas Foliculares.....	20
1.5. CLASSIFICAÇÃO DOS OVÓCITOS .....	21
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	23
2.1. OBJETIVO GERAL .....	23
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	24
3.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	24
3.1.1 Confecção dos meios .....	24
3.1.2 Procedimento de obtenção e classificação de ovócitos.....	26
3.1.3 Avaliação da expansão das células do <i>cumulus</i> .....	29
3.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
<b>4. RESULTADOS</b> .....	31
4.1. CLASSIFICAÇÃO DE OVÓCITOS.....	31
4.2. AVALIAÇÃO DA TAXA DE EXPANSÃO DAS CÉLULAS DO <i>CUMULUS</i> .....	32
4.3. ANÁLISE DOS DADOS EXPERIMENTAIS.....	32
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	36
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	41
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	42

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. CAPACIDADE REPRODUTIVA DA FÊMEA BOVINA

A capacidade reprodutiva se refere a uma condição em que algumas espécies conseguem se manter na cadeia evolutiva, este fator é essencial na produção animal, pois para o sucesso da produção comercial, o animal precisa se reproduzir periodicamente (PALMA, 2008). O sucesso na produção de bovinos é altamente dependente da capacidade reprodutiva das fêmeas bovinas (FREITAS et al, 2013). No caso dos bovinos leiteiros, diversos fatores podem influenciar na eficiência reprodutiva do animal. Dentre esses fatores, podemos citar o manejo ambiental e o alimentar que visa a ingestão adequada de nutrientes para atingir o balanço energético podendo interferir tanto na reprodução animal quanto na produção de leite (BERGAMASCHI et al., 2010; TRIANA et al, 2012) e carne (CASTRO et al, 2018). Da mesma forma, o intervalo interestrutal, os serviços de concepção, o grau de involução uterina e o reestabelecimento da atividade cíclica ovariana podem ser influenciados pelo manejo reprodutivo e influenciar a capacidade reprodutiva subsequente (BETANCOURT et al, 2005; EMERICK et al, 2009).

Os programas de melhoramento genético são realizados com intuito de aproveitar o processo de recombinação genética e incorporar características desejáveis para aumentar a produção de carne e leite nesses animais (PALMA, 2008). Estudos mostraram que a capacidade reprodutiva de vacas leiteiras pode ser afetada por diversos cruzamentos que são realizados com finalidade de melhorar a eficiência na produção de leite (PRYCE et al., 2004), proporcionando redução na fertilidade enquanto a produção leiteira aumenta e com isso, aumentando a incidência de algumas relacionadas ao incremento na produção de leite. Outro ponto importante é que ao diminuir a eficiência reprodutiva, a longevidade também pode ser prejudicada, levando ao abate prematuro (OLTENACU et al., 2010).

Em vacas com alta eficiência produtiva, para se obter o intervalo entre partos (IEP) ideal se torna muitas vezes tarefa difícil, pela baixa taxa de retorno ao estro no pós-parto e/ou baixa taxa de eficiência na detecção do mesmo, onde podem estar envolvidos fatores ambientais como estresse térmico, até os sistemas de produção a pasto ou em

piso de concreto (PORCIONATO et al, 2009; SARTORI, 2007; SILVA, 2019). O uso de técnicas e tratamentos hormonais podem melhorar a eficiência do ciclo estral, a sincronização da ovulação e podem auxiliar no aumento da eficiência reprodutiva quando realizados imediatamente após o parto (EMERICK et al, 2009; TRIANA et al, 2012; SARTORI, 2007) mas desde que seja acompanhado de boas condições nutricionais e de conforto térmico.

Outra ferramenta adotada para otimizar o desempenho reprodutivo em fêmeas bovinas é estabelecer um período de monta onde a concentração dos partos coincida com o período seco do ano, período que há baixa incidência de doenças que poderiam causar prejuízo. O uso da estação de monta permite controlar melhor a técnica de inseminação artificial e outros programas de melhoramento genético (JIMENEZ et al, 2013; VALLE et al, 2000).

A escolha e o uso correto das biotécnicas de reprodução tais como os cruzamentos industriais, inseminação artificial (IA), inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e a produção *in vitro* de embriões (PIVE) contribuem significativamente para o aumento na produção de bovinos ao aumentar a possibilidade de produção de bezerros geneticamente superiores podendo substituir doadoras com alta capacidade genética e com um provável valor agregado (COSTA, 2018).

## 1.2. FISILOGIA OVARIANA

Tanto a folliculogênese quanto a oogênese são etapas de desenvolvimento ovariano que ocorrem em conjunto (GIGLI et al, 2006). Diversas modificações celulares ocorrem no ovário fetal, como migrações das células primordiais, quando há massiva multiplicação das células mesonéfricas precursoras dos folículos e leva a diferenciação sexual gonádica (PALMA, 2008). A mitose das oogônias é produzida no interior da gônada sendo este o maior período da oogênese no ovário. Cada oogônia está contida em um folículo pré-antral com uma única camada de células da granulosa (DELGADO et al, 2011; MELLO et al, 2013). Antes do nascimento, todos os ovócitos encontram-se em profase I que está estagnada pela ação da substância inibitória da maturação (OMI, oocyte maturation inhibitor) secretada pelos folículos. Quando a fêmea bovina entra na puberdade, a substância responsável pela promoção da maturação é liberada e promove

um estímulo para que a divisão celular continue até chegar a metáfase II, culminando na ovulação, e se houver fecundação, a meiose é retomada e o ovócito passa a ser reconhecido como óvulo (GOTERA et al, 2008; PALMA, 2008). A partir da semana 35-36 de gestação, podem ser observados os folículos antrais pequenos, onde começa a formação do antro, que posteriormente aumentará o tamanho até adquirir as características de folículo pre-ovulatório na puberdade (FILIPAK et al, 2016).

### 1.3. OOGÊNESE EM BOVINOS

O processo de formação e desenvolvimento dos ovócitos é conhecido como oogênese ou ovogênese (GIGLI et al, 2006). A produção ovocitária nas fêmeas de mamíferos acontece quando o feto se encontra no terço médio da gestação (MARTINEZ et al, 2007). A formação do ovócito acontece em sete etapas: A formação das células primordiais germinais, a migração dessas células às gônadas primitivas, a colonização das gônadas pelas células primordiais germinais, a diferenciação das células primordiais germinais em oogônias, a proliferação das oogônias, o início da meiose e a detenção na fase de diploteno (prófase I) na meiose para permanecerem assim até a puberdade (PALMA, 2008; GOTERA, 2008).

Nas primeiras semanas do desenvolvimento embrionário, as células germinativas primordiais migram do mesentério da crista genital, enquanto a diferenciação sexual do embrião bovino ocorre quase uma semana depois, quando começa a meiose da ovogônia e o período de maior oogênese até o dia 110 de gestação. No segundo terço da gestação o ovário está repleto de oogônias com uma única camada de células da granulosa. No último terço da gestação ocorrem os estágios iniciais do crescimento folicular (DELGADO et al, 2011). Os ovócitos que alcançam estágios de folículo primordial ficam detidos na prófase I. Uma vez determinados os folículos primordiais, a disponibilidade de ovócitos será delimitada e a reserva gametogênica estabelecida. A meiose será reiniciada nos folículos pre-ovulatórios por meio do estímulo do hormônio luteinizante (LH), mecanismos endócrinos e fatores locais que regulam a atividade ovariana (GIGLI et al, 2006). O crescimento do ovócito dependerá da estabilidade das junções comunicantes entre as células do *cumulus* e o gameta (GOTERA, 2008).

### 1.3.1. Complexo *cumulus*-ovócito

As células pré-granulosas começam sua diferenciação em células da granulosa e envolvem o ovócito com uma camada de células planas, que começam a multiplicação e diferenciação em células cuboides com a retomada da meiose e podem formar várias camadas ao redor do ovócito, essas células são chamadas células do *cumulus* e em conjunto com o ovócito formam o complexo *cumulus*-ovócito (CCO) (ARASHIRO, 2012; GIGLI et al, 2006).

O complexo *cumulus*-ovócito cumpre uma função de proteção do ovócito e controle fisiológico que promove o crescimento do ovócito, a maturação meiótica e a formação e maturação da zona pelúcida (CHUI, 2016). Esta interação entre as células foliculares somáticas com o ovócito é necessária para a maturação de um ovócito competente (GOTERA, 2008; TANGHE et al, 2002). Uma boa expansão das células do *cumulus* é considerada essencial para o bom desenvolvimento da ovulação e posterior fecundação (FURNUS et al, 1998). Entre os critérios de expansão são considerados a expansão nula ou não expansão, expansão leve, expansão média e expansão máxima (CHUI, 2016).

### 1.3.2. Maturação dos ovócitos

O processo de maturação ovocitária consiste na conversão de ovócitos imaturos em ovócitos maduros com capacidade de serem fecundados. Uma série de eventos estruturais, moleculares e bioquímicos ocorrem para que a maturação do ovócito aconteça. Esse desenvolvimento ocorre desde os folículos primordiais até a ovulação, para que na sequência ocorra a fecundação, na qual o espermatozoide consegue introduzir no ovócito e começar a embriogênese (CHAVES et al, 2010). O processo de maturação ovocitária é um dos mais importantes para a produção *in vitro* de embriões, já que o ovócito deve transitar pela maturação nuclear e citoplasmática de forma sincronizada passando do estágio de diplóteno da prófase I para a meiose II e assim alcançar a aptidão e ser ativado ou fecundado (COUTO et al, 2017).

A maturação nuclear envolve a progressão da meiose a partir da prófase I até a metáfase II, ocorrem algumas alterações nucleares como a quebra da vesícula germinativa (VG), desaparecimento do nucléolo, condensação da cromatina, extrusão do primeiro corpúsculo polar e formação do segundo fuso mitótico (GOTTARDI et al, 2009;

COUTO et al, 2017). Após a remoção do ovócito de dentro do folículo, o mesmo perde a comunicação com as células do *cumulus* e conseqüentemente a transferência de inibidores é interrompida, o que ativa espontaneamente a meiose, independentemente da maturidade citoplasmática (COUTO et al, 2017). A maturação nuclear pode ser bloqueada utilizando estabilizadores farmacológicos ou inibidores fisiológicos afim de desenvolver a capacitação ovocitária de forma semelhante à observada *in vivo* (GOTTARDI et al, 2009).

A maturação nuclear pode ser classificada em 3 fases: ovócitos em VG com cromossomos descondensados, ovócitos em metáfase I (MI) com cromossomos altamente condensados e ovócitos em metáfase II (MII) com cromossomos condensados com formação da placa metafásica e extrusão do 1º corpúsculo polar (GUEMRA et al, 2013; GOTTARDI et al, 2009; CROCOMO et al, 2011). Na fase da VG as mitocôndrias são encontradas na periferia do citoplasma, enquanto na MII se agrupam no centro do citoplasma, já os grânulos corticais (GC) na VG se encontram distribuídos por todo o citoplasma, e na MII migram para o córtex até a periferia celular, o que torna possível avaliar o estágio de maturação citoplasmática de acordo com a posição dos grânulos corticais. Os GC que se encontram associados em grupos no interior do ovócito são próprios de um ovócito imaturo, já os GC situados no córtex do ovócito condicionam para um ovócito parcialmente maturo e os GC situados na periferia do ovócito indicam que o mesmo está maturo (OTERO et al, 2017; VELILLA et al, 2004).

Simultaneamente à maturação nuclear ocorre *in vivo* a maturação citoplasmática ou capacitação ovocitária, porém, o evento *in vitro* não se desenvolve da mesma forma. A maturação citoplasmática se desenvolve mais lentamente em relação à maturação nuclear podendo ocasionar em problemas de desenvolvimento dos embriões devido a ativação espontânea da meiose nuclear em momento dessincronizado com a maturação citoplasmática (GOTTARDI et al, 2009).

Uma série de situações e processos altamente complexos devem ocorrer de forma sincronizada para alcançar a maturação citoplasmática, além da reestruturação das organelas no citoplasma, devem ser realizadas modificações moleculares, síntese de proteínas, regulação da produção do fator de promoção da mitose (MPF) e a proteína quinase ativada por mitogênio (MAPK) envolvidas na progressão da meiose (KANITZ et

al, 2001). Assim como modificações moleculares, redistribuição de organelas intracelulares e maturação do mecanismo de liberação de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (GOTTARDI et al, 2009; COUTO et al, 2017)

Existe um particular interesse no processo de maturação *in vitro* de ovócitos bovinos devido às vantagens que pode proporcionar quanto ao custo na produção de embriões, obtenção de ovócitos de novilhas pré-púberes, redução do intervalo entre gerações e pela conservação do germoplasma de animais considerados superiores geneticamente (REY, 2017). Na maturação *in vitro*, diversos fatores podem influenciar para o sucesso da técnica, tais como a atmosfera gasosa, o meio de cultivo, a temperatura, a suplementação proteica e fatores de crescimento (GUEMRA et al, 2013; COUTO et al, 2017; OTERO et al, 2017).

#### 1.4. FOLICULOGÊNESE EM BOVINOS

Os folículos podem ser classificados em folículos pré-antrais, na qual não dependem das gonadotrofinas para o seu desenvolvimento, pois o estímulo é proporcionado por fatores locais e em folículos antrais. Estes últimos dependem das gonadotrofinas, do hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) para o seu desenvolvimento e completa maturação (MELLO, 2013). Os folículos pre-antrais incluem os folículos primordiais, de transição, primários e secundários, que são formados no ovário. Os folículos primordiais, consistem em um ovócito imaturo envolto por uma única camada de células da granulosa achatadas. Os folículos de transição consistem em um ovócito imaturo, envolto por uma junção de células da granulosa achatadas e células da granulosa cúbicas. Os folículos primários consistem em um ovócito imaturo rodeado por uma única camada de células da granulosa cúbicas. Já os folículos secundários consistem em um ovócito rodeado por duas ou mais camadas de células da granulosa cúbica. Os folículos pré-antrais permanecem quiescentes até a puberdade (MARTINS et al, 2008).

Os folículos antrais são caracterizados pelos folículos terciários com a formação do antro (cavidade repleta de líquido folicular), e caracterizados pelo desenvolvimento das camadas das células da teca, da lâmina basal e das células do *cumulus*. Os folículos pré-ovulatórios, que também possuem antro, são aqueles que possuem uma cavidade maior e um diâmetro próximo à ovulação, conhecidos como folículos antrais maduros (MELLO

et al, 2013; MARTINS et al, 2008). Estes possuem capacidade de responder ao estímulo do LH reiniciando a meiose e desencadeando a ovulação (GIGLI et al, 2006).

O crescimento dos folículos pré-antrais e antrais iniciais podem ser influenciados por fatores ovarianos locais (MAGALHÃES et al, 2012). Observa-se também grande importância na atuação das gonadotrofinas e somatotrofinas no crescimento dos folículos ovarianos, assim como fatores metabólicos extra ovarianos e sinalizações endógenas (MARTINS et al. 2008).

A ativação folicular possui duas etapas, a primeira, a ativação inicial, começa desde a diferenciação dos folículos primordiais até os folículos terciários iniciais. A segunda ativação é a ativação dos folículos antrais, ao contrário da primeira ativação dependem das concentrações de FSH e LH (GIGLI et al, 2006). Após o recrutamento folicular, apenas um dos folículos em crescimento, o folículo dominante, continua o seu crescimento até a ovulação ou atresia por meio de uma ação parácrina que atua inibindo o crescimento dos folículos subordinados, os quais diminuem de tamanho e sofrem atresia (LUCY et al, 1992; BARUSELLI et al, 2007; DELGADO et al, 2011). Da mesma forma, a maioria das células da granulosa que circundam o ovócito sofrem atresia mediada por apoptose (DELGADO et al, 2011).

#### 1.4.1. Ondas Foliculares

O desenvolvimento folicular dos ovócitos bovinos possui um padrão de ondas, onde cada onda é caracterizada pelo início de um grupo de pequenos folículos que são recrutados. Essa etapa pode ser chamada de emergência da onda folicular e acontece por aproximadamente 3 dias sob estimulação e em virtude do aumento do FSH (BARROS et al, 2010; BARUSELLI et al. 2007). Cada onda de crescimento folicular é dividida em quatro fases: recrutamento, seleção, dominância e atresia ou ovulação (PENITENTE FILHO, 2011). Apenas um dos folículos em crescimento, o folículo dominante, continua o seu crescimento, enquanto os folículos subordinados sofrem atresia (GIGLI et al, 2006). Na dinâmica folicular podem ocorrer de uma a quatro ondas foliculares por cada ciclo. Diferentes autores observaram que existe uma diferença na quantidade de ondas foliculares que se apresentam durante o ciclo estral, as quais podem variar em número de acordo com várias características, com idade do ano e raça, já que animais de raças

diferentes, possuem características de dinâmica folicular diferente (HENAO, 2010; BARUSELLI et al, 2007; DELGADO et al, 2011; RESTREPO, 2010). O crescimento da onda folicular começa nas primeiras duas semanas de idade e pode ser observado independentemente em fêmeas pré-púberes. As ondas podem se desenvolver aleatoriamente nos ovários, com exceção nos casos de prenhez e pós-parto, onde a presença do corpo lúteo determina o recrutamento no ovário oposto (GIGLI et al, 2006).

### 1.5. CLASSIFICAÇÃO DOS OVÓCITOS

A metodologia de aspiração folicular também conhecida como OPU (*ovum pick up*) constitui-se como uma das técnicas mais utilizadas para a obtenção de ovócitos. Trata-se de uma técnica de punção folicular *in vivo*, onde os ovócitos são aspirados mediante a punção dos folículos com a auxílio de uma agulha introduzida via vaginal guiada por ultrassom. O procedimento não é invasivo e pode ser repetido no mesmo animal, demonstrando maior capacidade de obtenção ovocitária em relação à obtenção proveniente de ovários de abatedouro, o que incrementa o rendimento reprodutivo (DENIS, 2008; MARIANO et al, 2015).

Após a aspiração folicular, seja em laboratório ou por OPU, a classificação e avaliação da qualidade dos ovócitos viáveis ou não viáveis, torna-se essencial para o futuro desenvolvimento embrionário (PALMA, 2008). Dependendo da viabilidade dos ovócitos, existirá ou não sucesso nas biotécnicas de reprodução animal como produção de embriões *in vitro* e a obtenção de ovócitos a partir de fêmeas vivas (DENIS, 2008; MARIANO et al, 2015). Existem relatos de que as taxas de recuperação, qualidade ovocitária e produção *in vitro* de embriões podem ser influenciadas pela fase do ciclo estral e do momento em que se realiza a punção folicular (GIMENES, 2010).

Diferentes autores (GIMENES, 2010; PENITENTE FILHO, 2011; BACELAR et al, 2010) realizaram a classificação de acordo com Leibfried & First em 1979 em quatro graus de qualidade ou de acordo à Viana et al (2004) que descreve cinco graus de qualidade ovocitária. Alguns critérios são avaliados para decidir se o ovócito pode ou não ser viável para posterior utilização na reprodução animal. A classificação atualmente mais utilizada para realizar a classificação é aquela que qualifica o complexo *cumulus-ovócito* (CCO) em graus de qualidade de I à V, onde:

- Grau I: Possuem CCO compactados com mais de três camadas de células do *cumulus* e ovócitos com citoplasma homogêneo. Enquanto o núcleo possui uma coloração clara e transparente.
- Grau II: Possuem CCO compactados com três ou menos camadas de células do *cumulus* e ovócitos com citoplasma ligeiramente heterogêneo.
- Grau III: Parcialmente desnudos: Os ovócitos mostram eliminação completa das células do *cumulus* de menos de 1/3 da superfície da zona pelúcida. Apresentam uma coloração translúcida (halo transparente) ao redor do ovócito.
- Grau IV: Apresentam *cumulus* expandido: Os CCO mostram a expansão das células do *cumulus* ao redor do ovócito.
- Grau V: Desnudos ou degenerados: Ovócitos sem células do *cumulus* sobre a maior parte da superfície da zona pelúcida e/ou vacuolização e contração do citoplasma, podem ser observadas granulações.

Ovócitos pertencentes aos graus I e II são considerados com maior probabilidade de progredirem até a fase embrionária e geralmente são selecionados para maturação *in vitro*, para posteriormente serem utilizados em técnicas de fertilização e cultivo *in vitro*. Ovócitos grau III podem ser utilizados em alguns casos de pouca recuperação de ovócitos, porém, ao possuir poucas células da granulosa, a capacidade de maturação e viabilidade diminui consideravelmente, sendo os de grau IV e V descartados por serem considerados inviáveis (MARIANO et al, 2015; PENITENTE FILHO, 2011).

## **2. OBJETIVOS**

### 2.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliar a taxa de recuperação e qualidade de ovócitos oriundos de coletas de ovários *post mortem* em frigoríficos.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a preparação de meios de maturação para produção *in vitro* de embriões;
- Analisar a estrutura morfológica e qualidade dos ovócitos extraídos de fêmeas bovinas mediante aspiração folicular;
- Verificar a taxa de expansão dos ovócitos considerados viáveis.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

O presente experimento foi realizado no período de janeiro a fevereiro de 2020 na Escola de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), localizada na cidade de Belo Horizonte, no estado de Minas Gerais, Brasil. O Laboratório de Células Embrionárias e Animais Transgênicos da referida Universidade possui um espaço qualificado para fins acadêmicos e pesquisa, dedicado exclusivamente à produção *in vitro* de embriões.

##### 3.1.1 Confeção dos meios

###### - Solução salina para transporte de ovário

A solução salina que foi utilizada para o transporte dos ovários coletados no abatedouro até o laboratório foi preparada para cada coleta no dia anterior. Foram utilizados 9,0g de NaCl e misturados com 1000mL de água Milli-Q. A solução foi aquecida no banho-maria entre 32 e 37°C, posteriormente foram colocados 500mL em saquinhos plásticos descartáveis e armazenados numa garrafa térmica. Os 500mL restantes são armazenados na geladeira para utilizar na lavagem de ovários no dia seguinte.

###### - Piruvato de Sódio (Sigma P 5280)

A concentração estoque do piruvato de sódio é de 100mM (11mg/mL), porém, a concentração utilizada para preparação dos meios é de 0,2mM (22µg/mL). Para preparar 5,0mL de piruvato de sódio foram pesados 0,055g da concentração estoque e dissolvidos em 5,0mL de água Milli-Q. A solução foi filtrada utilizando filtros de 0,22µm, posteriormente foram realizadas alíquotas de 50µL em tubos eppendorf de 0,5mL e congeladas no freezer em temperatura de -20°C para utilizados futuramente.

###### - Sulfato de Amicacina (Novafarma 500mg/2mL)

O Sulfato de Amicacina em concentração estoque possui 250mg/mL, porém a concentração de uso que foi colocada nos meios é de 83,4mg/mL. Para a preparação da solução foi utilizado um volume de 334µL de sulfato de amicacina e 666µL de água Milli-

Q. Foram preparadas alíquotas de 50µL em tubos eppendorf de 0,5mL e congeladas a temperatura -20°C no freezer.

- hCG (Chorulon 5000 UI)

Foram adicionados 3,540µL de TCM 199 HEPES (Gibco 12340030) para 5000UI da concentração estoque, da qual foram utilizados 10µL por cada mL de meio MIV a ser preparado afim de formular a concentração final de 14UI/mL do HCG. A solução estoque foi alíquotada em tubos eppendorf de 0,5mL, rotulada e congelada no freezer a temperatura de -20°C.

- FSH (Folltropin)

Foi utilizado o meio TCM 199 NaHCO<sub>3</sub> (Gibco 11150059) e misturado com 0,001g de FSH para preparar a solução com concentração de uso de 0,5µg/mL e posteriormente alíquotados 15µL de solução em tubos eppendorf de 0.5mL, rotulada e conservada no freezer a -20°C.

- Estradiol

Foram pesados 0,002g de estradiol (E 2758) e misturados com 2,0mL de etanol absoluto para preparar as soluções a ser utilizadas e posteriormente alíquotas de 15µL que foram identificadas e conservadas no freezer a -20°C de temperatura.

- Meio de Lavagem (LAV)

Para a confecção de 50mL do meio LAV foi utilizado um tubo Falcon de 50mL, onde foram adicionados 45mL do meio TCM 199 HEPES (Gibco 12340030), 5,0mL de soro fetal bovino (SFB), 250µL de amicacina (solução preparada) e 100µL de piruvato (solução preparada). A solução foi filtrada utilizando um filtro de 0,22µm e posteriormente identificada e armazenada na geladeira.

- Meio de Maturação *in vitro* (MIV)

Para a preparação de 15mL do meio utilizou-se 13,5mL do meio TCM 199 Bic (Gibco 11150059), 1,5mL de soro fetal bovino (Gibco 12657029), 75µL de amicacina, 30µL de piruvato, 150µL de HCG, 15µL de FSH das soluções estoque. O meio foi filtrado utilizando

uma membrana de 0,22 $\mu$ m e posteriormente foram adicionados 15 $\mu$ L da solução preparada de estradiol. O meio foi identificado e armazenado na geladeira.

Para cada procedimento a ser realizado, os meios LAV e MIV foram colocados na estufa a 38,5°C de temperatura e 5% de CO<sub>2</sub> para serem estabilizados por mínimo 30 minutos antes de entrar em contato com os ovócitos.

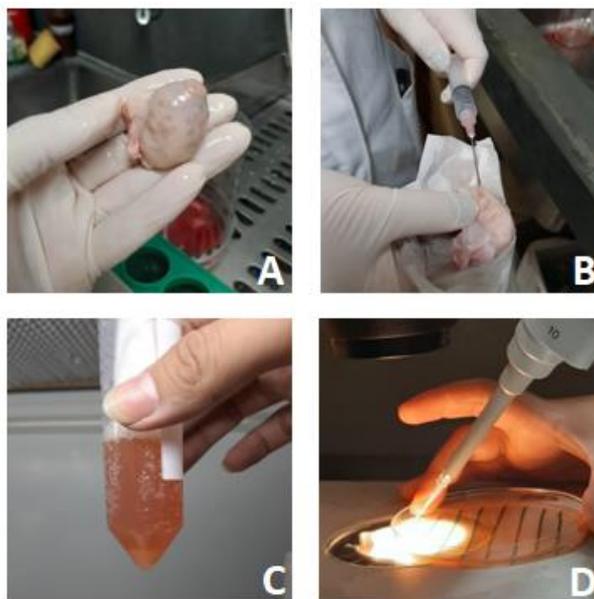
### 3.1.2 Procedimento de obtenção e classificação de ovócitos

Os ovários utilizados na pesquisa foram coletados nos frigoríficos Frigobet (localizado em Betim, Minas Gerais) e no Hipercarnes (Localizado em Belo Horizonte, Minas Gerais), uma vez por semana, dependendo da disponibilidade das fêmeas bovinos no abatedouro, em sua maioria bovinos de raças zebuínas. Os mesmos foram transportados em solução salina a temperatura de 32 – 37°C em um tempo máximo de 4 horas.

Ao chegar no laboratório, os ovários foram lavados e acondicionados em um béquer contendo solução salina, que encontrava-se dentro do banho-Maria que era mantido em temperatura de 36°C. Com o uso de luva estéril e papel toalha foram manipulados os ovários a fim de realizar a punção folicular. Antes da aspiração foram identificados os folículos com tamanho entre 2-8mm, os quais foram aspirados utilizando agulha de diâmetro 40x12mm e seringa de 5mL (Figura 01).

O líquido folicular foi coletado em tubos Falcon de 50mL e aspirado até alcançar os 25mL do tubo, o qual foi colocado dentro do banho-maria por 10 minutos afim de manter a temperatura dos ovócitos enquanto eles sedimentavam no fundo do tubo. Concluído o tempo de decantação, o líquido folicular aspirado foi levado para o fluxo laminar, onde a porção decantada foi coletada utilizando uma pipeta regulável de 1000 $\mu$ L e colocada numa placa de Petri contendo 1mL de meio LAV afim de rastrear e classificar os ovócitos recuperados segundo o grau de qualidade (Figura 1).

**Figura 1** – Protocolo de aspiração folicular. A – Ovário bovino contendo folículos. B – Aspiração dos folículos no ovário com agulha e seringa apropriados. C – Fluido folicular aspirado. D – Rastreamento dos ovócitos.



Fonte: Autoria própria.

A metodologia de classificação dos ovócitos foi selecionada de acordo aos procedimentos realizados por Viana et al (2004) e mencionados por Mariano et al (2015), os mesmos descrevem a classificação em 5 graus de qualidade.

Os complexos *cumulus-ovócito* (CCO) recuperados foram classificados morfológicamente segundo o aspecto do citoplasma (Figura 2), o número e morfologia das camadas de células do *cumulus* utilizando uma lupa estereomicroscópica no fluxo laminar e seguindo os seguintes critérios de qualidade:

- Grau I: COC compactados com mais de três camadas de células do *cumulus* e ovócitos com citoplasma homogêneo.

- Grau II: COC compactados com três ou menos camadas de células do *cumulus* e ovócitos com citoplasma ligeiramente heterogêneo.

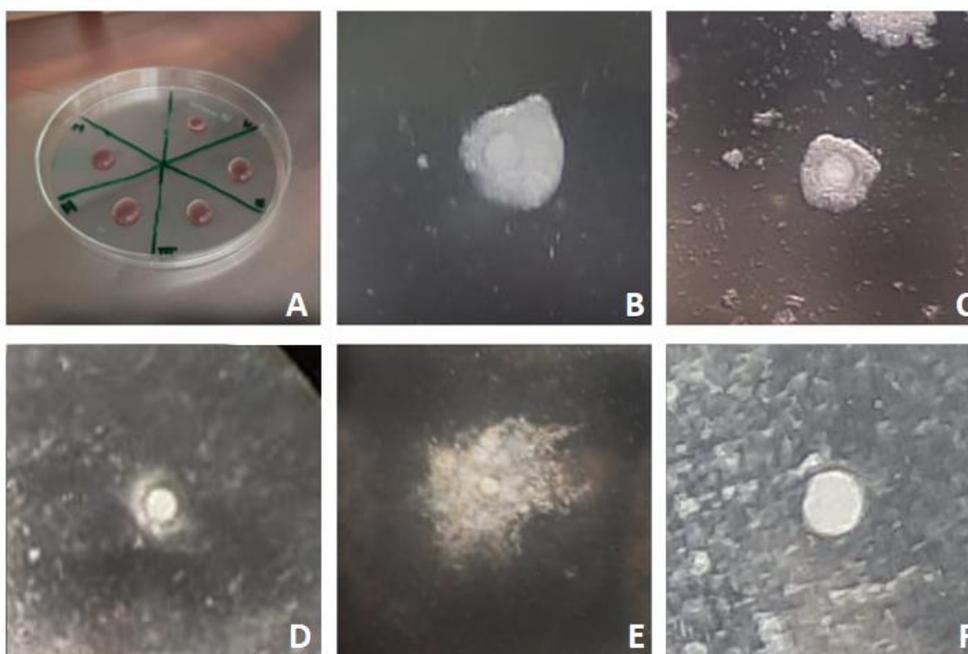
- Grau III: Parcialmente desnudos: Ovócitos que mostram eliminação completa das células do *cumulus* de menos de 1/3 da superfície da zona pelúcida. Apresentam uma coloração translúcida (halo transparente) ao redor do ovócito.

- Grau IV: Apresentam *cumulus* expandido: CCO que mostram a expansão das células do *cumulus* ao redor do ovócito.

- Grau V: Desnudos ou degenerados: Ovócitos sem células do *cumulus* sobre a superfície da zona pelúcida e/ou vacuolização e contração do citoplasma, podem ser observadas granulações.

Após realizar a classificação de acordo a seu grau de qualidade, os CCO foram separados em uma placa de Petri contendo o meio LAV para realizar a contagem de CCO por grau de qualidade e o total de ovócitos recuperados. Utilizou-se uma placa aquecedora enquanto os ovócitos não estavam sendo manipulados na lupa, afim de manter a temperatura e a viabilidade dos mesmos.

**Figura 2** – Classificação dos ovócitos. A – Placa utilizada para classificação dos ovócitos. B – Ovócitos de grau I. C – Ovócitos grau II. D – Ovócitos Grau III. E – Ovócito grau IV. F – Ovócitos grau V.



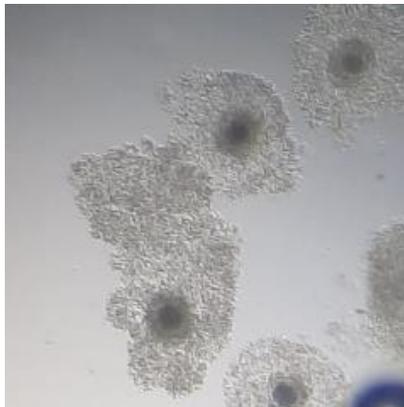
Fonte: Autorial própria.

### 3.1.3 Avaliação da expansão das células do *cumulus*

Classificados todos os ovócitos e anotados na ficha correspondente, os ovócitos de grau I e II foram selecionados e recolhidos para realizar a lavagem no meio LAV afim de retirar toda o excedente presente (sangue, células epiteliais, etc.) provenientes do líquido folicular aspirado. Foram realizadas duas lavagens no meio LAV e uma no meio MIV antes de serem colocadas para maturar. Após as lavagens, os ovócitos foram colocados em uma placa de Petri pequena em gotas de 70 $\mu$ L do meio MIV cobertas com 3500 $\mu$ L de óleo mineral. Após a estabilização, a placa contendo os ovócitos foram levados para estufa e colocados sob uma garrafa de cultivo a temperatura de 38,5°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Concluído o tempo de maturação, os ovócitos foram retirados da estufa para análise da expansão do *cumulus* em uma lupa estéreo-microscópica no fluxo laminar (Figura 3).

A avaliação da maturação dos ovócitos foi realizada considerando o método de expansão do *cumulus* mencionado por Valencia (2012) e Boruszewska et al (2015), considerando os critérios de expansão mencionados por CHUI (2016) e finalmente foram classificados como *cumulus* expandido ou não expandido.

**Figura 3** – Complexo *cumulus*-ovócito apresentando *cumulus* expandido.



Fonte: Autoria própria.

### 3.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *Statistical Analysis System* (SAS University). Para os dados referentes ao número de folículos por ovário foram utilizados os testes de Kolmogorov-Smirnov e Bartlett para verificação de normalidade dos erros e homogeneidade das variâncias. Os dados foram submetidos a análise de variância (*GLM procedure*) e as médias (*LS-means*) comparadas pelo teste de Tukey-Kramer.

Os dados referentes ao grau de classificação ovocitária e a taxa de expansão das células do *cumulus* em cada coleta foram arranjados em tabelas de contingência e analisados pelo teste de Qui-quadrado. O nível de significância adotado foi de  $\alpha = 0,05$ .

Os dados encontrados com maior relevância no presente estudo são apresentados a continuação.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. CLASSIFICAÇÃO DE OVÓCITOS

No início do experimento, a expectativa da utilização de ovários de fêmeas bovinos superava 90 ovários por coleta, no entanto, algumas dificuldades se apresentaram na hora do rastreamento dos ovócitos. Quando aspirados dos folículos, os ovócitos começam a apresentar *cumulus* expandido e quanto maior a quantidade de ovários aspirados, maior o tempo no qual os ovócitos ficam expostos ao meio e rapidamente começa a expansão do *cumulus*, dificultando a classificação dos ovócitos quanto a qualidade e procedimento de maturação. Consequentemente, decidiu-se utilizar um número de ovários menor, variando entre 25 e 35 ovários por coleta.

**Tabela 1** – Parâmetros descritivos dos dados das coletas

Parâmetros	Coletas			
	1	2	3	4
Ovários (n)	32	32	30	32
Folículos por ovário (n)	26,22 ±15,48	23,84 ±8,46	29 ±15,41	41,16 ±15,58
Taxa de recuperação de ovócitos viáveis I e II (%)	54,72%	77,96%	46,70%	70,41%

Os dados são expressos em médias ± desvio padrão da média.

A primeira coleta foi realizada no dia 21 de janeiro de 2020, na qual foram coletados e aspirados 32 ovários, onde, a quantidade total de folículos aspirados foi de 839 folículos, dos quais foram recuperados 148 ovócitos. Na segunda coleta, realizada no dia 28 de janeiro, foram coletados 32 ovários e aspirados 763 folículos dos quais foram recuperados 118 ovócitos. No dia 12 de fevereiro, a terceira coleta foi realizada, na qual foram coletados 30 ovários e aspirados 900 folículos dos quais foram recuperados 137 ovócitos. A quarta e última coleta foi realizada no dia 18 de fevereiro e foram coletados 32 ovários e aspirados 1317 folículos dos quais foram recuperados 257 ovócitos. Por cada coleta, foi realizada a contagem e classificação em graus de I à V dos ovócitos recuperados. Os dados encontram-se apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2** - Classificação e número de ovócitos recuperados durante as coletas.

Coleta	Grau I	Grau II	Grau III	Grau IV	Grau V
1	42,56%(63)	12,16%(18)	14,86%(22)	12,16%(18)	18,24%(27)
2	55,08%(65)	22,88%(270)	11,86%(14)	5,93%(7)	4,23%(5)
3	43,06%(59)	3,64%(5)	13,13%(18)	16,78%(23)	23,35%(32)
4	47,85%(123)	22,56%(58)	11,67%(30)	4,66%(12)	13,61%(35)

#### 4.2. AVALIAÇÃO DA TAXA DE EXPANSÃO DAS CÉLULAS DO *CUMULUS*

A avaliação da expansão das células do *cumulus*, foi realizada após 24 horas, para os quais foram selecionados aproximadamente 80 dos ovócitos grau I e II coletados para a avaliação que compreende a maturação dos ovócitos imaturos em meio de maturação. A avaliação da expansão do *cumulus* é um fator que está relacionado a maturação dos ovócitos e a competência ovocitária, no entanto, não pode ser usado como parâmetro para mensurar a taxa de maturação dos ovócitos. Foi realizada uma avaliação da expansão do *cumulus* por observação utilizando uma lupa estereomicroscópica após 24 horas de cultivo no meio de maturação *in vitro* (Tabela 3).

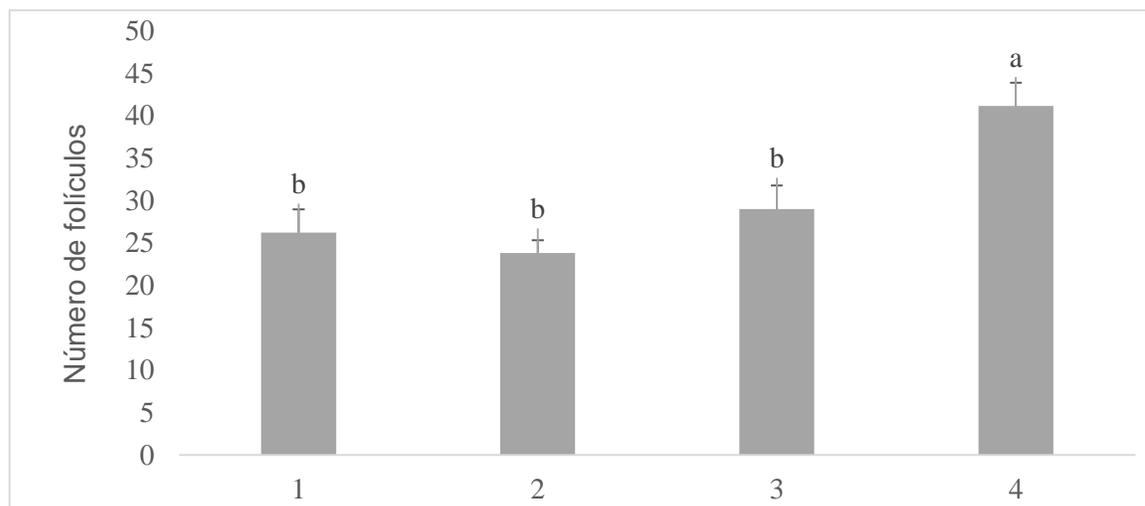
**Tabela 3.** Porcentagem de CCOs com expansão por coleta.

Coleta	Sem expansão do <i>cumulus</i>	Com expansão do <i>cumulus</i>
2	6,69%	93,31%
3	21,21%	78,79%
4	14,02%	85,98%

#### 4.3. ANÁLISE DOS DADOS EXPERIMENTAIS

Ao comparar as 4 coletas foi possível observar um maior número de folículos na coleta 4 ( $41,16 \pm 15,58$ ) ao comparar com as outras coletas ( $P < 0,05$ ), conforme observado no gráfico 1.

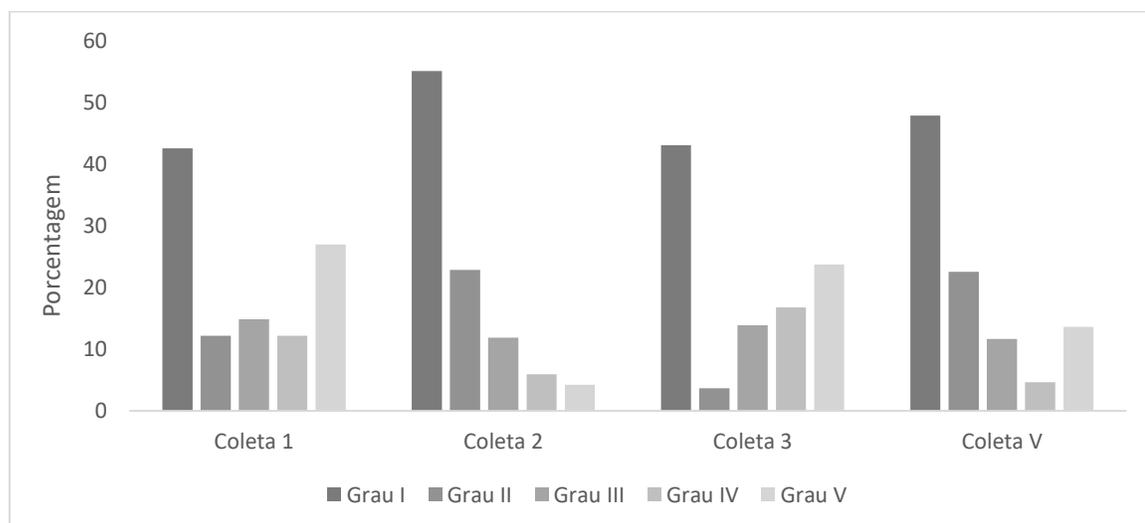
**Gráfico 1.** Número de folículos aspirados de acordo com as coletas.



Letras minúsculas diferem entre si.

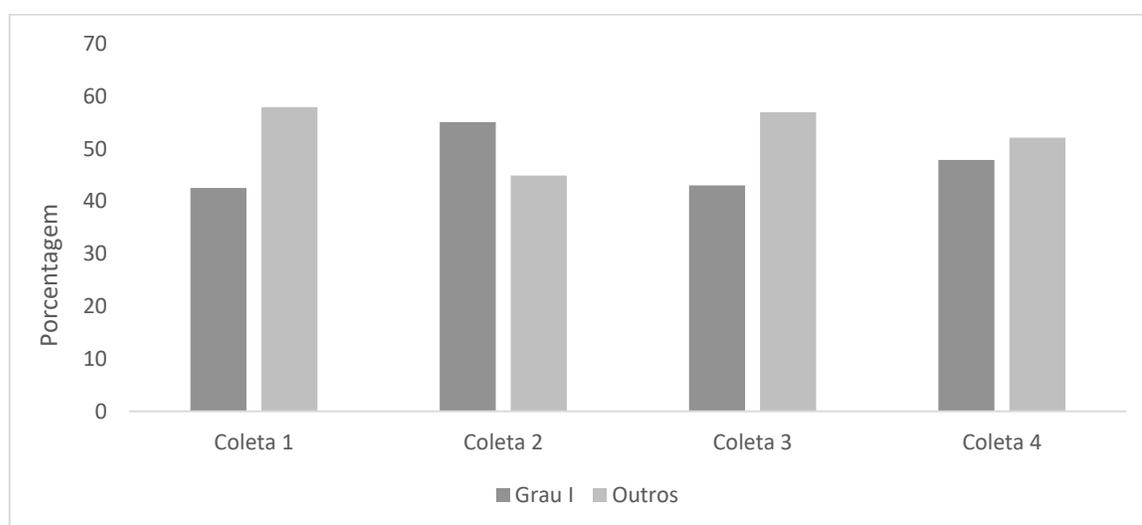
No gráfico 2 são apresentadas as porcentagens de acordo com a qualidade ovocitária classificadas em graus de I à V obtido em cada coleta. Os graus de classificação dos ovócitos foram comparados entre si para determinar se existia diferença na qualidade entre as coletas. Como observado no gráfico abaixo (Gráfico 2), a recuperação de ovócitos de grau I nas coletas 1, 2, 3 e 4 foi de 42,56%, 55,08%, 43,06% e 47,85%, respectivamente, sendo que estatisticamente a porcentagem de ovócitos grau I foi maior na coleta 2.

**Gráfico 2.** Porcentagem da qualidade ovocitária de graus I à V



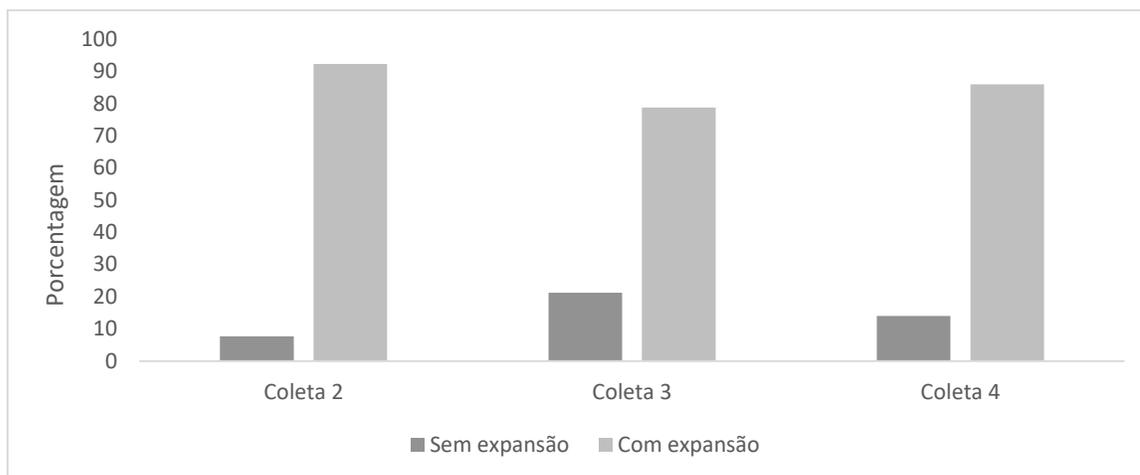
Uma outra análise comparando o grau de qualidade I (de maior importância para FIV) com os demais graus de qualidade, o mesmo mostrou que não há relação entre a coleta e a qualidade dos ovócitos. Ou seja, para todas as coletas a taxa de obtenção dos ovócitos de grau I se mantém a mesma em relação aos demais graus de qualidade ovocitária. No gráfico 3 pode ser observado que a porcentagem dos ovócitos de grau I se mantém em todas as coletas.

**Gráfico 3.** Porcentagem da qualidade ovocitária do grau I e demais graus de qualidade.



Nas coletas 2 e 3 e 4 observou-se uma variação de 93,31%, 78,79 e 85,98% de *cumulus* expandido respectivamente nas coletas analisadas, destacando-se a coleta 2 com 93,31% de expansão. Para a análise dos ovócitos maturados no meio MIV que passaram pela avaliação da expansão das células do *cumulus* foi determinado se existe relação entre as taxas de expansão e as coletas (Gráfico 4). Pelo teste estatístico realizado não há associação entre as coletas e a taxa de expansão. Logo pode-se entender que não houve variação da taxa de expansão entre as coletas.

**Gráfico 4.** Taxa de expansão das células do *cumulus* por coleta.



## 5. DISCUSSÃO

No presente trabalho, foi avaliada a taxa de recuperação de ovócitos obtidos por aspiração folicular de ovários oriundos de abatedouro.

Existem diversos fatores que podem afetar a viabilidade dos ovócitos utilizando ovários provenientes do abatedouro, dos quais não se tem um controle sanitário rigoroso. Porém, a utilização desses ovócitos pode ser efetiva já que ajuda na redução dos custos possibilitando o aproveitamento de ovócitos com potencial para a produção *in vitro* de embriões e que normalmente se tornaram atrésicos durante o ciclo estral do animal (BEZERRA et al, 2019; JEREZ, 2018).

O transporte dos ovários desde o abatedouro até o laboratório deve ser realizado com o máximo de segurança proporcionando menores variações de temperatura possíveis, para evitar perdas na qualidade dos ovócitos recuperados durante a aspiração folicular (VALENCIA, 2012). No presente experimento, os ovários foram transportados desde o abatedouro até o laboratório a temperatura de 32-37°C, podendo influenciar nas respectivas taxas de recuperação obtidas em cada coleta. A manutenção dos ovócitos no fluido folicular até serem avaliados proporciona o melhor ambiente para manter os CCOs em boas condições (VALENCIA, 2012).

Para um correto desenvolvimento do ovócito no cultivo *in vitro*, é importante que o mesmo, no momento da aspiração folicular apresente um desenvolvimento apropriado (entre 2mm e 10mm) capaz de responder aos estímulos proporcionados por sinais parácrinos e endócrinos responsáveis pela indução à maturação (ARAUJO et al, 2014). Quando o folículo é consideravelmente maior, é exercida uma pressão menor pela agulha durante a aspiração, o que impede uma possível fissura devido à maior quantidade de células do *cumulus* que circunda o ovócito, proporcionando uma proteção (ARASHIRO, 2012). Porém, quanto maior o folículo, as células do *cumulus* aspiradas tendem a ser mais expandidas ou degeneradas do que em folículos de menor tamanho, podendo prejudicar na hora da classificação do ovócito como viável ou não (ARASHIRO, 2012).

Concordando com COUTO et al (2017), o tempo de aspiração folicular foi um fator determinante observado no presente trabalho, pois em um primeiro momento, o número de amostras de ovários planejados para utilização foi maior do que os que foram efetivamente utilizados (FERNANDEZ, 2017; ERREIS, 2016). O fator que influenciou a

decisão de utilizar entre 25 e 35 amostras foi o menor tempo de espera dos ovócitos extraídos do ovário e que permaneciam decantando no fluido folicular, já que com amostras maiores percebeu-se maior proporção de expansão das células do *cumulus*.

Para obter uma boa qualidade de ovócitos mediante a aspiração folicular se deve levar em consideração o diâmetro da agulha e a pressão de aspiração, por isso, optou-se pela utilização de agulhas 40x12 que conseguem aspirar os ovócitos inteiros e evitar separar o complexo *cumulus*-ovócito deixando os ovócitos desnudos. Como a pressão gerada na aspiração é manual, optou-se pela utilização de seringas de 5 mL, as quais permitem uma melhor manipulação e menor pressão (ZAMORA, 2013). Outro fator que pode ser considerado é a habilidade manual, já que alguns autores mencionam que a taxa de CCOs recuperados depende também da destreza da pessoa durante a manipulação (VALENCIA, 2012; BOLAÑOS, 2014). Nesse trabalho, foi observada uma diferença na porcentagem de ovócitos recuperados entre os graus de qualidade das coletas realizadas, podendo ser resultado da manipulação da técnica. A diferença das primeiras coletas, para as últimas coletas foi observada uma melhora na recuperação de ovócitos, podendo inferir que junto com a experiência foi adquirida uma melhora na manipulação da técnica.

As técnicas mais comuns de obtenção de ovócitos utilizadas para ovários de abatedouro são, o método de *slicing* ou fatiamento do ovário (BOLAÑOS, 2015) e aspiração folicular acoplada a seringa ou bomba a vácuo (LUEDKE, 2018). Dentre essas técnicas, a taxa de obtenção de ovócitos é maior quando utilizado o *slicing* ou fatiamento do ovário, pois o mesmo permite um maior alcance de folículos localizados no córtex do ovário. No entanto, a qualidade desses ovócitos após a recuperação se encontra diminuída, devido as perdas das células do *cumulus* durante o fatiamento (ERREIS, 2016).

Um estudo realizado por Bezerra et al (2019) compara a taxa de obtenção dos ovócitos obtidos a partir de OPU de doadoras *in vivo* e aspiração folicular de doadoras provenientes do abate (*in vitro*), o artigo apresenta uma maior taxa de obtenção de ovócitos viáveis em ovários *in vitro*, do que *in vivo*, contudo, a quantidade de ovócitos que desenvolveram até a fase de blastocisto foi maior com a OPU para fêmeas vivas do que

para ovários de abatedouro. Resultados similares foram encontrados por Karadjole et al (2010).

Algumas pesquisas apresentam diferença entre a quantidade de folículos aspirados por ovário, possivelmente devido à manipulação da técnica de aspiração folicular (VALENCIA, 2012), as diferentes procedências dos animais, estação do ano (KANWICHAI et al, 2019), raça, idade da fêmea (BATISTA et al, 2016), e possíveis doenças reprodutivas (OLIVEIRA, 2007). No presente trabalho foi registrado um aumento na quantidade de folículos aspirados na última coleta, onde a quantidade de folículos aspirados por ovário supera o mencionado por Batista et al (2016) que foi de 3,54 folículos por ovário e Perea et al (2017) que foi de 13,8 folículos por ovário, mas continua sendo inferior à quantidade de folículos aspirados por Malca et al (2016) que foi de 100,75 ovócitos por vaca. Em relação a quantidade de ovócitos recuperados, os valores são muito menores aos encontrados em estudos relacionados (BATISTA et al, 2016; MALCA et al, 2017).

No trabalho realizado por Karadjole et al (2010) o número de folículos aspirados por ovário proveniente de abatedouros foi de 19,3 folículos por ovário, menor em relação aos dados apresentados neste trabalho, da mesma forma, a porcentagem de ovócitos de grau I e II recuperados para maturação *in vitro* foram menores. Contudo, os autores mencionam que existe uma variação muito grande em relação a quantidade de ovócitos viáveis que podem ser recuperados, podendo variar entre 7% e 69,6%, sendo maior a taxa de recuperação em ovários provenientes de abatedouro.

Erreis (2016) encontrou uma taxa de recuperação de ovócitos de qualidade I de 27,3%, considerada menor em comparação aos resultados obtidos no presente trabalho (entre 42,56 % e 55,08%). Porém, em relação à porcentagem total de ovócitos viáveis (grau I e grau II), a autora encontrou uma porcentagem de 47,6%, resultado similar em relação ao presente estudo (entre 46,70%). Kanwichai et al (2019) encontrou uma porcentagem de 74.9% de ovócitos de grau I utilizando o método de aspiração folicular, sendo considerado uma porcentagem maior em relação aos resultados obtidos no presente estudo, porém, para os demais graus de qualidade, as porcentagens se mantêm as mesmas. Isto difere do resultado encontrado neste estudo, onde a porcentagem de

ovócitos recuperados difere em cada coleta e somente o grau I se mantém em todas as coletas.

O experimento realizado por Batista et al (2016) encontrou uma porcentagem maior de ovócitos com grau de qualidade III em todas as suas repetições, isto difere do que foi encontrado no presente trabalho, onde a maior porcentagem de recuperação dos ovócitos foi do grau I, considerado o de maior importância para a produção *in vitro* de embriões (PIVE). No trabalho de Malca et al (2017) somente 36,96% dos ovócitos recuperados foram considerados viáveis e aptos para utilização na FIV. No entanto, Bolaños (2015) conseguiu uma porcentagem de 66,6% de ovócitos viáveis durante a primeira hora de aspiração *post mortem*, observando uma diminuição de 62,8% de viabilidade 3 horas após a morte dos animais, demonstrando que a manutenção dos ovários a 38°C mantém a viabilidade dos ovócitos durante o tempo que é realizada a classificação e posterior maturação *in vitro* de ovócitos viáveis.

Resultados encontrados por Mamy et al (2017) descrevem que a aspiração folicular de ovários com corpo lúteo presente contribuem para uma maior porcentagem de ovócitos não viáveis, quando comparado com a aspiração de ovários sem a presença do corpo lúteo, concluindo que a ausência do corpo lúteo permite a obtenção de uma quantidade maior de ovócitos viáveis.

Diversos autores relataram a possibilidade da classificação da qualidade oocitária de acordo com o interesse da pesquisa ou do produtor. Para uma melhor classificação dos ovócitos, no presente trabalho optou-se pela classificação em 5 graus de qualidade. Apesar de classificarmos os ovócitos nos graus I à V, somente aqueles pertencentes aos graus I e II contendo CCOs com várias camadas de células do *cumulus* compactas e citoplasma uniforme foram considerados viáveis para dar continuidade ao processo de maturação e posterior avaliação da expansão do *cumulus*.

O processo de maturação ovocitária é essencial para o sucesso da produção *in vitro* de embriões, pois garante que o ovócito possua a capacidade para ser fecundado (LUEDKE, 2018). Para o sucesso da maturação dos ovócitos, uma série de suplementos básicos devem ser utilizados (ARAUJO et al, 2014). A retomada da meiose depende da exposição dos folículos *in vivo* ou *in vitro* as gonadotrofinas (TSAFRIRI et al, 1982). Um estudo realizado por Rosseto e colaboradores (2012) comparando os meios TCM-199,

McCoy e  $\alpha$ -MEM demonstrou que o melhor meio que conduz à maior porcentagem de viabilidade dos ovócitos bovinos após o cultivo *in vitro* é o meio TCM-199.

O óleo mineral utilizado para cobrir as gotas do meio de cultivo durante a manipulação dos ovócitos (inclusive embriões) têm uma importante função; a de barreira física e térmica quando adicionado nas placas. Desta forma busca-se evitar a evaporação, favorecendo a manutenção da temperatura, a osmolaridade e o pH, enquanto a placa não estiver dentro da estufa, impedindo que sujeiras externas penetrem no microambiente onde se encontram os ovócitos (SWAIN et al, 2018; MARTINEZ et al, 2017). Contudo, Araujo et al (2014) menciona que a não utilização do óleo no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais bovinos mantém a viabilidade folicular e estimula a formação do antro e a produção de estradiol após o cultivo *in vitro*.

As células do *cumulus* desempenham um papel importante na maturação *in vitro*, estabelecendo a quantidade de nutrientes e energia necessários para a maturação, além disso, secreta ácido hialurônico que é responsável pela expansão das células do *cumulus* (ZHISPON & CONTRERAS, 2017). Acredita-se que estas sejam capazes de transportar os suplementos adicionados ao meio de maturação até o ovócito (DALTON et al, 2014).

O *cumulus* é considerado expandido quando os CCOs apresentam uma variação na morfologia e distribuição das células que envolvem o ovócito após a maturação *in vitro* (QUEZADA-CASASOLA et al, 2018). No presente trabalho foi avaliada a expansão do das células do *cumulus*, onde os resultados encontrados variam em torno de 78,79 a 93,31% da expansão das células do *cumulus* nas diferentes coletas, mesmo que não haja relação entre as coletas e a taxa de expansão do *cumulus*, os resultados encontrados neste trabalho foram similares e inclusive melhores do que os encontrados por Valencia (2012) em raças bovinas leiteiras.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, foi observada uma alta taxa de recuperação de ovócitos com grau de qualidade I em ovários obtidos de abatedouro utilizando a técnica de aspiração folicular. Foi observada uma variação nas diferentes coletas em relação à taxa de recuperação dos diferentes graus de qualidade, porém, a obtenção de ovócitos viáveis para continuar o processo de maturação *in vitro* se mantiveram em todas as coletas, o que indica que a aplicação dos mesmos para PIVE é de grande interesse na área de pesquisa para o aproveitamento do abate nos frigoríficos.

Em relação à quantidade de folículos aspirados por ovário, no período em que foram realizadas as coletas, a média encontrada por coleta teve variações sobretudo na última coleta. Esses resultados podem ser devido às diferentes procedências dos ovários, estação do ano, raça e inclusive a causa da morte desses animais nos frigoríficos.

Foi observada uma alta taxa de expansão das células do *cumulus* após a permanência de 24 horas no meio de maturação.

## 7. REFERÊNCIAS

ARASHIRO, E. K. N. ADEQUAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA O ESTUDO IN VIVO DA VASCULARIZAÇÃO E DA CARACTERIZAÇÃO DO FLUIDO FOLICULAR E CÉLULAS DA GRANULOSA. **Tese (Doutorado em Ciência Animal)**. Universidade Federal de Minas Gerais. 2012.

ARAUJO, V. R.; GASTAL, M. O.; FIGUEREIDO, J. R.; GASTAL, E. L. *In vitro* culture of bovine preantral follicles: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 12, n. 1, p. 78. 2014.

BACELAR, D.; MAX, M. C.; PADILHA, L. C.; BARREIROS, T. R. R.; SENEDA, M. M. Incremento na obtenção de oócitos em novilhas Nelore (*Bos taurus indicus*) tratadas com progesterona injetável e benzoato de estradiol. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 31, n. 1, p. 163-172. 2010

BARROS, C. M.; OLIVEIRA, A. C. S.; ROSA, F. S.; ERENO, R. L. Técnicas de sincronização para superovulação de doadoras *Bos taurus* e *bos indicus*. Disponível em: <[https://siraa.com.br/novo/wp-content/uploads/2018/04/4\\_siraa.pdf#page=192](https://siraa.com.br/novo/wp-content/uploads/2018/04/4_siraa.pdf#page=192)>. Acessado em dezembro de 2019>.

BARUSELLI, P S.; GIMENES, L. U.; SALES, J. N. de S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte**, v. 31, n. 2, p. 205-211, 2007.

BATISTA, J. F.; SILVA, L. F. D.; LAZARI, L. P.; LEAL, M. D. C. D. O.; SOUZA, M. M. D.; GARCIA, S. M. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E NUCLEAR DE OÓCITOS BOVINOS IMATUROS, OBTIDOS DE OVÁRIOS COM E SEM A PRESENÇA DE CORPO LÚTEO. **Colloquium Agrariae**, v. 12, n.2, p.01-05. 2016.

BERGAMASCHI, M. A. C. M.; MACHADO, R.; BARBOSA, R. T. Eficiência reprodutiva das vacas leiteiras. **Circular Técnica da Embrapa**. Edição 64. 2010.

BETANCOURT, J. A. Inclusión del Intervalo Interestral (IIE) como elemento diagnóstico de la fertilidad del rebaño bovino. **Revista Electrónica de Veterinaria**, vol. VI, núm. pp. 1-15. 2005.

BEZERRA, A. D. O.; NICACIO, A. C.; MENEZES, G. R. D. O.; GOMES, R. D. C.; SILVA, L. O. C.; ROCHA-FRIGONI, N. A. D. S.; MINGOTI, G. Z. Comparison between in vitro embryo production using Y-sorted sperm and timed artificial insemination with non-sorted sperm to produce crossbred calves. **Animal Reproduction Science** 208, 106101. 2019.

BOLAÑOS, D. K. S.. Determinación de la viabilidad de ovocitos bovinos obtenidos post mortem a varios periodos de tiempo en el Camal Municipal de Tulcán. Tese de grado (Engenharia em Desenvolvimento Agropequário) **Universidad Politécnica Estatal del Carchi**. 2015.

BORGES, Á. M.; TORRES, C. A. A.; RUAS, J. R. M.; ROCHA JUNIOR, V. R.; CARVALHO G. R.. Dinâmica folicular ovariana em novilhas mestiças Holandês-Zebu. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.2001 n.5. 2001.

BORUSZEWSKA, D.; SINDEREWICZ, E.; KOWALCZYK-ZIEBA, I.; GRZYCMACHER, K.; WOCLAWEK-POTOCKA, I.. The effect of lysophosphatidic acid during in vitro maturation of bovine cumulus–oocyte complexes: cumulus expansion, glucose metabolism and expression of genes involved in the ovulatory cascade, oocyte and blastocyst competence. **Reproductive Biology and Endocrinology**, 13:44. 2015.

CASTRO, F. C. D.; FERNANDES, H.; LEAL, C. L. V.. SISTEMAS DE MANEJO PARA MAXIMIZAÇÃO DA EFICIÊNCIA REPRODUTIVA EM BOVINOS DE CORTE NOS TRÓPICOS. **Veterinária e Zootecnia**, 25(1): 041-061. 2018.

CHAVES, R. N.; DUARTE, A. B. G.; MATOIA, M. H. T.; FIGUEIREDO, J. R.. Sistemas de cultivo in vitro para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.34, n.1, p.37-49. 2010.

CHUI, A. S. S. EVALUACION DE LA VIABILIDAD DE OVOCITOS COLECTADOS POR ASPIRACION EN VACAS POST MÓRTEM EN ALTURA. Tese de grado (Engenharia Agrônômica). **Universidad Mayor de San Andrés**. 2016.

COSTA, H. J. U.. GANHO GENÉTICO E AVALIAÇÃO ECONÔMICA DE SISTEMAS PRODUTIVOS DE GADO DE CORTE SOB DIFERENTES TÉCNICAS REPRODUTIVAS E COM CRUZAMENTO INDUSTRIAL. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Animal). **Universidade Estadual Paulista**. 2018.

COUTO, J. C.; SORIANO, G. A. M.; MEMBRIVE, C. M. B.; GIOMETTI, I. C.; CASTILHO, C.. MATURAÇÃO OOCITARIA EM BOVINOS: EFEITO DOS ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS. **Veterinária e Zootecnia** v. 24 n. 3-S1. 2017.

CROCOMO, L. F.; MARQUES FILHO, W. C.; ALVARENGA, F. C. L.; BICUDO, S. D.. Aspectos bioquímicos e ultraestruturais da maturação oocitária. **Veterinária e Zootecnia**, v. 18, n. 4, p. 542-552, 2011.

DALTON, C. M.; SZABADKAI, G.; CARROLL, J.. Measurement of ATP in Single Oocytes: Impact of Maturation and Cumulus Cells on Levels and Consumption. **Journal of Cellular Physiology**. v. 229, p. 353–361. 2014.

DELGADO, P. A. M.; CUELLAR, N. R.; SANCHEZ, C. M. G.; ROJAS, E. C. C.. Dinamica folicular en la vida reproductiva de la hembra bovina. **Veterinária e Zootecnia**. 5(2): 88-99, 2011.

DENIS, R.. ASPIRACIÓN FOLICULAR IN VIVO (OPU) UNA NUEVA PERSPECTIVA EN EL CAMPO DE LAS BIOTECNOLOGÍAS DE LA REPRODUCCIÓN. **Ciencia y Tecnología Ganadera** Vol. 2 No. 2,p. 57-70. 2008.

EMERICK, L. L.; DIAS, J. C.; GONÇALVES, P. E. M.; MARTINS, J. A. M.; SOUZA, VALE FILHO, V. R. ANDRADE, V. J.. Retorno da atividade ovariana luteal cíclica de vacas de corte no pós-parto: uma revisão. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.33, n.4, p.203-212. 2009.

ERREIS, M. D. C.. COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS DE RECOLECCIÓN (SLICING Y ASPIRACIÓN FOLICULAR) DE OVOCITOS BOVINOS OBTENIDOS POST MORTEM PARA LA PRODUCCIÓN DE EMBRIONES IN VITRO. Tese de grado (Medicina Veterinaria e Zootecnia). **Universidad Nacional de Loja**. 2016.

FERNANDES, R. C. D.. MADURACIÓN in vitro DE OVOCITOS EN METAFASE II DE VACAS POST MORTEM A TRÁVES DE LA TÉCNICA DE FIJACIÓN. Disertação (Magister Scientiae en Producción Animal). **Universidad Nacional Agraria La Molina**. 2017.

FILIPIAK, Y.; VIQUEIRA, M.; BIELLI, Alejandro. Desarrollo y dinámica de los folículos ováricos desde la etapa fetal hasta la prepuberal en bovinos. **Veterinaria (Montevideo)**, v. 52, n. 202, p. 2-2, 2016.

FREITAS, S.; AZAMBUJA, R. C. C.; RODRIGUES, P. F.; BALDISSERA, J.; MENDONÇA, F. d S.; COSTA, R. F.; SCHNEIDER, A; CARDOSO, F.. EFICIÊNCIA PRODUTIVA E REPRODUTIVA DE VACAS DE CORTE DE DIFERENTES GENÓTIPOS CRIADAS NO SUL DO BRASIL. **Universidade Federal de Pelotas**. 2013.

FURNUS, C. C.; MATOS, D. G; MOSES, D. F.. Cumulus Expansion During In Vitro Maturation of Bovine Oocytes: Relationship With Intracellular Glutathione Level and Its Role On Subsequent Embryo Development. **MOLECULAR REPRODUCTION AND DEVELOPMENT**, 51:76–83. 1998.

ZHISPON, A. R. M. & CONTRERAS, A. I. Q.. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD Y MADURACIÓN DE OVOCITOS BOVINOS OBTENIDOS DE OVARIOS DE MATADERO CON TRES PRESIONES DE VACÍO. Dissertação (Médico Veterinário Zootecnista). Facultad de Ciencias Agropecuárias. **Universidad de Cuenca**. 2017.

GIGLI, I; RUSSO, A.; AGÜERO,A.. Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. **InVet**, vol. 8, núm. 1, pp. 183-203. 2006.

GIMENES, L. U.. TAXA DE RECUPERAÇÃO IN VIVO E COMPETÊNCIA IN VITRO DE OÓCITOS BUBALINOS, ZEBUINOS E TAURINOS ASPIRADOS EM DIFERENTES FASES DA ONDA DE CRESCIMENTO FOLICULAR. Tese (Doutorado em Ciências). **Universidade de São Paulo**. 2010

GOTTARDI, F. P.; MINGOTI, G. Z.. MATURAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS E INFLUÊNCIA NA ADQUIÇÃO DE COMPETÊNCIA PARA O DESENVOLVIMENTO DO EMBRIÃO. Ver Bras Reprod Anim, Belo Horizonte, v33, n.2, p.82-94. 2009.

GOTERA, R. M.. Fisiología del gameto femenino. **Desarrollo Sostenible de Ganadería Doble Propósito**. 41:505-514. 2008.

GUEMRA, S.; MONZANI, P. S.; SANTOS, E. S.; ZANIN, R.; OHASHI, O. M.; MIRANDA, M. S.; ADONA, P. R.. Maturação in vitro de oócitos bovinos em meios suplementados com quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.65, n.6, p.1616-1624, 2013.

HENAO, G. R.. Algunos factores relacionados con la dinámica folicular en Bos Indicus. **Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín**, 63(2): 5577-5586. 2010.

JEREZ, E. R. M.. EFECTO DEL ESTATUS OVÁRICO SOBRE LA PRODUCCIÓN IN VITRO DE EMBRIONES BOVINOS. Dissertação (Mestrado em reprodução bovina). **Universidad Nacional de Córdoba**. 2018.

JIMENEZ, C. R.; TRIANA, E. L. C.; PENITENTE FILHO, J. M.. Manejo, Eficiência Reprodutiva e Interação Reprodução x Nutrição em Gado de Corte. **Universidade Federal de Viçosa**. 2013.

KANITZ, W.; BRUSSOW, K. P.; BECKER, F.; TORNER, H.; SCHNEIDER, F.; KUBELKA, M.; TOMEK, W.. Comparative Aspects of Follicular Development, Follicular and Oocyte Maturation and Ovulation in Cattle and Pigs. **Arch. Tierz**, Dummerstorf 44. Special Issue, 9-23. 2001.

KANWICHAI, S.; PANASOPHONKUL, S. VOS, P. L. A. M.; SURLYASATHAPORN, W.. In vitro maturation of class I oocytes of bovine during different tropical seasons. **Tropical Animal Health and Production**, 11250-019-01800. 2019.

KARADJOLE, M.; GETZ, I.; SAMARDZIJA, M.; MACESIC, N.; MATKOVIC, M.; MAKEK, Z.; KARADJOLE, T.; BACIC, G.; DOBRANIC, T.; POLETTO, M.. The developmental competence of bovine immature oocytes and quality of embryos derived from slaughterhouse ovaries or live donors by ovum pick up. **VETERINARSKI. ARHIV**. 80 (4), 445-454. 2010.

KOZICKI, L. F.. ASPECTOS FISIOLÓGICOS E PATOLÓGICOS DO PUERPÉRIO EM BOVINOS. *Arch. Vet. Scienc.* 3(1):9-19, 1998

LUCY, M. C.; SAVIO, J. D.; BADINGA, L.; DE LA SOTA, R. L.; THATCHER, W. W.. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. **J Anim Sci**, v.70, p.3615-3626, 1992.

LUEDKE, F. E.. ASPECTOS TÉCNICOS DA PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS – REVISÃO. Trabalho de conclusão de curso (Zootecnia). **Universidade Federal do Pampa**. 2018.

LEIBFRIED, L.; FIRST, N. L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. **Journal of Animal Science**, 1979, vol. 48, no 1, p. 76-86.

MAGALHÃES, D. M.; SALES, E. T.; PADILHA, R.T.; SILVA, T. F. P.; TONIOLI, R.; FIGUEIREDO, J. R.. Hormônio do crescimento (GH) e fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I): importantes reguladores das foliculogêneses in vivo e in vitro. **Rev Bras Reprod Anim**, v.36, p.32-38, 2012.

MALCA, A. E. A.; GAMARRA, G.; GALLEGOS, A.; SAMILILAN, V.. TASA DE RECUPERACIÓN DE OVOCITOS EN VACAS HOLSTEIN EN DESCARTE. **Anales Científicos**, 77 (1), 63-68. 2016.

MAMY, K., Atiqah, N. y Ariani, N. Effect of ovarian types and collection techniques on the number of follicles and the quality of cumulus-oocyte-complexes in cow. **Bangladesh Journal of Animal Science**, 45 (3), 10-16. 2017.

Martinez, CA, Nohalez, A., Parrilla, I. et al. The overlaying oil type influences in vitro embryo production: differences in composition and compound transfer into incubation medium between oils. **Scientific Reports** 7, 10505. 2017.

MARTINS, F. S.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R.. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.32, n.1, p.36-49. 2008.

MARIANO, R. S. G.; USCATEGUI, R. A. R.; NOCITI, R.; BARROS, . F. P. D. C.; RODRIGUEZ, M. G. K.; TAIRA, A. R.; FELICIANO, M. A. R.; VICENTE, W. R. R.;

TEIXEIRA, P. P. M.. ASPIRAÇÃO FOLICULAR EM RUMINANTES – REVISÃO DE LITERATURA. **Revista Investigação**, 14(6):46-53, 2015.

MELLO, R. R. C.; FERREIRA, J. E.; SILVA, A. P. T. B.; MELLO, M. R. B.; PALHANO, H. B.. DESENVOLVIMENTO FOLICULAR INICIAL EM BOVINOS. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.37, n.4, p.328-33. 2013.

MIRANDA, J. E. C.; FREITAS, A. F.. Raças e tipos de cruzamentos para produção de leite. **Circular Técnico da Embrapa** - Edição 98. 2009.

OLIVEIRA, A. P. Pesquisa do vírus da rinotraquíte infecciosa dos bovinos em complexos Cumulus-oócito e líquido folicular. 2007. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Escola de Veterinária. **Universidade Federal de Minas Gerais**. 2007.

OLTENACU, P. A.; BROOM, D. M.. The impact of genetic selection for increased milk yield on the welfare of dairy cows. **Anim. Welfare**, 19 (S), 39-49. 2010.

OTERO, A. R.; COSTA, P. E.; PEREIRA, M. E.. Maduración nuclear in vitro de ovocitos bovinos seleccionados por el método azul cresil brillante. **Rev Colombiana Cienc Anim** v9.n2.2017.617. 2017.

PALMA, G. A.. BIOTECNOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN. Segunda Edição. Santiago del Estero. Rebiotec. 2008.

PENITENTE FILHO, J. M.; OLIVEIRA, F. A.; JIMENEZ, AC. A. A.. PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS IN VIVO E IN VITRO. **UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA - DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA**. 2011.

PEREA, F.; QUEZADA C. A. I.; MOCHA, A. R.; ARGUDO, D. E. G.; AYALA, L. G.; MENDEZ, S. M.; SORIA, M. E.; GALARZA, L. R. A.; HERNANDEZ, H. L. F.. **Maskana**, 8, 69-71. 2017.

PORCIONATO, M. A. DE F.; FERNANDES, A. M.; NETTO, A. S.; DOS SANTOS, M. V.. INFLUÊNCIA DO ESTRESSE CALÓRICO NA PRODUÇÃO E QUALIDADE DO LEITE. **Revista Acadêmica Ciência Animal**. v. 7, n. 4.2009.

PRYCE, J. E.; ROYAL, M. D.; GARNSWORTHY, I.L. MAO.. Fertility in the high-producing dairy cow. **Livestock Production Science** 86, 125–135. 2004.

QUEZADA-CASASOLA, A.; ARMENDARIZ, K. E. M.; ORTIZ, M. F. I.; AVILA, A. M. E.; EGUIA, E. P.; FILIPIAK, Y.; LAROCCA, C.; CHAVEZ, J. M. C.. Effect of presence of corpora lutea on cumulus expansion of in vitro matured bovine oocytes selected by trypan blue and brilliant cresyl blue tests. **Journal of Applied Animal Research**, 46:1, 967-972. 2018.

RAMÍREZ, O.; JIMÉNEZ, C. Recolección de oocitos para procedimientos in vitro en bovinos. **Revista Acovez (Colombia)** v. 24 (1) p. 4-9ISSN 0120-1530, 2003.

RAMOS, A. F.; RUMPF, R.; CÁMARA, J. U.; MOLLO, M. R.; PIVATO, I.; MARQUES JR, A. P.; SARTORI, R. . Effect of follicular wave synchronization on in vitro embryo production in heifers. **Animal reproduction science**, vol. 117, no 3-4, p. 201-207. 2010.

RESENDE, M. D. V.; PEREZ, J. R. H. R.. MELHORAMENTO ANIMAL: PREDIÇÃO DE VALORES GENÉTICOS PELO MODELO ANIMAL – BLUP EM BOVINOS DE LEITE, BOVINOS DE CORTE, OVINOS E SUÍNOS. *Arch. Vet. Scienc.* 4(1):17-29. 1999.

RESTREPO, G. H.. Algunos Factores Relacionados con la Dinámica Folicular en Bos indicus. **Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín**, 63(2): 5577-5586. 2010.

REY, G. V. A.. OPTIMIZACIÓN DEL PROCESO DE MADURACIÓN OOCITARIA EN BOVINOS. Síntesis de la sustentación presentada como requisito parcial para optar al Título de Médico Veterinario. **Universidad de la Salle**. 2017.

RODRIGUES, R. S.. Crescimento, desempenho produtivo e eficiência reprodutiva de fêmeas leiteiras mestiças Holandês x Jersey em comparação ao Holandês. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - **Universidade do Estado de Santa Catarina**, Lages, 2009.

ROSSETO, R.; SARAIVA, M. V. A.; SANTOS, R. R. D.; SILVA, C. M. G. D.; FAUSTINO, L. R.; CHAVES, R. N.; BRITO, I. R.; RODRIGUES, G. Q.; LIMA, I. M. T.; DONATO, M. A. M.; PEIXOTO, C. A.; FIGUEIREDO, J. R.. Effect of medium composition on the in vitro culture of bovine pre-antral follicles: morphology and viability do not guarantee functionality. **Zygote**, pp. 125–128. 2012.

SARTORI, R. Manejo reprodutivo da fêmea leiteira. **Reprod Anim, Belo Horizonte**, v.31, n.2, p.153-159. 2007.

SILVA, H. H. PEREIRA.. QUALIDADE DA CARNE DE BOVINOS TERMINADOS EM SISTEMA DE PASTAGEM OU CONFINAMENTO. 2017. Disponível em: [http://www.bdm.unb.br/bitstream/10483/18002/1/2017\\_HarysonHenriqueDaSilva\\_tcc.pdf](http://www.bdm.unb.br/bitstream/10483/18002/1/2017_HarysonHenriqueDaSilva_tcc.pdf) Acessado em dezembro de 2019.

SWAIN, J. E.; BATCHELLERB, A. E.; SCHOOLCRAFTC, W. B.; BOSSERTB, N.. Washing mineral oil used for microdrop overlay does not improve stability of media osmolality. *Fertility and Sterility*, v. 106, p. e355. 2016.

TANGHE, S., VAN SOOM, A., NAUWYNCK, H., CORYN, M., & DE KRUIF, A. Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. **Molecular Reproduction and Development**, 61(3), 414–424. 2002.

TRIANA, E. L. C.; JIMENEZ, C. R.; TORRES, C. A. A.. EFICIÊNCIA REPRODUTIVA EM BOVINOS DE LEITE. **UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA**. 2012.

TSAFRIRI, A.; DEKEL, N.; BAR-AMI, S. The role of oocyte maturation inhibitor in follicular regulation of oocyte maturation. **Reproduction**, vol. 64, no 2, p. 541-551. 1982.

VALENCIA, G. E. D.. Maduración in vitro de ovocitos colectados post mortem de ovarios de vacas Holstein Friesian y Jersey. 2012. Tese de Licenciatura. **Universidad San Francisco de Quito**. 2012.

VALLE, E. R. D.; ANDREOTTI, R.; THIAGO, L. R. L. D. S.. TÉCNICAS DE MANEJO REPRODUTIVO EM BOVINOS DE CORTE. **Embrapa Gado de Corte**. 2000.

VELILLA, E.; IZQUIERDO, D.; RODRIGUEZ-GONZALEZ, E.; LOPEZ-BEJAR, M.; VIDAL, F.; PARAMIO, M. T.. Distribution of prepubertal and adult goat oocyte cortical granules during meiotic maturation and fertilisation: ultrastructural and cytochemical study. **Molecular Reproduction and Development**, 68(4), 507–514. 2004.

VIANA, J. H. M.; CAMARGO, L. S. DE A.; FERNANDES, C. A. C.; SA, W. F. JUNIOR, A. P. M.. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. **Animal Reproduction Science**, 84 1–12. 2004.

ZAMORA, L. A. R. OPTIMIZACION DEL METODO DE RECUPERACION DE OVOCITOS PARA LA FECUNDACION IN VITRO. Tese de Doutorado (Doutorado em Veterinária). **Univesidad de Santiago de Compostela**. 2013.