

Artículo original:

MANEJO DE RISCOS ASOCIADOS À ASPIRAÇÃO FOLICULAR ORIENTADA POR ULTRASSONOGRRAFIA EM BOVINOS

Manejo de riesgos asociados a la aspiración folicular guiada por ultrasonografía en bovinos

Viana P.J.H.M.(1,2), Arashiro E.K.N.(1,2),
Siqueira L.G.B.(1), Palhao M.P.(2),
Camargo L.S.A.(1,2), Fernandes C.A.C.(2)

(1) *Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG, Brasil*

(2) *Universidade Jose do Rosario Vellano, Alfenas, MG, Brasil*

Email: jhmviaana@hotmail.com

Palabras Clave:

OPU, ovario, lesiones

INTRODUÇÃO

O uso das técnicas de produção de embriões em laboratório (fertilização in vitro ou FIV) apresentou um aumento significativo na última década, particularmente no Brasil, que tornou-se o maior produtor mundial de embriões bovinos (Viana *et al.*, 2012). A FIV vem se tornando a técnica de eleição para a produção de embriões, em substituição a superovulação. Uma das condições necessárias para o sucesso comercial da FIV foi o desenvolvimento de uma técnica que possibilitasse a recuperação de oócitos de doadoras vivas, que pudesse ser realizada repetidas vezes e com o mínimo trauma para os animais. Esta técnica é a aspiração folicular orientada por ultrasonografia, também conhecida como ovum pick-up ou OPU. Ela foi desenvolvida inicialmente para uso na medicina humana (Feichtinger & Kemeter, 1986), e posteriormente adaptada para uso em bovinos (Pieterse *et al.*, 1988). Por ser menos invasiva que as abordagens anteriores, como a laparotomia ou a laparoscopia, que envolviam uma abordagem cirúrgica ou semi-cirúrgica dos ovários, a OPU rapidamente tornou-se o procedimento padrão para recuperação de complexos cumulus-oócito destinados a FIV, tanto na medicina humana quanto na veterinária. A OPU é geralmente considerada uma técnica pouco traumática (Pieterse *et al.*, 1991a), e por isso seu uso tem sido preconizado repetidas vezes em um mesmo animal (Kruip *et al.*, 1994, Boni *et al.*, 1997), com eficiência semelhante (Becker *et al.* 1996) ou eventualmente até maior (Santl *et al.*, 1998) que a da laparoscopia. O uso da OPU em larga escala, contudo, vem suscitando preocupação quanto a possíveis sequelas nas doadoras (van Wagtenonk-de Leeuw, 2006). No presente artigo, serão apresentados os riscos associados ao procedimento, assim como algumas estratégias para minimizá-los.

O PROCEDIMENTO DE ASPIRAÇÃO FOLICULAR

A OPU consiste em um procedimento semelhante a uma biópsia por agulha. Um equipamento de ultrasonografia equipado com um transdutor setorial ou microconvexo adequado para uso intravaginal é utilizado para a visualização dos ovários e identificação dos folículos a serem aspirados. Geralmente são utilizados transdutores com frequências variando de 5,0 a 8,0 MHz, em alguns casos com a possibilidade de configuração de uma “Linha de biópsia”, que corresponde ao trajeto da agulha durante o procedimento. A escolha do transdutor tem implicação direta na eficiência e segurança da técnica (Hashimoto *et al.*, 1999), uma vez que o ângulo de exploração e a qualidade da imagem interferem na visualização dos folículos. Um equipamento com configuração adequada permite identificar claramente os folículos a serem aspirados, além de reduzir ao máximo o trajeto da agulha fora do campo de imagem e, conseqüentemente, o risco de perfurações acidentais de estruturas adjacentes.

O transdutor é montado em um dispositivo-guia para aspiração, por meio do qual o sistema de agulha é direcionado. Existem diferentes opções de agulhas para aspiração folicular, com calibres variando de 17 a 21 Gauge, e em tamanhos curtos (3 a 6 cm) ou longos (acima de 50 cm). As agulhas são conectadas a um circuito de

teflon ligado ao sistema de vácuo, que será responsável pela sucção do conteúdo folicular durante o procedimento. O fluido folicular aspirado é recuperado em um recipiente localizado no final do circuito, e ao final do procedimento de aspiração este fluido é encaminhado ao laboratório para a identificação e classificação dos complexos cumulus-oócito coletados.

Previamente ao início da aspiração, é necessária a contenção e preparação das doadoras. Esta preparação envolve a limpeza das fezes presentes no reto e a higienização da região vulvar e perineal, e o bloqueio anestésico do trato genital pela anestesia epidural, aplicando-se 3 a 6 mL de anestésico local (lidocaína ou xilocaína, preferencialmente sem vasoconstritor) no espaço entre a primeira e a segunda vértebras coccígeas. Eventualmente, pode ser necessária uma tranquilização superficial com acepromazina em animais menos dóceis. Uma vez preparada a doadora, o transdutor é introduzido por via vaginal, e os ovários posicionados dentro do campo de imagem ultrasonográfica por palpção retal. Os folículos são então identificados e posicionados no sentido da linha de biópsia, e a agulha de punção movimentada até que os mesmos sejam perfurados e seu conteúdo aspirado.



LESÕES CAUSADAS POR OPU

Como qualquer procedimento invasivo, a punção folicular pode potencialmente acarretar danos ao tecido ovariano. Curiosamente, apesar de alguns estudos citarem a ocorrência de sequelas subsequentes às aspirações foliculares (Pieterse *et al.*, 1991b, Gibbons *et al.*, 1994, Kruip *et al.*, 1994) relativamente poucos trabalhos objetivaram especificamente avaliar as mesmas (Viana *et al.*, 2003b, Petyim *et al.*, 2000; 2001). Os principais danos macroscópicos observados em animais submetidos a repetidas sessões de aspiração foram espessamento da albugínea ovariana, presença de redes de fibrina na superfície dos ovários (Fig. 1a), coágulos, enrijecimento do tecido ovariano, calcificações, abscessos ovarianos e aderências (Fig. 1b). Viana *et al.* (2003b) realizaram avaliação histopatológica de ovários de doadoras submetidas a OPU e caracterizaram a presença de soluções de continuidade no epitélio ovariano (Fig. 1c), áreas com hemorragia e infiltrados de células inflamatórias, e fibrose no estroma ovariano, associado a cicatrizes no trajeto da agulha (Fig. 1d). Também foram observados folículos previamente aspirados apresentando graus variados de desorganização das camadas da parede folicular e presença de células luteais dispersas no estroma ovariano.

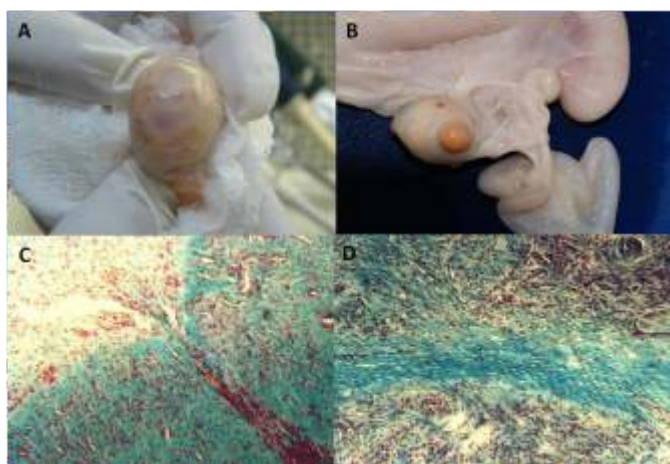


Figura 1: Lesiones en ovarios sometidos a recuperación repetida de ovocitos; (1a, 1b, 1c, 1d)

Contraditoriamente, diferentes estudos relataram a ocorrência de poucas alterações morfológicas ou funcionais subsequentes às aspirações foliculares (Kruip *et al.*, 1994; Gibbons *et al.*, 1994; Boni *et al.*, 1997; Petyim *et al.*, 2000). Broadbent *et al.* (1997) não observaram diferenças no número de embriões produzidos por superovulação em doadoras previamente submetidas a diferentes números de aspirações foliculares, e concluíram que a OPU não compromete a fertilidade das doadoras. Esta aparente contradição pode estar relacionada às diferenças não apenas no número de sessões de aspiração ao qual as doadoras foram submetidas, mas também ao número de oócitos recuperados em cada uma. Viana *et al.* (2003b) observaram uma correlação significativa entre o número de sessões de aspiração e a incidência de aderências, e entre o número de oócitos recuperados por sessão e o grau de fibrose dos ovários. De fato, doadoras com maior produção de oócitos por aspiração são aquelas com maior número de folículos nos ovários, e que consequentemente sofrem um maior número de perfurações pela agulha de punção. Coerentemente, não foram observadas aderências ou lesões graves em vacas da raça Holandesa submetidas a um número reduzido de sessões (entre 9 e 18), ou quando o número médio de oócitos recuperados por vaca foi pequeno (entre 3,5 a 5,1) (Pieterse *et al.* 1991a,b).

A parede folicular remanescente da aspiração pode também não entrar imediatamente em atresia e permanecer esteroidogenicamente ativa, formando os chamados folículos residuais (Viana *et al.*, 2013). Estas estruturas regredem após alguns dias, porém a produção de estradiol ou progesterona em quantidades variadas pelas mesmas pode interferir no equilíbrio do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal e, consequentemente, na fertilidade das doadoras.

MANEJO DE DOADORAS PARA REDUÇÃO DE RISCOS

A punção folicular, associada à produção *in vitro* (PIV) de embriões, foi inicialmente utilizada na produção de descendentes de animais com alto valor genético, mas com problemas adquiridos de fertilidade ou que não respondiam aos tratamentos superovulatórios convencionais (van Wagtenonk-de Leeuw, 2006). Para vacas que já apresentam problemas adquiridos de fertilidade, o risco de sequelas decorrentes das punções não é importante frente aos benefícios obtidos, e pouca atenção foi dada a esta possibilidade. Entretanto, a punção folicular apresenta um potencial de produção de embriões e gestações em um determinado período de tempo muito superior ao obtido por outras técnicas, e que pode ser aproveitado em animais com condições reprodutivas normais (Bousquet *et al.*, 1999) ou até pré-púberes (Fry *et al.*, 1998, Majerus *et al.*, 1999). Nestes casos, é desejável que não haja comprometimento posterior da fertilidade. A possibilidade do uso repetido da técnica, e em intervalos tão curtos como dois a três dias (Boni *et al.*, 1997), requer uma melhor avaliação dos riscos para os animais utilizados como doadores de oócitos. A seguir são apresentados alguns pontos que merecem atenção no manejo de doadoras submetidas à aspiração folicular.

a) RISCO DE CONTAMINAÇÃO

O fato do sistema de aspiração trabalhar com pressão negativa (vácuo) faz com que haja uma possibilidade maior de contaminação do material aspirado que do ovário da doadora. Contudo, como o procedimento requer a movimentação da agulha a partir do fundo de saco vaginal, que é uma região naturalmente contaminada, alguns cuidados devem ser observados. Além da higienização cuidadosa da região perineal, é recomendável a proteção do dispositivo-guia com uma proteção plástica (ou luva de palpação descartável), o que minimiza a exposição do dispositivo e principalmente da agulha de aspiração aos eventuais contaminantes do ambiente vaginal. A proteção plástica deve ser trocada a cada animal puncionado, facilitando a higienização do dispositivo e prevenindo a transmissão de eventuais contaminantes entre animais. Também é importante avaliar se a doadora apresenta situações que podem aumentar a contaminação do ambiente vaginal, como descargas mucopurulentas uterinas resultantes de infecções pós-puerperais, ou vaginites decorrentes do uso de implantes intravaginais de progesterona.

b) Traumas

O procedimento de aspiração apresenta traumas intrínsecos à perfuração do ovário pela agulha de punção, mas também está sujeito a traumas acidentais. Estes podem ocorrer, por exemplo, por movimentação abrupta da doadora durante o procedimento, em função de contenção insuficiente, ou por

inabilidade do técnico para posicionar adequadamente o ovário. Como resultado, pode ocorrer a transfixação do ovário, ou a perfuração acidental de órgãos ou estruturas adjacentes, como a tuba, vasos sanguíneos ou alças intestinais.

Os traumas intrínsecos à OPU podem ser minimizados pela escolha correta da agulha de punção e pelo critério na execução do procedimento. São relatadas a utilização de agulhas de calibre 17 (Gibbons *et al.*, 1994, Fry *et al.*, 1998, Scherthaner *et al.*, 1999), 18 (Stubbings & Walton 1995, Boni *et al.*, 1997), 19 (Machatková *et al.*, 2000) e 20G (Bols *et al.*, 1996, Viana *et al.*, 2013), descartáveis (Machatková *et al.*, 2000) ou não (Vos *et al.*, 1994, Stubbings & Walton 1995, Boni *et al.*, 1997). Agulhas de maior calibre possibilitam o uso de menor pressão de vácuo (Bols *et al.*, 1996), além de serem de fácil visualização na imagem ultrassonográfica e direcionamento, mas apresentam uma grande superfície cortante no bisel e podem facilmente causar danos significativos em caso de movimentação da doadora durante o procedimento. Agulhas muito finas (21G ou superior, por outro lado, tendem a curvar e podem dificultar o direcionamento da mesma ao folículo. Agulhas descartáveis curtas, além de apresentarem menor custo, também têm o bisel mais afiado que as agulhas longas, e exercem menor pressão sobre as estruturas puncionadas (Bols *et al.*, 1997).

Em relação à técnica, é importante evitar que a agulha atinja a região medular ou o hilo ovariano, no qual estão concentrados vasos e nervos. Também é possível posicionar o ovário de forma que mais de um folículo seja aspirado com um mesmo movimento de agulha, reduzindo desta forma o número de perfurações da albugínea ovariana. Nos dois casos, a habilidade do técnico em posicionar corretamente o ovário durante a aspiração é fundamental para a redução de traumas.

C) SANGRAMENTO

As perfurações causadas no ovário pela OPU vão estar invariavelmente associadas a algum sangramento, o que além de poder comprometer a identificação dos COCs no material aspirado podem ocasionar a posterior formação de aderências entre o ovário e estruturas adjacentes. Desta forma, é importante buscar alternativas para minimizar a ocorrência de sangramento associado à punção folicular.

O corpo lúteo é a estrutura mais bem vascularizada da fêmea bovina (Acosta *et al.*, 2002), e pode ser responsável por até 95% do aporte sanguíneo ao ovário (Reynolds *et al.*, 2000). O desenvolvimento de corpos lúteos está associado a um intenso processo de angiogênese (Jiang *et al.*, 2003), assim como sua regressão está associada à redução do fluxo sanguíneo (Acosta *et al.*, 2002). Desta forma, a presença de corpos lúteos, além de eventualmente dificultar o posicionamento do ovário junto ao dispositivo-guia de aspiração, aumenta significativamente a chance de perfuração acidental de vasos durante o trajeto da agulha dentro do ovário. Desta forma, os protocolos hormonais de preparação de doadoras podem ser estabelecidos objetivando, além de sincronizar a onda de crescimento folicular, evitar a presença de tecido luteal no momento da aspiração.

O desenvolvimento dos folículos ovarianos também está associado ao aumento da vascularização (Acosta *et al.*, 2005). O fluxo sanguíneo é importante para o aporte de nutrientes para a esteroidogênese folicular e para o estabelecimento de um ambiente intrafolicular adequado ao desenvolvimento do oócito (Rodgers and Irving-Rodgers, 2010). Na parede folicular, a camada da teca apresenta uma ampla rede de arteríolas, vênulas e capilares (Jiang *et al.*, 2003). A arquitetura vascular nos folículos, contudo, não é uniforme, e os vasos de maior calibre estão

concentrados na região basal (Arashiro *et al.*, 2012), o que possibilita a orientação da agulha de aspiração de forma a minimizar lesões vasculares. De fato, a aspiração individual de folículos, com objetivos de pesquisa, pode ser realizada de forma que amostras de fluido folicular sejam obtidas sem contaminação visível por células sanguíneas (Arashiro *et al.*, 2013). No caso de aspirações realizadas em condições de campo, além da adequação do trajeto da agulha, um menor sangramento pode ser obtido aspirando-se preferencialmente folículos de menor diâmetro. Existem protocolos de preparação de doadoras que usam a pré-estimulação ovariana com FSH (Viana *et al.*, 2003a) ou mesmo a indução da maturação *in vivo* (Fry *et al.*, 1998). Estes protocolos geralmente resultam em aumento da qualidade dos COCs recuperados e nas taxas de blastocistos subsequentes (Viana *et al.*, 2003a), e têm sido preconizados particularmente em raças taurinas. É importante considerar, contudo, que esta estimulação também aumenta o fluxo sanguíneo folicular, principalmente quando se utilizam indutores de ovulação (Acosta *et al.*, 2003).

d) OUTRAS ESTRATÉGIAS PARA MINIMIZAR RISCO

Em doadoras submetidas a repetidas sessões de aspiração folicular, o intervalo entre as sessões pode ser um fator importante na redução de riscos. Viana *et al.* (2004) observaram que a taxa de recuperação de oócitos cai quando são utilizados intervalos de 3 a 4 dias entre as sessões, em comparação com intervalos de 7 dias, e atribuíram esta redução ao fato de que intervalos curtos podem não possibilitar a completa resolução do processo inflamatório ocasionado pela aspiração anterior. A frequência das punções, neste caso, pode ter sido superior à capacidade de regeneração do órgão (Santl *et al.* 1998). Outra estratégia possível é alternar as aspirações foliculares com outras técnicas, como a superovulação (Pontes *et al.*, 2009), ou com gestações. Apesar de reduzir a produção de embriões em relação a doadoras mantidas em regime exclusivo de aspiração, esta estratégia permite estimar se houve ou não algum comprometimento da função reprodutiva, além de possibilitar períodos de “repouso” das doadoras.

CONCLUSÃO

O procedimento de aspiração folicular orientado por ultrassonografia pode ocasionar alterações morfológicas e funcionais nos ovários, cuja magnitude está relacionada ao número de sessões de punção aos quais as doadoras são submetidas, e ao número médio de estruturas recuperadas por sessão de coleta. Entretanto, diferentes estratégias podem ser adotadas para minimizar os danos ao ovário e possíveis sequelas causadas pelo procedimento.

REFERÊNCIAS

- Acosta, T.J.; Hayashi, K.G.; Matsui, M.; Miyamoto, M. 2005. Changes in follicular vascularity during the first follicular wave in lactating cows. *J Reprod Dev*, 51: 273-280.
- Acosta, T.J.; Hayashi, K.G.; Ohtani, M.; Miyamoto, A. 2003. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reproduction*, 125:759-767.
- Acosta, T.J.; Yoshizawa, N.; Ohtani, M.; Miyamoto, A. 2002. Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F(2 alpha) injection in the cow. *Biol Reprod*, 66:651-658.



- Arashiro, E.K.N.; Palhao, M.P.; Santos, J.R.L.; Fontes, R.; Henry, M.; Viana, J.H.M. 2012. Three dimensional modeling of color Doppler ultrasound images: a new approach to the evaluation of follicular vascularization in cattle. *Reprod Domest Anim*, 47:489. (abstract).
- Arashiro, E.K.N.; Palhao, M.P.; Wohlrtes-Viana, S.; Siqueira, L.G.B.; Camargo, L.S.A.; Henry, M.; Viana, J.H.M. 2013. In vivo collection of follicular fluid and granulosa cells from individual follicles of different diameters in cattle by an adapted ovum pick-up system. *Reprod Biol Endocrinol (in press)*.
- Becker, F.; Kanitz, W.; Nürnberg, G.; Kurth, J.; Spitschak, M. 1996. Comparison of repeated transvaginal ovum pick up in heifers by ultrasonographic and endoscopic instruments. *Theriogenology* 46:999-1007.
- Bols, P.E.J.; Van Soom, A.; Ysebaert, M.T.; Vandenheede, J.M.M.; De Kruif, A. 1996b. Effects of aspiration vacuum and needle diameter on cumulus oocyte complex morphology and developmental capacity of bovine oocytes. *Theriogenology* 45:1001-1014.
- Bols, P.E.J.; Ysebaert, M.T.; Van Soom, A.; De Kruif, A. 1997. Effects of needle tip bevel and aspiration procedure on the morphology and developmental capacity of bovine compact cumulus oocyte complexes. *Theriogenology* 47:1221-1236.
- Boni, R.; Roelofsen, M.W.M.; Pieterse, M.C.; Kogut, J.; Kruip, T.A.M. 1997. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. *Theriogenology* 48:277-289.
- Bousquet, D.; Wagiramungu, H.; Morin, N.; Brisson, C.; Carboneau, G.; Durocher, J. 1999. In vitro embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. *Theriogenology* 51:59-70.
- Broadbent, P.J.; Dolman, D.F.; Watt, R.G.; Smith, A.K.; Franklin, M.F. 1997. Effect of frequency of follicle aspiration on oocyte yield and subsequent superovulatory response in cattle. *Theriogenology* 45:1027-1040.
- Feichtinger, W.; Kemeter, P. 1986. Transvaginal sector scan sonography for needle guided transvaginal follicle aspiration and other applications in gynecologic routine and research. *Fertil Steril* 45:722-725.
- Fry, R.C.; Simpson, T.L.; Squires, T.J. 1998. Ultrasonically guided transvaginal oocyte recovery from calves treated with or without GnRH. *Theriogenology* 49:1077-1082.
- Gibbons, J.R.; Beal, W.E.; Krisher, R.L.; Faber, E.G.; Pearson, R.E.; Gwazdauskas, F.C. 1994. Effect of once versus twice - weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. *Theriogenology* 42:405-419.
- Hashimoto, S.; Takakura, R.; Minami, N.; Yamada, M. 1999. Ultrasound-guided follicle aspiration: Effect of the frequency of a linear transvaginal probe on the collection of bovine oocytes. *Theriogenology* 52:131-138.
- Jiang, J.Y.; Macchiarelli, G.; Tsang, B.K.; Sato, E. 2003. Capillary angiogenesis and degeneration in bovine ovarian antral follicles. *Reproduction* 125:211-223.
- Kruip, Th.A.M.; Boni, R.; Wurth, Y.A.; Roelofsen, M.W.M.; Pieterse, M.C. 1994. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology* 42:675-684.
- Machatková, M.; Jokesová, E.; Horky, F.; Krepelova, A. 2000. Utilization of the growth phase of the first follicular wave for bovine oocyte collection improves blastocyst production. *Theriogenology* 54:543-550.
- Majerus, V.; De Roove, R.; Etienne, D.; Kaidi, S.; Massip, A.; Dessy, F.; Donnay, I. 1999. Embryo production by ovum pick up in unstimulated calves before and after puberty. *Theriogenology* 52:1169-1179.
- Petyim, S.; Båge, R.; Forsberg, M.; Rodríguez-Martínez, H.; Larsson, B. 2001. Effects of repeated follicular punctures on ovarian morphology and endocrine parameters in dairy heifers. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 48:449-63.
- Pieterse, M.C.; Kappen, K.A.; Kruip, T.A.M.; Taverne, M.A.M. 1988. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 30:751-762.
- Pieterse, M.C.; Vos, P.L.A.M.; Kruip, T.A.M.; Wurth, Y.A.; Beneden, Th. H.; Willemse, A.H.; Taverne, M.A.M. 1991a. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology* 35:19-24.
- Pieterse, M.C.; Vos, P.L.A.M.; Kruip, T.A.M.; Wurth, Y.A.; Beneden, Th. H.; Willemse, A.H.; Taverne, M.A.M. 1991b. Characteristics of bovine estrous cycles during repeated transvaginal ultrasound-guided puncturing of follicles for ovum pick-up. *Theriogenology* 35:401-413.
- Pontes, J.H.; Nonato-Junior, I.; Sanches, B.V.; Ereno-Junior, J.C.; Uvo, S.; Barreiros, T.R.; Oliveira, J.A.; Hasler, J.F.; Seneda, M.M. 2009. Comparison of embryo yield and pregnancy rate between in vivo and in vitro methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology* 71:690-7.
- Reynolds, L.P.; Grazul-Bilska, A.T.; Redmer, D.A. 2000. Angiogenesis in the corpus luteum. *Endocrine* 12:1-9.
- Rodgers, R.J.; Irving-Rodgers, H.F. 2010. Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. *Biol Reprod* 82:1021-1029.
- Stubbings, R.B.; Walton, J.S. 1995. Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in Holstein cows. *Theriogenology* 43:705-712.
- van Wagendonk-de Leeuw, A.M. 2006. Ovum pick up and in vitro production in the bovine after use in several generations: a 2005 status. *Theriogenology* 65:914-25.
- Viana, J.H.M.; Ferreira, A.M.; Camargo, L.S.A.; Sá, W.F.; Fernandes, C.A.C.; Marques Júnior, A.P. 2003a. Efeito da pré-estimulação ovariana sobre características de oócitos após punção folicular em bovinos. *Arq Br Med Vet Zootec* 55:68-74.
- Viana, J.H.M.; Nascimento, A.A.; Pinheiro, N.L.; Ferreira, A.M.; Camargo, L.S.A.; Sá, W.F.; Marques Júnior, A.P. 2003b. Caracterização de seqüelas subsequentes à punção folicular em bovinos. *Pesq Vet Br* 23(3):119-124.
- Viana, J.H.M.; Camargo, L.S.A.; Ferreira, A.M.; Sa, W.F.; Fernandes, C.A.C.; Marques Junior, A.P. 2004. 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. *Anim Reprod Sci* 84:1-12.
- Viana, J.H.M.; Siqueira, L.G.B.; Palhao, M.P.; Camargo, L.S.A. 2012. Features and Perspectives of the Brazilian In Vitro Embryo Industry. *Anim Reprod* 9:12-18.
- Viana, J.H.; Dorea, M.D.; Siqueira, L.G.; Arashiro, E.K.; Camargo, L.S.; Fernandes, C.A.; Palhao, M.P. 2013. Occurrence and characteristics of residual follicles formed after transvaginal ultrasound-guided follicle aspiration in cattle. *Theriogenology* 79:267-273.

