

## COMUNICAÇÃO

[Communication]

### Nascimento de bezerra gerada com auxílio das técnicas de punção folicular e fertilização *in vitro* no Estado de Minas Gerais

[Birth of a calf produced by follicular puncture and *in vitro* fertilization techniques in Minas Gerais State, Brazil]

J.H.M. Viana<sup>1</sup>, L.S.A. Camargo<sup>1</sup>, A.M. Ferreira<sup>1</sup>, W.F. Sá<sup>1</sup>, A.P. Marques Júnior<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Leite  
Rua Eugênio do Nascimento 610  
36038-330 - Juiz de Fora, MG

<sup>2</sup>Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais

A técnica de punção folicular orientada por ultrassom (OPU) foi originalmente desenvolvida para a recuperação de oócitos destinados à fertilização *in vitro* em mulheres com problemas reprodutivos (Feichtinger & Kemeter, 1986), sendo posteriormente adaptada para a utilização em bovinos (Pieterse et al., 1991). A técnica apresenta grande potencial quando comparada aos métodos convencionais de reprodução assistida, pois possibilita a recuperação de gametas diretamente do ovário, independente da época do ciclo estral (Stubbings & Walton, 1995) e sem a necessidade de tratamentos hormonais (Gibbons et al., 1994), contornando limitações inerentes à superovulação (Hahn, 1992). Também possibilita a obtenção de produtos de animais com infertilidade adquirida por distúrbios na porção tubular do trato genital (Schernthaner et al., 1999).

Com o objetivo de implementar a técnica e adaptar a metodologia foi iniciado um protocolo experimental de punção folicular, utilizando vacas da raça Holandesa (n=8), multíparas, lactantes, pertencentes à Embrapa Gado de Leite, e mantidas no campo experimental de Coronel Pacheco, MG. As punções foram realizadas por meio de um aparelho de ultra-sonografia (Scanner 100S, Pie-Medical) equipado com um

transdutor setorial intravaginal de 7,5MHz e uma guia para punção folicular. O aspirado folicular foi recuperado em um filtro com malha de 80µ (Millipore) contendo PBS acrescido de 0,1% de BSA. Os oócitos identificados foram avaliados e conduzidos em meio Talp-Hepes ao laboratório de fertilização *in vitro*, localizado em Juiz de Fora, a uma distância aproximada de 40km. A maturação foi realizada em meio TCM 199 por 22h, em estufa a 39°C com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade. Para a fertilização utilizou-se sêmen de touro da raça Holandesa, na concentração de 2×10<sup>6</sup> espermatozoides por gota de fecundação. Após 18h em meio de fecundação, os oócitos foram transferidos para as placas de co-cultivo, realizado em meio CR-2 com células da granulosa. No sétimo dia de cultivo, os blastocistos viáveis obtidos foram envasados em palhetes de 0,25ml e transportados para o campo experimental de Coronel Pacheco, onde foram inovulados não-cirurgicamente em receptoras mestiças Holandês-Zebu (n=5) previamente sincronizadas. O diagnóstico de gestação foi realizado por ultra-sonografia 23 dias após a inovulação.

As primeiras transferências de embriões produzidos *in vitro* a partir de oócitos recuperados por punção folicular foram

---

Recebido para publicação em 3 de agosto de 2000

Recebido para publicação, após modificações, em 9 de março de 2001.

E-mail: jhmviaa@cnpqgl.embrapa.br

realizadas em setembro de 1999, e resultaram no nascimento de uma fêmea em julho de 2000, por parto natural, não assistido. O período de gestação foi de 293 dias, 11 dias (4,6 %) superior ao considerado normal para a raça Holandesa, que é de 278 a 282 dias, segundo Roberts (1986). Prolongamento do período de gestação foi relatado para bezerros oriundos de fertilização *in vitro* por Hasler et al. (1995) e Holm & Callesen (1998). Apesar do aumento no período de gestação, a bezerra nasceu com 32kg, e com características morfofisiológicas e vigor normais para a raça.

Embora técnica de rotina em outros centros, este é o primeiro bezerro gerado com o auxílio de punção folicular *in vivo* e fertilização *in vitro* por um grupo de pesquisa do Estado de Minas Gerais, e confirma o potencial das técnicas utilizadas na reprodução assistida de fêmeas bovinas, o que abre novas perspectivas de pesquisa nos campos da fisiologia ovariana e embriologia, e na multiplicação de animais com genótipos superiores em Minas Gerais.

Palavras-chave: Bovino, fertilização *in vitro*, punção folicular

### ABSTRACT

*Ultrasound-assisted follicular puncture is a technique of oocyte recovery for in vitro fertilization and production of embryos. In order to adjust the methodology, a field trial was performed using lactating Holstein cows (n=8) as oocyte donors. Punctures were done with an ultrasound device equipped with a 7.5 MHz intravaginal sectorial probe. Oocytes recovered were matured, fertilized and cultured in vitro, and embryos produced transferred to recipients heifers. On July, 2000, the first calf produced by these techniques in Minas Gerais State, Brazil, was born.*

Keywords: Cattle, in vitro fertilization, follicular puncture

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- FEICHTINGER, W., KEMETER, P. Transvaginal sector scan sonography for needle guided transvaginal follicle aspiration and other applications in gynecologic routine and research. *Fertil. Ster.*, v.45, p.722-725, 1986.
- GIBBONS, J.R., BEAL, W.E., KRISHER, R.L. et al. Effect of once versus twice-weekly transvaginal follicular aspiration on bovine oocyte recovery and embryo development. *Theriogenology*, v.42, p.405-419, 1994.
- HAHN, J. Attempts to explain and reduce variability of superovulation. *Theriogenology*, v.38, p.269-275, 1992.
- HASLER, J.F., HENDERSON, W.B., HURTGEN, P.J. et al. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. *Theriogenology*, v.43, p.141-152, 1995.
- HOLM, P., CALLESEN, H. In vivo versus in vitro produced bovine ova: similarities and differences relevant for practical application. *Reprod. Nutr. Develop.*, v.38, p.579-594, 1998.
- PIETERSE, M.C., VOS, P.L.A.M., KRUIP, T.A.M. et al. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology*, v.35, p.19-24, 1991.
- ROBERTS, S.J. *Veterinary obstetrics and genital diseases* (Theriogenology). 3.ed. Ann Arbor: Edwards Brothers, 1986. 981p.
- SCHERNTHANER, W., WENIGERKIND, H., STOJKOVIC, M. et al. Pregnancy rate after ultrasound-guided follicle aspiration in nonlactating cows from different breeds. *J. Vet. Med. Assoc.*, v.46, p.33-37, 1999.
- STUBBINGS, R.B., WALTON, J.S. Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in Holstein cows. *Theriogenology*, v.43, p.705-712, 1995.