

Morfometria ovariana e a qualidade dos oócitos de vacas zebuínas abatidas

Ovarian morphometry and quality of oocytes from slaughtered Bos indicus

Nayla Mayumi Sakate^[a], Luciana Machado Guaberto^[b], Ines Cristina Giometti^[c], Caliê Castilho^{[c]*}

^[a] Médica veterinária autônoma, Graduada pela Universidade do Oeste Paulista (Unoeste), Presidente Prudente, SP - Brasil, e-mail: naylasakate@hotmail.com

^[b] Bióloga, docente de Zootecnia e Farmácia da Universidade do Oeste Paulista (Unoeste), Presidente Prudente, SP - Brasil, e-mail: guaberto@unoeste.br

^[c] Médicas veterinárias, docentes de Medicina Veterinária e mestrado em Ciência Animal da Universidade do Oeste Paulista (Unoeste), Presidente Prudente, SP - Brasil, e-mails: calie@unoeste.br; inesgiometti@unoeste.br

*Autor para correspondência.

Resumo

Os objetivos do presente trabalho foram avaliar as características morfométricas, quantidade e diâmetro dos folículos e qualidade dos COC's (complexos *cumulus oophorus*) segundo o lado do ovário e presença ou não de corpo lúteo (CL) em ovários de vacas zebuínas. Foram utilizados 77 pares de ovários coletados de fêmeas zebuínas. Os ovários foram separados segundo o lado (direito ou esquerdo) e presença ou não de CL. A seguir, os folículos ovarianos foram contados e classificados de acordo com o diâmetro folicular em Classe 1 (< 5 mm); Classe 2 (5 a 7 mm); Classe 3 (> 7 mm). Os folículos foram aspirados com agulha 40 x 12 acoplada em seringa de 10 mL e os oócitos recuperados foram classificados segundo a qualidade em grau I, II e III, desnudo e atrésico. As medidas obtidas não variaram de acordo com o lado do ovário; no entanto, o comprimento, a espessura e a largura foram significativamente ($P < 0,05$) maiores em ovários que apresentaram CL. A quantidade de folículos Classe 2 (5 - 7 mm) foi maior ($P < 0,05$) em ovário com CL e de Classe 3 (>7 mm) foi maior ($P < 0,05$) no ovário direito. A incidência de CLs inclusos ocorreu tanto no ovário direito (61,29%) quanto no esquerdo (58,33%). Não houve diferença na qualidade dos oócitos comparando-se o lado do ovário, nem tampouco a presença de CL. Concluiu-se que o lado do ovário e a presença de CL não alteram a qualidade dos oócitos de fêmeas zebuínas.

Palavras-chave: CL incluso e protuso. Foliculo antral. OPU.

Abstract

The objectives of this work were to evaluate morphometric characteristics of the ovaries, number and diameter of follicles and quality of COCs (cumulus oophorus complexes) from right and left ovaries, with or without corpus luteum (CL) of Zebu females. For this, 77 ovary pairs of Zebu females were collected from the



doi:10.7213/academica.011.003.A001
Licenciado sob uma Licença Creative Commons

slaughterhouse. The ovaries were separated according to the side (right or left) and presence or absence of CL. The follicles were dissected, counted and classified according to their diameter in: Class 1 (< 5 mm), Class 2 (5 to 7 mm), Class 3 (> 7 mm). Immediately after, the follicles were aspirated with a 10 mL syringe with a needle 40 x 12 mm and retrieved oocytes were classified according to their quality in grade I, II, III, desnuded and atretic. The measurements obtained did not differ between the right and left ovaries. However, the length, width and thickness were significantly ($p < 0.05$) bigger in the ovaries with CL than in ovaries without CL. There were more Class 2 follicles in ovaries with CL ($p < 0.05$). The number of Class 3 follicles was greater in the right ovary than in the left ovary ($p < 0.05$). The incidence of included CLs was 61.29% in the right ovary and 58.33% in the left ovary. There was no significant difference in the quality of oocytes between the ovaries from each side or between the ovaries with or without CL. In conclusion, the ovary side (right or left) and the presence of CL do not interfere in the quality of oocytes Zebu females.

Keywords: Protruded and included CL. Antral follicle. OPU.

Introdução

As técnicas de aspiração folicular guiada por ultrassonografia (OPU) seguida da produção de embrião *in vitro* (PIV), a partir de oócitos obtidos de doadoras de alto mérito genético, evoluíram e hoje são adotadas pelos criadores.

Sabe-se que oócitos maturados *in vitro* geram taxas embrionárias inferiores àqueles maturados *in vivo* (BLONDIN et al., 2002). O crescimento do oócito dentro do folículo ovariano é determinado por grande número de fatores que influenciam a viabilidade e competência para o desenvolvimento *in vitro* (CASTILHO et al., 2007).

Oócitos de boa qualidade são requisitos importantíssimos para o sucesso da fertilização *in vitro* (FIV), pois a qualidade dos oócitos está diretamente ligada ao sucesso das taxas de desenvolvimento embrionário. Embora a aparência não assegure a capacidade dos oócitos de se desenvolverem *in vitro* serve como indicador de sua viabilidade (FERNANDES et al., 2001). Moléculas de RNA e de proteínas acumulam-se no citoplasma dos oócitos durante a sua fase de crescimento e são utilizadas para manter as primeiras fases do desenvolvimento embrionário, antes da ativação do genoma (BREVINI-GANDOLFI; GANDOLFI, 2001). Assim, a avaliação das células do *cumulus* quanto à compactação e número de camadas, bem como homogeneidade do citoplasma, ainda é rotineiramente utilizada para a seleção e classificação dos COC's (LOONERGAN, 1992; PAVLOK; LUCAS-HAHN; NEMANN et al., 1992).

Os COC's podem ser recuperados dos ovários de fêmeas bovinas em qualquer fase do ciclo estral graças à característica do crescimento folicular nessa espécie, bem descrito após vários trabalhos com ultrassonografia que se iniciaram no fim da década de 1980 (GINTHER; KNOPF; KASTELIC et al., 1989; FIGUEIREDO et al., 1997; GAMBINI et al., 1998; KASTELIC; KNOPF; GINTHER, 1990; KOZICKI et al., 2005).

Durante o ciclo estral de bovinos ocorrem, na maioria das vezes, duas ou três ondas de crescimento folicular em fêmeas europeias (GINTHER; KNOPF; KASTELIC, 1989), zebuínas (FIGUEIREDO et al., 1997; GAMBINI et al., 1998) ou cruzadas (CASTILHO et al., 2000; KOZICKI et al., 2005). A onda folicular que irá gerar o folículo ovulatório está relacionada à duração da fase luteínica (KASTELIC; KNOPF; GINTHER, 1990; KOZICKI et al., 2005) e coincide com a liberação endógena ou aplicação exógena (BORGES et al., 2003) de prostaglandina F2 α (PGF2 α). Portanto a duração da fase luteínica determina o número de ondas por ciclo estral.

A ovulação é um processo fisiológico, no qual o oócito é liberado do folículo ovariano, cujo objetivo básico é a fecundação. Após a ovulação, o CL iniciará a secreção de progesterona que, por sua vez, será responsável pela manutenção da gestação, caso esta ocorra (NISWENDER et al., 1994; HAFEZ; HAFEZ, 2004).

As mudanças cíclicas que ocorrem nos ovários em função da formação e regressão de corpos lúteos e do surgimento e atresia das ondas de crescimento

folicular podem dificultar a interpretação dos achados clínicos no exame ginecológico (NASCIMENTO et al., 2003), em virtude da grande variação na forma e tamanho normais dos ovários. A importância do exame ginecológico para avaliação do aparelho reprodutor de fêmeas bovinas, nos casos de infertilidade por inúmeras causas ou na rotina do manejo reprodutivo para aplicação de biotécnicas é inestimável.

Os objetivos do presente trabalho foram avaliar as características morfométricas, quantidade e diâmetro dos folículos e qualidade dos COC's (complexos *cumulus oophorus*) segundo o lado do ovário e presença ou não de corpo lúteo (CL) em ovários de vacas zebuínas.

Materiais e métodos

Foram utilizadas 77 peças de aparelho reprodutor de fêmeas bovinas abatidas em frigorífico. Após o abate as peças eram submersas em solução fisiológica a 35 °C e enviadas ao laboratório de Genética Molecular da Universidade do Oeste Paulista (Unoeste). Os ovários eram separados em direito e esquerdo, com e sem CL, e mantidos em solução fisiológica a 35 °C.

Com auxílio de paquímetro, foram mensurados o comprimento, espessura e largura de cada ovário. Em ovários com CL, a classificação dada foi incluso ou protuso de acordo com sua inserção no estroma ovariano. O corpo lúteo foi definido em protruso, quando apresentava a porção luteal acima da superfície do ovário e em incluso quando a ocupação total do tecido luteal localizava-se abaixo da superfície do ovário (NEVES et al., 2002; RAMOS et al., 2008).

A seguir, todos os folículos visualizados na região cortical do ovário eram contados, medidos e classificados em uma das três classes de diâmetro folicular: Classe 1 (< 5mm); Classe 2 (5 a 7 mm) e Classe 3 (> 7 mm) (CASTILHO et al., 2007). Na sequência, os folículos ovarianos eram aspirados com agulha 40 x 12 acoplada em seringa de 10 mL. O fluido folicular aspirado era colocado em placas de Petri, os COC's selecionados, contados e classificados de acordo com a qualidade em lupa estereomicroscópica – *Forty, American Optical Corporation*. A classificação baseou-se no aspecto morfológico dos COCs (LONERGAN, 1992), em cinco grupos: Grau I

(células compactas do *cumulus* com mais que três camadas); Grau II (células compactas do *cumulus* com menos que três camadas); Grau III (células do *cumulus* com uma camada); Desnudo (ausência de camada celular) e Atrésicos (células do *cumulus* em regressão celular). Os COC's classificados como grau I, II e III foram considerados viáveis e os desnudo e atrésicos não viáveis (CASTILHO et al., 2007).

Os resultados de morfologia ovariana e classe folicular (Classes 1, 2 e 3) foram submetidos à análise de variância pelo teste F, com delineamento inteiramente casualizado (BANZATTO; KRONKA, 2006). As variáveis: quantidade de oócitos aptos para a PIV (GI, GII e GIII) e não aptos (desnudo e atrésico), o lado do ovário e a presença de CL foram calculadas pelo teste de Qui-quadrado (χ^2).

Resultados e discussão

No presente estudo, em ovários de fêmeas zebuínas, o comprimento, a largura e a espessura do ovário direito foram 2,73; 2,04 e 1,71 cm e do ovário esquerdo 2,67; 1,94 e 1,70 cm (Tabela 1). Pimentel (1973), em vacas Gir, observou médias de 2,31; 1,40 e 1,10 cm, respectivamente para comprimento, largura e espessura do ovário esquerdo e 2,62; 1,27 e 0,92 cm para o direito, sendo inferiores às obtidas no presente estudo. Já Neves et al. (2002), também estudando ovários de vacas zebuínas, obtiveram medidas semelhantes de comprimento, largura e espessura do ovário direito (2,62; 1,71 e 1,21 cm) e do ovário esquerdo (2,57; 1,61 e 1,22 cm). Achados similares foram observados por Chacur et al. (2006) ao verificarem o comprimento, largura e espessura do ovário direito de 2,80; 1,83 e 1,56 e do ovário esquerdo 2,75; 1,95 e 1,65. Esses dados são relevantes para a avaliação ginecológica de fêmeas bovinas, pois a deficiência nutricional e a hipoplasia congênita podem causar diminuição no tamanho e na funcionalidade ovariana (PIMENTEL, 1973).

As medidas obtidas não variaram de acordo com o lado do ovário (direito e esquerdo). No entanto, o comprimento, a espessura e a largura foram significativamente ($p < 0,05$) maiores em ovários que apresentaram CL. Chacur et al. (2006) observaram que a largura do ovário esquerdo foi maior ($p < 0,05$) que do direito, também estudando fêmeas zebuínas.

Tabela 1 - Médias, Desvio Padrão e Coeficiente de Variação do comprimento (Comp), espessura (Esp), largura (Larg) dos ovários direito e esquerdo com e sem corpo lúteo (CL) e quantidade de folículos ovarianos Classe 1 (< 5mm), Classe 2 (5-7 mm) e Classe 3 (> 7 mm) obtidos de vacas zebuínas abatidas

Fatores	Comp (cm)	Larg (cm)	Esp (cm)	Classe 1 \sqrt{x}	Classe 2 \sqrt{x}	Classe 3 \sqrt{x}
Ovário D (n = 77)	2,73 ^a	2,04 ^a	1,71 ^a	4,70 ^a	1,54 ^a	1,33 ^a
Ovário E (n = 76)	2,67 ^a	1,94 ^a	1,70 ^a	4,61 ^a	1,53 ^a	1,23 ^b
Com CL (n = 54)	2,82 ^a	2,17 ^a	1,85 ^a	4,50 ^a	1,66 ^a	1,29 ^a
Sem CL (n = 99)	2,59 ^b	1,80 ^b	1,55 ^b	4,82 ^a	1,42 ^b	1,27 ^a
Teste F						
Ovário (O)	0,62 ^{NS}	0,03 ^{NS}	2,75 ^{NS}	0,19 ^{NS}	0,01 ^{NS}	3,92 [*]
Corpo Lúteo (CL)	6,66 [*]	26,86 ^{**}	38,49 ^{**}	2,13 ^{NS}	8,13 ^{**}	0,19 ^{NS}
Interação O x CL	1,56 ^{NS}	1,85 ^{NS}	0,48 ^{NS}	0,01 ^{NS}	1,85 ^{NS}	0,22 ^{NS}
Desvio Padrão	0,52	0,35	0,34	0,82	0,51	0,30
C.V. (%)	19,34	17,86	20,10	27,80	33,09	23,71

Legenda: ^{NS}= não significativo (P > 0,05); ^{*}= significativo (P < 0,05); ^{**}= significativo (P < 0,01).

Nota: Letras iguais na coluna não diferem entre si (P > 0,05).

Fonte: Dados da pesquisa.

A média total de folículos dissecados de ovários com CL 7,12 não foi diferente dos sem CL 7,28, embora a quantidade de folículos classe 2 (5-7 mm) tenha sido significativamente maior (p < 0,05) em ovário com CL. Barbosa, Toniollo e Guimarães (2013) observaram que a quantidade de oócitos aspirados de ovários com CL (16,94) não diferiu de ovários sem CL (18,00).

A incidência de folículos classe 3 (>7 mm) foi maior (p < 0,05) no ovário direito. Isso está de acordo com o maior número de CLs no ovário direito, resultado do maior número de ovulações (Tabelas 1 e 2). Fêmeas zebuínas ou cruzadas apresentam diâmetro médio aproximado do folículo ovulatório de 11 mm (FIGUEIREDO et al., 1997; GAMBINI et al., 1998; CASTILHO et al., 2000). Outros trabalhos com morfometria ovariana em vacas gestantes também

observaram maior porcentagem de gestações no corno direito (NEVES et al., 2002; RAMOS et al., 2008).

Houve elevada incidência de CLs inclusos tanto no ovário direito (61,29%) quanto no esquerdo (58,33%), (Tabela 2). Esse resultado é semelhante ao de outros autores que observaram 55,8% (NEVES et al., 2002) e 52,3% (RAMOS et al., 2008), diferindo, contudo, dos dados de Chacur et al. (2006), nos quais apenas 26,19% dos CLs eram inclusos. Câmara e Dias (2009) observaram que os animais não gestantes apresentaram incidência igual entre CLs protusos e inclusos, porém no grupo gestante o número de protusos foi superior.

Não houve diferença significativa na quantidade de oócitos potencialmente aptos para a PIV (GI, GII e GIII) comparando-se o lado do ovário (direito ou esquerdo), nem tampouco a presença ou não de CL (Tabela 3).

Tabela 2 - Frequência e porcentagem de ovário direito e esquerdo com corpo lúteo (CL) e de CL incluso ou protuso obtidos de vacas zebuínas abatidas

	Ovário direito (n = 77)(%)	Ovário Esquerdo (n = 76)(%)
Presença de CL	31 (40,25)	24 (31,57)
CL incluso	19 (61,29)	14 (58,33)
CL protuso	12 (38,71)	10 (41,67)

Fonte: Dados da pesquisa.

Tabela 3 - Quantidade e porcentagem de oócitos aptos para PIV (GI, GII e GIII) e não aptos (desnudo e atrésico) aspirados de ovários, direito (OD) e esquerdo (OE), com e sem corpo lúteo (CL), obtidos de ovários de vacas abatidas em abatedouro

	Oócitos	
	(GI, II e III)(n,%)	(desnudos e atrésicos)(n,%)
Ovário direito (n = 77)	364 (67,65) ^a	174 (32,34) ^a
Ovário esquerdo (n = 76)	394 (69,36) ^a	174 (30,63) ^a
Ovário com CL (n = 54)	260 (67,53) ^a	125 (32,46) ^a
Ovário sem CL (n = 99)	498 (69,07) ^a	223 (30,92) ^a

Nota: Letras iguais na coluna não diferem entre si ($P > 0,05$) pelo teste de Qui-quadrado.

Fonte: Dados da pesquisa.

Ao investigar se a morfologia dos COC's está relacionada com a fase de desenvolvimento do folículo e da presença do CL, Vassena et al. (2003) não observaram efeito local do CL e as características morfológicas dos oócitos não anteciparam a identificação de oócitos competentes.

Machatková et al. (2004) notaram melhor qualidade dos COC's obtidos de ovários com CL (três dias pós-cio), porém a presença de um CL funcional não proporcionou melhoria da qualidade oocitária e a taxa de produção de embriões foi significativamente maior em ovários sem CL. Recente estudo em vacas Nelore reporta que a presença de CL não influi sobre a qualidade oocitária em vacas não gestantes, mas houve maior número de oócitos qualidade G-I nos animais prenhes. No mesmo estudo, foi observado que oócitos obtidos de ovários com CL resultaram em melhores índices de produção de embriões (BARBOSA; TONIOLLO; GUIMARÃES, 2013).

Embora o número de camadas de células do *cumulus* não assegure a capacidade dos oócitos de se desenvolverem *in vitro*, há o indicativo de sua viabilidade (FERNANDES et al., 2001), pois as células do *cumulus* têm ligação direta com o ooplasma, permitindo o transporte de nutrientes, controle do metabolismo, bem como a maturação nuclear e citoplasmática (HIRSHFIELD, 1991).

Conclusões

A morfometria ovariana mostrou similaridade a outros estudos em fêmeas zebuínas posto que o lado do ovário e a presença de Cl não alteraram a qualidade dos oócitos; ovários de fêmeas zebuínas abatidas apresentaram grande incidência de CLs inclusos.

Referências

BANZATTO, D. A.; KRONKA, S. N. **Experimentação agrícola**. 4. ed. Jaboticabal: FUNEP, 2006.

BARBOSA, C. P.; TONIOLLO, G. H.; GUIMARÃES, E. C. Produção *in vitro* de embriões de bovinos da raça Nelore oriundos de ovócitos de ovários com e sem corpo lúteo. **Ciência Animal Brasileira**, v. 14, n. 1, p. 81-90, 2013. doi: 10.5216/cab.v14i1.12588.

BLONDIN, P. et al. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 1, p. 38-43, 2002. PMID:11751261.

BORGES, A. M. et al. Características da dinâmica folicular e regressão luteal de vacas das raças Gir e Nelore após tratamento com cloprostenol sódico. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 1, p. 85-92, 2003. doi:10.1590/S1516-35982003000100011.

BREVINI-GANDOLFI, T. A. L.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1255-1276, 2001. doi:10.1016/S0093-691X(01)00481-2.

CÂMARA, A.; DIAS, R. V. C. Características morfométricas de ovários de fêmeas bovinas SRD, colhidos no abatedouro público Municipal de Umarizal - RN. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 2, n. 3, p. 89-92, 2008.

CASTILHO, C. et al. Synchronization of ovulation in crossbred dairy heifers using gonadotrophin-releasing hormone agonist, prostaglandin F2 α and human chorionic gonadotrophin or estradiol benzoate. **Brazilian Journal Medical Biology Research**, v. 33, n. 1, p. 91-101, 2000. doi:10.1590/S0100-879X2000000100013.

- CASTILHO, C. et al. Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 98, n. 3-4, p. 189-196, 2007. doi:10.1016/j.anireprosci.2006.03.008.
- CHACUR, M. G. M. et al. Morfometria de ovários de fêmeas zebu *Bos taurus indicus* coletados em matadouro. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, n. 1, p. 65-70, 2006.
- FERNANDES, C. E. et al. Efeito estacional sobre características ovarianas e produção de óocitos em vacas *Bos indicus* no Mato Grosso do Sul. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 3, p. 131-135, 2001. doi:10.1590/S1413-95962001000300007.
- FIGUEIREDO, R. A. et al. Ovarian follicular dynamics in Nelore Breed (*Bos indicus*). **Theriogenology**, v. 47, n. 8, p. 1489-1505, 1997. PMID:16728093.
- GAMBINI, A. L. G. et al. Dinâmica folicular e sincronização da ovulação em vacas da raça Gir. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 22, p. 201-210, 1998.
- GINTHER, O. J.; KNOPE, L.; KASTELIC, J. P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 87, n. 1, p. 223-30, 1989. doi:10.1530/jrf.0.0870223.
- HAFEZ, E.; HAFEZ, E. S. E. **Reprodução Animal**. 7. ed. São Paulo: Manole, 2004.
- HIRSHFIELD, A. N. Development of follicles in mammalian ovary. **International Review of Cytology**, v. 124, p. 43-101, 1991. doi:10.1016/S0074-7696(08)61524-7
- KASTELIC, J. P.; KNOPE, L.; GINTHER, O. J. Effect of day of prostaglandin treatment on selection and development of the ovulatory follicle in heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 23, n. 3, p. 169-180, 1990. doi:10.1016/0378-4320(90)90001-V.
- KOZICKI, L. E. et al. A somatotrofina bovina (BST) e sua relação com o recrutamento folicular ovariano durante o ciclo estral de vacas. **Archives of Veterinary Science**, v. 10, n. 1, p. 35-44, 2005.
- LONERGAN, P. **Studies in the in vitro maturation, fertilization and culture of bovine follicular oocytes**. 157 f. 1992. Thesis (PhD) – National University of Ireland, Dublin, 1992.
- MACHATKOVÁ, M. et al. Developmental competence of bovine oocytes: effects of follicle size and the phase of follicular wave on in vitro embryo production. **Theriogenology**, v. 61, n. 3, p. 329-335, 2004. PMID:14662132.
- NASCIMENTO, A. A. et al. Correlação morfométrica do ovário de fêmeas bovinas em diferentes estádios reprodutivos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, n. 2, p. 126-132, 2003.
- NEVES, M. M. et al. Características de ovários de fêmeas zebu (*Bos taurus indicus*), colhidos em abatedouros. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 54, n. 6, p. 651-654, 2002. doi:10.1590/S0102-09352002000600016.
- NISWENDER, G. D. et al. Luteal function: the estrous cycle and early pregnancy. **Biology Reproduction**, v. 50, n. 2, p. 239-247, 1994. PMID:8142542.
- PAVLOK, A.; LUCAS-HAHN, A.; NEMANN, H. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v. 31, n. 1, p. 63-67, 1992. PMID:1562328.
- PIMENTEL, C. A. **Hipoplasia ovariana num rebanho Gir: aspectos clínicos, histopatológicos e hereditários**. 1973. 55 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1973.
- RAMOS, E. M. et al. Morfometria ovariana de vacas zebuínas criadas na Amazônia Oriental. **Revista Brasileira de Saúde Produção Animal**, v. 9, n. 4, p. 696-702, 2008.
- VASSENA, R. et al. Morphology and developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. **Theriogenology**, v. 60, n. 5, p. 923-932, 2003. PMID:12935869.

Recebido: 12/11/2012

Received: 11/12/2012

Aprovado: 19/07/2013

Approved: 07/19/2013