

1 **INFLUÊNCIA DO MÉTODO DE RECUPERAÇÃO OOCITÁRIA SOBRE OS**
2 **PARÂMETROS QUANTI-QUALITATIVOS DE OÓCITOS BOVINOS**

3
4 *INFLUENCE OF THE RECOVERY METHOD ON THE QUANTI-QUALITATIVE*
5 *PARAMETERS OF BOVINE OOCYTES*

6
7 **RESUMO**

8 Os objetivos foram avaliar os parâmetros quanti-qualitativos de oócitos bovinos após
9 recuperação usando diferentes métodos de colheita e tipos de êmbolo da seringa de aspiração.
10 Assim, dois experimentos foram realizados usando ovários de fêmeas *post-mortem*. No
11 primeiro experimento, duas técnicas de colheita oocitária foram empregadas: aspiração de
12 folículos (2–8 mm) com agulha 21G e seringa de 5 mL e, fatiamento da superfície ovariana
13 (*slicing*). No segundo experimento, folículos (2–8 mm) foram aspirados usando seringa com
14 distintos êmbolos (borracha *vs.* plástico). Os complexos *cumulus*-oócito (CCOs) foram
15 classificados por critérios morfológicos em grau I e II (viáveis), III e IV (não viáveis). Em
16 seguida, CCOs foram corados com o ACB (60 min; 26 µM) e classificados como ACB⁺
17 (viáveis) e ACB⁻ (não viáveis). Um total de cinco repetições por experimento foi realizado e
18 os dados analisados pelo teste exato de Fisher (P<0,05). No primeiro experimento, o número
19 de oócitos por ovário obtido por *slicing* foi maior quando comparado à aspiração folicular
20 (14,8 *vs.* 7,5; P<0,05). Contudo, um maior percentual de CCOs viáveis observado pelo ensaio
21 de ACB foi obtido a partir da aspiração folicular (65,7% *vs.* 31,0%; P<0,05). No segundo
22 experimento, nenhuma diferença (P>0,05) foi observada entre os tipos de êmbolos quanto aos
23 parâmetros quantitativos. Quanto à qualidade oocitária avaliada por critérios morfológicos,
24 um percentual maior de oócitos viáveis foi recuperado usando êmbolo de borracha (75,4% *vs.*

25 58,2%; $P < 0,05$). Em conclusão, óocitos de melhor qualidade podem ser obtidos a partir da
26 aspiração folicular, especialmente usando seringa com êmbolo de borracha.

27 **PALAVRAS-CHAVE:** Aspiração folicular. Qualidade oocitária. *Slicing*.

28

29 **ABSTRACT**

30 The aims were to evaluate qualitative-quantitative parameters of bovine oocytes after
31 recovery using different collection methods and piston type from the aspiration syringe. Thus,
32 two experiments were performed using ovaries from *post-mortem* females. In the first
33 experiment, two techniques of oocyte recovery were used: aspiration of follicles (2–8 mm)
34 with 21G needle and 5 mL syringe, and slicing of the ovarian surface. In the second
35 experiment, follicles (2–8 mm) were aspirated using syringes with different pistons (rubber
36 vs. plastic). The *cumulus*-oocyte complexes (COCs) were classified by morphological criteria
37 as grade I and II (viable), III and IV (non-viable). Then, COCs were stained with BCB (60
38 min, 26 μ M) and categorized as BCB⁺ (viable) and BCB⁻ (non-viable). A total of five
39 repetitions per experiment was performed and the data analyzed by Fisher's exact test
40 ($P < 0,05$). In the first experiment, the number of oocytes per ovary obtained by slicing was
41 higher when compared to the follicular aspiration (14.8 vs. 7.5; $P < 0,05$). Nevertheless, a
42 greater percentage of viable COCs observed by BCB assay was obtained from the follicular
43 aspiration (65.7% vs. 31.0%; $P < 0,05$). In the second experiment, no difference ($P > 0,05$) was
44 observed the piston type as the quantitative parameters. As the oocyte quality evaluated by
45 morphological criteria, a higher percentage of viable oocytes were recovered using rubber
46 piston (75.4% vs. 58.2%; $P < 0,05$). In conclusion, better quality oocytes can be obtained from
47 follicular aspiration, especially by using a rubber piston syringe.

48 **KEY-WORDS:** Follicular aspiration. Oocyte quality. *Slicing*.

49

INTRODUÇÃO

50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74

Ao longo dos anos, inúmeros avanços foram alcançados quanto ao desenvolvimento de programas relacionados ao uso de biotécnicas aplicadas à reprodução animal (MACHATY *et al.*, 2012). Dentre esses avanços, destacam-se àqueles relacionados à produção *in vitro* de embriões (PIVE), especialmente na espécie bovina, que possibilitaram vários benefícios para o setor científico, produtivo e tecnológico (DE BEM *et al.*, 2014).

A PIVE compreende várias etapas que consistem desde a recuperação de oócitos até o desenvolvimento *in vitro* (DIV) dos embriões, na qual cada uma tem influência direta no resultado final. De forma sucinta são as seguintes as etapas do processo: recuperação, seleção e maturação *in vitro* de complexos *cumulus*-oócito (CCOs), capacitação espermática seguida de fecundação *in vitro*, DIV dos presumíveis zigotos e transferência de embriões para receptoras sincronizadas (VARAGO *et al.*, 2008). Em virtude de todas as suas aplicações, vários grupos têm buscando aumentar a eficiência da PIVE, visando conhecer os fatores envolvidos em cada etapa.

Uma vez que o desenvolvimento embrionário está intimamente relacionado à qualidade dos oócitos, estudos têm sido realizados a fim de aperfeiçoar os sistemas de colheita e avaliação qualitativa dos mesmos (IORIO *et al.*, 2014; OPIELA; KATSKA-KSIAZKIEWICZ, 2013). Em fêmeas *post-mortem*, a colheita oocitária é realizada pelas técnicas de aspiração folicular, utilizando agulha acoplada a seringa ou bomba de vácuo, e *slicing*, que consiste no fatiamento do córtex ovariano para exposição do líquido folicular (BERNAL *et al.*, 2014). Ambas as técnicas podem apresentar vantagens e desvantagens quanto à taxa de recuperação e qualidade dos oócitos obtidos (KAKKASSERY *et al.*, 2010). Além disso, a composição dos materiais utilizados durante a colheita também pode diminuir a qualidade desses gametas, especialmente devido à toxicidade que podem apresentar para a reprodução (ENGLAND; ALLEN, 1992; NIJS *et al.*, 2009).

75 Assim, a qualidade oocitária adquirida progressivamente durante a foliculogênese deve
76 ser conservada durante a recuperação oocitária (SILVA *et al.*, 2016). Portanto, os objetivos do
77 presente trabalho foram avaliar os parâmetros quanti-qualitativos de oócitos bovinos após
78 recuperação usando diferentes métodos de colheita e tipos de êmbolo da seringa de aspiração.

79

80

MATERIAL E MÉTODOS

81 Todos os experimentos foram realizados em concordância com Comitê de Ética de Uso
82 de Animais (CEUA, no. 23091.001069/2015-79). Os reagentes usados foram adquiridos da
83 Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA) e quando necessário o pH das soluções e/ou meios foi
84 ajustado para 7,4.

85 Assim, dois experimentos foram realizados usando ovários de fêmeas adultas, mestiças
86 e provenientes de abatedouro local. No primeiro experimento, duas técnicas de colheita
87 oocitária foram empregadas: aspiração folicular e fatiamento da superfície ovariana (*slicing*).
88 No segundo experimento, folículos foram aspirados usando seringa com distintos tipos de
89 êmbolos (borracha *vs.* plástico).

90 Para tanto, ovários bovinos foram transportados ao laboratório em solução salina (NaCl,
91 0,9%) aquecida a 35–37oC. No laboratório, ovários foram lavados em uma nova solução de
92 transporte e mantidos em banho-maria (37oC) para a colheita oocitária. Então, para a
93 aspiração folicular, folículos de 2–8 mm de diâmetro foram aspirados com auxílio de uma
94 agulha de 21G acoplada a uma seringa de 5 mL contendo solução tampão fosfato (PBS). Já
95 para o *slicing*, ovários foram alocados separadamente em placas de Petri e cortes foram
96 realizados no córtex ovariano com distância de aproximadamente 2 mm, utilizando uma
97 lâmina de bisturi e priorizando as regiões com folículos de 2–8 mm.

98 Após a colheita oocitária, o líquido folicular foi examinado sob estereomicroscópio
99 para a recuperação dos CCOs. Em seguida, os mesmos foram classificados por critérios

100 morfológicos em viáveis (pelo menos uma camada completa de células do *cumulus* e
101 citoplasma homogêneo) e não viáveis (camada incompleta de células do *cumulus* e citoplasma
102 homogêneo ou heterogêneo e/ou oócito degenerado), conforme Gonçalves *et al.* (2008).

103 Para o ensaio de azul de crescil brilhante (ACB), os oócitos foram lavados em gotas de
104 PBS e incubados com ACB diluído em PBS (26 μ M) por 60 min a 38,5°C. Decorrido o
105 tempo, oócitos foram lavados em PBS e sob estereomicroscópio foram classificados em
106 ACB⁺ (viáveis; coloração azul no citoplasma) e ACB⁻ (não viáveis; citoplasma incolor). O
107 corante ACB é reduzido pela enzima glucose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) de azul para
108 incolor (ACB⁻) em oócitos em fase de crescimento. Já em oócitos crescidos, o ACB não é
109 reduzido pela G6PDH fazendo com que os oócitos apresentem cor azul no citoplasma (ACB⁺)
110 (OPIELA; KATSKA-KSIAZKIEWICZ, 2013).

111 Para análise dos dados, a taxa de recuperação oocitária (oócitos recuperados/ folículos
112 aspirados), o número de oócitos colhidos por ovário e os percentuais de oócitos viáveis
113 (oócitos viáveis/total de oócitos recuperados) por classificação morfológica e ensaio de ACB
114 foram analisados pelo teste de exato de Fisher, usando o software Graphpad Instat 3.06
115 (GraphPad Software Inc., La Jolla, EUA). Para cada experimento, pelo menos cinco
116 repetições foram realizadas. Os resultados foram expressos como média e/ou médias
117 percentuais, sendo considerados significativamente diferentes quando $P < 0,05$.

118

119

RESULTADOS E DISCUSSÃO

120 No primeiro experimento, um total de 48 ovários foi utilizado (24 ovários/método de
121 recuperação). Destes, 181 e 355 estruturas foram recuperadas por aspiração folicular e *slicing*,
122 respectivamente. O número de oócitos por ovário obtido pela técnica de *slicing* foi maior
123 quando comparado à aspiração folicular (14,8 vs. 7,5; $P < 0,05$). Diferença nesse parâmetro
124 também foi observado por Wang *et al.* (2007) para oócitos bovinos (9,6 vs. 5,8). Em geral, a

125 maior recuperação alcançada pela técnica de *slicing* pode está associada ao procedimento que
126 favorece a colheita de oócitos de folículos com pequeno diâmetro que normalmente não são
127 utilizados na colheita por aspiração folicular (SIANTURI *et al.*, 2002).

128 Quanto à qualidade oocitária (**Tabela 1**), nenhuma diferença foi observada entre as
129 técnicas de recuperação para a qualidade oocitária avaliada por critérios morfológicos
130 ($P>0,05$). Sianturi *et al.* (2002), estudando esse mesmo parâmetro de avaliação oocitária,
131 também não observaram influência dos métodos de recuperação sobre a qualidade de oócitos
132 bovinos viáveis oriundos de abatedouro (aspiração folicular: 27,71%; *slicing*: 33,78%). Já
133 outros autores têm demonstrado que CCOs de melhor qualidade podem ser obtidos a partir da
134 técnica de *slicing* em comparação a aspiração folicular (CAROLAN *et al.*, 1994; WANG *et*
135 *al.*, 2007).

136 Além disso, um maior percentual de CCOs viáveis usando o ensaio de ACB ($P<0,05$)
137 foi obtido a partir da aspiração folicular quando comparado ao *slicing*. Adicionalmente, um
138 maior percentual de CCOs não viáveis foi obtido a partir do *slicing* ($P<0,05$). Esse resultado
139 pode estar relacionado à capacidade do ACB em corar CCOs mais desenvolvidos (OPIELA;
140 KATSKA-KSIAZKIEWICZ, 2013), os quais foram obtidos em maior quantidade através da
141 aspiração folicular, que permite a seleção mais eficiente dos folículos que serão utilizados. Na
142 técnica de *slicing*, os cortes podem atingir regiões que apresentem folículos de pequeno
143 diâmetro onde os oócitos não estão totalmente crescidos (FAIR *et al.*, 1995; SIANTURE *et*
144 *al.*, 2002). Portanto, é possível afirmar que para a comparação entre os métodos de colheita, o
145 ensaio de ACB foi determinante para a avaliação eficiente da qualidade oocitária.

146 Atualmente, vários grupos têm utilizado o ensaio ACB a fim de auxiliar a avaliação
147 morfológica convencional na classificação de oócitos de melhor qualidade e,
148 conseqüentemente, aumentar o sucesso da PIVE (MIRSHAMSI *et al.*, 2013; OPIELA;
149 KATSKA-KSIAZKIEWICZ, 2013). Normalmente, oócitos ACB⁺ (considerados viáveis)

150 possuem um melhor desempenho nas etapas de maturação e fecundação *in vitro*
151 (MIRSHAMSI *et al.*, 2013), considerando assim o ensaio como eficaz para predizer a
152 qualidade oocitária e, no presente estudo, afirmando a aspiração folicular como método de
153 recuperação de um maior número de oócitos viáveis e, portanto, outra variável no método de
154 aspiração foi testada, a qual consistiu na comparação dos tipos de êmbolo da seringa
155 (borracha vs. plástico).

156 No segundo experimento, um total de 64 ovários (32 ovários /tipo de êmbolo) foi
157 utilizado, perfazendo uma taxa de recuperação de 43,7% (203/465) e 40,2% (153/381) e
158 número de oócitos/ovário de 6,3 e 5,1 para o êmbolo de borracha e plástico, respectivamente.
159 Nenhuma diferença ($P>0,05$) foi observada entre os tipos de êmbolos quanto aos parâmetros
160 quantitativos.

161 Quanto à qualidade oocitária avaliada por critérios morfológicos, um percentual maior
162 de oócitos viáveis foi recuperado usando êmbolo de borracha (**Tabela 2**). Contudo, nenhuma
163 diferença foi observada na qualidade de oócitos avaliada pelo ensaio de ACB ($P>0,05$,
164 **Tabela 2**) para êmbolo de borracha e plástico, respectivamente. Assim, apesar das seringas
165 com êmbolo de plástico ser inertes, evitando possíveis reações com o fluido folicular, a
166 qualidade dos oócitos foi afetada positivamente pelo êmbolo de borracha, utilizando a
167 morfologia como método de análise da qualidade oocitária. Tal resultado pode ser atribuído a
168 maior rigidez do êmbolo de plástico, o qual pode ter causado um desprendimento maior das
169 células do *cumulus*, promovendo a diminuição no percentual de oócitos morfológicamente
170 viáveis.

171 Contudo, Iorio *et al.* (2014), usando êmbolo de borracha para a obtenção de estruturas
172 ovinas para a fecundação *in vitro*, verificaram que com 96 h de cultivo *in vitro*, o
173 desenvolvimento embrionário foi interrompido, apresentando sinais de degeneração. Essa
174 interrupção pode estar relacionada com o látex encontrado na seringa, o qual pode reagir com

175 o fluido folicular e talvez interferir no desenvolvimento embrionário e, que nos primeiros
176 momentos de recuperação oocitária não gera danos na qualidade das estruturas.

177 Estudos anteriores demonstraram que seringas com êmbolo de borracha apresentam
178 efeitos tóxicos em testes utilizando espermatozoides (CRITCHLOW *et al.*, 1989;
179 CLAASSENS *et al.*, 2000). Contudo neste estudo, utilizando o ensaio de ACB, a qualidade de
180 oócitos imaturos não foi afetada pela composição da seringa. Provavelmente o curto tempo de
181 exposição dos oócitos a borracha do êmbolo não foi capaz de estabelecer o efeito tóxico em
182 relação à seringa sem borracha (ENGLAND; ALLEN, 1992).

183

184

CONCLUSÕES

185 Ambos os métodos (aspiração folicular e *slicing*) podem ser utilizados para recuperação
186 de oócitos bovinos oriundos de fêmeas *post-mortem*. Contudo, apesar da maior recuperação
187 oocitária através da técnica de *slicing*, o ensaio de azul cresil brilhante mostrou que oócitos
188 oriundos de aspiração folicular possuem uma melhor qualidade, parâmetro importante para a
189 determinação da competência oocitária. Além disso, o tipo de êmbolo da seringa não afetou a
190 quantidade de oócitos recuperados; contudo, a aspiração folicular usando êmbolo de borracha
191 resultou em um número maior de oócitos viáveis de acordo com a avaliação morfológica.

192

193

AGRADECIMENTOS

194 Este estudo foi apoiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e
195 Científico (CNPq, processo no. 477710/2013-1).

196

197

REFERÊNCIAS

198 BERNAL, S.M.; HEINZMANN, J.; HERRMANN, D.; TIMMERMANN, B.; BAULAIN, U.;
199 GROßFELD, R.; DIEDERICHA, M.; LUCAS-HAHNA, A.; NIEMANN, H. Effects of

200 different oocyte retrieval and *in vitro* maturation systems on bovine embryo development and
201 quality. *Zygote*. Cambridge. v.23, p.367-377, 2015.

202 CAROLAN, C.; MONAGHAN, P.; GALLAGHER, M.; GORDON, I. Effect of recovery
203 method on yield of bovine oocytes per ovary and their developmental competence after
204 maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Theriogenology*. New York. v.41, p.1061-1068,
205 1994.

206 CLAASSENS, O.E.; WEHR, J.B.; HARRISON, K.L. Optimizing sensitivity of the human
207 sperm motility assay for embryo toxicity testing. *Human Reproduction*. Oxford. v.15, p.1586-
208 1591, 2000.

209 CRITCHLOW, J.D.; MATSON, P.L.; MAUREEN, C.N.; HORNE, G.; TROUP, S.A.;
210 LIEBERMAN, B.A. Quality control in an *in vitro* fertilization laboratory: use of human
211 sperm survival studies. *Human Reproduction*. Oxford. v.4, p.545-549, 1989.

212 DE BEM, T.H.C.; ADONA, P.R.; BRESSAN, F.F.; MESQUITA, L.G.; CHIARATTI, M.R.;
213 MEIRELLES, F.V.; LEAL, C.L.V. The influence of morphology, follicle size and Bcl-2 and
214 Bax transcripts on the developmental competence of bovine oocytes. *Reproduction in*
215 *Domestic Animals*. Linköping. v.49, p.576-583, 2014.

216 ENGLAND, G.C.W.; ALLEN, W.E. Factors affecting the viability of canine spermatozoa: I.
217 Potential influences during processing for artificial insemination. *Theriogenology*. New York.
218 v.37, p.363-371, 1992.

219 FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational
220 competence and transcriptional activity. *Molecular Reproduction and Development*.
221 Linköping. v.42, p.437-442, 1995.

222 GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. *Biotécnicas Aplicadas à*
223 *Reprodução Animal*. 2ª ed., São Paulo: Roca, 2008, 395p.

224 IORIO, G.A.; PUMARÁ, P.D.; RAFAELLI, P.M. Influence of rubber piston syringe used in
225 recovery of oocytes in the development of sheep embryos produced *in vitro*. *Animal*
226 *Reproduction*. Belo Horizonte. v.11, p.420, 2014.

227 KAKKASSERY, M.P.; VIJAYAKUMARAN, V.; SREEKUMARAN, T. Effect of cumulus
228 oocyte complex morphology on *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Journal of Veterinary*
229 *and Animal Sciences*. New York. v.41, p.12-17, 2010.

230 MACHATY, Z.; PEIPPO, J.; PETER, A. Production and manipulation of bovine embryos:
231 techniques and terminology. *Theriogenology*. New York. v.78, p.937-950, 2012.

232 MIRSHAMSI, S.M.; KARAMISHABANKAREH, H.; AHMADI-HAMEDANI, M.;
233 SOLTANI, L.; HAJARIAN, H.; ABDOLMOHAMMADI, A.R. Combination of oocyte and
234 zygote selection by brilliant cresyl blue (BCB) test enhanced prediction of developmental
235 potential to the blastocyst in cattle. *Animal Reproduction Science*. Amsterdam. v.136, p.245-
236 251, 2013.

237 NIJS, M.; FRANSSSEN, K.; COX, A.; WISSMANN, D.; RUIS, H.; OMBELET, W.
238 Reprotoxicity of intrauterine insemination and *in vitro* fertilization-embryo transfer
239 disposables and products: a 4-year survey. *Fertility and Sterility*. New York, v.92, p.527-535,
240 2009.

241 OPIELA, J.; KAŹSKA-KSIAŹKIEWICZ, L. The utility of brilliant cresyl blue (BCB)
242 staining of mammalian oocytes used for *in vitro* embryo production (IVP). *Reproductive*
243 *Biology*. New York. v.13, p.177-183, 2013.

244 SIANTURI, R.G.; THEIN, M.; WAHID, H.; ROSNINA, Y.C. Effect of collection technique
245 on yield of bovine oocytes and the development potential of oocytes from different grades of
246 oocytes. *Indonesian Journal of Animal and Veterinary Sciences*. v.7, p.188-193, 2002.

247 SILVA, J.R.V.; VAN DEN HURK, R.; FIGUEIREDO, J. R. Ovarian follicle development *in*
248 *vitro* and oocyte competence: advances and challenges for farm animals. *Domestic Animal*
249 *Endocrinology*. Amsterdam. v.55, p.123-135, 2016.

250 VARAGO, F.C.; MENDONÇA, L.F.; LAGARES, M.A. Produção *in vitro* de embriões
251 bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. *Revista*
252 *Brasileira de Reprodução Animal*. Belo Horizonte. v. 36, p. 100-109, 2008.

253 WANG, Z.G.; YU, S.D.; XU, Z.R. Effects of collection methods on recovery efficiency,
254 maturation rate and subsequent embryonic developmental competence of oocytes in Holstein
255 cow. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*. Seoul. v.20, p.496-500, 2007.

256

257

258

259

260

261

262

263

264

265 **Tabela 1** – Qualidade de oócitos bovinos obtidos por diferentes métodos de recuperação e
 266 avaliados por critérios morfológicos e ensaio azul de cresil brilhante.

Métodos de recuperação	Análise morfológica		Ensaio de azul cresil brilhante	
	Viáveis (%)	Não viáveis (%)	Viáveis (%)	Não viáveis (%)
Aspiração	108/181	73/181	119/181	62/181
folicular	(59,7) ^a	(40,3) ^a	(65,7) ^a	(34,2) ^a
<i>Slicing</i>	241/355	114/355	110/355	245/355
	(67,9) ^a	(32,1) ^a	(31,0) ^b	(69,0) ^b

267 ^{a,b}: diferem na mesma coluna (P<0,05).

268

269 **Tabela 2** – Qualidade de oócitos bovinos obtidos por diferentes êmbolos de seringa de
 270 aspiração folicular (borracha vs. plástico) e avaliados por critérios morfológicos e ensaio de
 271 azul de cresil brilhante.

Tipo de êmbolo	Análise morfológica		Ensaio de azul cresil brilhante	
	Viáveis (%)	Não viáveis (%)	Viáveis (%)	Não viáveis (%)
Borracha	153 (75,4) ^a	50 (24,6) ^a	134 (66,0) ^a	69 (34,0) ^a
Plástico	89 (58,2) ^b	64 (41,8) ^b	92 (60,1) ^a	61 (39,9) ^a

272 ^{a,b}: diferem na mesma coluna (P<0,05).

273

274

275

276