

EFEITO DO DIÂMETRO FOLICULAR SOBRE A QUALIDADE DOS OÓCITOS OBTIDOS DE OVÁRIOS DE FÊMEAS BOVINAS DE ABATEDOURO

Vítor Teixeira Basso¹, Paula Pires Nascimento², Calié Castilho³

¹Aluno do Curso de Medicina Veterinária Universidade do Oeste Paulista – UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil; ²Residente Reprodução Animal do Curso de Medicina veterinária, ³Professora e Pesquisadora do Curso de Medicina veterinária, calie@unoeste.br

RESUMO

Características macroscópicas do folículo são importantes para determinar o potencial de maturação nuclear e citoplasmática do oócito, desta forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência do diâmetro folicular sobre a qualidade dos oócitos obtidos de ovários de abatedouro. Foram utilizados ovários provenientes de abatedouro que foram dissecados, mensurados e divididos em três classes de diâmetro: classe 1 (C1) – folículos < 5 mm; classe 2 (C2) - 5 a 7 mm e classe 3 (C3) – > 7mm. Os oócitos recuperados foram observados e selecionados quanto ao aspecto morfológico em 5 grupos de qualidade: Grau 1, Grau 2, Grau 3, Desnudo e Atrésicos. Dos 528 folículos dissecados, 373 foram classe I (<5mm); 80 classe II (5 –7mm) e 75 classe III (> 7mm). Não foram observadas correlações entre qualidade dos oócitos e tamanho dos folículos ($p>0,05$). Concluímos que em nosso experimento não foi observada influência do diâmetro folicular sobre a qualidade do complexo cumulus –oócito (COC) recuperados de ovários de abatedouro.

Palavras-chave: qualidade oocitária, ovários, folículo dissecado

EFFECT OF FOLLICULAR DIAMETER ON THE QUALITY OF OBTAINED OOCYTE OF OVARIES BOVINE FEMALES SLAUGHTER

ABSTRACT

Macroscopic characteristics of the healthy follicle are important to determine the potential of nuclear and cytoplasmic maturation of the oocytes. The present study work was developed to examine the effect of follicular diameter on the quality of oocytes obtained from ovaries collected after slaughter. Ovaries were dissected, measured and divided in three classes according to the diameter: class 1 (C1) – follicles <5 mm; class 2 (C2) - 5 to 7 mm and class 3 (C3) – >7mm. Of 528 dissected follicles, 373 were class I, 80 were class II, and 75 were class III. Correlations were not observed between quality of the oocytes and size of the follicles ($p> 0,05$). The present results demonstrated that the diameter of the follicle did not influence the quality of oocytes recovered after slaughter.

Key-words: oocyte quality, ovaries, dissected follicle

INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos obteve avanços consideráveis nos últimos anos e está sendo rapidamente incorporadas aos meios de produção. Juntamente com a aspiração folicular transvaginal guiada por ultra-sonografia (OPU-*Ovum Pick Up*), favorecendo os programas de melhoramento genético (ALVES *et al.*, 2003). No entanto, a taxa de desenvolvimento embrionário ainda permanece baixa, em média 20 a 30% dos oócitos maturados chegam até o estágio de blastocisto (DAYAN *et al.*, 2000).

Muitos cientistas vêm tentando entender o sistema reprodutivo de fêmeas através da manipulação do desenvolvimento folicular, na esperança de produzir mais oócitos competentes para a fecundação (BLONDIN *et al.*, 2002). Estudos têm examinado as diferentes características foliculares, como competência para o desenvolvimento, tamanho folicular, folículos saudáveis, perfil hormonal e status ovariano. Estes nos mostram que pode ser impossível criar condições ideais para obter 100% de competência dos complexos cumulus – oócito (COC`s) (BLONDIN; SIRARD, 1995).

Devido à dinâmica folicular em novilhas ou vacas zebuínas e européias ser caracterizada pela presença de duas ou três ondas de desenvolvimento folicular (GINTHER *et al.*, 1989, FIGUEIREDO *et al.*, 1997, CASTILHO *et al.*, 2000), é possível realizar a recuperação de oócitos por via transvaginal durante todo o ciclo estral, mesmo repetidamente (KRUIP *et al.*, 1994). Desta forma a maioria das aspirações foliculares é realizada em estágio aleatório do ciclo estral, portanto em diferentes fases de desenvolvimento folicular e sujeito a diferentes concentrações hormonais o que afeta a qualidade dos oócitos obtidos.

A influência do tamanho folicular na competência oocitária para o desenvolvimento *in vitro* tem sido exaustivamente estudada, embora indiquem que folículos maiores geram oócitos com melhor competência (PAVLOK *et al.* 1992, LONERGAN *et al.* em 1994, CAROLAN *et al.* 1996, HENDRIKSEN *et al.* 2000, SENEDA *et al.*, 2001), ainda não há um consenso entre os trabalhos. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência do diâmetro folicular sobre a qualidade dos oócitos obtidos de ovários de fêmeas bovinas de abatedouro.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os ovários utilizados foram obtidos de fêmeas bovinas abatidas no frigorífico Bom Mart de Presidente Prudente, portanto em fase aleatória de ciclo estral. Os ovários eram colocados em recipiente estéril juntamente com solução fisiológica 0,9%, temperatura de 35°C e imediatamente enviados ao laboratório, em tempo não superior a 30 minutos após o abate. No laboratório, os ovários eram mantidos em banho maria e todos os folículos visíveis dissecados com o auxílio de pinças e tesouras, posteriormente eram mensurados com paquímetro e divididos em três classes de diâmetro: classe 1 (C1) – folículos menores que 5 mm; classe 2 (C2) – folículos medindo 5mm até 7mm e classe 3 (C3) – maiores que 7 mm. Posteriormente estes folículos foram contados, rompidos com agulhas e os oócitos recuperados colocados em placas de Petri com solução fisiológica e líquido folicular, para serem observados e selecionados em lupa estereomicroscópica – Forty, American Optical Corporation. Nesta seleção, observou-se o aspecto morfológico dos COC`s, segundo Lonergan (1992) em 5 grupos de qualidade, onde Grau I = células do *cumulus* compacto presente, contendo mais de três camadas de células; Grau

II = células do *cumulus* compacto parcialmente presente em volta do oócito ou rodeando completamente o oócito, com menos de três camadas celulares; Grau III = células do *cumulus* presente, com apenas uma camada de célula; Desnudo = ausência de camada de células do *cumulus* e Atrésicos = células do *cumulus* em regressão celular.

Para fins de comparação, os oócitos foram classificados em escores segundo sua qualidade em oócitos atrésicos = escore 0, oócitos desnudos = escore 1, oócitos grau I = escore 2, oócitos grau II = escore 3 e oócitos grau III = escore 4.

Para correlacionar os escores de qualidade oocitária com o tamanho folicular empregou-se o teste não - paramétrico de Spearman.

RESULTADOS

Dos 528 folículos dissecados, 373 foram classificados como classe I; 80 classe II e 75 classe III. Não foram observadas correlações entre qualidade dos oócitos e tamanho dos folículos ($r = 0,01509$, $p\text{-value} = 0,7302$). Os resultados obtidos para os diferentes tamanhos avaliados e as respectivas classificações sobre a qualidade estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Número e porcentagem de oócitos obtidos de folículos dissecados de ovários de abatedouro nos diâmetros classe I (<5mm), classe II (5 –7mm) e classe III (> 7mm).

	Grau I	Grau II	Grau III	Desnudo	Atrésico	Total
Classe I	88	71	76	47	91	373
(< 5mm)	(23,6%)	(19,0%)	(20,4%)	(12,6%)	(24,4%)	
classe II	17	15	19	10	19	80
(5 –7mm)	(21,2%)	(18,7%)	(23,7%)	(12,5%)	(23,7%)	
classe III	20	14	18	05	18	75
(>7mm)	(26,7%)	(18,7%)	(24,0%)	(6,7%)	(24,0%)	
Total						528

DISCUSSÃO

No presente estudo não foi observado efeito significativo do diâmetro folicular sobre a qualidade dos oócitos de fêmeas bovinas obtidos em fase aleatória do ciclo estral. Isso se deve à característica do crescimento folicular em fêmeas bovinas que ocorre através de ondas foliculares, denominado dinâmica folicular (GINTHER *et al.*, 1989). Desta forma em qualquer fase do ciclo estral existem folículos em desenvolvimento, ou seja saudáveis, e sofrendo atresia. A atresia dos folículos recrutados é devida a queda na concentração plasmática de FSH (ADAMS *et al.*, 1992), induzindo no folículo atrésico queda no estradiol intra-folicular (KRUIP; DIELEMAN, 1985). Todas essas alterações hormonais induzem alterações na qualidade do oócito.

Segundo VASSENA *et al.* (2003) a qualidade do oócito é de suma importância nas tecnologias de reprodução assistida. A presença das células do *cumulus* é benéfica para a obtenção de embriões após a fertilização *in vitro* (FIV), pois oócitos desnudos tem uma taxa de clivagem baixa (FATEHI *et al.*, 2005). Mas Fukui e Sakuma, (1980) observaram que não houve diferença na maturação oocitária de oócitos de diferentes qualidades. Onde observaram que oócitos recuperados de folículos de menor diâmetro (≤ 4 mm) possuíam qualidade superior aos de maior diâmetro (> 4 mm). Em outro estudo observou-se que oócitos bovinos com células do *cumulus* exibindo sinais médios de atresia tiveram taxas maiores de desenvolvimento embrionário que oócitos sem sinais de atresia e a competência para o desenvolvimento embrionário *in vitro* somente é afetada por altos níveis de atresia (BLONDIN, SIRARD, 1995).

Embora em nossos trabalhos avaliamos apenas a qualidade dos oócitos, muitos estudos foram realizados para avaliar o efeito do diâmetro folicular na competência oocitária. Carolan *et al.*

(1996), não observaram influência do diâmetro folicular sobre a maturação do oócito. Resultado similar foi observado por Seneda *et al*, (2001) estudando oócitos oriundos de folículos pequenos (< 4mm) e grandes (> 4mm) aspirados *in vivo*. Por outro lado, oócitos de folículos maiores possuem melhor competência para o desenvolvimento *in vitro* (Lonergan *et al* em 1994. Pavlok *et al* (1992), Hendriksen *et al* , 2000). Rauber *et al*, (2003) citou que provavelmente as substâncias estimuladoras estejam presentes nos folículos grandes e médios e ausentes ou presentes em menor concentração em folículos pequenos.

O resultado do nosso experimento indica que em estágio aleatório do ciclo estral não há efeito do diâmetro folicular sobre a qualidade dos oócitos, portanto a aspiração folicular, realizada a campo, em estágio aleatório do ciclo estral, não afeta a qualidade do oócito.

CONCLUSÃO

Não houve influência do diâmetro folicular sobre a qualidade dos complexos *cumulus*-oócitos (COC) recuperados de ovários de abatedouro, de fêmeas bovinas, em fase aleatória do ciclo estral.

Nosso resultado indica que, provavelmente, a aspiração folicular de doadoras vivas a campo, em fase indeterminada do ciclo estral, resulta na obtenção de oócitos com qualidades similares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS Greg P. *et al*. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **J Reprod Fertil**, v.94, p.177-88, 1992.
<http://dx.doi.org/10.1530/jrf.0.0940177>

ALVES, Denis Faustino, RAUBER, Lucio Pereira, RUBIN, Fernanda Bastos *et al*. Desenvolvimento embrionário *in vitro* de oócitos bovinos mantidos em líquido folicular ou TCM-hepes. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** [online]. 2003, vol.40, no.4 [citado 10 Maio 2006], p.279-286. Disponível na World Wide Web: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S141395962003000400007&lng=pt&nrm=iso>. ISSN 1413-9596.

BLONDIN, Patrick.; BOUSQUET, Daniel, TWAGIRAMUGU, Herménégilde; BARNERS, Frank.; SIRARD, Marc-André. Manipulation of follicular development to produce developmentally competent bovine oocytes. **Biol. Reprod.**v.66, p. 38-43, 2002.

BLONDIN, Patrick.; SIRARD, Marc-André. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in sheep oocytes. **J. Reprod. Fertil.** v.62: 575 – 582, 1995.
<http://dx.doi.org/10.1095/biolreprod66.1.38>

CAROLAN, Catherine; LONERGAN, Pat.; MONGET, Philippe.; MONNIAUX, Daniele; MERMILLOD, Pascal. Effect of follicle size and quality on the ability of follicular fluid to support cytoplasmic maturation of bovine oocytes. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 43: 477 – 483, 1996.

CASTILHO, Caliê, GARCIA, Joaquim Manzano. Divergência no crescimento folicular: efeito na competência oocitária para o desenvolvimento *in vitro* de embriões: Revisão. **Archives of Veterinary Science.** v. 10, n. 3, p. 17-23, 2005.

CASTILHO, Caliê, GAMBINI Ana Lúcia G., FERNANDES Paulo, TRINCA Luzia A., TEIXEIRA Andrey Borges, BARROS Ciro Moraes. Synchronization of ovulation in crossbred dairy heifers using gonadotrophin-releasing hormone

agonist, prostaglandin F2 α and human chorionic gonadotrophin or estradiol benzoate. **Braz J Med Biol Res**, v. 33(1), p. 91-101, 2000.

DAYAN, André; WATANABE, Michele Rodrigues.; WATANABE, Yeda Fumie. Fatores que interferem na produção comercial de embriões FI. **Arq. Facul. Vet. UFRGS**. v. 20:181 – 185, 2000.

FATEHI A. Nader; ROELEN, Bernard A.; COLENBRANDER, Ben; SCHOEVEERS, Eric J.; *et al.* Presence of cumulus cells during *in vitro* fertilization protects the bovine oocyte against oxidative stress and improves first cleavage but does not affect further development. **Zygote**, v. 13 (2), p. 177-85, 2005.
<http://dx.doi.org/10.1017/S0967199405003126>

FIGUEIREDO Ricardo Alamino, BARROS Ciro Moraes, PINHEIRO Osni L., SOLER Júlia Maria Pavan. Ovarian follicular dynamics in Nelore Breed (*Bos indicus*). **Theriogenology**.47:1489-1505, 1997.

FUKUI, Yu-ichi.; SAKUMA, Yasuo. Maturation of bovine oocytes cultured *in vitro*: relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of cumulus cells. **Biol. of Reprod.** v. 22:669 – 673, 1980.

GINTHER, Oliver J., KNOPF, Lea.; KASTELIC, John Patrick. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. **J. Reprod. Fertil.** v.887: 223 – 230, 1989.

HENDRIKSEN, Peter J.M.; VOS, Peter L.A.M; *et al.* Bovine follicular development and its effect on the *in vitro* competence of oocytes. **Theriogenology**. v.53: 11 -20, 2000.
[http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00236-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00236-8)

KRUIP Theo A., DIELEMAN Steph J. Steroid hormone concentrations in the fluid of bovine follicles relative to size, quality and stage of the oestrus cycle. **Theriogenology**. v.24, p.:395-408, 1985.
[http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X\(85\)90046-9](http://dx.doi.org/10.1016/0093-691X(85)90046-9)

KRUIP, Theo A.; BONI, Rafeale; *et al.* Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. **Theriogenology**, v. 42, p. 675-684, 1994.

LONERGAN, Pat; 1992. Studies in the *in vitro* maturation, fertilization and culture of bovine follicular oocytes. PHD Thesis, National University of Ireland, Dublin.

LONERGAN, Pat; *et al.* Effect of follicle size on bovine oocyte quality and development competence following maturation, fertilization and culture *in vitro*. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 37: 48 -53, 1994.
<http://dx.doi.org/10.1002/mrd.1080370107>

PAVLOK, Antonin; LUCANS – HAHN, Andrea; NIEMANN, Heiner. Fertilization and developmental competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. **Mol. Reprod. Dev.** v. 31: 63 – 67, 1992.
<http://dx.doi.org/10.1002/mrd.1080310111>

RAUBER, Lúcio Pereira.; ALVES; Denis Faustino; *et al.* Desenvolvimento embrionário de oócitos bovinos mantidos em fluido folicular bovino de folículos de diferentes diâmetros. **Bras. J. Vet. Res. Anim. Sci**, v.40:169 – 177, 2003.

SENEDA, Marcelo Marcondes; ESPER, Cesar Roberto; GARCIA, Joaquim Mansano.; de OLIVEIRA, J.A; VANTINI, Roberta. Relationship between follicle size and ultrasound – guided transvaginal oocyte recovery. **An. Reprod. Sci**, v.67: 37 – 43, 2001.

[http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00113-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00113-0)

VASSENA Rita; *et al.* developmental competence of bovine oocytes relative to follicular status. **Theriogenology**. v. 15; p. 923-32, 2003.