

Boletim 52

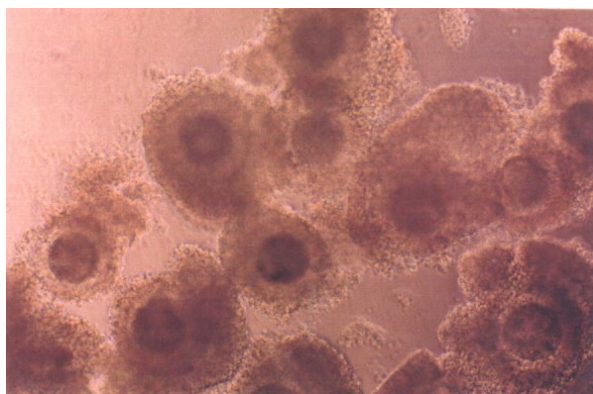
Técnico

ISSN 2318-3837

Descalvado, SP

Setembro, 2019

Produção Animal Universidade Brasil



ASPIRAÇÃO FOLICULAR OVARIANA E CLASSIFICAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS

Autores:

- ¹ Jhienny C. Petry
- ² Willian Boni
- ³ Dilma Farias
- ⁴ Jackeline Silva
- ⁵ Débora N. Alves
- ⁶ Carlos H. A. De Carli
- ⁷ Cássia M. B. Orlandi

^{1,3-6} Discentes do Programa de Mestrado Profissional em Produção Animal (PMPPA) – UNIVERSIDADE BRASIL/ Descalvado-SP.

² Médico Veterinário, Central de Reprodução Bovina EmbryoFIV, Colorado do Oeste, RO.

⁷ Docente do Programa de Mestrado Profissional em Produção Animal (PMPPA) – UNIVERSIDADE BRASIL/Descalvado-SP.

Boletim Técnico da Produção Animal
(Programa de Mestrado Profissional em Produção Animal)
Ano 2012

Universidade Brasil
Campus Descalvado
Disponibilização *on line*

Autores / Organizadores

Prof. Dr. Vando Edésio Soares
Prof. Dr. Paulo Henrique Moura Dian
Profa. Dra. Käthery Brennecke
Prof. Dr. Gabriel M.P. de Melo
Profa. Dra Liandra M.A. Bertipaglia

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Brasil,
com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

Aspiração folicular ovariana e classificação de oócitos bovinos /
Jhienny C. Petry...[et. al]. – Descalvado: Universidade Brasil,
2019.
19 f. : il. -- (Boletim Técnico da Produção Animal, Universidade
Brasil, 52).

Disponível em:
https://universidadebrasil.edu.br/portal/curso.php?id_curso=161

Inclui Bibliografia
ISSN 2318-3837

1. Complexos cumulus oócitos. 2. Ovário. 3. Vaca. I. Petry,
Jienny C. II. Boni, Willian. III. Farias, Dilma. IV. Silva, Jackeline.
V. Alves, Débora N. VI. De Carli, Carlos H. A. VII. Orlandi, Cássia
M. B. VIII. Título.

CDD 636.20824

É permitida a reprodução parcial ou total dessa obra, desde que citada a fonte.

RESUMO

Existem diversas técnicas para obtenção de complexos cumulus oóctios – CCOs, bovinos. Dentre as metodologias aplicadas aos ovários de abatedouro e realizadas in vitro temos punção por meio de bomba a vácuo ou seringa manual, ambas acopladas às agulhas, e o fatiamento com uso de bisturi oftálmico, mais conhecida como “slicing”, técnica com uso de “microblade”. Neste manual apresentaremos os passos necessários para a aspiração folicular ovariana in vivo, guiada por ultrasonografia, assim como in vitro, por meio de punção folicular manual com seringa e agulha. As condições de transporte dos ovários do abatedouro para o laboratório, asepsia e rastreamento dos CCOs serão abordadas, assim como os detalhes da classificação morfológica dos CCOs.

Palavras-chave: complexos cumulus oócitos, ovário, vaca

INTRODUÇÃO

Segundo a Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE), em 2018, foram produzidos 341.583 mil embriões in vitro no seguimento zebuínos leiteiro/corte e taurinos leiteiro/corte. Nos últimos anos, o Brasil tornou-se o país líder no mundo para o número de embriões produzidos in vitro, fato que pode ser atribuído ao elevado número de folículos e oócitos recuperados de fêmeas *Bos indicus* (BARUSSELI, 2007; EFSA, 2012).

Segundo Bueno e Beltran (2008), uma das vantagens da aspiração folicular guiada por ultrassonografia na PIVe está no fato de que não é necessário o uso de hormônios para a recuperação dos oócitos nas fêmeas bovinas. Portanto, a aspiração pode ser realizada aleatoriamente quanto ao dia do ciclo da fêmea e até mesmo em fêmeas prenhez. No entanto, protocolos de sincronização hormonal podem favorecer a aspiração de várias fêmeas doadoras em um mesmo momento do ciclo, assim como das ondas foliculares, otimizando o número de oócitos obtidos em uma mesma visita a propriedade (MEINTJES et al. 1995).

O rastreamento e a seleção de CCOs após o processo de aspiração folicular são etapas importantes na cadeia de Produção in vitro de Embriões (PIVe). Portanto, o primeiro passo, o qual consiste na aspiração folicular será abordado neste informe técnico, a fim de apresentar metodologias e equipamentos envolvidos no processo.

TÉCNICAS UTILIZADAS PARA A RECUPERAÇÃO DE CCOs EM FÊMEAS RUMINANTES

A recuperação de oócitos de fêmeas bovinas pode ser realizada via transvaginal guiada por ultrassom, técnica também conhecida como “ovum pick-up” (OPU), a qual é largamente utilizada em bovinos, embora limitada em pequenos ruminantes (BALDASSARRE & KARATZAS, 2004).

Em ovinos, a dificuldade na manipulação do trato reprodutivo via trans retal faz com que a abordagem cirúrgica, ou laparoscópica facilite o desenvolvimento das biotecnologias reprodutivas (TERVIT, 1996).

Laparoscopia

A laparoscopia se destaca por ser uma técnica menos invasiva, proporcionando recuperação mais rápida e podendo ser realizada diversas vezes na mesma fêmea. Mais recentemente esta técnica tem sido utilizada para a obtenção de oócitos *in vivo* direcionados à pesquisa fundamental e para PIVe em pequenos ruminantes (BALDASSARRE & KARATZAS, 2004; CORDEIRO, 2006).

A laparoscopia é uma técnica cirúrgica minimamente invasiva, realizada por meio de um endoscópio introduzido transabdominal, de modo a serem observados os órgãos no interior das cavidades abdominal e pélvica. Em pequenos ruminantes destaca-se o fato de proporcionar rápida recuperação, podendo ser realizada diversas vezes se necessário. Assim, a vídeo laparoscopia é aplicada em animais de produção para realização de biópsias hepáticas,

ruminoscopias, ovariectomias e aspirações foliculares (TEIXEIRA et al., 2011).

ASPIRAÇÃO FOLICULAR OVARIANA EM BOVINOS E BUBALINOS

Os oócitos utilizados na PIVE são geralmente aspirados de folículos com diâmetro entre 2 a 8 mm, pois folículos menores ainda não apresentam competência para continuar o desenvolvimento, enquanto que os maiores de 8 mm encontram-se em atresia ou já iniciaram o processo de maturação, tornando-se inviáveis para a FIV (GONÇALVES et al., 2002; HENDRIKSEN et al 2004).

- ***Aspiração folicular ovariana guiada por ultrassonografia***

De acordo com a técnica descrita por Mainardes (2010), o procedimento de aspiração folicular é realizado utilizando-se um equipamento de ultrassom com auxílio de um transdutor micro convexo, o qual é acoplado a uma guia de aspiração, com uma agulha acoplada em sua extremidade (figura 1). A pressão de vácuo é obtida com uma bomba de vácuo, ajustada entre 60 e 80 mm Hg, que levará os oócitos até um tubo de 50 mL (tubo Falcon).

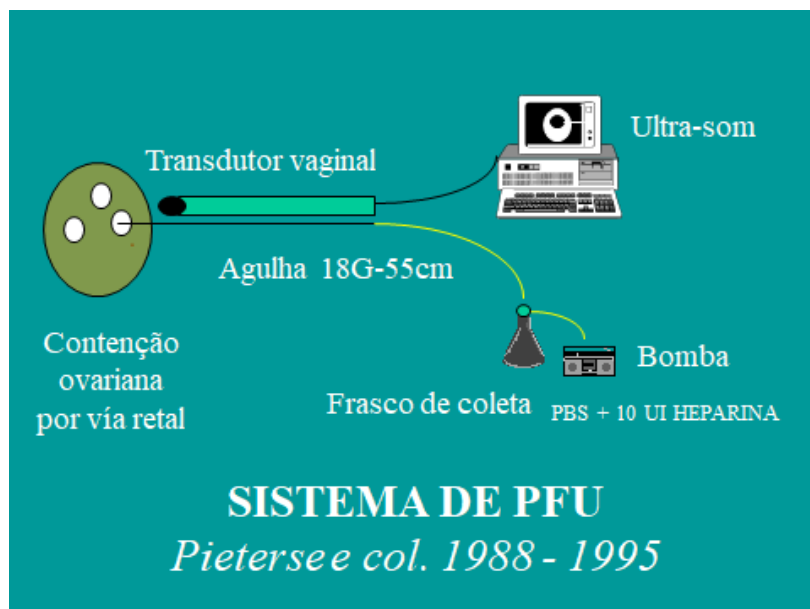


Figure 1: Representação dos equipamentos utilizados na Técnica de aspiração folicular ovariana guiada por Ultrassonografia

Previamente, as vacas doadoras devem ser colocadas no tronco de contenção (figura 2), de maneira calma e evitando ao máximo estresse. As fêmeas são submetidas à anestesia epidural e limpeza da região perineal, temas discutidos a seguir.

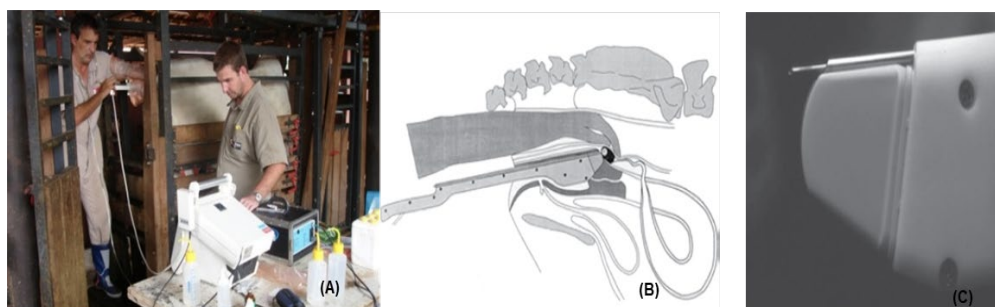


Figura 2: Procedimentos envolvidos na aspiração folicular guiada por ultrassonografia na fêmea bovina

(A) Animal no tronco de contenção, submetido à OPU; (B) Representação do posicionamento do transdutor (*probe* ultrassonográfica) inserida trans- vaginal e palpção retal, auxiliando no posicionamento do ovário a ser aspirado; (C) Agulha acoplada ao transdutor por meio de guia de aspiração.

Após a contenção adequada das fêmeas, realiza-se a palpação retal para verificação das condições dos ovários, seguindo-se então com a lavagem da região perineal. A higienização desta região deve ser realizada com água e sabão, sendo devidamente enxaguada e desinfetada com álcool 70%.

Para melhor relaxamento e bem estar da fêmea submetida à aspiração folicular ovariana, busca-se a analgesia por meio de anestesia epidural baixa utilizando-se 5 ml de Lidocaína a 2%.

A introdução da guia de aspiração acoplada com o transdutor do ultrassom deve ser realizada com auxílio de uma pessoa para que os lábios vulvares sejam abertos.

Em seguida, a guia de aspiração acoplada com o transdutor é inserida até o “fundo de saco” na região cranial da vagina e com auxílio da manipulação retal, os ovários são posicionados para obtenção de uma boa visualização na tela do ultrassom. Os folículos visualizados são aspirados, sendo o número e dimensões foliculares registrados na ficha da vaca doadora, de acordo com os resultados obtidos em cada réplica, com data e local, no qual se realizou o procedimento.

Os procedimentos e materiais citados nos itens a seguir fazem parte dos protocolos do laboratório de produção *in vitro* de embriões bovinos (Embryofiv, Colorado do Oeste, RO).

- ***Aspiração de folículos a partir de ovários de abatedouro***

Os ovários devem ser transportados em solução salina a 0,09% em recipiente térmico para a manutenção da temperatura entre 35-37°C. A punção dos folículos é feita com uma agulha acoplada em uma seringa de 20 mL colocados posteriormente em tubos cônicos. Segue no quadro abaixo o material necessário para aspiração de oócitos em ovários de abatedouro.

Tabela 1- Material para aspiração de ovários de abatedouro.

Adaptadores de tomada	Filtro	Pinça hemostática
Agulha fina e 40x12	Fita crepe	Pipetador 100 200
Alcool 70%	Lupa	Ponteira 200
Banho Maria	Placa Aquecedora	Seringa 5ml e 20 ml
Caneta p/ plástico	Placa de 60 mm	Suporte para Tubos de 50 ml
Cilindro de gás	Papel toalha	Tesoura
Extensão	Papel craft	Transportador de Oócitos

Fonte: (Embryofiv, Colorado do Oeste, RO, 2019)

- ***Procedimentos***

- ✓ Retirada do par de ovários do equipamento aquecido (transportador de ovários);
- ✓ Com auxílio de uma seringa de 20mL, aspiração dos folículos;
- ✓ Colocação do líquido aspirado em tubo falcon de 15ml.



Figura 3: A. Aspiração folicular em ovários de abatedouro, manualmente com agulha e seringa. B. Tubo Falcon com TCM 199, acoplado no sistema de guia do transdutor ultrassonográfico, preparado para recuperação do fluido folicular. Fonte: (Embryofiv, Colorado do Oeste, RO, 2019)

- **Filtragem**

- ✓ Preparação da placa de recepção do filtrado
- ✓ Com auxílio de uma agulha, traçar linhas horizontais no fundo da placa para orientação no momento da procura (rastreamento).
- ✓ Encher a seringa de 20 ml com o PBS.



Figura 4: A. Lavagem do filtro com seringa contendo fluido obtido na aspiração. B. Abertura do filtro para saída do fluido excedente para evitar que o fluido transborde dentro do filtro. Fonte: (Embryofiv, Colorado do Oeste, RO, 2019).

Lavagem do filtro por meio de derrame do volume de fluido obtido na aspiração (procedimento realizado suavemente em direção à parede do filtro). Detalhes a serem seguidos:

- ✓ Tombar o filtro em 45 graus e com a seringa remover detritos do fundo suavemente.
- ✓ Lavar com a seringa as bordas do fundo do filtro.
- ✓ Abrir o filtro e deixar apenas uma linha de líquido. (Não deixar secar o fundo do filtro).
- ✓ Com a seringa, lavar com 10 a 20 ml de PBS as paredes do tubo de coleta.
- ✓ Repetir procedimento até que o líquido do filtro esteja transparente.
- ✓ Abrir o filtro ainda com inclinação e deixar volume com 1 cm abaixo do círculo central do filtro.
- ✓ Mantendo o filtro inclinado, verter o volume de coleta dentro da placa de procura sempre com auxílio da seringa removendo detritos e lavando as bordas.



Figura 5: Lavagem do filtro e colocação do fluido obtido em uma placa previamente riscada para o rastreamento de CCOs.

Fonte: (Embryofiv, Colorado do Oeste, RO, 2019).

Finalmente, entende-se que o operador é responsável pela qualidade e quantidade de oócitos resultantes da filtragem, a quantidade de oócitos viáveis, assim como pela assepsia, ambos resultantes de um trabalho ágil e seguro.

RASTREAMENTO E SELEÇÃO DE COMPLEXO CUMULUS OÓCITOS

Assepsia

Para realização desta etapa, ao chegar ao local de trabalho, após a aspiração, as condições mínimas de assepsia devem ser consideradas na limpeza de paredes, forro e bancadas. É necessário evitar ao máximo levar contaminação para o laboratório de FIV, com o material rastreado. Para tanto, medidas envolvendo assepsia, muitas vezes a campo em locais improvisados para esta etapa, serão citadas a seguir:

- Passe álcool 70 nas superfícies onde repousará o seu material bem como nas superfícies da área de trabalho. De preferência cubra a área de trabalho com um pano limpo;
- Lave as mãos com sabão neutro e passe álcool 70 antes de iniciar qualquer procedimento;
- Feche constantemente as caixas de ponteiras bem como os pacotes de tubo e placas;
- Evite idas constantes ao curral bem como a entrada de pessoas com roupas sujas dentro da sala de procura;
- Mantenha a porta do local sempre fechada, evite correntes de

ar e muito cuidado com o fluxo do ar-condicionado diretamente sobre seu local de trabalho;

- Quando tocar a ponteira ou uma agulha com a mão, ou o fundo de uma placa, ao tocar o bico da bolsa de PBS ou mesmo entrar água na bolsa, jamais tente economizar;

- Descarte o material que você tenha a menor dúvida de que ocorreu qualquer tipo de contaminação;

- Trabalhe sempre com material estéril, desde os tubos, ponteiras, filtros, placas, seringas, agulhas e demais materiais;

- Observe se o PBS, meio de lavagem e meio dos criotubos, os quais serão utilizados, estão dentro da data de validade, e se não há nenhum sinal de contaminação como formação de grumos, escurecimento ou amarelamento do líquido;

- Mantenha uma boa impressão com o cliente. Jogue sempre todo o material descartável em um lixo durante todo o procedimento. Ao terminar, deixe a sala limpa, como você gostaria de reencontrá-la em um próximo trabalho.

CONSIDERAÇÕES QUANTO AO CONTROLE E MANUTENÇÃO DA TEMPERATURA

Certifique-se sempre se os materiais fixos de manutenção de temperatura estão funcionando corretamente. Mantenha todos os insumos em controle de temperatura: tubos, PBS, placas, meio de lavagem, criotubos e demais.

Jamais inicie um procedimento de procura e seleção sem antes esperar que os meios, tanto PBS, meio de lavagem e criotubos estejam já equilibrados na temperatura.

Trabalhe com Banho Maria e placa aquecedora sempre em 37°C, estando o transportador de oócitos entre 38 e 38,5 °C.

Caso o tubo com material de coleta esteja chegando frio, avise imediatamente o Puncionador. Em dias frios e na época de inverno, redobre a atenção.

Luz

Caso a sala de trabalho tenha incidência de luz solar forte, cubra as janelas. Em outro caso, evite montar a estação de trabalho perto de janelas que tenham incidência de luz solar direta. Certifique-se que o tubo de coleta está chegando a você desde o curral, protegido da incidência direta da luz solar.

Conforto

Ajuste a cadeira e a mesa para que você tenha conforto físico em relação à altura da lupa. Lembre-se que um trabalho de procura e seleção demora horas.

O posicionamento do material de trabalho, bem como tubos, Banho Maria, ponteiras e demais materiais devem estar distribuídos de maneira que você possa evoluir na rotina de procedimentos.

Evite Perder tempo com a procura de materiais mal localizados, o que refletirá no período total de tempo durante os procedimentos.

Rastreamento e Seleção

- ✓ Fazer gota de 100 microlitros de meio de lavagem em uma placa limpa.
- ✓ Iniciar a procura dos oócitos.



Figura 6: Pipeta e ponteira visualizadas na superfície da placa com fluido para rastreamento sob a placa aquecida. Fonte: (Embryofiv, Colorado do Oeste, RO, 2019)

- ✓ Passar somente os oócitos viáveis para segundo banho de meio de lavagem de maneira a passá-los todos de uma só vez.

CLASSIFICAÇÃO DOS COMPLEXOS CUMULUS OÓCITOS

Os complexos cumulus oócitos (CCOs) são classificados em função do número de camadas e o grau de compactação e transparência das células do cumulus, assim como pela homogeneidade e transparência do ooplasma. Considera-se viáveis aqueles CCOs classificados de I a III, descartando-se os de grau IV. Grau I (Excelente), Grau II (Bom), Grau III (Parcialmente Desnudo), Grau IV (Desnudos) e Grau V (Atrésico). A classificação descrita

inicialmente por Leibfried & First (1979), sofreu modificações e está ilustrada na tabela 2.

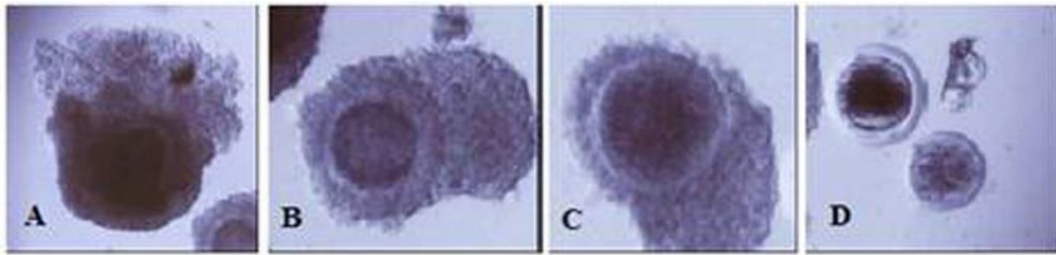


Figura 7: Classificação morfológica dos complexos cumulus oócitos. (A) oócitos de grau I, (B) grau II, (C) grau III e (D) oócitos superior grau IV e inferior grau V.

Nas tabelas 2 e 3 encontram-se descritas as características dos CCOs de acordo com a classificação morfológica clássica proposta na literatura.

Tabela 2 - Classificação morfológica dos complexos cumulus oócitos bovinos. **Fonte:** Modificado de Leibfried & First 1979

Oócitos	Descrição
GRAU 1	Cumulus compacto presente, contendo mais de três camadas de células, ooplasma com granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração marrom;
GRAU 2	Cumulus compacto parcialmente presente em volta do oócito ou rodeando completamente o oócito, com menos de três camadas celulares, ooplasma com granulações distribuídas heterogeneamente, podendo estar mais concentradas no centro e mais claras na periferia ou condensadas em um só local aparentando uma mancha escura, preenchendo o espaço do interior da zona pelúcida;
GRAU 3	Espaço entre a membrana celular e a zona pelúcida, preenchendo irregularmente o espaço perivitelino, degenerado, vacuolizado ou fragmentado;
GRAU 4	Oócito desnudo ou sem cumulus.

Outras classificações quanto à morfologia e qualidade dos oócitos foram descritas e encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3 - Classificação da qualidade de oócitos bovinos de acordo com as camadas de células do cumulus.

Oócitos	Descrição
Grau I:	Revestimento com multicamadas de cumulus compacto, ooplasma homogêneo e complexo cumulus-oócito claro e transparente;
Grau II	Revestimento com 3 a 5 camadas de cumulus compacto, ooplasma homogêneo ou com regiões escuras na periferia;
Grau III	Pouco revestimento de células do cumulus (1 a 3 camadas) e ooplasma irregular com picnose
Grau IV	Ou atrésico: cumulus expandido com células escuras e em grumos, e complexo cumulus-oocitário escuro e irregular
Desnudo	Sem camadas do cumulus e com ooplasma uniforme ou com granulações

Fonte: Modificado de Tetzner (2007).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BALDASSARRE H KARATZAS CN. Advanced assisted reproduction technologies (ATR) in goats. *Animal Reproduction Science*. DOI: 10.1016/j.anireprosci.2004.04.027;

BARUSELLI P, GIMENES L, SALES JS. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. *Rev Bras Reprod Anim*. 31: 205 -11, 2007.

BUENO AP, BELTRAN MP. Produção in vitro de embriões bovinos. *Rev Elet Med Vet*, n.11, p.1-7, 2008.

CORDEIRO MF. 2006. Avaliação da laparoscopia na aspiração folicular em fêmeas caprinas pré-púberes e adultas com ou sem estimulação ovariana hormonal. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

EUROPEAN Food Safety Authority (EFSA). Scientific opinion. Statement on the use of animal-based parameters to assess the welfare of animals. *EFSA Journal* 2012;10:2767.

GONÇALVES, B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. Biotécnicas aplicadas à Reprodução Animal. São Paulo: Varela, 2002. p. 195-226.

HENDRIKSEN PJM, Steenweng WNM, Harkema JC, Merton JS, Bevers MM, Vos PLAM, Dieleman SJ. Effect of different stages of follicular wave on in vitro developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology*, v.61, p.909-920, 2004.

LEIBFRIED, L.; FIRST, N. L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. *Journal of Animal Science*, v. 48, p. 76-86, 1979.

MEINTJES M, BELLOW MS, BROUSSARD JR, et al. 1995. Transvaginal aspiration of oocytes from hormone-treated pregnant beef for in vitro fertilization. *Journal of Animal Science*. 73:967-974.

PENITENTE FILHO JM, OLIVEIRA FA, TORRES CAA. Produção de embriões bovinos in vivo e in vitro. IN: *Annais da 83a Semana do Fazendeiro*, Universidade Federal de Viçosa; 19p; 2012.

TEIXEIRA PPM, PADILLHA LC, OLIVEIRA MEF, et al. Laparoscopic ovum collection in sheep: Gross and microscopic evaluation of the ovary and influence on oocyte production. *Animal Reproduction Science*. 127:169– 175, 2011.

TERVIT HR. Laparoscopy/laparotomy oocyte recovery and juvenile breeding. *Animal Reproduction Science*. 42: 227-238,1996.

TETZNER, T. A. D. Efeitos da substituição do soro fetal bovino (SFB) e da albumina sérica (BSA) pela ovalbumina (OVA) na produção in vitro de embriões bovinos. 2007. 92f. Dissertação (mestrado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista.