

RECUPERAÇÃO DE OÓCITOS EQUÍNOS COM *Cumulus oophorus* COMPACTO POR CURETAGEM DA PAREDE FOLICULAR

BRUNA DA ROSA CURCIO,¹ FRIEDRICH FREY JR.,² ANDRÉ LUIS NUNES BOFF,³ PRISCILA MARQUES MOURA DE LEON,² LUCIANA ARAÚJO LINS,³ LUÍS PEDRO ALBUQUERQUE,³ GISSELE RAMBO,² CARLOS EDUARDO WAYNE NOGUEIRA⁴ E JOÃO CARLOS DESCHAMPS⁵

-
1. Doutoranda em Biotecnologia Agrícola, Universidade Federal de Pelotas (UFPeL);
 2. Mestrandos do Programa de Pós-Graduação em Veterinária, UFPeL;
 3. Alunos de Graduação Medicina Veterinária, UFPeL;
 4. Professor do Departamento de Clínicas Veterinárias, Faculdade de Veterinária, UFPeL;
 5. Professor do Departamento de Patologia Animal, Faculdade de Veterinária, UFPeL e Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas, UFPeL, Campus Universitário, CEP 96010-900, Pelotas, RS. E-mail:deschamp@ufpel.edu.br.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo determinar a eficiência da técnica de curetagem da parede folicular (*scraping*) para a obtenção de complexos *Cumulus oophorus* compactos, bem como descrever as etapas do processo. Submeteram-se ovários equínos coletados em abatedouro à dissecação da túnica albugínea, para identificação e individualização dos folículos com diâmetro entre 10 e 30 mm. Esses foram abertos individualmente em placa de *Petri* e, posteriormente, realizou-se raspagem da camada granulosa com auxílio de cureta e exame do líquido folicular em lupa estéreo-microscópica. Classificaram-se os oócitos quanto à integridade do ooplasma e as características das

células do *Cumulus oophorus*. De um total de 527 ovários dissecados, obtiveram-se 3,5 folículos/ovário e uma média de 2,5 oócitos/ovário, compreendendo uma taxa de recuperação de 71,0% (oócitos/folículos), sendo 70,2% classificados como *Cumulus oophorus* compactos e ooplasma homogêneo. A média de oócitos *Cumulus oophorus* compactos por ovário foi de 1,7. A utilização da curetagem da camada granulosa de folículos entre 10 e 30 mm de diâmetro comprovou ser satisfatória para a obtenção de um elevado percentual de oócitos equínos com *Cumulus oophorus* compacto, o que é adequados para estudos de maturação *in vitro*.

PALAVRAS-CHAVE: Curetagem da parede folicular, maturação *in vitro*, oócitos equínos, *scraping*.

ABSTRACT

THE RECOVERY RATES OF EQUINE OOCYTES COMPACT *Cumulus oophorus* BY SCRAPING THE FOLLICLE WALL

The objective of this study was to describe the steps of the method to recover equine oocytes by scraping the follicle wall and to determine recovery rates of compact *Cumulus-oocytes* by scraping. Equine ovaries were obtained at a slaughterhouse. After removal of the albuginea tunica, follicles having 10 to 30 mm in diameter were dissected without the ovarian stroma. The follicles were opened individually in *Petri* dishes, and the granulose cell

layer was scraped with a bone currett. *Cumulus-oocytes* complexes were identified using a dissection microscope and classified according to the *Cumulus oophorus* morphology and ooplasm appearance. From a total of 527 dissected ovaries, were obtained 3.5 follicles dissected/ovary and 2.5 oocytes/ovary. The recovery rate was 71.0% (oocytes/follicles), whereas 70.2% of these were classified as having compact *Cumulus-oocytes* and homogenous

ooplasma. The average of compact *Cumulus*-oocytes per ovary was 1.75. The scraping of the granulose layer of follicle having 10 to 30 mm in diameter allows the recovery of equine

oocytes with compact Cumulus, which are considered adequate for *in vitro* maturation studies.

KEY WORDS: Equine oocytes, scraping of follicle wall, *in vitro* maturation.

INTRODUÇÃO

A maturação e a fertilização *in vitro* (MIV e FIV) são biotécnicas usuais na espécie humana e em diversas espécies domésticas, no entanto com pouco sucesso na espécie equina (CARNEIRO, 2002). O escasso número de abatedouros equinos próximo aos laboratórios que realizam pesquisas na área dificulta o desenvolvimento de técnicas eficientes de obtenção e maturação oocitária, fertilização e cultivo embrionário *in vitro* (SQUIRES et al., 2003).

O índice de recuperação de oócitos na espécie equina é inferior quando relacionado a outras espécies de produção (SHABPAREH et al., 1993). Nessa espécie, os complexos *Cumulus oophorus* (CCOs) estão aderidos de forma mais intensa à parede dos folículos, o que influencia diretamente nos índices de recuperação oocitária equina *in vivo* e *in vitro* (HAWLEY et al., 1995; BRÜCK et al., 1999).

As várias técnicas para obtenção de oócitos possuem impacto considerável sobre a quantidade e a morfologia dos CCOs recuperados e, conseqüentemente, sobre a competência no desenvolvimento oocitário (Bols et al., 1997). Os métodos de coleta utilizados para obtenção de oócitos equinos são: aspiração folicular, fatiamento do ovário (*slicing*) e curetagem da parede folicular (*scraping*). A média de recuperação de oócitos por aspiração do fluido folicular é de 0,8 a 1,75 oócitos/ovário (CHOI et al., 1993; PEREIRA, 1997). A utilização de *slicing*, após a aspiração dos folículos presentes na superfície do ovário, aumenta a taxa de recuperação para 5,98 oócitos/ovário (CHOI et al., 1993). Entretanto, mediante a técnica de *slicing*, não se pode determinar o tamanho dos folículos presentes, além da possibilidade de contaminação dos oócitos. O *scraping* da parede folicular é uma técnica que permite índices de recuperação entre 2,15 e 4,1 oócitos/ovário (HINRICHS et al., 1993; DEL CAMPO et al., 1995; DELL'AQUILA et al., 2001; CHOI et

al., 2002), com raras ocorrências de lesões nos CCOs (CHOI et al., 1993). Os trabalhos que utilizam o *scraping* da parede folicular, em geral, apenas citam os índices de recuperação alcançados, porém não descrevem as etapas que devem ser desenvolvidas para a coleta de oócitos viáveis.

Segundo FERNANDES (2004), a partir das características morfológicas, oócitos com maior potencial devem apresentar: ooplasma homogêneo de coloração marrom com granulações finas e estarem completamente envolvidos por uma camada de células do *Cumulus* dispostas de forma compacta. *In vivo*, oócitos *Cumulus oophorus* compacto equinos são circundados por células da granulosa cubóides altamente compactadas, aderidos de forma mais intensa à parede folicular e encontrados, geralmente, em folículos terciários (não-atréticos) (HAWLEY et al., 1995; BRÜCK et al., 1999).

Em equinos, a coleta de oócitos com *Cumulus* expandido está relacionada à atresia e apoptose das células da granulosa, presença de cromatina compacta e maiores índices de maturação em sistemas de MIV (HINRICHS & WILLIAMS, 1997; DELL'AQUILA et al., 2003). Segundo DELL'AQUILA et al. (2003), oócitos equinos com *Cumulus* expandido possuem maiores índices de maturação, porém menores índices de ativação após injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) em relação A oócitos *Cumulus oophorus* compacto.

Este trabalho teve como objetivo descrever as etapas para obtenção de oócitos equinos pelo método de *scraping* e determinar as taxas de recuperação de CCOs compactos.

MATERIAL E MÉTODOS

Durante o período de setembro a novembro de 2003 realizou-se treinamento de técnicos envolvidos com o acompanhamento de profissionais já ex-

perientes no processo de dissecação e raspagem da parede folicular. No período de novembro de 2003 a janeiro de 2004, coletaram-se ovários eqüinos em matodouro, localizado a 30 km do laboratório (Pelotas, RS - Paralelo 32° S). O transporte dos ovários foi realizado em solução salina à temperatura de 25-30 °C, contendo 40 mg/L de sulfato de gentamicina. No laboratório realizou-se a dissecação dos ovários para retirada da cápsula albugínea e individualização dos folículos (Figura 1). Utilizaram-se folículos com diâmetro entre 10 e 30 mm (Figura 1), os quais foram transferidos para solução salina adicionada de sulfato de gentamicina (40 mg/L) e mantidos à temperatura de 25 a 30 °C. Os folículos foram abertos individualmente em placa de *Petri* e submetidos à raspagem da camada granulosa com auxílio de cureta (Figura 2). Examinou-se o conteúdo folicular



FIGURA 1. Ovário eqüino (A); após dissecação da túnica albugínea e estroma ovariano (B); individualização e medição dos folículos (C).



FIGURA 2. Abertura individual dos folículos em placa de Petri

em lupa estéreo-microscópica para identificação e classificação dos CCOs, os quais foram classificados quanto à integridade do ooplasma e características das células do *Cumulus oophorus* em: *Cumulus oophorus* compacto (Figura 3), expandidos (Figura 4), oócitos desnudos (Figura 5) e degenerados.

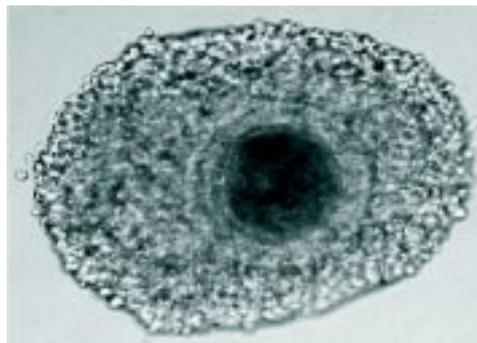


FIGURA 3. Oócito eqüino *Cumulus oophorus* compacto imediatamente após a coleta por *scraping* da camada granulosa (aumento 400 X).

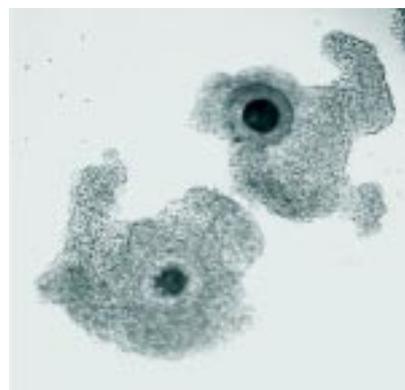


FIGURA 4. Oócitos eqüinos após coleta, apresentando *Cumulus oophorus* expandido (aumento 200 X).

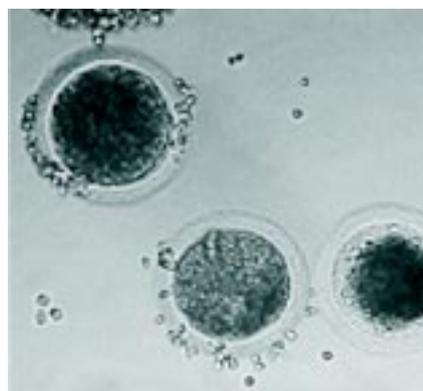


FIGURA 5. Oócitos eqüinos desnudos no momento da coleta (aumento 400 X).

Submeteram-se os dados à análise estatística descritiva, sendo avaliados os índices de folículos e oócitos por ovário, média de *Cumulus oophorus* compacto por ovário e a taxa de recuperação oocitária (oócitos/folículos).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Utilizaram-se 527 ovários, distribuídos em dezessete coletas. A média de folículos dissecados, entre 10 e 30 mm, foi de 3,5 folículos/ovário.

Mediante a técnica de *scraping*, obteve-se uma média de 2,5 oócitos coletados por ovário, o que o que se assemelha aos índices publicados, entre 2,1 e 4,1 (HINRICHS et al., 1993; DEL CAMPO et al., 1995; DELL'AQUILA et al., 2001; CHOI et al., 2002). A taxa de recuperação obtida foi de 71,0%, destes 70,2%, os quais foram classificados como *Cumulus oophorus* compacto e ooplasma homogêneo. A média de oócitos *Cumulus oophorus* compacto por ovário foi de 1,7.

É importante enfatizar que no presente trabalho foram selecionados somente folículos entre 10 e 30 mm de diâmetro, critério esse utilizado por DELL'AQUILA et al. (2001), os quais recuperaram 2,15 oócitos/ovário. Vale ressaltar que folículos entre 10 e 30 mm de diâmetro contêm oócitos imaturos, predominando os estádios de vesícula germinativa (VG) e quebra da vesícula germinativa (QVG) (DEL CAMPO et al., 1995). Oócitos em VG e QVG estão aptos a retomarem a meiose e, portanto, ideais para MIV (HINRICHS et al., 1993).

A taxa de recuperação oocitária demonstra ser a melhor forma de avaliar a eficiência da técnica de *scraping*, por relacionar o número de oócitos recuperados ao número de folículos presentes. A quantidade de folículos por ovário, na espécie equina, varia de acordo com a fase do ciclo estral, estacionalidade reprodutiva e o estado nutricional das éguas (BRÜCK et al., 1996); oscilando entre 2 e 7 folículos/ovário (HINRICHS et al., 1993; DEL CAMPO et al., 1995; DELL'AQUILA et al., 2001; CHOI et al., 2002). A taxa de recuperação oocitária alcançada (71%) assemelha-se aos índices citados de 48,0 a 83,0% (HINRICHS et al., 1993; DEL CAMPO et al., 1995; DELL'AQUILA et al., 2001;

CHOI et al., 2002). Outro fator importante a ser considerado é que o treinamento dos técnicos que realizaram a coleta dos oócitos, provavelmente, tenha contribuído para a alta taxa de recuperação oocitária obtida.

As principal vantagem na utilização do *scraping* é a alta taxa de recuperação oocitária, associada à obtenção de CCOs intactos, o que facilita a classificação dos oócitos (HINRICHS et al., 1993; ALM et al., 1997). A desvantagem de sua utilização é ser uma técnica laboriosa, portanto, demanda grandes períodos de tempo (SHABPAREH et al., 1993).

A união dos oócitos *Cumulus oophorus* compacto à parede folicular ocorre de forma mais intensa, o que dificulta a coleta por aspiração (DELL'AQUILA et al., 2001), mas pela técnica de *scraping* esses oócitos são coletados com maior eficiência e com *Cumulus* intacto.

Diante das diferenças nos índices de maturação e viabilidade na fertilização e desenvolvimento embrionário inicial, é evidente a importância da classificação dos oócitos equinos, de acordo com a morfologia do *Cumulus*, para avaliação dos desempenhos de MIV e FIV em diferentes pesquisas. Segundo DELL'AQUILA et al. (2001), a utilização do *scraping*, mesmo sendo laboriosa, mantém maior quantidade de células ao redor do oócito, permitindo uma definição mais precisa da classificação dos CCOs.

CONCLUSÕES

Com base nos dados obtidos, pode-se afirmar que o método de *scraping* da parede de folículos, entre 10 e 30 mm de diâmetro, mostrou-se eficiente para a obtenção de oócitos equinos com *Cumulus oophorus* compacto, os quais são ideais para estudos sobre MIV em equinos.

REFERÊNCIAS

ALM, H.; TORNER, H.; KANIZ, W.; BECKER, F.; HINRICHS, K. Comparison of different methods for recovery of horse oocytes. **Equine Veterinary Journal Supplement**, v. 25, p. 47-50, 1997.

- BOLS, P. E. J.; YSEBAERT, M. T.; VAN SOOM, A.; KRUIF, A. Effects of needle tip bevel an aspiration procedure on the morphology and developmental capacity bovine compact Cumulus oocyte complexes. **Theriogenology**, v. 47, p. 1221-1236, 1997.
- BRÜCK, I.; GRONDAHL, C.; HOST, T.; GREVE, T. *In vitro* maturation of equine oocytes: effect of follicular size, cyclic stage and season. **Theriogenology**, v. 46, p. 75-84, 1996.
- BRÜCK, I.; GREVE, T.; HYTTEL, P. Morphology of the oocyte-follicular connection in the mare. **Anatomy Embryology**, v. 199, p. 21-28, 1999.
- CARNEIRO, G. F. Maturação *in vitro* de oócitos eqüinos. **Ciência e Tecnologia Veterinária**, v. 2, p. 5-10, 2002.
- CHOI, Y. H.; HOCHI, S.; BRAUN, J.; SATO, K.; OGURI, N. *In vitro* maturation of equine oocytes collected by follicle aspiration and the slincing of ovaries. **Theriogenology**, v. 40, p. 959-966, 1993.
- CHOI, Y. H.; LOVE, C. C.; LOVE, L. B.; VARNER, D. D.; BRINSKO, S.; HINRICH, K. Developmental competence *in vivo* and *in vitro* matured equine oocytes fertilized by intracytoplasmic sperm injection with fresh or frozen-thawed spermatozoa. **Reproduction**, v. 123, p. 455-465, 2002.
- DEL CAMPO, M. R.; DONOSO, X.; PARRISH, J. J.; GINTHER, O. J. Selection of follicles, preculture oocytes evaluation, and duration of culture for *in vitro* maturation of equine oocytes. **Theriogenology**, v. 43, p. 1141-1153, 1995.
- DELL'AQUILA, M. E.; MASTERSON, M.; MARITATO, F.; HINRICH, K. Influence of oocyte collection technique on initial chromatin configuration, meiotic competence, and male pronucleus formation after ICSI of equine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 60, p. 79-88, 2001.
- DELL'AQUILA, M. E.; ALBRIZIO, M.; MARITATO, F.; MINOIA, P.; HINRICH, K. Meiotic competence of equine oocytes and pronucleus formation after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) as related to granulose cell apoptosis. **Biology and Reproduction**, v. 68, p. 2065-2072, 2003.
- FERNANDES, C. B. **Maturação *in vitro* de ovócitos eqüinos: comparação entre meios TCM 199, SOFaa e HTF:BME, e avaliação da adição de FSH bovino, FSH eqüino e do hormônio do crescimento eqüino por meio da transferência de ovócito.** 2004. 129 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual de São Paulo, Faculdade de Veterinária, Botucatu, 2004.
- HAWLEY, L. R.; ENDRES, A. C.; HINRICH, K. Comparison of equine and bovine oocyte-Cumulus morphology within the ovarian follicle. **Biology and Reproduction Monogr.**, v. 1, p. 243-252, 1995.
- HINRICH, K.; SCHIMIDT, A. L.; FRIEDMAN, P. P.; SELGRATH, J. P.; MARTIN, M. G. *In vitro* maturation of horse oocytes: characterization of chromatin configuration using fluorescence microscopy. **Biology and Reproduction**, v. 48, p. 363-370, 1993.
- HINRICH, K.; WILLIAMS, K. A. Relationships among oocyte-Cumulus morphology, follicular atresia, initial chromatin configuration, and oocyte meiotic competence in the horse. **Biology and Reproduction**, v. 57, p. 377-384, 1997.
- PEREIRA, J. M. L. B. **Maturação *in vitro* de ovócitos eqüinos: influência do tempo, LH e FSH.** 1997. 89 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, Faculdade de Veterinária, Santa Maria, 1997.
- SHABPAREH, V.; SQUIRE, E. L.; SEIDEL, G. E. JR.; JASKO, D. J. Methods for collecting and maturing equine oocytes *in vitro*. **Theriogenology**, v. 40, p. 1161-1175, 1993.

SQUIRES, E. L.,;CARNEVALE, E. M., McCUE, P. M.; BRUEMMER, J. E. Embryo technologies in the horse. **Theriogenology**, v. 59, p. 151-170, 2003.

Protocolado em: 5 maio 2006. Aceito em: 4 ago. 2006.