

Tipos morfológicos de ovócitos bovinos

(Morphological types of bovine oocytes)

E.P. Costa¹, V.R. Vale Filho², J.C. Nogueira³, W.F. Sá⁴, A.H.A. Costa⁵

¹Departamento de Veterinária - Universidade Federal de Viçosa
Av. P. H. Rolfs, s/n
36571-000 - Viçosa, MG

²Escola de Veterinária - UFMG

³Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

⁴EMBRAPA - CNPGL - Juiz de Fora, MG

⁵Médica Veterinária

RESUMO

Foram utilizados ovários de vacas abatidas em matadouro para estudar o tipo de envoltório celular em 14.583 ovócitos. Após aspiração dos folículos, os complexos "cumulus-ovócitos" foram lavados e classificados da seguinte maneira: 1- *corona radiata* intacta e mais de três camadas compactas de células do *cumulus oophorus*; 2- uma a três camadas de células envolvendo o ovócito; 3- parcialmente recoberto por células da *corona radiata* e do *cumulus oophorus*; 4- células do *cumulus oophorus* apresentando expansão; 5- desnudo; 6- ovócitos apresentando características que não configuram em nenhuma classificação anteriormente citada. As frequências encontradas foram 69,3; 7,8; 6,7; 11,1; 4,7 e 0,3%, para as categorias 1, 2, 3, 4, 5 e 6 respectivamente. Ficou caracterizada a importância de estudos de maturação e fecundação *in vitro*, com ovócitos apresentando o *cumulus* compacto, devido à sua elevada incidência em ovários de vacas.

Palavras-Chave: Ovócito, bovino

ABSTRACT

Bovine oocytes collected from ovaries obtained at a slaughter-house were used to study the frequency of morphological types. After follicular aspiration, the oocytes were

Recebido para publicação em 23 de setembro de 1996.

classified into six distinct categories, according to their cellular investment, as follows: 1- intact *corona radiata* and more than three layers of *cumulus oophorus* cells; 2- *corona radiata* and one to three layers of *cumulus oophorus* cells; 3- incomplete *corona radiata* and *cumulus oophorus* cell layers; 4- *cumulus oophorus* cells showing expansion; 5- nude oocytes; 6- features that did not fit in none of the categories above. The analysis of 14,583 oocytes showed frequencies of 69.3, 7.8, 6.7, 11.1, 4.7 and 0.3%, for categories 1, 2, 3, 4, 5 and 6, respectively.

Keywords: Oocyte, bovine

INTRODUÇÃO

Com o objetivo de estabelecer critérios de avaliação morfológica utilizáveis na seleção de ovócitos, vários pesquisadores têm classificado os ovócitos quanto às células que o circundam (King et al., 1986; Shioya et al., 1988; Berg & Brem, 1989), quanto ao espaço perivitelino (Greve et al., 1984) e quanto ao aspecto do citoplasma (Leibfried & First, 1979), visando estudar a relação entre qualidade do ovócito, sua frequência e seu potencial de desenvolvimento. Os resultados de várias pesquisas têm indicado que o ovócito necessita de algum tipo de envoltório celular para que tenha capacidade de maturar e desenvolver adequadamente após a fecundação *in vitro* (Leibfried & First, 1979; King et al., 1986; Shioya et al., 1988).

Assim, a frequência de diferentes tipos morfológicos de ovócitos tem sido estudada, após a aspiração folicular em ovários de vacas abatidas em matadouros. King et al. (1986) utilizando-se dos critérios de classificação determinados por Leibfried & First (1979), classificaram, quanto ao envoltório, 151 ovócitos obtidos de 92 vacas, encontrando 42, 27, 31, 35, 13 e 3 para os tipos com *cumulus (cumulus oophorus)* compacto, com até três camadas de células, parcialmente recoberto por células, desnudos, com *cumulus* expandido e dissociado, respectivamente. Analisando 165 ovócitos e classificando-os quanto ao citoplasma, encontraram 67, 67, 25 e 6 para os tipos com: finas granulações, granuloso, vacuolizados e degenerados, respectivamente. Süss et al. (1988) encontraram média de 22,6 ovócitos para cada par de ovário (n=150), dos quais 46,9% apresentavam o *cumulus* compacto (10,6 por ovário). Berg & Brem (1989) verificaram média de 15 ovócitos por animal (7,5 por ovário), 63% deles com *cumulus* compacto. Maiores variações foram verificadas por Stringfellow et al. (1993), média de 43,9 ovócitos por vaca, com variação de sete a 129.

Pesquisas têm sido realizadas para verificar a influência do estágio do ciclo estral e da superovulação na incidência dos diferentes tipos de ovócitos. Assim, King et al. (1986), coletando ovócitos da tuba uterina após a superovulação de 12 vacas Holstein canadenses superovuladas, obtiveram 32 (80%) desnudos, quatro (10%) com camadas incompletas de células, dois (5%) com até três camadas de células do *cumulus* e dois (5%) com *cumulus* expandido. Entretanto, após a aspiração de folículos, verificaram que sete (39%) tinham o *cumulus* expandido. Quanto ao citoplasma, encontraram 10 (55,5%) e 37 (92,5%) com granulação homogênea, cinco (27,7%) e três (7,5%) granulados e três (16,6%) e zero vacuolizados e degenerados, para os ovócitos oriundos dos folículos e da tuba uterina, respectivamente. Também Sirard & Lambert (1985), trabalhando com 27 novilhas e duas vacas superovuladas, classificaram 454 ovócitos recuperados após 110 laparoscopias em três grupos: 1 (ovócitos com *cumulus* compacto - 22,3%), 2 (ovócitos desnudos - 9,3%) e 3 (ovócitos com *cumulus* expandido - 68,4%). Süß et al. (1988) não observaram correlação entre o número de ovócitos compactos com a idade do animal, com o estágio do ciclo estral e com o número de folículos visíveis no ovário. Entretanto, Moreno et al. (1993) sugeriram que vacas gestantes poderiam fornecer maior número de ovócitos de melhor qualidade.

Na execução de experimentos relacionados com maturação e fecundação *in vitro* (MIV e FIV) é indispensável determinar uma padronização na seleção de ovócitos. Neste contexto, é de particular importância um estudo conclusivo sobre a frequência dos tipos morfológicos de ovócitos, para evitar a utilização, em delineamentos experimentais, de tipos poucos frequentes. Apesar dos vários estudos realizados com os diferentes tipos morfológicos de ovócitos, pouca importância tem sido dada a este aspecto. Assim, objetiva-se, neste trabalho, verificar a incidência dos diferentes tipos de ovócitos após a aspiração de folículos em ovários de vacas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 3.112 ovários de vacas abatidas em matadouro. Imediatamente após o abate e a evisceração, os ovários foram removidos e imersos em solução fisiológica a 35-37°C, acrescida de penicilina e estreptomicina (Sirard & Bilodeau, 1990). Posteriormente, foram levados ao laboratório e lavados três vezes em solução fisiológica.

A aspiração dos ovócitos foi realizada com agulhas 25 x 7, adaptadas em seringas de 5ml. Após a punção dos folículos terciários, com diâmetro mínimo de 1,5ml, o líquido era aspirado e depositado em cálice cônico mantido a 38 - 39°C que continha 40ml de meio Talp-Hepes (Bavister et al., 1983). Após decantação por cinco minutos, o sobrenadante foi sifonado lentamente para uma placa de Petri. O sedimento foi ressuspenso com meio de Talp-Hepes e transferido para placa de Petri mantida em placa aquecedora, na temperatura de 3°C. O sobrenadante desprezado foi observado com o auxílio de um microscópio estereoscópio, para verificar a presença eventual de ovócitos.

Os complexos "*cumulus* - ovócitos" foram lavados em meio de Talp-Hepes, com o auxílio de um microscópio estereoscópio. Em seguida os ovócitos foram classificados em categorias quanto ao tipo de envoltório celular, da seguinte maneira: 1- Os que apresentavam *cumulus* compacto (ovócitos sem alterações microscópicas visíveis, que mostravam *corona radiata* intacta e mais de três camadas completas de células do *cumulus oophorus*. As células do *cumulus* apresentavam forma compacta, sem nenhum aspecto aparente de expansão e mucificação). 2- Os que tinham até três camadas de células (ovócitos com até três camadas de células do *cumulus* envolvendo totalmente a zona pelúcida). 3- Os que eram parcialmente recobertos por células (ovócitos com áreas da zona pelúcida totalmente desprovidas de células). 4- Os que mostravam *cumulus* expandido (ovócitos com expansão das células do *cumulus*, estando estas células em aspecto apoptótico) 5- Ovócitos com *cumulus* desnudos (ovócitos desprovidos de células) 6- Outros (ovócitos com características que não configuram em nenhuma categoria anteriormente citada).

A estatística descritiva foi feita segundo Gomes (1977).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisados 14.583 ovócitos obtidos de 3.112 ovários de vacas abatidas em matadouro. As amostras foram realizadas com 57 repetições. Os resultados encontram-se na Tab. 1. Não foram observados ovócitos com células do *cumulus oophorus* em apoptose, exceto naqueles com *cumulus* expandidos. As características morfológicas de cada tipo encontram-se nas Fig. 1a, b, c, d, e.

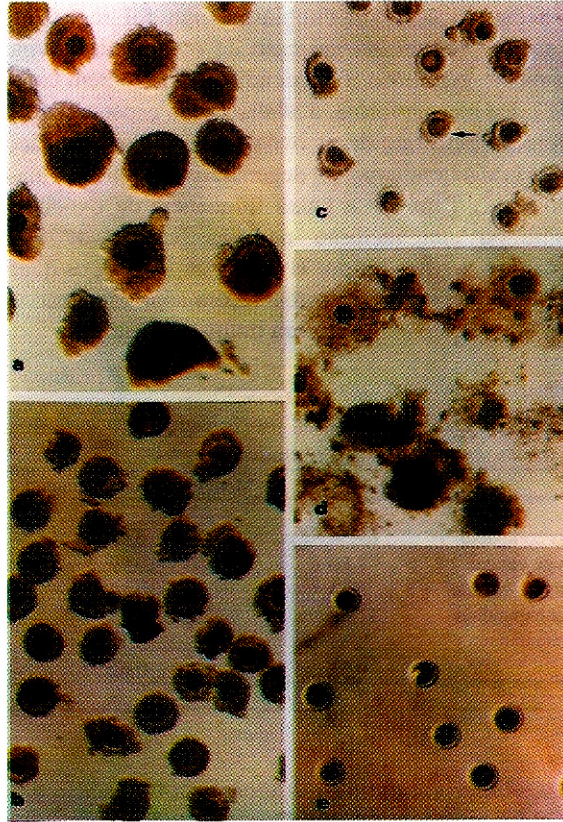


Figura. 1. Ovócitos classificados como tipo *cumulus* compacto (a); contendo até três camadas completas de células do *cumulus* (b); parcialmente recobertos de células (c); tipo *cumulus* expandido (d) e desnudos (e). Seta: superfície da zona pelúcida totalmente desprovida de células do *cumulus* e da *corona radiata*. 40 X

Trabalhos de pesquisas têm verificado que a presença de algum tipo de célula de revestimento é importante na capacidade do ovócito de maturar *in vitro* (Leibfried & First, 1979; King et al., 1986). O mesmo foi observado para a fecundação e clivagem, adotando as técnicas de FIV e MIV (Shioya et al., 1988). Entretanto, alguns autores classificaram os ovócitos quanto ao espaço perivitelino (Greve et al., 1984) e aspecto do citoplasma (Leibfried & First, 1979; King et al.,

1986). Contudo, a classificação do citoplasma não foi realizada no presente trabalho, por ser muito prejudicada, no caso de ovócito de bovinos, por ser o citoplasma intensamente granuloso. Esta condição foi também caracterizada por Shioya et al. (1988). Da mesma forma, a avaliação do espaço perivitelino não foi levada em consideração pelo fato de os ovócitos com algum espaço perivitelino apresentarem vários graus de alterações degenerativas, entrando na classificação denominada de "outros". Também a baixa frequência de ovócitos com espaço perivitelino possibilitou sua inclusão na classificação de "outros". Estas observações reforçam as verificadas por Hyttel et al. (1989), os quais registraram que, ao nível ultra-estrutural, os ovócitos recém-aspirados não apresentavam espaço perivitelino ou, quando existente, era muito pequeno.

Tabela 1. Prevalência dos diferentes tipos morfológicos de ovócitos, observados em 3.112 ovários de vacas abatidas em matadouro

Tipo	Taxa (%)	Média ± Desvio padrão	Total
Apresentando <i>cumulus</i> compacto	69,34	3,25±0,68	10.112
Com até três camadas de células	7,80	0,37±0,19	1.137
Parcialmente recoberto por células	6,74	0,32±0,13	983
Apresentando <i>cumulus</i> expandido	11,10	0,52±0,23	1.619
Desnudo	4,71	0,22±0,11	687
Outros	0,31	0,01±0,02	45
Total			14.583

No presente estudo, observou-se grande diferença na frequência de ovócitos que apresentavam *cumulus* compacto, quando comparados com os outros tipos morfológicos observados. Devido à escassa literatura a respeito do assunto, os resultados obtidos não permitem uma comparação detalhada com os verificados por outros estudos. A percentagem verificada de ovócitos com *cumulus* compactos foi semelhante à encontrada por Berg & Brem (1989) e superior à verificada por Moreno et al. (1993), Sirard & Lambert (1985) e Süß et al. (1988)

King et al. (1986) trabalharam com número muito reduzido de ovócitos, prejudicando uma análise mais conclusiva dos resultados. A baixa percentagem de ovócitos com *cumulus* compacto verificada por Moreno et al. (1993) ocorreu provavelmente pela razão de terem utilizado 120mm de Hg de pressão para a aspiração dos ovócitos. Esta contínua pressão pode ter provocado rompimentos mecânicos do *cumulus*, diminuindo a taxa de ovócitos com *cumulus* compacto. Sirard & Lambert (1985) trabalharam com vacas superovuladas. Neste caso, encontraram percentagem de ovócitos expandidos semelhante à verificada para

os compactos no presente experimento. O crescimento e o desenvolvimento dos folículos, estimulados com a superovulação, permitem a expansão do *cumulus* já dentro do folículo, culminando na ovulação de ovócitos com o *cumulus* expandido ou já desnudos. Estes achados corroboram as observações de Leibfried & First (1979), os quais demonstraram que 80% de ovócitos coletados da tuba uterina após a superovulação são desnudos, sendo 10% na forma de expandidos. No presente experimento, os folículos não foram estimulados para o crescimento, justificando-se a elevada incidência de ovócitos com *cumulus* compacto.

Quanto aos ovócitos com poucas camadas celulares, os resultados foram muito inferiores aos verificados por Moreno et al. (1993). Provavelmente, a maior incidência verificada por esses pesquisadores tenha ocorrido através do desnudamento parcial de ovócitos com *cumulus* compacto, devido à pressão utilizada na aspiração dos folículos.

A incidência de ovócitos expandidos foi similar à dos obtidos por Moreno et al. (1993), levemente inferior à dos obtidos por King et al. (1986) e muito inferior à verificada por Sirard & Lambert (1985). A elevada incidência verificada por esses últimos pesquisadores reside no fato de terem eles trabalhado com vacas superovuladas. O estímulo do crescimento e desenvolvimento dos folículos com a superovulação provocou a expansão de um grande número de ovócitos. No presente experimento, foi encontrada percentagem de *cumulus* expandidos semelhante à taxa verificada por esses pesquisadores.

A percentagem verificada de ovócitos desnudos foi semelhante à dos encontrados por Sirard & Lambert (1985) e um pouco inferior aos dados de King et al. (1986). Da mesma forma, a taxa de ovócitos parcialmente envolvidos por células do *cumulus* foi levemente inferior à dos obtidos por King et al. (1986). Estes pesquisadores utilizaram número reduzido de ovócitos, o que dificulta uma análise mais conclusiva.

CONCLUSÕES

Independente da fase do ciclo estral, o elevado percentual de ovócitos com *cumulus* compacto, obtidos a partir de folículos terciários de ovários de vaca, sugere que os estudos relacionados com a fecundação *in vitro* devam ser realizados com a utilização deste tipo de ovócito.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAVISTER, B.D., LEIBFRIED, M.L., LIEBERMAN, G. Development of preimplantation embryos of the Golden hamster in a defined culture medium. *Biol. of Reprod.*, v.28, p.235-247, 1983.
- BERG, V., BREM, G. *In vitro* production of bovine blastocysts by *in vitro* culture and fertilization of oocytes and subsequent *in vitro* culture. *Zuchthygiene*, v.24, p.134-139, 1989.
- GOMES, F.P. *Curso de estatística experimental*. 7. ed. Piracicaba, Nobel, 1977. 430p.
- GREVE, T., BOUSQUET, D., KING, W.A., et al. *In vitro* fertilization and cleavage of *in vivo* matured bovine oocytes. *Theriogenology*, v.22, p.151-165, 1984.
- HYTTEL, P., GREVE, T., CALLENSSEN, H. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. *J. Reprod. Fertil.*, Suppl v.38, p.35-47, 1989.
- KING, W.A., BOUSQUET, D., GREVE, T., Meiosis in bovine oocytes matured *in vitro* and *in vivo*. *Acta Vet. Scand.*, v.27, p.267-279, 1986.
- LEIBFRIED, M.L., FIRST, N.L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, v.48, p.76-86, 1979.
- MORENO, J.F., FLORES-FOXWOTH, G., WESTHUSIN, M., KRAEMER, D.C. Influence of pregnancy and presence of a CL on quantity and quality of bovine oocytes obtained from ovarian follicles aspirated post-mortem. *Theriogenology*, v.39, p.271, 1993.
- SHIOYA, Y., KUWAYAMA, M., FUKUSHIMA, M., et al. *In vitro* fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by *cumulus* cells and matured *in vitro*. *Theriogenology*, v.30, p.489-496, 1988.
- SIRARD, M.A. & LAMBERT, D. *In vitro* fertilization of bovine follicular oocytes obtained by laparoscopy. *Biol. Reprod.*, v.33, p.487-494, 1985.
- SIRARD, M.A., BILODEAU, S. Granulosa cells inhibit the resumption of meiosis in bovine oocytes *in vitro*. *Biol. Reprod.*, v.43, p.777-783, 1990.
- STRINGFELLOW, D., RIDDELL, M., RIDDELL, K., et al. Use of *in vitro* fertilization for production of calves from involutary cull cows. *Theriogenology*, v.39, p.320, 1993.
- SÜSS, U., WÜTHRICH, K., STRANZINGER, G. Chromosome configurations and time sequence of the first meiotic division in bovine oocytes matured *in vitro*. *Biol. Reprod.*, v.38, p.871-880, 1988.