

<https://doi.org/10.31533/pubvet.v16n05a1103.1-5>

Avaliação métrica da zona pelúcida relacionada à viabilidade celular de oócitos bovinos

André Belico de Vasconcelos^{1*}  , Augusto Urzedo Pereira Queiroz²  , Ana Clara Ferreira Batista²  , Amanda Pifano Neto Quintal³  

¹Docente da Universidade de Uberaba, Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos. Uberaba –MG, Brasil.

²Discente da Universidade de Uberaba, Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos. Uberaba –MG, Brasil.

³Docente da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Instituto de Ciências Biomédicas. Uberaba - MG, Brasil.

*Autor para correspondência, e-mail: devasconcelos.a.b@gmail.com

Resumo. O objetivo do trabalho foi estabelecer um protocolo de avaliação métrica da zona pelúcida e aplicar os valores métricos com a relação à viabilidade do oócito. Foram avaliados 32 oócitos coletados de abatedouro e classificados em atresícos e não atresícos. Os oócitos não atresícos passaram primeiramente por avaliação morfológica e posteriormente por avaliação métrica pela qual foi possível realizar a mensuração em mm da corona radiata, zona pelúcida e diâmetro do antro. A partir dos resultados obtidos foi possível calcular a média dos valores mensurados. A corona radiata dos 10 oócitos apresentava leve degeneração com valores médios de 27,10 mm, a zona pelúcida apresentou-se intacta com uma média de 2,45 mm e o diâmetro do antro, que manteve valores quase constantes, apresentou média de 58,75 mm. Quanto à relação morfologia-média da corona radiata, pode-se observar que oócitos com graus morfológicos menores (I e II) apresentaram, em média, maior tamanho médio da corona radiata comparado com os oócitos de graus maiores (III e IV). Não houve relação da morfologia do oócito com a zona pelúcida. Quanto ao diâmetro do antro pode-se observar que o único oócito de grau IV apresentou o menor diâmetro de antro entre os oócitos analisados. A análise métrica pode estabelecer parâmetros de uma célula de boa qualidade e facilitar a escolha para procedimentos.

Palavras-chave: Aspiração folicular, biotecnologia reprodutiva, reprodução bovina

Zona pellucida metric evaluation related to cell viability of bovine oocytes

Abstract. The objective of this work was to establish a protocol for the metric evaluation of the zona pellucida and apply the metric values in relation to oocyte viability. Thirty-two oocytes collected from the slaughterhouse and classified into atresic and non-atresic were evaluated. Non-atresic oocytes were firstly morphologically evaluated and then metrically evaluated, through which it was possible to measure the corona radiata, zona pellucida and diameter of the antrum in mm. From the results obtained, it was possible to calculate the mean of the measured values. The corona radiata of the 10 oocytes showed mild degeneration with mean values of 27.10 mm, the zona pellucida was intact with a mean of 2.45 mm and the antrum diameter, which maintained almost constant values, had a mean of 58.75 mm. As for the morphology-mean ratio of the corona radiata, it can be observed that oocytes with lower morphological degrees (I and II) had, on average, a greater mean size of the corona radiata compared to oocytes with higher degrees (III and IV). There was no relationship between the morphology of the oocyte and the zona pellucida. As for the antrum diameter, it can be observed that the only grade IV oocyte had the smallest antrum diameter among the analyzed oocytes. Metric analysis can establish good quality cell parameters and facilitate choice for procedures.

Keywords: Bovine reproduction, follicular aspiration, reproductive biotechnology

Introdução

Nas últimas décadas, a embriologia dos mamíferos apresentou um enorme progresso científico, especialmente, na espécie bovina ([Pazzim, 2021](#)). Pesquisas nos campos celular, molecular e genético promoveram novas oportunidades para o desenvolvimento tecnológico da pecuária, principalmente, na área de reprodução ([Junqueira & Carneiro, 1997](#)). Diversas biotecnologias têm sido desenvolvidas com o objetivo de aumentar a eficiência reprodutiva e produtiva de espécies, tanto de interesse econômico quanto daquelas em extinção, visando maximizar o potencial genético das mesmas, tendo em vista o limitado número de descendentes produzidos pelas fêmeas ([Bols et al., 1998](#); [Fernandes-França et al., 2020](#)).

Nesse contexto destaca-se a transferência de embriões (TE) e a fertilização *in vitro* (FIV), como as mais modernas biotecnologias da reprodução empregadas ([Bem, 1993](#); [Camargo et al., 2002](#); [Pazzim, 2021](#)). Portanto, considerando que na natureza, apenas uma pequena fração do potencial genético e reprodutivo dos animais é utilizada, essas alternativas têm representado um avanço substancial na eficiência reprodutiva. No caso dos bovinos, em média, um macho gera entre 15 a 20 produtos por ano, enquanto uma fêmea, na maioria das vezes, gera uma cria por ano, o que corresponde de oito a dez produtos durante toda sua vida reprodutiva. Acrescenta-se que tais biotecnologias permitem ganhos genéticos em grande escala nos programas de melhoramento animal. A seleção é mais rápida e precisa, diminuindo o intervalo entre gerações pela obtenção de várias crias de doadoras de mérito confirmado (vacas) ou previsível (novilhas) ([Costa & Silva, 2004](#)).

No caso da FIV, os oócitos podem ser obtidos de ovários de vacas abatidas em frigoríficos ou de animais vivos; neste último caso, pela ovariectomia e laparoscopia ou, ainda, por aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom (OPU – *Ovum Pick-up*) ([Tessmann et al., 2004](#)).

Este trabalho foi realizado para estabelecer um protocolo de avaliação métrica da zona pelúcida e aplicar os valores métricos com a relação da viabilidade do oócito.

Material e métodos

O processo de avaliação morfológica de oócitos, constituiu-se com a obtenção e manutenção dos ovários recuperados 20 minutos após o abate de fêmeas bovinas no frigorífico. Os mesmos foram mantidos em solução salina estéril com aproximadamente 30–35° C e transportados para o laboratório em caixas térmicas, não excedendo o limite de 3 horas desde o abate até o início das aspirações.

As punções foliculares foram realizadas manualmente com auxílio de seringas e agulhas de calibre 19-G, descartáveis. Todo o material aspirado foi transferido para tubos plásticos de 50 ml, onde permaneceram por pelo menos 5 minutos para a sedimentação dos oócitos. Os oócitos foram maturados *in vitro* pela empresa Bio Vitro e chegaram ao laboratório prontos para análise.

Para análise e seleção dos oócitos, foi preparada uma placa de 100 x 20 mm com gotas de solução tampão PBS e óleo mineral. O uso do óleo mineral sobre a maioria das soluções utilizadas na FIV, tem a finalidade de protegê-las contra contaminações externas, da evaporação e consequente alteração do pH. Além de seu efeito protetor, possibilita as trocas gasosas. Todavia, cuidados em relação à toxidade, devido a sua exposição à luz ultravioleta e outros cuidados devem ser tomados ([De Roover et al., 2008](#); [Hocquette et al., 2007](#); [Mikkola et al., 2020](#); [Wu & Zan, 2012](#)).

Após o preparo da placa, os oócitos foram pipetados e acondicionados dentro das gotas de tampão PBS. A placa foi colocada em uma lupa sob aumento de 4x para que seja possível a visualização dos oócitos. Com a ajuda da lupa e uma pipeta de 20 µL apenas um oócito por vez foi pipetado. Este foi colocado em uma lâmina e recoberto por uma lamínula. A lâmina foi visualizada sob microscópio óptico, ajustado em lente objetiva de 5x, e posteriormente sob objetiva de 10x, a imagem foi ajustada no computador de forma que a zona pelúcida estivesse completamente visível e focada.

As imagens foram obtidas utilizando a câmera SAMSUNG SDC – 435. Após visualização das imagens, os oócitos foram classificados em atrésicos e não atrésicos considerando a integridade de sua membrana.

Para a avaliação métrica dos oócitos, utilizou-se o programa ECHO IMAGEVIEWER® (EVIEW). Para as medições da zona pelúcida foram exercidas duas medidas da corona radiata e duas medidas do diâmetro do antro e a análise foi estabelecida pelas médias das medidas.

Resultados e discussão

Em um total de 32 oócitos utilizados para análise, 22 (69%) eram atrésicos ([Figura 1](#)) e não permitiam boa visualização das estruturas a serem analisadas. Os 10 restantes (31%) foram classificados como não atrésicos ([Figura 2](#)) nos quais foram realizadas as avaliações métricas ([Figura 3](#)).

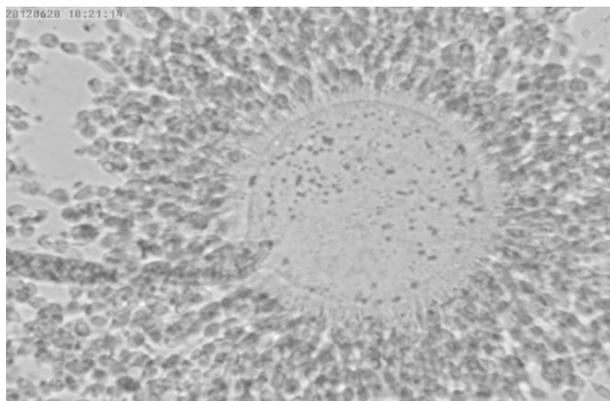


Figura 1. Oócito atrésico com ruptura de membrana (Câmera Samsung SDC – 435)

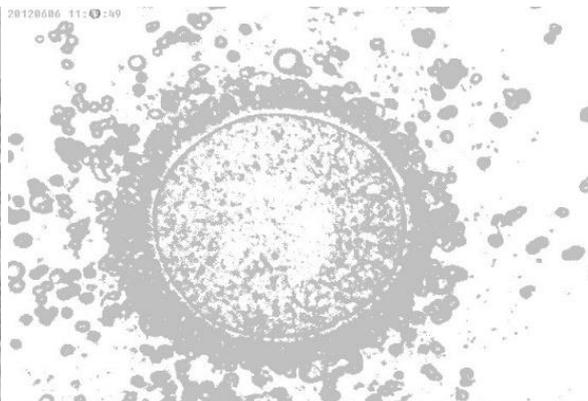


Figura 2. Oócito não atrésico (Câmera Samsung SDC – 435)

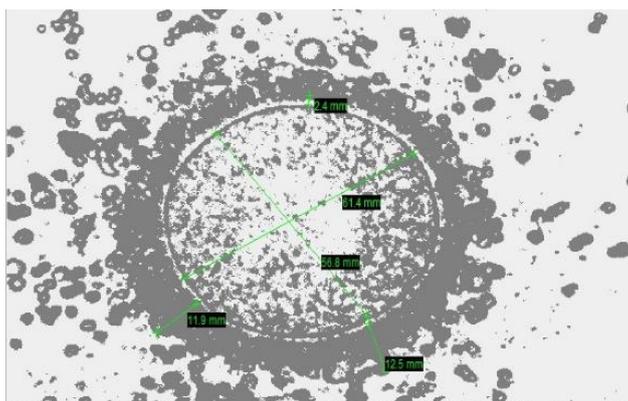


Figura 3. Oócito com avaliações métricas. (Programa Echo Imageviewer®)

Os oócitos não atrésicos passaram primeiramente por avaliação morfológica ([Tabela 1](#)) e posteriormente por avaliação métrica pelo programa ECHO IMAGEVIEWER® no qual foi possível realizar a mensuração em mm da corona radiata, zona pelúcida e diâmetro do antro ([Tabela 2](#)).

Observou-se que a corona radiata dos 10 oócitos apresentava leve degeneração com valores médios de 27,105 mm, a zona pelúcida apresentou-se intacta com uma média de 2,45 mm e o diâmetro do antro, que manteve valores quase constantes com média de 58,755 mm.

Tabela 1. Avaliação morfológica dos oócitos classificados como não atrésicos (N=10)

Oócito	Classificação Morfológica
1	GRAU II
2	GRAU I
3	GRAU I
4	GRAU I
5	GRAU IV
6	GRAU II
7	GRAU I
8	GRAU III
9	GRAU II
10	GRAU I

Para avaliar a relação da morfologia com os valores mensurados as informações foram organizadas (Tabela 3) levando em consideração o grau morfológico dos oócitos.

Tabela 2. Média das medidas dos oócitos classificados como não atresícos (N=10)

Oócito	Corona Radiata	Zona Pelúcida	Diâmetro Antro
1	12,20 mm	2,4 mm	59,10 mm
2	23,40 mm	2,7 mm	61,50 mm
3	31,50 mm	3,3 mm	56,05 mm
4	25,70 mm	2,2 mm	51,60 mm
5	24,30 mm	3,2 mm	48,85 mm
6	26,65 mm	1,7 mm	55,50 mm
7	44,75 mm	2,7 mm	63,30 mm
8	7,150 mm	2,3 mm	52,90 mm
9	19,70 mm	1,7 mm	69,75 mm
10	55,70 mm	2,3 mm	69,00 mm

Tabela 3. Tabela para avaliação da relação morfologia e mensurações

Classificação Morfológica	Corona Radiata (média)	Zona Pelúcida	Diâmetro Antro (média)
GRAU I	36,20 mm	2,7 mm	60,29mm
GRAU II	19,51 mm	2,4 mm	61,45 mm
GRAU III	7,15 mm	2,3 mm	52,90 mm
GRAU IV	24,30 mm	3,2 mm	48,85 mm

Quanto à relação morfologia-média da corona radiata, pode-se observar que oócitos com graus morfológicos menores (I e II) apresentaram, em média, maior tamanho médio da corona radiata comparado com os oócitos de graus maiores (III e IV). O oócito de grau IV foi classificado desta forma, pois em um dos lados houve desprendimento total da corona radiata (Figura 4). Não houve relação da morfologia do oócito com a zona pelúcida. Quanto ao diâmetro do antro pode-se observar que o único oócito de grau IV apresentou o menor diâmetro de antro entre os oócitos analisados.

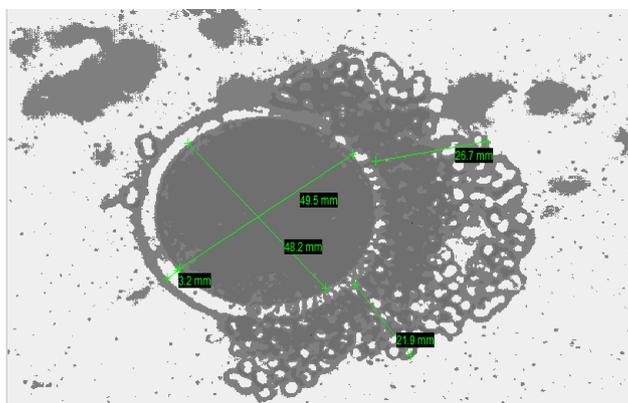


Figura 4. Oócito classificado como grau IV. (Programa Echo Imageviewer®).

Os resultados encontrados não puderam ser relacionados com a viabilidade dos oócitos pois, na literatura, não foram encontrados valores de referência. Todavia, Lonergan (1992) considera de melhor qualidade, oócitos que apresentam maior número de camadas do cúmulus, compactas e citoplasma mais homogêneo. Lonergan (1992) comparou a eficiência dos vários tipos de oócitos usados na maturação *in vitro*, e concluiu que oócitos desnudos e com camadas de cúmulus expandidas, apresentavam eficiência bem menor, comparados aqueles envolvidos por camadas de cúmulus. Sendo ainda observado, que quanto maior o número de camadas compactas, melhor a eficiência. Atualmente, estudos com oócitos tem sido realizados em seres humanos e peixes.

Conclui-se, portanto, que os dados apresentados sobre a análise métrica de oócitos coletados em abatedouros é de suma importância para todas as biotecnias que necessitam destas células. Considerando que cada estrutura do oócito tem sua função, a análise métrica pode estabelecer parâmetros de uma célula de boa qualidade e facilitar a escolha para procedimentos.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão dos recursos financeiros e a empresa BioVitro pela colaboração nas avaliações.

Referências bibliográficas

- Bem, A. R. (1993). *Manual sobre transferência e micromanipulação de embriões nas espécies bovina e equina*. EMBRAPA-CENARGEN.
- Bols, P. E. J., Ysebaert, M. T., Lein, A., Coryn, M., Van Soom, A., & Kruif, A. (1998). Effects of long-term treatment with bovine somatotropin on follicular dynamics and subsequent oocyte and blastocyst yield in an OPU-IVF program. *Theriogenology*, *49*(5), 983–995.
- Camargo, L. S. A., Sá, W. F., Ferreira, A. M., Viana, J. H. M., & Araújo, M. C. C. (2002). Efeito de concentração espermática e período de incubação oócito-espermatozóides na fecundação in vitro em bovinos da raça Gir. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, *37*(5), 709–715.
- Costa, P. A., & Silva, F. M. (2004). Segurança sanitária em transferência de embriões: Revisão bibliográfica. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, *28*, 253–258.
- De Roover, R., Feugang, J. M. N., Bols, P. E. J., Genicot, G., & Hanzen, C. (2008). Effects of Ovum Pick-up Frequency and FSH Stimulation: A Retrospective Study on Seven Years of Beef Cattle In Vitro Embryo Production. *Reproduction in Domestic Animals*, *43*(2), 239–245. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00873.x>
- Fernandes-França, P. H., Oliveira-Santos, M. V., Oliveira-Lira, G. P., Azevedo-Borges, A., & Fernandes-Pereira, A. (2020). Influência de diferentes suplementações proteicas sobre a recuperação e maturação in vitro de oócitos bovinos. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, *33*(3), 172–181.
- Hocquette, J. F., Levéziel, H., Renand, G., & Malafosse, A. (2007). La révolution génomique au service de la filière viande bovine. *Cahiers Agricultures*, *16*(6), 457–463. <https://doi.org/10.1684/agr.2007.0141>
- Junqueira, L. C., & Carneiro, J. R. (1997). *Biologia Celular e Molecular*. Guanabara Koogan.
- Loneragan, P. (1992). *Studies in the in vitro maturation, fertilization and culture of bovine follicular oocytes*. University College Dublin.
- Mikkola, M., Hasler, J. F., & Taponen, J. (2020). Factors affecting embryo production in superovulated *Bos taurus* cattle. *Reproduction, Fertility and Development*, *32*(2), 104–124.
- Pazzim, L. V. L. (2021). *Transferência de embriões em bovinos: revisão de literatura*. Curitiba, SC.
- Tessmann, J. V., Mozzaquatro, F. D., Rauber, L. P., Santos, M. V. dos, Chequim, R. M., Bernardi, M. L., Silva, C. A. M., & Rubin, M. I. B. (2004). Transporte-maturação de oócitos bovinos em palhetas. *Acta Scientiae Veterinariae*, *32*(3), 177–184.
- Wu, B., & Zan, L. (2012). Enhance Beef Cattle Improvement by Embryo Biotechnologies. *Reproduction in Domestic Animals*, *47*(5), 865–871. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01945.x>

Histórico do artigo:

Recebido: 5 de janeiro de 2022

Aprovado: 12 de fevereiro de 2022

Artigo disponível online: 6 de maio de 2022

Licenciamento: Este artigo é publicado na modalidade Acesso Aberto sob a licença Creative Commons Atribuição 4.0 (CC-BY 4.0), a qual permite uso irrestrito, distribuição, reprodução em qualquer meio, desde que o autor e a fonte sejam devidamente creditados.