

## **FLUSHING FOLICULAR: UMA NOVA ALTERNATIVA PARA MELHORAR A OBTENÇÃO DE OÓCITOS POR ASPIRAÇÃO OVARIANA EM BOVINOS**

*(Follicular flushing: a new alternative to improve oocyte Recovery by ovarian aspiration in cattle)*

André de Medeiros Costa LINS<sup>1\*</sup>; Adriana Novaes dos REIS<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Central de Biotecnologia de Reprodução Animal da Universidade Federal do Pará (UFPA), Rua João Henrique de Carvalho, S/N, B. Saudade I, Castanhal, Pará. CEP: 68.740-970; <sup>2</sup>Universidade Federal do Pará (CEBRAN). \*E-mail: [andremedeiros.bn@gmail.com](mailto:andremedeiros.bn@gmail.com)

### **RESUMO**

A lavagem folicular (*flushing*) associado à aspiração folicular, ou também chamado de *flushing* folicular (FF) é uma técnica bastante utilizada para a recuperação de oócitos em mulheres. Em animais, já foi empregado para a aspiração folicular transvaginal em equinos e na aspiração de ovários bovinos de abatedouros. A recuperação do maior número possível de oócitos é o propósito desse método, pois corresponde a uma ou mais lavagens do folículo puncionado imediatamente após a aspiração folicular. Este trabalho objetivou comparar o uso do FF associado à aspiração folicular (AF) em ovários bovinos de frigoríficos, quanto às taxas de recuperação de oócitos (TRO) e a morfologia dos oócitos. Na AF utilizou-se agulha 18G acoplada a seringa. No FF foi elaborado um sistema manual no laboratório INVITRO/CEBRAN, utilizando equipo, torneira de 3 vias, agulha, seringa, tubo e bomba de vácuo. Neste trabalho, ocorreu apenas uma lavagem intrafolicular. Os oócitos foram classificados de A (COC) a F (Desnudos), conforme o número de camada de células do *cumulus*, grau de compactação, coloração e uniformidade do citoplasma. Na taxa de obtenção de oócitos por ovário não houve diferença estatística (FF 11±3,12 vs. AF 11,63±3,74; p>0,05); porém existiu diferenças na TRO por folículo aspirado (FF 88,13%±16,44 vs. AF 71,50%±14,47; p<0,05) e na taxa de recuperação de oócitos grau A (FF 27%±10,98 vs. AF 12,75%±8,56; p<0,05). Além disso, o FF aumentou o tempo de colheita dos oócitos devido a lavagem extra (p<0,01). Com os dados obtidos pode-se observar que o *flushing* folicular melhorou a TRO em ovários bovinos, favorecendo maior recuperação de COCs.

**Palavras-chave:** Recuperação oocitária; intrafolicular; aspiração, bovinos

### **ABSTRACT**

Follicular lavage (*flushing*) associated with follicular aspiration, or also called follicular flushing (FF) is a technique widely used for the oocyte recovery in women. In animals, it has already been used by transvaginal follicular aspiration in horses and aspiration of bovine ovaries from slaughterhouses. The recovery of the largest possible number of oocytes is the purpose of this method, as it corresponds to one or more washes of the punctured follicle immediately after follicular aspiration. This study aimed to compare the use of FF associated with follicular aspiration (FA) in bovine ovaries from slaughterhouses, in terms of oocyte recovery rates (ORT) and oocyte morphology. In FA, an 18G needle attached to a syringe was used. In the FF a manual system was elaborated in the INVITRO / CEBRAN laboratory, using parenteral infusion equipment, 3-way stopcock, needle, syringe, tube and vacuum

pump. In this study, there was only an intra-follicular lavage. Oocytes were classified from A (COC) to F (Denudes), according to the number of cumulus cell layers, degree of compaction, staining and uniformity of the cytoplasm. There was no statistical difference in the oocytes rate obtained by ovary (FF  $11 \pm 3.12$  vs. FA  $11.63 \pm 3.74$ ;  $p > 0.05$ ); however, there were differences in ORT per aspirated follicle (FF  $88.13\% \pm 16.44$  vs. FA  $71.50\% \pm 14.47$ ;  $p < 0.05$ ) and in the recovery rate of grade A oocytes (FF  $27\% \pm 10.98$  vs. AF  $12.75\% \pm 8.56$ ;  $p < 0.05$ ). In addition, the FF increased the time to harvest the oocytes due to extra washing ( $p < 0.01$ ). With the data obtained, it can be seen that follicular flushing improved ORT in bovine ovaries, favoring greater recovery of COCs.

**Key words:** Oocyte recovery, intrafollicle, aspiration, bovine.

## INTRODUÇÃO

A lavagem folicular (*flushing*) associado à aspiração do folículo, ou também chamado de *flushing* folicular, é uma técnica bastante utilizada na recuperação de oócitos em mulheres (SOUZA *et al.*, 1997), assim como também já foi descrita na aspiração folicular transvaginal em equinos e na aspiração *in vitro* de ovários bovinos (FRY *et al.*, 1997), com o objetivo de recuperar o maior número possível de oócitos de boa qualidade, pois corresponde a uma ou mais lavagens do folículo puncionado imediatamente após a aspiração folicular propriamente dita.

A eficiência da aspiração associada ao *flushing* folicular em humanos apresenta resultados satisfatórios quanto ao uso desse método, aumentando o número de oócitos colhidos (SOUZA *et al.*, 2017), necessitando de até 4 lavagens para a recuperação máxima de oócitos, sem comprometer sua qualidade, devido ao tempo de realização da técnica (BAGTHARIA E HALOOB, 2005).

O uso do *flushing* associado à aspiração, descrito em éguas por Mari *et al.* (2005), aumentou significativamente ( $p < 0,01$ ) a taxa de recuperação de oócitos no período de estro quando comparado à aspiração convencional (46,4% vs. 12,5%), utilizando uma agulha de canal duplo acoplada a uma guia de aspiração transvaginal por meio de ultrassonografia.

Segundo Fry *et al.* (1997), o *flushing* folicular, utilizado em humanos, pode ser uma importante ferramenta para a coleta de oócitos imaturos oriundos de ovários bovinos. No entanto, esta técnica, por ainda não ter sido utilizada e estudada adequadamente em bovinos, necessita ser melhor avaliada e adaptada primeiramente *in vitro*, para então ser utilizada nas fêmeas *in vivo*. Adaptações do aparato de aspiração, dos equipamentos de vácuo, da utilização da técnica associada ao uso de gonadotrofinas e do controle da dinâmica folicular das fêmeas são alguns desses fatores.

Neste contexto, este trabalho visa avaliar se o desenvolvimento dessa nova técnica de aspiração folicular, associada ao *flushing* e realizada em laboratório (*in vitro*), pode melhorar a taxa de recuperação e a qualidade morfológica dos oócitos, a fim de poder ser utilizada como uma nova alternativa de melhoria da eficiência da obtenção de oócitos de ovários bovinos e posteriormente poder ser utilizada a campo (*in vivo*).

## MEDOTOLOGIA

Para a realização desse trabalho, o projeto de pesquisa sob o número 3294270318 foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Pará, em 17 de abril de 2018, tendo atendido os critérios solicitados pela CEUA/UFPA.

Os ovários foram obtidos de frigoríficos localizados nos arredores do município de Castanhal (PA) e transportados em solução salina estéril a 0,9% em caixa térmica a temperatura ambiente (25-30 °C). O material foi processado no Laboratório de Fertilização *in vitro*, da Central de Biotecnologia de Reprodução Animal (CEBRAN/UFPA), também localizada no município de Castanhal, PA. Foram realizados dois métodos de colheita de oócitos *in vitro*: o *flushing* associado à aspiração folicular (*flushing* folicular) e a aspiração folicular convencional, sendo realizadas 8 repetições de cada técnica.

Antes da execução das técnicas, os ovários foram classificados de acordo com o número de folículos de 2 e 8 mm presentes: Grupo 1 = 1 a 9 folículos; Grupo 2 = 10 a 19 folículos e Grupo 3 = 20 a 29 folículos. Essa classificação foi realizada para melhor avaliar o tempo de realização das técnicas empregadas nesse estudo. Além disso, foram registrados a taxa de recuperação oocitária (número de oócitos recuperados/número de folículos puncionados), assim como o tempo de realização de cada método.

Na aspiração folicular convencional, folículos de 2 a 8 mm de diâmetro foram aspirados através de agulha 18G (40x1,2mm) acoplada à seringa hipodérmica estéril (20 mL) contendo 2 mL de PBS. O aspirado folicular foi disposto em tubos de fundo cônico (15 mL) por aproximadamente 3 minutos para sedimentação das células, para posterior seleção e classificação dos oócitos.

Na aspiração folicular associada ao *flushing*, o procedimento foi semelhante, no entanto, foi utilizado um sistema elaborado no laboratório INVITRO, composto por um equipo de macrogotas, uma torneira de 3 vias, uma agulha 18 G, uma seringa hipodérmica de 20 mL, uma bomba de aspiração folicular, uma rolha de silicone para aspiração, um tubo de 50 ml, duas câmaras de refluxo do cateter e uma bomba de vácuo, com pressão ajustada para 15 mL/minuto. Foi realizada somente uma lavagem folicular (*flushing*) por folículo aspirado.

Na elaboração do sistema do *flushing*, três porções do tubo do equipo foram segmentadas e acopladas a uma torneira de 3 vias. Na parte anterior da torneira foi encaixada a agulha, nos outros lados foi encaixada a seringa com PBS a ser injetado no folículo (*flushing*) e o tubo de 50 mL com a rolha de silicone adaptada à bomba de vácuo.

Na aspiração, o conteúdo direciona-se para o tubo coletor; em seguida, a chave de fluxo da torneira de 3 vias é girada, abrindo o curso do líquido para ocorrer a lavagem do folículo ou *flushing*. Após o preenchimento do folículo, a chave da torneira de 3 vias retorna para a posição inicial, para a aspiração do folículo preenchido com PBS. A sedimentação do líquido folicular aspirado foi realizada de forma similar à aspiração folicular.

A qualidade morfológica dos oócitos foi classificada em função das características do *cumulus oophorus* (COC) tais como, o número de camadas, o grau de compactação e a coloração e uniformidade do citoplasma, em: Grau A (COCs) - Oócitos com citoplasma homogêneo e com toda superfície cercada com mais de 3 camadas de células; Grau B - Oócitos com citoplasma homogêneo e com 1 a 3 camadas de células; Grau C - Oócitos com 1 camada de células em 70% da superfície; Grau D (DEG) - Oócitos com evidentes sinais de degeneração citoplasmática; Grau E (Expandido) - Oócitos envolvidos por células

expandidas; Grau F (Desnudo) - Oócitos com ausência de células (DI FRANCESCO *et al.*, 2012).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) pelo software IBM SPSS versão 22 (2013), e as diferenças entre as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 109 ovários bovinos foram coletados de frigoríficos, sendo divididos aleatoriamente em 56 ovários na aspiração folicular associada ao *flushing* e 53 na aspiração convencional, com 1.516 folículos aspirados, com 741 no *flushing* e 775 na aspiração folicular, e 1.198 oócitos obtidos no total, com 643 no *flushing* e 555 na aspiração.

A taxa de recuperação de oócitos foi significativamente maior no *flushing* quando comparada com a aspiração convencional ( $88,97 \pm 16,49$  vs.  $72,08 \pm 14,46$ ;  $p < 0,05$ ), o que comprova a eficiência da associação do *flushing* na obtenção de maior número de oócitos durante a aspiração folicular. Não houve diferença estatística no número de oócitos recuperados por ovário (*Flushing*  $11,81 \pm 3,80$  vs.  $10,26 \pm 3,12$  na aspiração convencional;  $p > 0,05$ ).

Quando se compara a classificação morfológica dos oócitos obtidos no *flushing* e na aspiração convencional, pode-se observar um aumento na taxa de recuperação de oócitos de grau A (Tab. 01), sendo maior para o *flushing* ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 01:** Classificação dos oócitos recuperados (%) com base nas características do *cumulus oophorus* e de acordo com a técnica de colheita.

Técnica	Grau A	Grau B	Grau C	Grau D	Grau E	Grau F
<b>Flushing</b>	$27,36 \pm 10,95^a$ (184/643)	$33,19 \pm 8,20^a$ (215/643)	$17,03 \pm 7,45^a$ (105/643)	$8,76 \pm 3,29^a$ (55/643)	$7,27 \pm 4,15^a$ (43/643)	$6,40 \pm 5,43^a$ (41/643)
<b>Aspiração</b>	$13,18 \pm 8,48^b$ (84/555)	$35,83 \pm 9,22^a$ (207/555)	$24,37 \pm 12,79^a$ (124/555)	$12,49 \pm 2,01^a$ (64/555)	$6,01 \pm 3,75^a$ (31/555)	$8,12 \pm 6,21^a$ (45/555)

<sup>a, b</sup> Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

A realização do *flushing* demandou um tempo (em segundos) significativamente maior do que a aspiração convencional ( $p < 0,01$ ), para as três classificações de ovários: 1 a 9 folículos ( $83,33 \pm 16,71$  seg. vs.  $26,50 \pm 0,71$  seg.;  $p < 0,05$ ); 10 a 19 folículos ( $155,87 \pm 49,73$  seg. vs.  $66,40 \pm 19,66$  seg.;  $p < 0,05$ ) e de 20 a 29 folículos ( $212,50 \pm 19,09$  seg. vs.  $78,67 \pm 7,02$  seg.;  $p < 0,05$ ).

O primeiro relato do uso do *flushing* folicular para a colheita de oócitos em ovários bovinos oriundos de abatedouros foi descrito por Fry *et al.* (1997), os quais realizaram apenas uma lavagem dos folículos por meio de uma agulha de canal duplo e uma máquina de *flushing* programada para injetar 1,5 mL de PBS no folículo, diferente do que foi utilizado no presente trabalho, que fez o uso de um sistema de baixo custo, pois não utilizou a agulha

de canal duplo e nem a máquina de *flushing*, realizando a lavagem intra-folicular de forma manual, através da injeção de PBS nos folículos de 2 a 8 mm de diâmetro.

Em equinos e humanos os oócitos são mais difíceis de se desprender da camada de células da granulosa (HAWLEY *et al.*, 1995; FRY *et al.*, 1997; MARI *et al.*, 2005), por isso o uso do *flushing* melhora a taxa de recuperação por meio do uso de uma agulha de canal duplo. Em mulheres é necessário realizar mais de uma lavagem em cada folículo, podendo serem realizadas até 4 lavagens intrafoliculares, o que geralmente recupera até 90% dos oócitos (BAGTHARIA e HALOOB, 2005; XIAO *et al.*, 2018). Em bovinos, as células do *cumulus oophorus* têm a base menos ampla e maior espessura entre o oócito e a lâmina basal, além de possuir menores fenestrações no *cumulus*, provavelmente facilitando a separação dos oócitos durante a aspiração, com maior possibilidade de aspirar oócitos com *cumulus oophorus* intacto (HAWLEY *et al.*, 1995).

As mesmas características do COC de bovinos (HAWLEY *et al.*, 1995) também pode ter contribuído para a obtenção de oócitos de melhor qualidade morfológica (grau A), visto que o *flushing* teve um aumento, não somente na taxa de recuperação de oócitos, mas também na quantidade dos oócitos grau A. É possível supor que o *flushing* em bovino não necessitará de muitas lavagens, como em humanos e equinos, porque se o oócito não for recuperado na aspiração, ele possui maiores chances de ser recuperado na primeira aspiração associada ao *flushing*. Estes resultados não coincidem com os dados encontrados por Fry *et al.* (1997), que não encontraram diferença na qualidade dos oócitos entre os dois métodos utilizados.

Além do *flushing* aumentar a taxa de recuperação de oócitos, essa técnica contribuiu para uma recuperação significativa de oócitos classificados em grau A, com isso, mais oócitos são disponibilizados produção *in vitro* de embriões (PIVE), visto que os oócitos de grau A e grau B são os únicos competentes para a PIVE (DI FRANCESCO *et al.*, 2012).

Com o intuito de melhor avaliar o tempo de aspiração dos ovários, para comparar as duas técnicas, foi realizado uma classificação ovariana diferente das tradicionais, que leva em consideração as características morfométricas do ovário (MONTEIRO *et al.*, 2009). Essa classificação foi utilizada, pois verificou-se que alguns ovários que possuíam tamanhos maiores, seja em largura ou comprimento, apresentavam uma população folicular menor do que ovários de menor tamanho, e com o isso, o tempo de realização das técnicas poderia ser alterado.

No uso do *flushing* folicular em humanos, é importante levar em consideração o tempo de anestesia (KARA *et al.*, 2012), visto que a realização do *flushing* associado à aspiração demanda o dobro de tempo da aspiração convencional ( $p < 0,01$ ) (LEVENS *et al.*, 2009), por esse motivo não devem ser realizadas muitas lavagens. De modo semelhante, neste trabalho, o *flushing* folicular aumentou significativamente o tempo de realização da aspiração ( $p < 0,01$ ), sendo 2 a 3 vezes maior do que a aspiração convencional, o que pode ter influência na viabilidade dos oócitos a serem utilizados na maturação, fertilização e cultivo *in vitro*.

Com os dados apresentados neste trabalho, é possível afirmar que a realização do *flushing* associado à aspiração folicular, pelo uso de um sistema de baixo custo elaborado no laboratório INVITRO/CEBRAN, e com apenas uma lavagem intrafolicular, aumentou a taxa de recuperação de oócitos, contribuindo para a recuperação de mais oócitos COCs (Grau A);



e apesar de ser uma técnica que aumenta o tempo de realização da colheita, ainda não foi possível afirmar se isso afeta os outros passos da produção *in vitro* de embriões bovinos.

Pelo exposto, mais estudos são necessários para definir se um maior número de lavagens na aspiração folicular associada ao *flushing* em ovários bovinos aumentaria ainda mais a taxa de recuperação, assim como, para verificar se a taxa de produção de embriões pode ser influenciada quando o *flushing* é realizado.

## REFERÊNCIAS

- BAGTHARIA, S.; HALOON, A.R.K. Is there a benefit from routine follicular *flushing* for oocyte retrieval? *Journal of Obstetrics and Gynaecology*, v.25, n.4, p.374-137, 2005.
- DI FRANCESCO, S.; NOVOA, M.V.S.; VECCHIO, D.; NEGLIA, G.; BOCCIA, L.; CAMPALINE, G.; ZICARELLI, L.; GASPARRINI, B. Ovum pick-up and in vitro embryo production (OPU-IVEP) in mediterranean italian buffalo performed in different seasons. *Theriogenology*, v.77, n.1, p.148-154, 2012.
- FRY, R.C.; NIALL, E.M.; SIMPSON, T.L.; SQUIRES, T.J.; REYNOLDS, J. The collection of oocytes from bovine ovaries. *Theriogenology*, v.47, n.5, p.977-987, 1997.
- HAWLEY, L.R.; ENDERS, A.C.; HINRICHS, K. Comparison of equine and bovine oocyte-cumulus morphology within the ovarian follicle. *Biology of Reproduction*, v.52, n.1, p.243-252, 1995.
- KARA, M.; AYDIN, T.; TURKTEKIN, N. Is follicular *flushing* really effective? A clinical study. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, v.286, n.4, p.1061-1064, 2012.
- LEVENS, E.D.; WHITCOMB, B.W.; PAYSON, M.D.; LARSEN, F.W. Ovarian follicular *flushing* among low-responding patients undergoing assisted reproductive technology. *Fertility and Sterility*, v.91, n.4, p.1381-1384, 2009.
- MARI, G.; BARBARA, M.; ELEONORA, I.; STEFANO, B. Fertility in the mare after repeated transvaginal ultrasound-guided aspirations. *Animal Reproduction Science*, v.88, n.3-4, p.299-308, 2005.
- MONTEIRO, C.M.R.; PERRI, S.H.V.; CARVALHAL, R.; CARVALHO, R.G. Estudo morfológico comparativo dos ovários de vacas e novilhas da raça nelore (*Bos taurus indicus*). *Ars Veterinaria*, v.24, n.2, p.122-126, 2009.
- SOUZA, A.L.; SAMPAIO, M.; NORONHA, G.B.; COSTER, L.G.; OLIVEIRA, R.S.; GEBER, S. Effect of follicular *flushing* on reproductive outcomes in patients with poor ovarian response undergoing assisted reproductive technology. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v.34, n.10, p.1353-1357, 2017.
- XIAO, Y.; WANG, Y.; WANG, M.; LIU, K. Follicular *flushing* increases the number of oocytes retrieved in poor ovarian responders undergoing in vitro fertilization : a retrospective cohort study. *BMC Women's Health*, v.18, n.1, p.1-7, 2018.