

Diferentes concentrações de etileno-glicol na organização da cromatina nuclear de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano bovino (*Bos indicus*).

Different concentration of the ethylene glycol in nuclear chromatin organization of the preantral ovarian follicles from bovine (Bos indicus).

LUNA, H. S.^{1*}; LIJERON, L. A.²; COSTA, R. N.³

1. Médico Veterinário, Doutor em Patologia Molecular, Professor do Departamento de Biociências da UFMS/CPAQ.

2. Bióloga, UFMS.

3. Bióloga, Mestranda em Ciência Animal, UFMS.

*Endereço para correspondência: hluna@ceua.ufms.br

RESUMO

A criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais pode ajudar na conservação de muitas espécies domésticas, silvestres e selvagens. O objetivo do presente estudo foi verificar o efeito do etileno-glicol, em diferentes concentrações, na organização morfológica da cromatina nuclear de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano bovino. Cinco ovários obtidos em abatedouro foram utilizados e analisado um total de 523 folículos. O teste de toxicidade foi realizado com fragmentos ovarianos expostos ao etileno-glicol, em concentrações de 10, 20 ou 40%, diluído em solução de NaCl a 0,9%. O tecido foi analisado por técnica histológica clássica. A análise da organização morfológica da cromatina nuclear de folículos primordiais mostrou diferença significativa ($P < 0,05$) entre o grupo-controle (81,1%) *versus* grupos 10% (60,5%), 20% (19,3%) e 40% (7,3%). Em folículos primários, foram observadas diferenças significativas entre o grupo controle (86,4%) e grupos 20% (18,7%) e 40% (9,5%) ($P < 0,05$), mas não entre o grupo 10% (65,5%). Estes resultados indicam que o crioprotetor etileno-glicol leva a alterações morfológicas na cromatina nuclear de folículos primordiais e primários, inclusos em tecido ovariano bovino.

Palavras-chave: bovino, etileno-glicol, folículos pré-antrais, histologia.

SUMMARY

The cryopreservation of the ovarian preantral follicles could help the conservation of several domestic and wild animal species. The objective of this investigation was to verify the effect of the ethylene glycol in different concentrations in nuclear organization of ovarian preantral follicles. Ovaries had been gotten in slaughter house. A toxicity test was conducted with strips of ovarian cortex using ethylene glycol (10, 20 or 40%). Tissues analysis were run using classic techniques of histology. The analysis of the morphologic organization of the nuclear chromatin of primordial follicles showed significant difference ($P < 0.05$) between the control group (81,1%) and 10% (60,5%), 20% (19,3%) and 40% (9,5%) groups. In primary follicles, significant differences between the control group and 20% (18,7%) and 40% (9,5%) groups ($P < 0.05$), but not between group 10% (65,5%). These results indicate that the cryoprotectant ethylene-glycol takes the morphologic alterations in the nuclear chromatin of primordial and primary follicles, enclosed in bovine ovarian tissue.

Key Words: bovine, ethylene-glycol, histology, preantral follicles.

INTRODUÇÃO

A possibilidade de conservação de tecido ovariano, principalmente, em humanos submetidos a tratamentos de quimioterapia ou radioterapia e acometidas por doenças auto-imunes e artrites reumatóides, levou muitos pesquisadores a desenvolverem pesquisas na área de criopreservação de fragmentos ovarianos (DONNEZ e BASSIL, 1998; OKTAY e KARLIKAYA, 2000; AUBARD et al., 2001; OKTAY, 2001; POSADA et al., 2001).

Em animais, a criopreservação de tecido ovariano objetiva atingir programas conservacionistas e de melhoramento genético animal. Entretanto, para o sucesso da criopreservação, é de fundamental importância o conhecimento dos efeitos das substâncias crioprotetoras. É sabido que os crioprotetores apresentam efeitos tóxicos aos sistemas biológicos (SCHALKOFF et al., 1989; VINCENT et al., 1990; FUKU et al., 1995), além de causarem choques osmóticos (AGCA et al., 2000). Com relação ao tecido ovariano, os crioprotetores mais utilizados para congelamento são o dimetil-sulfóxido (DMSO), o propileno-glicol, o glicerol e o etileno-glicol (DEMIRCI et al., 2003).

Na busca de melhores metodologias de criopreservação e de substâncias crioprotetoras para viabilizar a conservação de folículos pré-antrais, estudos têm sido aplicados em várias espécies, como bovinos (PAYNTER et al., 1999; LUCCI et al., 2004), caprinos (SILVA et al., 2000), ovinos (AMORIM et al., 2003), gatos (LIMA et al., 2006), suínos (GANDOLFI et al., 2006), camundongos (CANDY et al., 2000) e humanos (OKTAY e KARLIKAYA, 2000). O objetivo com

o presente estudo foi verificar o efeito do etileno-glicol, em diferentes concentrações, na organização morfológica da cromatina nuclear de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano bovino.

MATERIAL E MÉTODOS

Para manipulação ovariana e procedimento histológico foram utilizados cinco ovários de diferentes vacas zebus provenientes de abatedouro localizado no município de Aquidauana-MS, tendo sido transportados ao laboratório da UFMS/CPAQ à temperatura ambiente em um intervalo de 1 h. Os ovários foram lavados em álcool 70% seguido de solução de NaCl a 0,9%. Um total de 40 fragmentos (3 mm x 3 mm x 3 mm) foi retirado da região cortical dos ovários.

Em seguida, os fragmentos foram transferidos para uma solução de NaCl 0,9% em temperatura ambiente e divididos em 4 grupos: controle (sem exposição e fixado em Carnoy, imediatamente), 10, 20 e 40%. Cada grupo foi exposto por 10 minutos ao etileno-glicol nas concentrações de 10; 20 e 40%, diluído em solução de NaCl a 0,9%. Os fragmentos foram submetidos à exposição, de forma gradual, da menor concentração para a maior, por período de 1 minuto em cada concentração (grupo 20% permanecia 1 minuto exposto na solução de etileno-glicol a 10% e o grupo 40% permanecia 1 minuto na solução de 10% e 1 minuto na solução de 20%). Em seguida, para retirada do crioprotetor, procedeu-se inversamente utilizando as mesmas concentrações e período de tempo. Após a exposição,

os fragmentos foram fixados em Carnoy por 12 h. As amostras foram desidratadas em etanol, clarificadas com xilol, embebidas em parafina e seccionadas a 5 μ m. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina (HE) e examinados em microscópio óptico em aumento de 400X.

Para a análise dos folículos pré-antrais ovarianos, os mesmos foram classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento em primordial (uma camada de células da granulosa de forma pavimentosa ou pavimentosa-cúbica ao redor do ovócito), primários (uma camada de células da granulosa de forma cúbica ao redor do ovócito) e pequenos secundários (duas ou mais camadas de células da granulosa de forma cúbica) (van WEZEL e RODGERS, 1996; KACINSKIS et al., 2005).

Após classificação, os folículos foram analisados quanto a presença ou ausência de núcleo. A cromatina nuclear foi considerada organizada quando apresentava distribuição característica da prófase I da meiose. Folículos com distribuição da cromatina condensada ou fragmentada foram considerados núcleos com cromatinas desorganizadas.

Os dados foram analisados estatisticamente por ANOVA e o teste de Tukey aplicado quando encontrada variação. Foram realizadas 5 repetições por tratamento (um ovário por repetição). Os valores foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisados um total de 523 folículos, inclusos em tecido ovariano bovino, entre folículos primordiais (335) e primários (188). Os pequenos folículos secundários não foram computados, em função do reduzido número de estruturas encontradas. Os resultados relativos à organização nuclear dos folículos primordiais encontram-se na Tabela 1.

Quanto à presença de núcleos, não houve diferença estatística significativa ($P > 0,05$). Com relação à organização morfológica da cromatina nuclear, observou-se diferença significativa ($P < 0,05$) entre o grupo-controle e os grupos: 10%, 20% e 40%. O grupo 10% mostrou diferença significativa quando comparado aos grupos 20 e 40%.

Tabela 1. Organização da cromatina nuclear de folículos primordiais tratados com diferentes concentrações de etileno-glicol.

| Grupos | Folículos Analisados | Presença de Núcleo (%) | Núcleo Organizado (%) |
|--------------|----------------------|------------------------|------------------------|
| Controle | 157 | 106 (67,5) | 86 (81,1) ^a |
| 10% | 49 | 38 (77,5) | 23 (60,5) ^b |
| 20% | 53 | 31 (58,4) | 6 (19,3) ^c |
| 40% | 76 | 41 (53,9) | 3 (7,3) ^c |
| Total | 335 | - | - |

^{a-c}Sobrescritos diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

Na Tabela 2, encontram-se os resultados obtidos a partir das análises dos folículos primários. Com relação à presença de núcleos, o grupo-controle apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) quando comparado ao grupo 40%, mas não, se considerados os grupos 10 e 20% ($P > 0,05$). Em relação à organização da cromatina nuclear, foram observadas diferenças significativas entre o grupo-controle e os grupos 20% e 40% ($P < 0,05$) mas não em relação ao grupo 10%.

Tabela 2. Organização da cromatina nuclear de folículos primários tratados com diferentes concentrações de etileno-glicol.

| Grupos | Folículos Analisados | Presença de Núcleo (%) | Núcleo Organizado (%) |
|--------------|----------------------|--------------------------|------------------------|
| Controle | 46 | 37 (80,4) ^a | 32 (86,4) ^a |
| 10% | 49 | 29 (59,1) ^{a,b} | 19 (65,5) ^a |
| 20% | 47 | 32 (68,1) ^{a,b} | 6 (18,7) ^b |
| 40% | 46 | 21 (45,6) ^b | 2 (9,5) ^b |
| Total | 188 | - | - |

^{a-b}Sobrescritos diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

A análise morfológica de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano tem sido realizada como controle de tecnologias de conservação, como resfriamento (SILVA et al., 1999) e criopreservação (DEMIRCI et al., 2001). Os folículos, de forma geral, são analisados, levando-se em conta a organização e integridade das células da granulosa, densidade citoplasmática e morfologia da cromatina nuclear (LUCCI et al., 2004; KACINSKIS et al., 2005). Quanto à cromatina nuclear, os folículos pré-antrais encontram-se

bloqueados na prófase I da primeira meiose (HIRSFIELD, 1991), sendo muito importante a manutenção da configuração morfológica da cromatina para o sucesso do desenvolvimento folicular. Nesse sentido, Demirci et al. (2002) testaram duas concentrações de DMSO em protocolo de congelamento lento, verificando-se alterações morfológicas na cromatina nuclear, se comparada ao tecido ovariano não congelado.

No presente estudo, analisaram-se os efeitos de diferentes concentrações de

etileno-glicol na organização morfológica da cromatina nuclear. Esse crioprotetor apresenta baixo peso molecular e devido a essa característica, possui maior permeabilidade do que outros agentes utilizados, como o dimetilsulfóxido, o propanediol e o glicerol (NEWTON et al., 1998). Relatos em camundongos (CANDY et al. 1997) e humanos (NEWTON et al. 1996) não mostraram efeitos tóxicos quando foi utilizada o etileno-glicol para criopreservar o tecido ovariano. Esse fenômeno sugere que folículos ovarianos de bovinos podem ser mais sensíveis que os de outras espécies, uma vez que o etileno-glicol, no presente estudo, provocou alterações na morfologia da cromatina folicular. Em estudos com bovinos também foram verificadas alterações foliculares mais acentuadas com o uso do etileno-glicol em relação a outros crioprotetores (LUCCI et al., 2004). Altas concentrações de crioprotetores são rotineiramente utilizadas em protocolos de vitrificação (SANTOS et al., 2007). No presente estudo, verificou-se que concentrações acima de 10% de etileno-glicol para folículos primordiais e 20% para primários levaram as alterações na cromatina folicular, observando-se efeitos

progressivos nas concentrações de 40% (Tabelas 1 e 2). Estes resultados mostram que cuidados devem ser tomados quando se utiliza etileno-glicol em protocolos de criopreservação em bovinos, particularmente, em processos de vitrificação. Uma das alternativas para redução da toxicidade do etileno-glicol seria, a associação com outros agentes crioprotetores (DEMIRCI et al., 2001; dela PEÑA et al., 2002; DEMIRCI et al., 2003; HASEGAWA et al., 2004).

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que o crioprotetor etileno-glicol induz a alterações morfológicas na cromatina nuclear de folículos primordiais e primários, inclusos em tecido ovariano bovino, principalmente em altas concentrações (20 e 40%).

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à FUNDECT pelo apoio financeiro e ao Frigorífico Buriti por fornecer os ovários.

REFERÊNCIAS

AGCA, Y.; LIU, J.; RUTLEDGE, J.J.; CRITSER, E.S.; CRITSER, J.K. Effect of osmotic stress on the developmental competence of germinal vesicle and metaphase II stage bovine cumulus oocyte complexes and its relevance to

cryopreservation. **Mol. Reprod. Devel.**, v.55, p. 212-219, 2000.

AMORIM, C.A.; RODRIGUES, A.P.R.; RONDINA, D.; GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; GIORGETTI, A. Cryopreservation of ovine primordial

follicles using dimethylsulfoxide. **Fertil. Steril.**, v.79, p.682–686, 2003.

AUBARD, Y.; POIROT, C.; PIVER, P.; GALINAT, S.; TEISSIER, M.P. Are there indications for ovarian tissue cryopreservation? **Fertil. Steril.**, v.76, p.414-415, 2001.

CANDY C.J.; WOOD, M.J.; WHITTINGHAM, D.G. Effect of cryoprotectants on the survival of follicles in frozen mouse ovaries. **J. Reprod. Fertil.**, v.110, p.11–19, 1997.

CANDY, C.J.; WOOD, M.J.; WHITTINGHAM, D.G. Restoration of a normal reproductive lifespan after grafting of cryopreserved mouse ovaries. **Hum. Reprod.**, v.15, p.1300–1304, 2000.

de la PEÑA, E.C.; TAKAHASHI, Y.; KATAGIRI, S.; ATABAY, E.C.; NAGANO, E. Birth of pups after transfer of mouse embryos derived from vitrified preantral follicles. **Reproduction**, v.123, p.593-600, 2002.

DEMIRCI, B.; LORNAGE, J.; SALLE, B.; FRAPPART, L.; FRANCK, M.; GUERIN, J.F. Follicular viability and morphology of sheep ovaries after exposure to cryoprotectant and cryopreservation with different freezing protocols. **Fertil. Steril.**, v. 75, p.124-128, 2001.

DEMIRCI, B.; SALLE, B.; FRAPPART, L.; FRANCK, M.; GUERIN, J.F.; LORNAGE, J. Morphological alterations and DNA fragmentation in oocytes from primordial and primary follicles after freezing–thawing of ovarian cortex in sheep. **Fertil. Steril.**, v.77, p.595–600, 2002.

DEMIRCI, B.; LORNAGE, J.; SALLE, B.; POIRELA, M.P.; GUERIN, J.F.;

FRANCKA, M. The cryopreservation of ovarian tissue: uses and indications in veterinary medicine. **Theriogenology**, v.60, p.999-1010, 2003.

DONNEZ, J.; BASSIL, S. Indications for cryopreservation of ovarian tissue. **Hum. Reprod.**, v.4, p.248–259, 1998.

FUKU, E.; LIU, J.; DOWNEY, B.R. In vitro viability and ultrastructural changes in bovine oocytes treated with a vitrification solution. **Mol. Reprod. Devel.**, v.40, p.177-185, 1995.

GANDOLFI, F.; PAFFONI, A.; BRAMBILLA, E.P.; BONETTI, S.; BREVINI, T.A.L.; RAGNI, G. Efficiency of equilibrium cooling and vitrification procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: comparative analysis between human and animal models. **Fertil. Steril.**, v. 85, p.1150-1156, 2006.

HASEGAWA, A.; HAMADA, Y.; MEHANDJIEV, T.; KOYAMA, K. In vitro growth and maturation as well as fertilization of mouse preantral oocytes from vitrified ovaries. **Fertil. Steril.**, v.81, p.824-830, 2004.

HIRSFIELD, A.N. Development of follicles in the mammalian ovary. **Int. Rev. Cytol.** v.124, p.43–101, 1991.

KACINSKIS, M.A.; LUCCI, C.M.; LUQUE, M.C.A.; BAO, S. Morphometric and ultrastructural characterization of *Bos indicus* preantral follicles. **Anim. Reprod. Sc.**, v.87, p.45-57, 2005.

LIMA, A.K.F.; SILVA, A.R.; SANTOS, R.R.; SALES, D. M.; EVANGELISTA, A.F.; FIGUEIREDO, J.R.; SILVA, L.D.M. Cryopreservation of preantral ovarian follicles in situ from domestic cats (*Felis catus*) using different cryoprotective

agents. **Theriogenology**, v.66, p.1664-1666, 2006.

LUCCI, C.M.; KACINSKIS, M.; LOPES, L. H. R.; RUMPF, R.; BÃO, S.N. Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue. **Theriogenology**, v.61, p.1101-1114, 2004.

NEWTON, H.; AUBARD, Y.; RUTHERFORD, A.; SHARMA, V.; GOSDEN, R. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. **Hum. Reprod.**, v.11, p.1487-1491, 1996.

NEWTON, H.; FISHER, J.; ARNOLD, J.R.; PEGG, D.E.; FADDY, M.J.; GOSDEN, R.G. Permeation of human ovarian tissue with cryoprotective agents in preparation for cryopreservation. **Hum. Reprod.**, v.13, p.376-380, 1998.

OKTAY, K.; KARLIKAYA, G. Ovarian function after autologous transplantation of frozen, banked autologous ovarian tissue. **N. Engl. J. Med.**, v.342, p.1919, 2000.

OKTAY, K. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: preliminary findings and implications for cancer patients. **Hum. Reprod.**, v.7, p.526-534, 2001.

PAYNTER, S.J.; COOPER, A.; FULLER, B.J.; SHAW, R.W. Cryopreservation of bovine ovarian tissue: structural normality of follicles after thawing and culture in vitro. **Cryobiology**, San Diego, v.38, p.301-308, 1999.

POSADA, M. N.; KOLP, L.; GARCÍA, J.E. Fertility options for female cancer patients: facts and fiction. **Fertil. Steril.**, v.75, p.647-656, 2001

SANTOS, R.R.; THARASANIT, T.; VAN HAEFTEN, T.; FIGUEIREDO, J.R.; SILVA J.R.; VAN DEN HURK, R. Vitrication of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrication methods. **Cell and Tissue Res.**, v.327, p.167-176, 2007.

SCHALKOLFF, E.M.; OSKOWITZ, P.S.; POWERS, R.D. Ultrastructural observations of human and mouse oocytes treated with cryopreservatives. **Biol. Reprod.**, v.40, p.379-393, 1989.

SILVA, J.R.V.; CARVALHO, F.C.A.; LUCCI, C.M.; SANTOS, R.R.; FIGUEIREDO, J.R. Conservation of goat preantral follicles *in situ* in coconut water solution. **Ciênc. Anim.** v.9, p.27-36, 1999.

SILVA J.R.V.; LUCCI, C.M.; CARVALHO, F.C.A.; BÃO, S.N.; COSTA, S.H.F.; SANTOS, R.R.; FIGUEIREDO, J.R. Effect of coconut water and Braun-Collins solutions at different temperatures and incubation times on the morphology of goat preantral follicles preserved in vitro. **Theriogenology**, v.54, p.809-822, 2000.

Van WEZEL, I.; RODGERS, R.J. Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment in vivo. **Biol. Reprod.**, Madison, v.55, p.1003-1011, 1996.

VINCENT, C.; PICKERING, S.J.; JOHNSON, M. The hardening effect of dimethylsulphoxide on the mouse zona pellucida requires the presence of an oocytes and is associated with a reduction in the number of cortical granules present. **J. Reprod. Fertil.**, v.89, p.253-259, 1990.