

## Morfometria e número de células da granulosa de folículos ovarianos pré-antrais de bovinos (*Bos indicus*) preservados a 4 °C em solução salina por diferentes períodos de tempo

*Morphometry and granulosa cells number of preantral ovarian follicles from bovine ("Bos indicus") preserved at 4 °C in saline solution for different periods of time*

LUNA, Hélder Silva e <sup>1\*</sup>; MUNHOZ, Anna Letícia Rigo <sup>2</sup>

<sup>1</sup>-Médico Veterinário, Doutor em Patologia Molecular, Professor Adjunto do Departamento de Biociências da UFMS/CPAQ, Brasil.

<sup>2</sup>-Bolsista de Iniciação Científica do Curso de Ciências Biológicas da UFMS/CPAQ, Brasil.

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

### RESUMO

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de se avaliar o efeito do resfriamento, a 4 °C, em diferentes períodos de tempo, na morfometria, e o número de células da granulosa de folículos pré-antrais de ovário bovino. Os ovários foram obtidos em abatedouro, divididos em 4 partes e distribuídos em 4 grupos: controle (sem resfriamento) e grupos resfriados por 12, 24 e 48 h em solução salina (NaCl a 0,9%), a 4 °C. Após tratamento, as amostras foram fixadas em Carnoy e encaminhadas para rotina histológica clássica. Para análise folicular, utilizou-se microscópio óptico e ocular com escala micrométrica. Foram analisados 340 folículos, sendo 242 primordiais e 98 primários. Os resultados obtidos indicam que os folículos primordiais e primários, quando resfriados em solução salina a 4 °C, não apresentam variação em sua morfometria e quantidade de células da granulosa, na comparação do grupo-controle com grupos 12, 24 e 48 h ( $P > 0,05$ ). Conclui-se que o resfriamento, à temperatura de 4 °C, não influencia a morfometria folicular e a quantidade de células da granulosa.

Palavras-chave: gametas, resfriamento, salina, vaca

### INTRODUÇÃO

A tecnologia de manipulação de tecido ovariano é de grande interesse e aplicabilidade para laboratórios que trabalham com melhoramento animal e

### SUMMARY

The present study had the objective to evaluate the effect of cooling at 4 °C, at different periods of time, in the morphometry and number of granulosa cells of preantral ovarian follicles of bovines. Ovaries were gotten from slaughterhouse, divided in 4 parts and distributed in 4 groups: control (without cooling) and groups cooled for 12, 24 and 48 h in saline solution (NaCl 0.9%) at 4 °C. After treatment, samples were fixed in Carnoy and forwarded to classic histology techniques. The follicles were analyzed with optic and ocular microscope with micrometric scale. Total of 340 follicles were analyzed, which 242 were primordial and 98 primary. Results indicated that the primordial and primary follicles when cooled in saline solution at 4 °C did not present variation in oocyte and diameter and amount of cells of the granulosa when comparing the control group to 12, 24 and 48 h groups ( $P > 0.05$ ). In conclusion, the temperature at 4 °C does not influence the morphometry of the follicles and the amount of the granulosa cells.

Key words: bovine, cooling, follicles, saline solution

conservação de recursos genéticos (HOLT, 1997; DEMIRCI et al., 2003). O estudo da conservação do tecido ovariano ganhou impulso, principalmente devido à importância na medicina humana, em especial, em pacientes submetidos a tratamentos que podem alterar os gametas

femininos (DONNEZ & BASSIL, 1998; OKTAY & KARLIKAYA, 2000; AUBARD et al., 2001; OKTAY, 2001; POSADA et al., 2001).

Trabalhos com resfriamento de ovócitos antrais e pré-antrais, têm sido realizados (WANG, 1995; ARAV, 1996; LUCCI et al., 2007). O estudo da exposição de gametas femininos a baixas temperaturas torna-se relevante uma vez que os locais de coleta das gônadas destinados às biotecnologias assistida encontram-se, comumente, em locais distantes dos laboratórios especializados, sendo o resfriamento um procedimento importante por possibilitar a redução dos danos celulares durante o transporte (SCHERNTHANER et al., 1997). Entretanto, cuidados nas metodologias de preservação devem ser observadas devido a possíveis riscos de alterações nos gametas (SHAW et al., 2000).

Em função dos baixos índices de sucessos nos processos de resfriamento e criopreservação de ovócitos antrais (NIEMAN, 1991; PARKS & RUFFING, 1992; NIEMAN, 1996; LUNA et al., 2001), a implementação de tecnologias de conservação de folículos pré-antrais faz-se de fundamental importância. Os ovócitos oriundos de folículos antrais são muito vulneráveis às baixas temperaturas. Por outro lado, ovócitos pré-antrais apresentam ainda pouca diferenciação celular, reduzido tamanho e menor taxa de metabolismo (GOSDEN et al., 1994), tornando-se mais resistentes aos procedimentos de conservação (DEMIRCI et al., 2001). O presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o efeito do resfriamento, a 4 °C, em diferentes períodos de tempo, na morfometria e número de células da granulosa de folículos pré-antrais de ovário bovino.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Os ovários foram obtidos em abatedouro localizado no município de Aquidauana-MS. Após a coleta, foram acondicionados em bolsa plástica, com solução salina (NaCl a 0,9%), à temperatura ambiente. O tempo de transporte entre o local de coleta e o início do processamento do material foi de 50-60 minutos. Foram utilizados animais da raça Nelore. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia do Campus de Aquidauana (CPAQ). Nesse local, os ovários foram lavados em álcool a 70 % por 10 segundos e em solução salina. Inicialmente, foram puncionados os folículos antrais superficiais do ovário e, em seguida, o ovário foi dividido em quatro partes, as quais foram distribuídas aleatoriamente nos tratamentos: uma parte destinada ao grupo-controle (imediatamente fixado em Carnoy) e as outras 3 partes imersas em frasco de vidro contendo solução salina em temperatura de 4 °C, em refrigerador, por 12, 24 ou 48 horas. Após o resfriamento, as partes de todos os grupos foram fixadas em Carnoy por 12 horas e encaminhadas para rotina histológica. Foram obtidos cortes seriados de 5 µm de espessura, corados por hematoxilina e eosina.

Para análise folicular, foi utilizado microscópio óptico em aumento de 400 x. Inicialmente, realizou-se a classificação dos folículos pré-antrais, de acordo com o estágio de desenvolvimento, como: primordiais (uma camada de células da granulosa de forma pavimentosa ao redor do ovócito), primários (uma única camada de células da granulosa de forma cubóide) e pequenos secundários (duas ou mais camadas de células da granulosa de forma cúbica). Em todas as classes foliculares foram realizadas a contagem do número de células da granulosa. Foram realizadas as análises morfométricas, utilizando-se microscópio óptico contendo ocular com escala micrométrica, conforme Kacinskis et al. (2005). Apenas os folículos que

apresentavam as células da granulosa organizadas, ooplasma homogêneo e núcleo não picnótico foram analisados. Para comparações entre os grupos, foi realizado ANOVA. Foram realizadas 4 repetições por tratamento (um ovário por repetição).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisados 340 folículos inclusos em tecido ovariano bovino, sendo 242 primordiais e 98 primários (Figura 1). Os pequenos folículos secundários não foram computados em função do reduzido número de estruturas encontradas. Entre os estudos de avaliações foliculares, a verificação de aspectos morfométricos e de células da granulosa têm sido realizados (BRAW-TAL & YOSSEFI, 1997;

LUNDY et al., 1999). Acredita-se que a normalidade desses parâmetros seja de fundamental importância para o desenvolvimento folicular. No presente trabalho, foi realizada a morfometria folicular/ovocitária e contagem do número de células da granulosa de folículos ovarianos pré-antrais de bovinos, resfriados a 4 °C por 12, 24 ou 48 horas. Os resultados relativos aos folículos primordiais, encontram-se na Tabela 1. Não foram verificadas diferenças significativas entre todos os grupos comparados ( $P > 0,05$ ). Os resultados dos folículos primários referentes ao grupo-controle e resfriados encontram-se na Tabela 2.

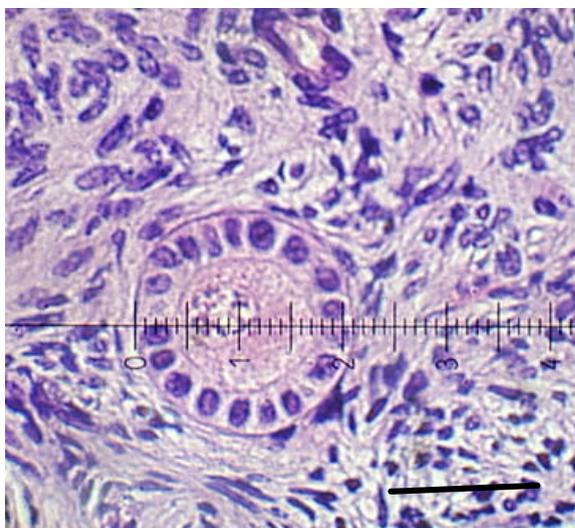


Figura 1. Folículo primário analisado em microscópio óptico com escala micrométrica (400 x). Barra = 25  $\mu$ m

Tabela 1. Média e desvio padrão do diâmetro folicular/ovocitário em micrômetros e número de células da granulosa de folículos primordiais dos grupos-controle e resfriados por 12, 24 e 48 horas

Grupos	n	Diâmetro do folículo	Diâmetro do ovócito	Número de células da Granulosa
Controle	67	36,33±6,68 (27,5-45)*	27,24±6,43 (12,5-35)	6,35±2,35 (1-13)
12 h	67	38,32±7,60 (25-52,5)	28,76±4,38 (25-37,5)	7,20±2,62 (3-14)
24 h	51	36,76±6,02 (25-47,5)	29,20±5,40 (20-37,5)	7,19±2,68 (3-12)
48 h	57	37,32 ± 4,35(30-47,5)	28,07±4,35 (20-40)	7,28±2,29 (3-12)

\*Números entre parênteses correspondem aos intervalos de variação

Tabela 2. Média e desvio padrão do diâmetro folicular/ovocitário em micrômetros e número de células da granulosa de folículos primários dos grupos-controle e resfriados por 12, 24 e 48 horas

Grupos	n	Diâmetro do folículos	Diâmetro do ovócito	Número de células da granulosa
Controle	19	46,05±9,40 (35-57,5)*	31,57±8,08 (25-37,5)	12,15±3,18 (7-19)
12 h	39	49,10±10,96 (30-62,5)	31,53±8,08 (25-47,5)	13,76±4,31 (10-21)
24 h	12	46,45±12,67 (30-77,5)	31,04±10,46 (20-50)	12,91±5,19 (8-22)
48 h	28	44,28±10,44 (50-65)	30,44±6,94 (35-50)	12,53± 3,39 (7-20)

\*Números entre parênteses correspondem aos intervalos de variação.

O teste estatístico aplicado constatou que não houve diferenças significativas ( $P>0,05$ ) entre todos os grupos comparados. Os resultados de folículos primordiais e primários são similares aos obtidos por Kacinskis et al. (2005), que realizaram a caracterização de folículos de bovinos zebus, sem nenhum tipo de tratamento, apresentando uma média de 36  $\mu\text{m}$  para os folículos, 28,1  $\mu\text{m}$  para os ovócitos e 7,3 para o número de células da granulosa em folículos primordiais. Para os folículos primários, relataram a média de 48,5  $\mu\text{m}$  para os folículos, 31,7  $\mu\text{m}$  para os ovócitos e de 14,6 para número de células da granulosa.

Os resultados encontrados, no presente estudo, mostraram que o resfriamento não causou alterações nas características foliculares analisadas, indicando que a forma de conservação dos ovários, em solução salina composta por NaCl a 0,9%, mostrou-se adequada à preservação das estruturas foliculares. A manutenção da morfometria do folículo/ovócito e o número de células da granulosa nos grupos

resfriados, observados no presente estudo, indicam que esses parâmetros celulares são bastante estáveis aos efeitos do resfriamento. Possivelmente, a redução do metabolismo celular pelo processo de resfriamento a 4 °C proporcionou adequada preservação tecidual, mesmo no período mais longo de conservação (48 horas).

Alguns pesquisadores resfriam os ovários logo após a coleta para transporte ao laboratório. Esse procedimento pode aumentar a sobrevivência dos ovócitos em função da redução do processo de isquemia ovariana, o que diminuiria a taxa de degeneração ovocitária (DEMIRCI et al., 2001).

Estudos com a finalidade de avaliar os efeitos do resfriamento na morfologia dos folículos têm sido realizados em várias espécies, mas não em relação aos efeitos morfométricos ocasionados pela baixa temperatura. Folículos foram resfriados a 4 °C por período de 18 horas em bovinos (LUCCI et al., 2004) e suínos (LUCCI et al., 2007), por período de 24 horas em ovinos (MATOS et al., 2004) e 12 horas

em cabras (CARVALHO et al., 2001). Todos foram mantidos em solução de NaCl a 0,9%, mostrando-se normais após análises histológicas, quando comparados aos respectivos grupos não resfriados. Esses resultados, citados na literatura, e os encontrados no presente estudo indicam que a solução de NaCl a 0,9% pode ser usada com sucesso em processos de resfriamento e transporte de tecido ovariano bovino. Outras soluções têm sido utilizadas com sucesso na conservação de ovários, como água de coco (SILVA et al., 1999; LUCCI et al., 2004) e meio TCM 199 (MATOS et al., 2004). Entretanto, é necessário que outros estudos celulares relacionados ao resfriamento, em bovinos, sejam realizados visando a verificação das condições que proporcionem o mínimo de alterações celulares, em particular com relação aos folículos pré-antrais, que efetivamente poderão contribuir na formação de bancos de gametas femininos.

## CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que os folículos primordiais e primários, quando expostos ao resfriamento, à temperatura de 4 °C, em solução de NaCl a 0,9%, nos períodos de 12, 24 e 48 horas, não apresentam alterações em sua morfometria e número de células da granulosa.

## AGRADECIMENTOS

*Agradecemos à FUNDECT e à UFMS pelo apoio financeiro e ao Frigorífico Buriti pelo fornecimento dos ovários. Também agradecemos ao laboratório de Histologia da UFMS, em nome da Profa. Iraceles Ap. Laura.*

## REFERÊNCIAS

- ARAV, A.; ZERON, Y.; LESLIE, S. B.; BEHBOODI, E.; ANDERSON, G. B.; CROWE, J.B. Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes. **Cryobiology**, v.33, p.589-599, 1996.
- AUBARD Y.; POIROT, C.; PIVER, P.; GALINAT, S.; TEISSIER, M.P. Are there indications for ovarian tissue cryopreservation. **Fertility and Sterility**, v.76, p.414-415, 2001.
- BRAW-TAL, R.; YOSSEFI, S. Studies *in vivo* and *in vitro* on the initiation of follicular growth in the bovine ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.109, p.165-171, 1997.
- CARVALHO, F. C. A.; LUCCI, C.M.; SILVA, J. R. V.; ANDRADE, E. R.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Effect of Braun-Collins and Saline solutions at different temperatures and incubation times on the quality of goat preantral follicles preserved *in situ*. **Animal Reproduction Science**, v.66, p.195-208, 2001.
- 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.
- 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. **Fertility and Sterility**, v.75, p.124-128, 2001.
- DONNEZ, J.; BASSIL, S. Indications for cryopreservation of ovarian tissue. **Human Reproduction**, v.4, p.248-259, 1998.
- GOSDEN R. G.; BAIRD D. T.; WADE J. C.; WEBB R. Restoration of fertility to oophorectomized sheep by ovarian autografts stored at 2196 °C. **Human Reproduction**, v. 9, p. 597- 603, 1994.

HOLT, W. V. The roles of cryobiology and reproductive technology in the conservation of biodiversity. **Cryo-Letters**, v.40, p.47-55, 1997.

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

LUCCI, C. M.; SCHREIER, L. L.; MACHADO, G. M.; AMORIM, C. A.; BÁO, S. N.; DOBRINSKY, J.R. Effects of Storing Pig Ovaries at 4 or 20 °C for Different Periods of Time on the Morphology and Viability of Pre-Antral Follicles. **Reproduction Domestic Animal**, v.42, p.76-82, 2007.

LUCCI, C. M.; KACINSKIS, M. A.; RUMPF, R. BAO, S. N. Effects of lowered temperatures and media on short-term preservation of zebu (*Bos indicus*) preantral ovarian follicles. **Theriogenology**, v.61, p.461-472, 2004.

LUNA, H. S.; FERRARI, I.; RUMPF, R. Influence of stage of maturation of bovine oocyte at time of vitrification on the incidence of diploid metaphase II at completion of maturation. **Animal Reproduction Science**, v.68, p.23-28, 2001.

LUNDY, T.; SMITH, P.; O'CONNELL, A.; HUDSON, N. L.; MCNATTY, K. P. Population of granulosa cells in small follicles of the sheep ovary. **Journal Reproduction Fertility**, v.115, p.251-262, 1999.

MATOS, M. H. T.; ANDRADE, E. R.; LUCCI, C. M.; BAO, S. N. J.; SILVA, R. V.; SANTOS, R. R.; FERREIRA, M. A. L.; COSTA, S. H. F.; CELESTINO, J. J. H.; FIGUEIREDO J. R. Morphological and ultrastructural analysis of sheep primordial follicles preserved in 0.9% saline solution and TCM 199. **Theriogenology**, v.62, p.65-80, 2004.

NIEMAN, H. Advances in cryopreservation of bovine oocytes and embryos derived in vitro and in vivo. **Arquivo da Faculdade de Veterinária**, v.24, p.67-81, 1996.

NIEMAN, H. Cryopreservation of ova and embryos livestock: current status and research needs. **Theriogenology**, v.35, p.109-124, 1991.

OKTAY, K. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: preliminary findings and implications for cancer patients. **Human Reproduction**, v.7, p.526-34, 2001.

OKTAY, K.; KARLIKAYA, G. Ovarian function after autologous transplantation of frozen banked autologous ovarian tissue. **New England Journal of Medicine**, v.342, p.1919, 2000.

PARKS, J. E.; RUFFING, N. A. Factors affecting low temperature survival of mammalian oocytes. **Theriogenology**, v.37, p.59-73, 1992.

POSADA, M. N.; KOLP, L.; GARCÍA, J.E. Fertility options for female cancer patients: facts and fiction. **Fertility and Sterility**, v.5, p.647-656, 2001.

SCHERNTHANER, W.; SCHMOLL, F.; BREM, G.; SCHELLANDER, K. Storing bovine ovaries for 24 hours between 14 and 21°C does not influence in vitro production of blastocysts. **Theriogenology**, v.47, p. 297-297, 1997.

SILVA, J. R. V.; CARVALHO, F. C. A.; LUCCI, C.M.; SANTOS, R. R.; FIGUEIREDO, J. R. Conservação de folículos pré-antrais caprinos in situ em solução de água de coco. **Ciência Animal**, v.9, p.27-36, 1999.

SHAW, J. M.; ORANRATNACHAI, A.; TROUNSON, A. O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**, v.53, p.59-72, 2000.

WANG, S.; HOLYOAK, G.R.; LIU, Y.; BUNCH, T. D. Developmental capacity and nuclear changes of bovine oocytes from ovaries stored for varied times and temperatures. **Theriogenology**, v.43, p.347, 1995.

Data de recebimento: 09/10/2007

Data de aprovação:08/01/2008