

Metodologia de avaliação morfológica de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano equino

Rafaela Amestoy de Oliveira¹; Antonio Sérgio Varela Junior²; Milena Miolo Antunes³; Eliza Moreira Piemolini⁴; Morgana Alves Borges⁵; Bruna da Rosa Cúrcio⁶.

¹Universidade Federal de Pelotas 1 – rafaamestoy@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas 2 – milenaantunes2@outlook.com

³Universidade Federal de Pelotas 2 – elizapiemolini@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas 2 – ab.morgana@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas 2 - varelajras@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas 3 – curcio.bruna@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A população de folículos primários caracterizados pela reserva ovariana é uma fonte de gametas finitos que estão disponíveis durante toda a vida reprodutiva da fêmea (ALVES et al., 2018). Além disso, a fisiologia ovariana equina possui diversas similaridades com a fisiologia reprodutiva humana (GINTHER et al., 1992). Com base nesses fatores, podemos considerar a espécie equina um potencial modelo para estudos comparativos de foliculogênese, utilizando folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano na preservação da fertilidade feminina (BAERWALD, 2009).

O ovário equino possui uma arquitetura peculiar dentre os mamíferos em razão do arranjo das zonas cortical e medular, além da presença de fossa ovulatória (GINTHER et al., 1992). Além disso, foi evidenciado que os folículos pré-antrais não são homogeneamente distribuídos por todo o parênquima do ovário equino (ALVES et al., 2018), e essa distribuição pode ser influenciada pela fase reprodutiva, estruturas ovarianas e idade da égua (ALVES et al. 2016).

A dinâmica folicular e o perfil hormonal reprodutivo das éguas são estudados há quase cinco décadas (GINTHER et al., 2008; GINTHER, 2017), e é indispensável o desenvolvimento de mais estudos com folículos pré-antrais equinos para avaliar o desenvolvimento folicular e aplicar este conhecimento em técnicas reprodutivas (GASTAL et al., 2011). Sabe-se ainda que a potencial fertilidade de fêmeas mamíferas pode ser mensurada por meio da avaliação desta dinâmica, pela densidade de folículos pré-antrais e pela quantificação do número e qualidade dos oócitos inclusos nestes folículos (ALVES et al., 2016).

Assim, a avaliação histológica é uma ótima ferramenta para avaliar características (morfometria, distribuição, qualidade, número e densidade) de uma população de folículos pré-antrais (ALVES et al., 2014). No entanto, para garantir a eficiência das técnicas de manipulação ovariana e preservar a qualidade morfológica tecidual e folicular, é imprescindível que seja realizada uma avaliação histológica de qualidade (AGUIAR et al., 2020). Além disso, estudos com folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano equino são escassos e a avaliação do processo de foliculogênese em éguas jovens permanece pouco elucidado.

Em síntese, o objetivo do presente trabalho é descrever a técnica de avaliação morfológica de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano equino após processamento histológico.

2. METODOLOGIA

O experimento foi realizado no Hospital Clínico Veterinário da Universidade Federal de Pelotas, sob a autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA 12986-2021 x). O ovário de uma égua adulta mestiça com aproximadamente 2,5 anos de idade foi coletado por meio de procedimento cirúrgico de ovariectomia unilateral (LOESCH e RODGERSON, 2003). Após a recuperação cirúrgica, o ovário foi lavado por 10 segundos em álcool 70%, e em seguida, foi lavado duas vezes em *Phosphate-Buffered Saline* (PBS) para remoção dos resquícios de sangue. Posteriormente no laboratório, foi realizada a retirada do tecido adiposo e ligamentos circundantes. As amostras foram recuperadas evitando áreas adjacentes a um corpo lúteo e folículo pré-ovulatório, 4 amostras de tecido de estroma ovariano de tamanho de cultivo *in vitro* (3 mm × 3 mm × 1 mm) próxima a fossa ovulatória foram obtidas com o auxílio de uma pinça de dissecação sem dente e bisturi. Os fragmentos foram dispostos em solução fixadora paraformaldeído 4% durante 6 horas, e após, armazenados em álcool 70% até posterior processamento histológico.

Em seguida, os fragmentos ovarianos foram desidratados pelo uso de uma série graduada de álcool, incluídos em cera de parafina e cortados em seções seriais de 7 µm. As amostras foram coradas com ácido periódico-Schiff (PAS) e contrastadas com hematoxilina e eosina (HE). As seções histológicas foram analisadas em microscópio óptico Olympus CX41 (Olympus America, Center Valley, PA).

A classificação folicular foi realizada em relação ao estágio de desenvolvimento dos folículos pré antrais de acordo com Hulshof e colaboradores (1994) da seguinte maneira: Folículo primordial (uma camada de células da granulosa achatadas circundando o oócito), folículo de transição (uma camada de células da granulosa achatadas e cubóides), folículo primário (uma camada de células granulosas cubóides) ou folículo secundário (duas ou mais camadas de células da granulosa). Além disso, também avaliamos quanto à morfologia folicular segundo Gougeon (1994), classificando-os como normais ou anormais. Os folículos normais, são caracterizados pela presença de um oócito com um núcleo visível rodeado por células da granulosa bem organizadas em uma ou mais camadas. Já os folículos anormais, são caracterizados por apresentarem uma camada de células da granulosa desorganizada ou separada da membrana basal, citoplasma retraído e oócito com núcleo picnótico.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, 4 fragmentos de tecido ovariano equino de tamanho de cultivo *in vitro* (3mm x 3mm x 1mm) foram avaliados através de processamento histológico gerando 58 lâminas. Destas, somente 18 lâminas

foram representativas com folículos. A partir da avaliação morfológica, foi possível avaliar 97 folículos pré-antrais, sendo que 83 (85,6%) apresentaram morfologia normal e 14 (14,4%) anormais. Quanto a classe folicular, do total de folículos encontrados 92 foram classificados como folículos primordiais, sendo 78 (80,4%) normais e 14 (14,4%) anormais. E somente 5 (5,15%) folículos estavam em estágio de transição, sendo todos estes normais. Nas seções avaliadas, não foram observados folículos primários e secundários.

A histologia clássica tem sido uma das abordagens mais convencionais para a avaliação de folículos pré-antrais em diferentes espécies (HAAG et al., 2013). O método de avaliação histológica permite a avaliação de várias características importantes como a morfologia folicular e oocitária, o

desenvolvimento folicular e o número de folículos inclusos no tecido ovariano (GOUGEON, 1996). Nossos resultados demonstram que através da técnica de histologia é possível avaliar uma quantidade significativa de folículos pré-antrais em um tamanho de tecido de cultivo *in vitro*.

Diversos estudos em diferentes espécies mamíferas demonstraram que a distribuição dos folículos pré-antrais no parênquima ovariano não é homogênea, e que isso é influenciado por diversos fatores, incluindo a idade do animal. Alves et al. (2018) concluíram que durante a juventude os folículos seguem um padrão de 'aglomeração' próxima ao centro geométrico do ovário, e que o envelhecimento faz com que ocorra uma dispersão desses folículos. Alves et al. (2016), utilizando 3 grupos de éguas com diferentes idades demonstraram que o envelhecimento causa uma redução no número de folículos morfológicamente normais, além de uma redução na densidade folicular. Corroborando com os resultados encontrados em nossa avaliação, onde uma maior porcentagem de folículos primordiais normais foram encontrados.

4. CONCLUSÕES

Através deste estudo, descrevemos a metodologia de avaliação folicular padrão ouro para classificar folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano equino.

AGRADECIMENTOS: A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro ao projeto e concessão de bolsas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR et al. Supportive techniques to investigate *in vitro* culture and cryopreservation efficiencies of equine ovarian tissue: A review. **Theriogenology**, 2020.

ALVES et al. Spatial distribution of preantral follicles in the equine ovary. **PloS one**, v. 13, n. 6, p. e0198108, 2018.

ALVES et al. The mare model to study the ovarian effects of dynamics of preantral follicles features. **Plos One**, v. 11, 2016

ALVES KA, Alves BG, Gastal GD, de Tarso SG, Gastal MO, Figueiredo JR, et al. The mare model to study the effects of ovarian dynamics on preantral follicle features. **PLoS ONE** 2016; 11:e0149693.

ALVES, K. A. Avaliação da densidade folicular e de estratégias para otimizar a obtenção de folículos pré-antrais equinos. 2014. 97 f. **Tese (Doutorado em Ciência Animal)** - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014. Disponível em: <https://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/5118>. Acesso em: 25 jul. 2021.

BAERWALD, A. R. Human antral folliculogenesis: what we have learned from the bovine and equine models. **Animal Reproduction (AR)**, v. 6, n. 1, p. 20-29, 2009.

GASTAL EL, Gastal MO, Wishral A & Davis J 2011 The equine model to study the influence of obesity and insulin resistance in human ovarian function. **Acta Scientiae Veterinariae** 39 57-70.

GINTHER OJ. Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspects. 2nd ed. **Plains Cross: Equiservices Publishing**; 1992

GINTHER, O.J. Follicle selection in mares: 90 years from observation to theory. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 54, p. 24-31, 2017.

GINTHER, O.J., GASTAL, E.L., GASTAL, M.O., BEG, M.A. Dynamics of the equine preovulatory follicle and periovulatory hormones: What's new? **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, p. 454-460, 2008

GOUGEON, Alain. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. **Endocrine reviews**, v. 17, n. 2, p. 121-155, 1996.

GRIFFIN, J. EMERY, B.R.; HUAG, I.; PETERSON, M.; CARRELL, D.T. Comparative analysis of follicle morphology and oocyte diameter in four mammalian species (mouse, hamster, pig, and human). **Journal of Experimental & Clinical Assisted Reproduction**, v.3, p.2, 2006.

GURGEL et al. Dinâmica folicular em éguas: aspectos intrafoliculares. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 2, p. 122 - 132, 2008.

HAAG, K. T. et al. Quantification, morphology, and viability of equine preantral follicles obtained via the Biopsy Pick-Up method. **Theriogenology**, v. 79, n. 4, p. 599-609, 2013.

HULSHOF, S. C. J. et al. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **Veterinary Quarterly**, v. 16, n. 2, p. 78-80, 1994.

LOESCH, Dawn A.; RODGERSON, Dwayne H. Surgical approaches to ovariectomy in mares. **Compendium**, v. 25, n. 862, p. e71, 2003.

ONO et al. Analysis of the equine ovarian structure during the first twelve months of life bt three-dimensional internal structure microscopy. **Theriogenology**, v. 77, n. 12, p. 1599-1603, 2015

WALT ML, Stabenfeldt GH, Hughes JP, Neely DP, Bradbury R. Development of the equine ovary and ovulation fossa. **J Reprod Fertil** 1979; Suppl 27:471–477.