

MÉTODO RÁPIDO DE FIXAÇÃO PARA AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DE TECIDO OVARIANO DE ÉGUAS

MORGANA ALVES BORGES¹; FRANCISCO LEO N. AGUIAR²; LUIZA GHENO³;
ANTONIO S. VARELA JUNIOR⁴; CARINE DAHL CORCINI⁵; BRUNA DA ROSA
CURCIO⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – ab.morgana@hotmail.com

²Instituto Federal da Paraíba – francisco.aguiar@ifpb.edu.br

³Universidade Federal de Pelotas – luizaghen@hotmail.com

⁴Universidade Federal do Rio Grande – varelajras@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – corcinicd@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – curciobruna@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

A reserva ovariana engloba uma coorte de folículos em estágios iniciais de desenvolvimento, conhecidos como folículos pré-antrais, os quais constituem a predominante proporção de gametas intraovarianos (cerca de 90%) (CORTVRINDT; SMITZ, 2001; ALVES et al. 2015). Essa população folicular reserva, caracterizada por sua fase inicial, desempenha um papel crucial no potencial reprodutivo e na fisiologia ovariana. No entanto, a grande parte destes folículos será perdida através do processo fisiológico de atresia (MCGEE; HSUEH, 2000). Atualmente, por meio da utilização de biotécnicas, é possível realizar a manipulação de folículos pré-antrais visando permitir seu completo desenvolvimento, e assim, possibilitando otimizar o potencial reprodutivo tanto em espécies domésticas quanto em humanos (GREEN; SHIKANOV, 2016; GASTAL et al. 2020; BENAMMAR et al. 2021).

Todavia, é essencial realizar um processamento tecidual adequado para viabilizar a avaliação morfológica dos folículos pré-antrais e do tecido ovariano, a fim de preservar o tecido estromal, e assegurar a elevada qualidade morfológica dos folículos pré-antrais (GASTAL et al. 2020; AGUIAR et al. 2020). Neste sentido, a histologia é uma técnica clássica padrão ouro para avaliação de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano equino, suas principais vantagens são o baixo custo e a prolongada preservação das amostras (GASTAL et al. 2020). No entanto, é indispensável a seleção criteriosa de uma solução fixadora apropriada para assegurar a adequada execução da avaliação histológica, com o intuito de realizar um protocolo de fixação capaz de manter a morfologia folicular fidedigna ao tecido ovariano fresco recuperado sem causar injúrias ao tecido (GASTAL et al. 2020).

Em síntese, os agentes fixadores histológicos visam a preservar a morfologia das estruturas e dos componentes celulares essenciais, inibindo processos como autólise tecidual, coagulação e endurecimento dos tecidos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008). Desta forma, é crucial considerar que a duração da exposição ao fixador pode afetar a integridade morfológica do tecido ovariano, levando em conta fatores como o tamanho do tecido, a eficácia fixadora e o período de ação da solução empregada (SANTOS et al. 2012; CULLING et al. 2014).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de um protocolo de fixação rápido com etanol 70% frente a um fixador clássico, com ênfase na qualidade morfológica de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano equino.

2. METODOLOGIA

O protocolo de pesquisa (#12986-2021) realizado neste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) da Universidade Federal de Pelotas. Seis éguas mestiças (idade 2-8 anos) previamente selecionadas de acordo com o escore de condição corporal (4 a 6, em uma escala de 1 a 9; HENNEKE et al. 1983) foram usadas neste estudo. Os ovários (n = 6, um por égua) foram coletados através de procedimento cirúrgico de ovariectomia unilateral (LOESCH; RODGERSON, 2003). Após a recuperação, cada ovário foi seccionado em oito fragmentos (3 mm x 3 mm x 1 mm; GOMES et al. 2012) distribuídos aleatoriamente (4 fragmentos por grupo, em um total de 48 fragmentos) em dois grupos: 1. Etanol 70% usado por 45 min (EtOH 70%); 2. Paraformaldeído 4% solução fixadora utilizada por 6h (PAF 6h). Após o tempo de fixação, os fragmentos foram submetidos ao processamento histológico clássico, e foram cortados em seções seriadas de 7 µm. As amostras foram coradas com ácido periódico-Schiff e contrastadas com hematoxilina e eosina, para posterior análise em microscopia de luz (400x). A classificação da morfologia dos folículos pré-antrais foi realizada conforme GOUGEON (1994), classificando-os em normal (folículo contendo um oócito intacto circundado por células da granulosa organizadas sem núcleo picnótico) ou anormal (camadas de células da granulosa desorganizadas ou destacadas da membrana basal, encolhimento do citoplasma e núcleo picnótico). Cada animal representou uma repetição e os resultados da análise estatística estão descritos em média ± erro padrão, sendo a comparação entre as médias realizada pelo Teste t-student.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir das análises histológicas realizadas, foram classificados como normais 2403 folículos no grupo EtOH 70% e 1261 folículos no PFA 6h. Em relação a morfologia anormal, observamos um total de 1213 folículos anormais no tratamento com EtOH 70% e 405 no PFA 6h. A partir da análise das médias encontradas, não foram observadas diferenças ($p > 0,05$) em relação à morfologia dos folículos pré-antrais nos tratamentos utilizados (Tabela 1).

Tabela 1. Avaliação morfológica de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano equino de acordo com os diferentes fixadores testados (Média ± erro padrão).

Tratamentos	*Morfologia folicular	
	Normal	Anormal
EtOH 70%	400,5 ± 210,9	202,1 ± 84,6
PFA 6H	210,1 ± 91,0	67,5 ± 24,8

Letras diferentes nas linhas demonstram diferença pelo Teste T-student

Nossos resultados demonstram que o EtOH 70% manteve a morfologia dos folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano equino similarmente ao PAF 6h. A fixação é um processo crucial para a preservação da morfologia do tecido, permitindo que ele seja analisado posteriormente.

O PAF é fixador amplamente utilizado em estudos histológicos, no entanto, pode causar encolhimento e deformação do tecido, interferindo na análise de algumas estruturas celulares (RICHTER et al. 2018). Na espécie equina, o PAF é comumente utilizado para avaliação histológica de folículos pré-antriais em diferentes tempos de exposição (GASTAL et al. 2017; AGUIAR et al. 2017). Entretanto, torna-se necessário o uso de um fixador rápido, com menor toxicidade e que preserve de forma fidedigna a morfologia folicular.

Neste estudo, observamos que o EtOH 70% preserva a integridade dos componentes teciduais mantendo sua arquitetura original. Além disso, o PAF requer um tempo de fixação mais longo, enquanto o EtOH 70% permite uma fixação de baixo custo, mais rápida e eficiente. Uma alternativa promissora aos protocolos de histologia, especialmente indicado para avaliações teciduais em que serão empregues posteriormente técnicas de imunocoloração.

4. CONCLUSÕES

O EtOH 70% preservou a morfologia normal de folículos pré-antrais incluídos em tecido ovariano equino, validando um protocolo rápido de fixação para avaliação histológica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, F. L. N., GASTAL, G. D. A., ALVES, K. A., ALVES, B. G., FIGUEIREDO, J. R., GASTAL, E.L. Supportive techniques to investigate in vitro culture and cryopreservation efficiencies of equine ovarian tissue: A review. **Theriogenology**, v. 156, p. 296-309, 2020.

AGUIAR, F. L. N., LUNARDI, F. O., LIMA, L. F., BRUNO, J. B., ALVES, B. G., MAGALHÃES-PADILHA, D. M., CIBIN, F. W. S., BERIONI, L., APGAR, G. A., LO TURCO, E. G., GASTAL, E. L., FIGUEIREDO, J. R. Role of EGF on in situ culture of equine preantral follicles and metabolomics profile. **Research in veterinary science**, v. 115, p. 155-164, 2017.

ALVES, K. A., ALVES B.G., ROCHA C.D., VISONNÁ M., MOHALLEM R.F.F., GASTAL M.O., JACOMINI J.O., BELETTI M.E., FIGUEIREDO J.R., GAMBARINI M.L., GASTAL E.L. Number and density of equine preantral follicles in different ovarian histological section thicknesses. **Theriogenology**, v. 83, n. 6, p. 1048-1055, 2015.

BENAMMAR, A., DERISOUD, E., VIALARD, F., PALMER, E., AYOUBI, J. M., POULAIN, M., CHAVATTE PALMER, P. The mare: a pertinent model for human assisted reproductive technologies?. **Animals**, v. 11, n. 8, p. 2304, 2021.

CORTVRINDT, R. G.; SMITZ, JOHAN E.J. Fluorescent probes allow rapid and precise recording of follicle density and staging in human ovarian cortical biopsy samples. **Fertility and sterility**, v. 75, n. 3, p. 588-593, 2001.

CULLING, C. F. A., ALLISON, R. T., BARR, W. T. **Cellular pathology technique**. Elsevier, 2014.

GASTAL, E. L., AGUIAR, F. L. N., GASTAL, G. D. A., ALVES, K. A., ALVES, B. G., FIGUEIREDO, J.R. Harvesting, processing, and evaluation of in vitro-manipulated equine preantral follicles: A review. **Theriogenology**, v. 156, p. 283-295, 2020.

GASTAL, G. D. A., ALVES, B. G., ALVES, K. A., SOUZA, M. E. M., VIEIRA, A. D., VARELA, A. S., FIGUEIREDO, J. R., FEUGANG, J. M., LUCIA, T., GASTAL, E. L. Ovarian fragment sizes affect viability and morphology of preantral follicles during storage at 4 C. **Reproduction**, v. 153, n. 5, p. 577-87, 2017.

GOMES, R.G., ANDRADE E.R., LISBOA L.A., CIQUINI A., BARREIROS T.R., FONSECA N.A.N., SENEDA M.M. Effect of holding medium, temperature and time on structural integrity of equine ovarian follicles during the non-breeding season. **Theriogenology**, v.78, p.731-6, 2012.

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

GREEN, L.J.; SHIKANOV, A. In vitro culture methods of preantral follicles. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 229-238, 2016.

HENNEKE, D. R., POTTER, G. D., KREIDER, J. L., YEATES, B. F. Relationship between condition score, physical measurements and body fat percentage in mares. **Equine veterinary journal**, v.15, n.4, p.371-372, 1983.

JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. Histologia Básica. 11a Edição. Rio de Janeiro: Guanabara, 2008.

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

MCGEE, E. A., HSUEH, A. J. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. **Endocrine reviews**, v.21, n.2, p. 200-214, 2000.

RICHTER, K. N., REVELO, N. H., SEITZ, K. J., HELM, M. S., SARKAR, D., SALEEB, R. S., D'ESTE, E., EBERLE, J., WAGNER, E., VOGL, C., LAZARO, D. F., RICHTER, F., COY-VERGARA, J., COCEANO, G., BOYDEN, E. S., DUNCAN, R. R., HELL, S. W., LAUTERBACH, M. A., LEHNART, S. E., RIZZOLI, S. O. Glyoxal as an alternative fixative to formaldehyde in immunostaining and super-resolution microscopy. **The EMBO Journal**, v.37, n.1, p. 139–159, 2018.

SANTOS, J. T. D., SILVA-SANTOS, K. C., ANDRADE, E. R., LISBOA, L. A., SCHNEIDER, C. L., CIQUINI, A., FERREIRA, R., JUNIOR, J.E.N., SENEDA, M. M. Efeito do tipo de fixador e tempo de fixação na morfologia de folículos pré-antrais ovarianos bovinos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 1, p. 297-303, 2012.