

## EFICIÊNCIA DO TRICRÔMICO DE GOMORI NA ANÁLISE HISTOLÓGICA DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS EM OVÁRIOS EQUINOS

LUIZA GHENO<sup>1</sup>; GUSTAVO DESIRE ANTUNES GASTAL<sup>2</sup>; ANTONIO SERGIO VARELA JÚNIOR<sup>3</sup>; CLARISSA FERNANDES FONSECA<sup>4</sup>; ISADORA PAZ OLIVEIRA DOS SANTOS<sup>5</sup>; BRUNA DA ROSA CURCIO<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [luizaghen@hotmail.com](mailto:luizaghen@hotmail.com)

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria - INIA Uruguay – [gastalgustavo@gmail.com](mailto:gastalgustavo@gmail.com)

<sup>3</sup>Universidade Federal do Rio Grande - [varelajras@gmail.com](mailto:varelajras@gmail.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – [clarissafonseca1@gmail.com](mailto:clarissafonseca1@gmail.com)

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas - [isadorapazoliveirasantos@gmail.com](mailto:isadorapazoliveirasantos@gmail.com);

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – [curciobruna@hotmail.com](mailto:curciobruna@hotmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

A análise histológica é um método tradicionalmente utilizado para a avaliação de folículos pré-antrais em ovários de animais domésticos, como bovinos (HULSHOF et al. 1994), ovinos (SANTOS et al. 2006), caprinos (LUCCI et al. 1999), equinos (HAAG et al. 2013a), e suínos (WU et al. 2001). Esse método possibilita a avaliação da morfologia dos folículos e oócitos em diferentes estágios de desenvolvimento. Em ovários equinos, a histologia é essencial para entender as características específicas da espécie, como a distribuição e organização dos folículos. Ela também fornece dados importantes sobre a maturação e qualidade dos oócitos, fundamentais para o desenvolvimento de biotécnicas reprodutivas eficazes (AGUIAR et al. 2020; GASTAL, et al. 2020; ADENIRAN, et al. 2021). A avaliação morfológica do tecido ovariano fresco após a coleta deve garantir a preservação das características estruturais celulares e parenquimatosas, assegurando assim a integridade e qualidade dos folículos pré-antrais (AGUIAR et al. 2020; GASTAL, et al. 2020).

Embora exista uma grande variedade de técnicas de coloração histológica, a hematoxilina e eosina (H&E) é a mais amplamente utilizada (ALTURKISTANI et al., 2016), principalmente devido à sua praticidade em evidenciar diferenças celulares. No caso do tecido ovariano, o H&E permite a análise da morfologia folicular, do desenvolvimento dos folículos, da quantidade de folículos inclusos no tecido, do número de camadas celulares que envolvem o oócito, bem como da densidade celular folicular e estromal (GASTAL et al., 2020).

O Tricrômico de Gomori (TG) é um corante comumente utilizado para a coloração de lâminas histológicas de tecidos de ovários de tubarões (RÊGO et al., 2013; RÊGO et al., 2020), testículos de tubarões (RÊGO et al., 2015; RÊGO et al., 2016) e em análises de alterações degenerativas da estrutura do disco intervertebral (WALTER et al., 2014). No entanto, até o momento, seu uso não foi descrito em estudos de histologia de tecido ovariano equino, visto que a coloração H&E é predominantemente empregada na rotina histológica, proporcionando bons resultados na quantificação de folículos pré-antrais.

O presente estudo tem como objetivo comparar o TG o corante padrão ouro H&E, possibilitando verificar a empregabilidade de um novo corante histológico nas análises dos componentes do tecido ovariano, em principal avaliar e classificar os folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano fresco.

### 2. METODOLOGIA

Foram selecionadas de 3 éguas mestiças crioulas, com idade de 3 a 4 anos e escore corporal 5 a 7 [escala onde 1 é considerada magra e 9 obesa (HENNEKE, et al. 1983)]. Essas éguas foram submetidas a ovariectomia unilateral para obtenção dos ovários, utilizando a técnica descrita por Auer e Stick (2018). Após a recuperação cirúrgica, os ovários (n=3, sendo um por égua) foram lavados por 10 segundos em álcool 70%, e em seguida, foram lavados duas vezes em Phosphate-Buffered Saline (PBS) para remoção de debris celulares. Posteriormente no laboratório, foi realizada a retirada do tecido adiposo e ligamentos circundantes. As amostras foram recuperadas evitando áreas adjacentes aos corpos lúteos e folículos pré-ovulatórios, 3 fragmentos de tecido de ovariano de tamanho de cultivo in vitro (3 mm x 3 mm x 1 mm) próximas à 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 4 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 hematoxilina e eosina (H&E) e com Tricrômico de Gômori (TG).

As análises morfológicas dos folículos pré antrais foram baseadas na classificação descrita por Alves, et al (2016). Foram analisados o número de folículos e suas classes foliculares, com microscópio de luz (Olympus CX41, Toquio, Japão) com ampliação de 400x. Referente as suas classes foliculares eles foram classificados como: primordiais (uma única camada de células da granulosa achatadas) e em desenvolvimento sendo os folículos transicionais (uma única camada de células da granulosa achatadas e cuboides), primários (uma única camada de células da granulosa cuboides) ou secundários (duas ou mais camadas de células granulosas cuboides, com zona pelúcida visível) (HULSHOF, et al. 1994; WRIGHT, et al. 1999). Quanto a morfologia dos folículos, eles foram classificados em normal (folículo contendo um oócito íntegro cercado por células da granulosa organizadas sem núcleo picnótico) e anormal (camadas desorganizadas de células da granulosa separadas da membrana basal, encolhimento do citoplasma e núcleo picnótico) como previamente descrito por Maciel, et al (2004). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Statistix versão 10.0 (Analytical Software, Tallahassee, EUA).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, foram analisadas 2574 seções histológicas de tecido ovariano equino provenientes de 9 fragmentos ovarianos (3 éguas, 3 fragmentos por animal). Dessas, 1275 seções foram coradas com Tricrômico de Gomori e 1299 com Hematoxilina e Eosina, com o objetivo de classificar a morfologia dos folículos pré-antrais. No total, 1593 folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano equino foram analisados e classificados conforme sua morfologia e classe folicular, dos quais 726 (45,6%) foram considerados normais e 867 (54,4%) anormais (Tabela 1).

**Tabela 1.** Quantificação e porcentagem de folículos normais de acordo com a classe folicular em coloração Tricrômico de Gomori e Hematoxilina e Eosina (H&E)

Treatamento	Primordial	Transição	Primário	Secundário	TOTAL
TG	46 (288/629)	44 (40/90)	33 (4/12)	- (0/0)	45.4 (332/731)

<b>H&amp;E</b>	46 (324/704) *	42 (54/128)	48 (13/27)	100 (3/3)	45.7 (394/862)
<b>TOTAL</b>	46 (612/1333)	43 (94/218)	44 (17/39)	100 (3/3)	45.6 (726/1593)

\*% (Normal / Total). Análise variância one-way e post hoc Tukey, a ausência de letras nas colunas denota ausência de diferença estatística entre as colorações ( $p > 0,05$ ).

Em relação à classe folicular, 83,7% dos folículos pré-antrais ( $n=1333$ ) foram classificados como primordiais, com distribuição similar entre as colorações de Tricrômico de Gomori ( $n=629$ ) e Hematoxilina e Eosina ( $n=704$ ). Além disso, 13,7% dos folículos analisados estavam em transição ( $n=218$ ), também com distribuição similar entre Tricrômico de Gomori ( $n=90$ ) e Hematoxilina e Eosina ( $n=128$ ). Já os folículos primários ( $n=39$ ) representaram 2,4% do total de folículos pré-antrais. Folículos pré-antrais secundários foram encontrados apenas em fragmentos corados com Hematoxilina e Eosina ( $n=3$ ).

O presente estudo demonstrou pela primeira vez que o uso do corante TG foi eficaz na coloração histológica de tecido ovariano equino, quando comparado ao corante controle H&E. Considerando a visualização adequada das estruturas ovarianas, e assim permitindo classificar os folículos pré-antrais de acordo com a sua classe e morfologia.

Os folículos são classificados com base no desenvolvimento do ovócito e nas células da granulosa. Os folículos primordiais fazem parte do grupo de estruturas quiescentes (não ativados) e são caracterizados por possuírem uma única camada de células da granulosa de formato achatado que circundam o ovócito. Após o momento de ativação desses folículos, as células da granulosa passam a se modificar de achatadas para cuboides, denominando-os de folículos de transição. Os folículos primários são compostos por uma única camada de células cuboides ao redor do ovócito. Dessa forma, avaliando e classificando a população folicular presente no tecido nos permite acompanhar além do desenvolvimento oocitário, também atresia folicular (PALMA et al. 2012). A coloração de TG permitiu a visualização adequada com acuidade essas características específicas necessárias para a classificação das classes foliculares e morfologia.

#### 4. CONCLUSÕES

Com base no exposto, podemos concluir que o TG é um corante histológico que pode ser utilizado para avaliação da morfologia de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano equino, sendo que mais estudos são necessários para ampliar a gama de potenciais colorações histológicas para estudos do tecido ovariano equino.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADENIRAN, B. V. et al. Improved preservation of ovarian tissue morphology that is compatible with antigen detection using a fixative mixture of formalin and acetic acid. **Human Reproduction**, v. 36, n. 7, p. 1871-1890, 2021.

- AGUIAR, F. L. N. et al. Supportive techniques to investigate in vitro culture and cryopreservation efficiencies of equine ovarian tissue: A review. **Theriogenology**, v. 156, p. 296-309, 2020
- ALTURKISTANI, H. A.; FARIS, M. T.; ZUHAIR, M. M. Histological stains: a literature review and case study. **Global journal of health science**, v. 8, p. 72-79, 2016.
- ALVES, K. A. et al. The mare model to study the effects of ovarian dynamics on preantral follicle features. **PloS one**, v. 11, n. 2, p. e0149693, 2016.
- AUER, Jorg A.; STICK, John A. Equine surgery-E-book. Elsevier Health Sciences, 2018.
- GASTAL, E. L. et al. Harvesting, processing, and evaluation of in vitro-manipulated equine preantral follicles: a review. **Theriogenology**, v. 156, p. 283-295, 2020.
- HAAG, K. T. et al. Equine preantral follicle harvesting, processing, and in vitro culture: the journey has already started. **Animal Reproduction (AR)**, v. 10, n. 3, p. 187-198, 2018.
- 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.
- LUCCI, Carolina Madeira et al. Study of preantral follicle population in situ and after mechanical isolation from caprine ovaries at different reproductive stages. **Animal Reproduction Science**, v. 56, n. 3-4, p. 223-236, 1999.
- MACIEL, G. A., BARACAT, E. C., BENDA, J. A., MARKHAM, S. M., HENSINGER, K., et al. Stockpiling of transitional and classic primary follicles in ovaries of women with polycystic ovary syndrome. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, p. 5321-5327, 2004.
- PALMA, Gustavo Adolfo et al. Biology and biotechnology of follicle development. **The Scientific World Journal**, v. 2012, n. 1, p. 938138, 2012.
- RÊGO, M. G. et al. Characterization of testicular morphology and spermatogenesis in the nurse sharks *Ginglymostoma cirratum* (Bonnaterre, 1788). **Zoomorphology**, v. 134, n. 1, p. 117-123, 2015.
- RÊGO, M. G. et al. Comparison of the Morphology and Histomorphometry of Spermatogenic Cyst of Three Sharks Species With Diametric Testes. **The Anatomical Record**, v. 299, n. 6, p. 759-768, 2016.
- RÊGO, M. G. et al. Morphological analysis and description of the ovaries of female silky sharks, *Carcharhinus falciformis* (Müller & Henle, 1839). **Neotropical Ichthyology**, v. 11, n. 4, p. 815-819, 2013.
- RÊGO, M. G. et al. Morphological description of ovary and uterus of the nurse shark (*Ginglymostoma cirratum*) caught off at the Fortaleza coast, Northeast Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 39, n. 12, p. 997-1004, 2020
- SANTOS, Regiane R. et al. Histological and ultrastructural analysis of cryopreserved sheep preantral follicles. **Animal reproduction science**, v. 91, n. 3-4, p. 249-263, 2006.
- WALTER, B. A. et al. Form and function of the intervertebral disc in health and disease: a morphological and stain comparison study. **Journal Of Anatomy**, v. 227, n. 6, p. 707-716, 2014.
- WRIGHT, C. S. et al. Effects of follicle-stimulating hormone and serum substitution on the in-vitro growth of human ovarian follicles. **Human Reproduction**, v. 14, n. 6, p. 1555-1562, 1999.
- WU, Ji; EMERY, Benjamin R.; CARRELL, Douglas T. In vitro growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. **Biology of reproduction**, v. 64, n. 1, p. 375-381, 2001.