

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**  
**PROGRAMA MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**CONSERVAÇÃO DE TECIDO OVARIANO EQUINO EM DIFERENTES**  
**TEMPERATURAS E PERÍODOS DE TEMPO**  
*CONSERVATION OF EQUINE OVARIAN TISSUE IN DIFFERENT TEMPERATURES*  
*AND PERIODS OF TIME*

**Viviane Bento da Silva**

CAMPO GRANDE  
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL  
FEVEREIRO DE 2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA  
PROGRAMA MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**CONSERVAÇÃO DE TECIDO OVARIANO EQUINO EM DIFERENTES  
TEMPERATURAS E PERÍODOS DE TEMPO**

**Viviane Bento da Silva**

Bióloga

**Orientadora: Profa. Dra. Carmem Estefânia Serra Neto Zúccari**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.  
Área de concentração: Produção Animal.

CAMPO GRANDE  
MATO GROSSO DO SUL – BRASIL  
2012

**VIVIANE BENTO DA SILVA**

**“CONSERVAÇÃO DE TECIDO OVARIANO EQUINO EM DIFERENTES  
TEMPERATURAS E PERÍODOS DE TEMPO”**

*“CONSERVATION OF EQUINE OVARIAN TISSUE IN DIFFERENT TEMPERATURES  
AND PERIODS OF TIME”*

Dissertação apresentada à Universidade Federal  
de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos  
do programa de Pós-Graduação em Ciência  
Animal para obtenção do título de Mestre.  
Área de concentração: Produção Animal

---

Profa. Dra. Carmem Estefânia Serra Neto Zúccari  
Orientadora

---

Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim

---

Profa. Dra. Iraceles Aparecida Laura

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

(Albert Einstein)

Ao meu avô Milton Bento (*in memoriam*) que sempre depositou em mim sua confiança e me ensinou o quanto devemos ser justos. Aos meus grandes heróis Mirian Bento da Silva & Orlando Batista da Silva, pais, e a minha avó Janícia Alves Bento que é meu maior exemplo de vida.

*Dedico*

## **AGRADECIMENTO ESPECIAL**

À minha Orientadora Profa. Dra. Carmem Estefânia Serra Neto Zúccari que me acolheu e deu força nas horas mais difíceis, pela orientação dedicada, pela confiança, ensinamentos, amizade sincera, pela paciência, contribuindo em meu crescimento acadêmico, profissional e pessoal.

Ao meu Co-orientador Prof. Dr. Hélder Silva e Luna, pela amizade e por ter me incentivado a realizar o curso de mestrado, pelo carinho e confiança que sempre depositou em mim.

À Profa. Dra. Iraceles Aparecida Laura e à Profa. Dra. Luciane Candeloro pela colaboração no desenvolvimento do trabalho.

À Profa. Dra. Eliane Vianna da Costa e Silva pelo auxílio durante as análises estatísticas deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ricardo Antônio de Amaral Lemos e seus orientados pelo apoio na obtenção dos ovários.

Ao CNPq pelo apoio financeiro ao projeto e à agência CAPES pela bolsa do programa de mestrado.

Meus sinceros e carinhosos agradecimentos.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo caminho que me indicaste, pois é com a fé e a confiança de que ele nos acompanha que nos motiva à enfrentar os obstáculos.

Aos meus Pais Orlando e Mirian por me apoiarem em todas as escolhas que fiz em minha vida, independente de suas próprias opiniões.

Aos meus avós Milton (*in memoriam*) e Janicia que estiveram comigo nesta caminhada, e que confiaram na minha capacidade me apoiando incondicionalmente.

Aos meus irmãos Ricardo e Robson, que sempre me incentivaram a fazer as escolhas que primeiramente me agradassem.

Ao meu namorado Rodrigo pela paciência, amor e carinho que tem me dado nestes últimos meses, tornando este período mais sereno.

Às grandes amigas Alice, Bruna e Evane que sempre estiveram me dando apoio mesmo à distância.

Agradeço também à minha amiga Anna Letícia que decidiu fazer o mesmo curso de mestrado e que mesmo em outra área de atuação sempre esteve ao meu lado.

Aos acadêmicos do curso de Medicina Veterinária, Ellen, Kryssia, Edjalma, Letícia e Guilherme, pela amizade, ajuda na condução dos experimentos e pelo convívio bem humorado.

Ao meu colega de mestrado Breno que se tornou um grande amigo nos últimos meses, me apoiando e me ajudando sempre que preciso.

Agradeço ao técnico de laboratório, Cláudio Gonçalves Oliveira, que me deu apoio durante a etapa de processamento histológico do trabalho, pela amizade e colaboração.

Ao programa de Mestrado em Ciência Animal representado pelo Coordenador Prof. Dr. Fernando Borges pelo apoio durante o curso.

À secretária Marilete, pela sua disposição, simpatia, carinho e atenção.

Aos professores do programa Mestrado em Ciência Animal por compartilharem seus conhecimentos.

À minha amiga Flávia, técnica do laboratório de botânica, que me auxiliou na morfometria dos folículos pré-antrais e ao Laboratório de Captura de Imagem do CCBS.

A todos os amigos e colegas de Mestrado pelo convívio e amizade.

Aos funcionários da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                 |        |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| <b>Figura 1.</b> Representação de folículos ovarianos. Folículos pré-antrais: (A) primordial; (B) intermediário, apresentando células pavimentosas e cúbicas; (C) primário e (D) secundário. Folículo antral: (E) pré-ovulatório. CG: células da granulosa..... | xiii4  |
| <b>Figura 2.</b> Ilustração de ovário mamífero com suas principais estruturas.....                                                                                                                                                                              | xviii9 |
| <b>Figura 3.</b> Comparação entre ovário não equino e equino, evidenciando a presença da fossa da ovulação e a inversão das regiões medular e cortical no ovário equino.....                                                                                    | xix0   |
| .....                                                                                                                                                                                                                                                           |        |



## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                                                                    |         |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| <b>Quadro 1.</b> Classificação morfológica de folículos pré-antrais de éguas de acordo com as características histológicas de normalidade e graus de degeneração após reação histoquímica com Ácido Periódico de Schiff (PAS)..... | xxxvii  |
| <b>Tabela 1.</b> Número médio ( $\pm$ erro padrão) de folículos pré-antrais de éguas, de acordo com o estágio de desenvolvimento, em diferentes temperaturas e tempos de conservação do tecido ovariano.....                       | xxxviii |
| <b>Tabela 2.</b> Número médio ( $\pm$ erro padrão) de folículos primordiais e primários nas classes morfológicas, de acordo com diferentes temperaturas e tempos de conservação.....                                               | xxxix   |
| <b>Tabela 3.</b> Número médio ( $\pm$ erro padrão) de folículos pré-antrais <i>in situ</i> observados por égua de acordo com o estágio de desenvolvimento....                                                                      | xl      |
| <b>Tabela 4.</b> Número médio ( $\pm$ erro padrão) de folículos primordiais e primários por égua de acordo com a classificação morfológica.....                                                                                    | 45      |

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO I

|                                                     |    |
|-----------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO.....                                  | 13 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA.....                       | 14 |
| 2.1. Folículos Ovarianos.....                       | 14 |
| 2.1.1. Folículos pré-antrais.....                   | 15 |
| 2.1.1.1. Folículos primordiais.....                 | 15 |
| 2.1.1.2. Folículos intermediários.....              | 15 |
| 2.1.1.3. Folículos primários.....                   | 15 |
| 2.1.1.4. Folículos secundários... ..                | 15 |
| 2.1.2. Folículos antrais.....                       | 15 |
| 2.2. Foliculogênese.....                            | 16 |
| 2.3. População Folicular Ovariana.....              | 16 |
| 2.4. Perda Folicular.....                           | 17 |
| 2.5. Ovário Mamífero.....                           | 18 |
| 2.6. Ovário Equino.....                             | 19 |
| 2.7. Conservação de Folículos Pré-antrais.....      | 20 |
| 2.8. Manipulação de Folículo Pré-antral Equino..... | 23 |
| 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....                  | 25 |

### CAPÍTULO II

|                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Conservação de tecido ovariano equino em diferentes temperaturas e períodos de tempo..... | 32 |
| Resumo.....                                                                               | 32 |
| Abstract.....                                                                             | 33 |
| Introdução.....                                                                           | 33 |
| Material e Métodos.....                                                                   | 36 |
| Coleta dos ovários.....                                                                   | 36 |
| Processamento histológico e classificação dos folículos.....                              | 37 |
| Análise estatística.....                                                                  | 38 |
| Resultados e Discussão.....                                                               | 39 |
| Conclusão.....                                                                            | 48 |
| Referências Bibliográficas.....                                                           | 48 |

## CONSERVAÇÃO DE TECIDO OVARIANO EQUINO EM DIFERENTES TEMPERATURAS E PERÍODOS DE TEMPO

RESUMO - O objetivo do trabalho foi testar o efeito de diferentes temperaturas e tempos de conservação em PBS (*phosphate buffer saline*) sobre a morfologia de folículos pré-antrais (FPA) inclusos em tecido ovariano equino. Foram utilizados ovários de sete éguas de diferentes idades, os quais foram divididos em fragmentos e distribuídos nos tratamentos: controle; 4°C - por 18, 24 ou 30 h; 18°C - por 4, 8 ou 12 h e; 39°C - por 2, 4 ou 6 h. Para o estudo *in situ* os fragmentos ovarianos foram fixados em Carnoy e processados para rotina histológica, sendo utilizada a técnica do PAS para destaque da membrana basal. As avaliações foram feitas sob microscopia de luz. Considerando o pequeno número de FPA encontrados nos diferentes tratamentos, foram usadas análises não paramétricas. Na comparação dos tempos dentro de cada temperatura, pelo teste de Kruskal-Wallis, verificou-se que não houve variação significativa para o número de FPA dentro da classificação morfológica. Foi observada variação significativa entre éguas quanto ao número de FPA encontrados e sua distribuição dentro das classes morfológicas. Conclui-se que devido ao pequeno número de folículos pré-antrais encontrado nos fragmentos de ovário equino, não foi possível avaliar os efeitos das diferentes temperaturas e tempos na conservação dessas estruturas.

**Palavras-chave:** égua, folículo ovariano, refrigeração

## CONSERVATION OF EQUINE OVARIAN TISSUE IN DIFFERENT TEMPERATURES AND PERIODS OF TIME

**ABSTRACT** - The aim of this study was to test the effect of different temperatures and storage times in PBS (phosphate buffered saline) on the morphology of preantral follicles (FPA) enclosed in mare ovarian tissue. Ovaries from seven mares of different ages were used, which were divided into fragments and distributed among treatments: control, 4°C - for 18, 24 or 30 h, 18°C - for 4, 8 or 12 h, 39°C - 2, 4 or 6 h. For *in situ* study ovarian fragments were fixed in Carnoy and processed for classical histology, using the PAS technique for analysis of the basement membrane. Evaluations were made under light microscopy. Considering the small number of preantral follicles found in the different treatments, non-parametric tests were used. Comparing the times within each temperature, using the Kruskal-Wallis test, we found that there was no significant difference related with the number of preantral follicles in the morphological classification. We observed difference ( $p < 0.05$ ) among mares on the number and distribution of FPA found within morphological classes. It was concluded that due to low number of preantral follicles found in the equine ovary, it was not possible to assess the effects of different temperatures and times in the conservation of these structures.

**Keywords:** mares, ovarian follicle, cooling

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil possui o maior rebanho equino da América Latina e o quarto em nível mundial, movimentando R\$ 7,3 bilhões com o Agronegócio Cavalo e gerando aproximadamente 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos (MAPA, 2011).

Segundo Pimentel e Carneiro (2008) a biotecnologia da reprodução compreende todas as técnicas utilizadas como ferramentas para aumentar a eficiência reprodutiva dos animais. Neste sentido, várias biotécnicas têm sido empregadas na reprodução de equinos. Dentre elas pode-se citar a inseminação artificial, transferência de embriões ou de ovócitos, injeção intracitoplasmática de espermatozóide e a clonagem.

Ao longo dos últimos anos as biotécnicas reprodutivas tiveram uma grande melhoria, especialmente nas espécies destinadas à produção, portanto que têm importância econômica, ou naquelas em risco de extinção. O primeiro alvo de estudos sobre a biologia reprodutiva envolveu espermatozoides e embriões. Recentemente, estudos sobre o gameta feminino têm recebido mais interesse em quase todas as espécies (Carrijo Jr et al., 2010). Isto porque, considerando-se os milhares de folículos pré-antrais presentes em um único ovário, a recuperação e cultivo desses ovócitos poderá otimizar a maturação e fecundação *in vitro* para fins de utilização em programas de transferência embrionária, transgenia e clonagem (Figueiredo et al., 2008). Assim, o desenvolvimento de protocolos de conservação dos folículos pré-antrais, por um período de tempo, é fundamental para o sucesso da criopreservação e/ou cultivo folicular *in vitro*. Contudo, para o aproveitamento máximo deste *pool* de ovócitos faz-se necessária a manutenção da viabilidade folicular durante o transporte do ovário do local de coleta até o laboratório, bem como durante as manipulações *in vitro*.

Diversas pesquisas estão sendo realizadas para definir um protocolo de conservação do tecido ovariano em diferentes espécies, porém até o presente momento testes visando a conservação, criopreservação e cultivo de folículos pré-antrais equinos não foram realizados. Neste sentido, a necessidade de implantar e desenvolver os procedimentos de manipulação de tecido ovariano na espécie equina são de fundamental importância uma vez que os equinos estão inseridos em contextos sócio-econômicos e culturais da população mundial.

Para um melhor entendimento da função ovariana serão abordados temas relacionados à classificação dos folículos, foliculogênese, população folicular, perda folicular, morfologia do ovário mamífero e equino e a conservação de tecido ovariano em curto prazo, aspectos que demonstram a importância da presente proposta de trabalho.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Folículos Ovarianos

O folículo é a unidade morfofuncional do ovário sendo constituído por um ovócito circundado pelas células somáticas da granulosa e tecais. De acordo com o grau de evolução podem ser divididos em: a) folículos pré-antrais ou não cavitários e b) antrais ou cavitários, sendo a população folicular constituída de 90-95% de pré-antrais. A diferença entre estes dois grupos está na presença de uma cavidade (antro) nos folículos antrais, que contém o fluido folicular. Este possui componentes do plasma sanguíneo e produtos secretados pelas células da granulosa, estando presentes glicosaminoglicanos, várias proteínas inclusive aquelas ligantes de esteroides e altas concentrações de progesterona, andrógenos e estrógenos (Junqueira & Carneiro, 2004).

Os folículos pré-antrais podem ser classificados em primordiais, intermediários, primários e secundários, ou antrais sendo eles os terciários e pré-ovulatórios (Figueiredo et al., 2008; Figura 1).

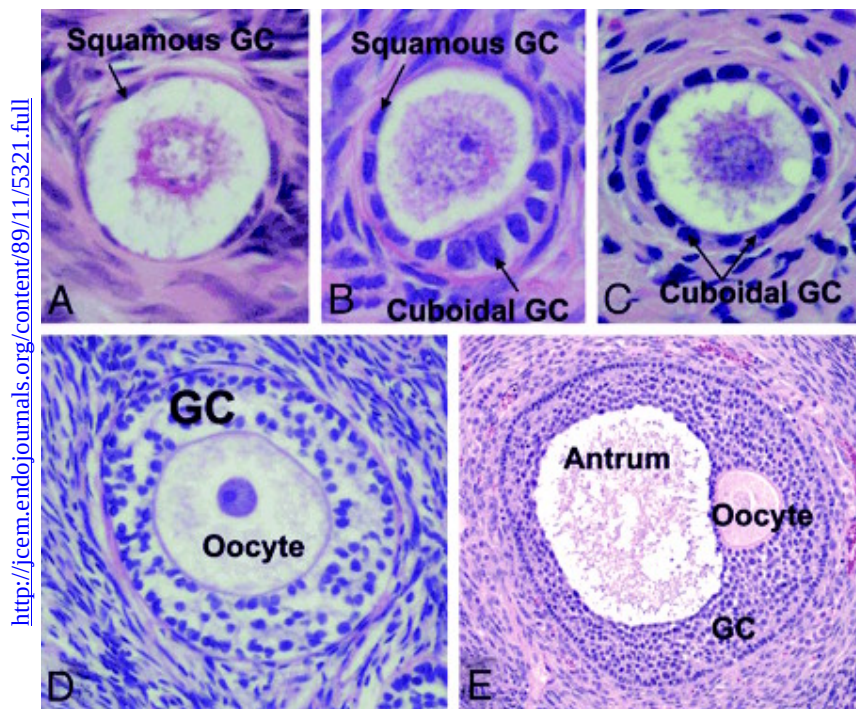


Figura 1. Representação de folículos ovarianos. Folículos pré-antrais: (A) primordial; (B) intermediário, apresentando células pavimentosas e cúbicas; (C) primário e (D) secundário. Folículo antral: (E) pré-ovulatório. CG: células da granulosa

### **2.1.1. Folículos pré-antrais**

Os folículos pré-antrais constituem o *pool* de reserva ovariano não renovável, que será utilizado ao longo da vida reprodutiva da fêmea (Silva-Santos et al., 2011). Estes podem ser diferenciados entre si pela forma e número de camadas de células da granulosa que circundam o ovócito imaturo (Figueiredo et al., 2008).

#### **2.1.1.1. Folículos primordiais**

Os folículos primordiais são os primeiros formados no ovário (Eppig & O'Brien, 1996) e consistem de um ovócito central, circundado por uma única camada de células da pré-granulosa de forma pavimentosa, delimitados por uma membrana basal (Braw-Tal & Yossefi, 1997), que os separa do estroma ovariano (Gordon, 1994).

#### **2.1.1.2. Folículos intermediários**

Quando os folículos possuem um ovócito circundado por células da granulosa com formatos pavimentoso e cúbico (Figueiredo et al., 2008).

#### **2.1.1.3. Folículos primários**

Caracterizam-se pela presença de um ovócito imaturo central, circundado por uma camada de células da granulosa de forma cúbica (Hulshof et al., 1994). Neste estágio ainda não são observadas células tecais diferenciadas, mas podem apresentar a zona pelúcida em formação (Cortvrindt & Smitz, 2001).

#### **2.1.1.4. Folículos secundários**

Os folículos secundários são caracterizados por apresentarem o ovócito central, circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa de forma cúbica (Hulshof et al., 1994), já podendo ser evidenciadas a zona pelúcida e a camada de células tecais (Van Den Hurk & Bevers, 1997).

### **2.1.2. Folículos antrais**

Os folículos antrais compreendem os terciários e os *De Graaf*, que correspondem àqueles maduros ou pré-ovulatórios. Os folículos terciários apresentam múltiplas camadas de células da granulosa, acúmulo de fluido folicular e a *corona radiata*, enquanto os maduros caracterizam-se pela presença do complexo ovócito *cumulus oophorus* (Figueiredo et al., 2008).

## **2.2. Foliculogênese**

A foliculogênese pode ser definida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular, iniciando com a formação do folículo primordial e culminado com o estágio de folículo pré-ovulatório (Saumande, 1981).

O ovócito não é apenas um receptor de ações parácrinas oriundas das células vizinhas na fase pré-antral e durante a foliculogênese. Ele participa ativamente na indução da proliferação e diferenciação das células da granulosa (Gilchrist et al., 2004). Para tanto, a comunicação intercelular é proporcionada por processos citoplasmáticos trans-zonais (TZP) e pela secreção de mediadores parácrinos.

Os TZPs são extensões das células da granulosa que penetram através da zona pelúcida e atingem a membrana do ovócito, onde junções do tipo *gap* permitem o transporte bidirecional de moléculas reguladoras (Albertini et al., 2001). Já a comunicação parácrina entre o ovócito e as células da granulosa, embora também bidirecional, é mediada por vários fatores de crescimento produzidos por ambos os tipos celulares, como a ativina, fator de crescimento e diferenciação-9 (GDF-9), fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1), *kit ligant* (KL) ou fator de células tronco (SCF), fator de crescimento epidermal (EGF), proteínas morfogenéticas ósseas (BMP-15), estradiol, fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento de queratinócitos (KGF), fator de crescimento e transformação- $\alpha$  e  $\beta$  (TGF- $\alpha$  e  $\beta$ ) neurotrofinas, peptídio intestinal vasoativo (VIP) e fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (Silva et al., 2011).

## **2.3. População folicular ovariana**

O estoque finito e não renovável de células germinativas é considerado como uma premissa básica da fisiologia da reprodução de fêmeas. O declínio progressivo do número de ovócitos ao longo da vida pós-natal ocorre principalmente por mecanismos apoptóticos (Seneda & Bordinon, 2007).

Em muitos mamíferos a população folicular ovariana é estabelecida ainda na vida intra-uterina (primatas e ruminantes – Knight & Glistler, 2006) ou em um curto período de tempo após o nascimento (roedores – Ojeda et al., 2000). Por outro lado, trabalhos têm demonstrado mecanismos envolvidos na formação de novas células germinativas e folículos na mulher (Bukovsky et al., 2005) e camundonga adulta (Johnson et al., 2004). Esses autores demonstraram indícios da continuidade da ovogênese e foliculogênese no período pós-natal,



pela atuação de células-tronco ovarianas. Foi evidenciada a presença de proteínas específicas do início da meiose em ovários de camundongas adultas. De acordo como o conceito atual, a expressão dessas proteínas deveria ocorrer apenas durante a vida intra-uterina (Seneda & Bordignon, 2007). Independente disso a população folicular difere entre as espécies, sendo de aproximadamente 1.500 na camundonga (Shaw et al., 2000), 160.000 na ovelha (Amorim et al., 2000), 35.000 na cabra (Lucci et al., 1999), aproximadamente 2.000.000 na mulher (Erickson, 1986) e 35.000 na égua (Driancourt et al., 1982), destacando-se uma forte variação individual (Ksiazkiewicz, 2006).

## **2.4. Perda folicular**

Ao longo da vida do animal ocorre uma redução ordenada, geralmente exponencial, no número de folículos pré-antrais (Shaw et al., 2000). Somente uma pequena parte (0,1%) dos folículos primordiais chega ao estágio de ovulação (Nuttinck et al., 1993), pois a maioria (99,9%) torna-se atresica durante as fases de crescimento e maturação (Otalá et al., 2002).

### **2.4.1. Atresia**

A atresia, apesar de causar a perda de vários folículos, é um evento crucial para a manutenção da homeostase ovariana em mamíferos, assegurando a ciclicidade das fêmeas e prevenindo o desenvolvimento de múltiplos embriões durante a gestação (Amsterdam et al., 2003). A atresia é um fenômeno natural comum a todas as espécies domésticas, podendo ocorrer em qualquer estágio do desenvolvimento folicular, sendo mais comum nos estágios antrais mais avançados (Glamoclija et al., 2005). Este processo é caracterizado por interrupção da mitose nas células da granulosa, separação das células da granulosa da membrana basal e morte do ovócito. Ela pode ocorrer por via apoptótica ou degenerativa, fazendo com que o ovário seja um órgão de baixíssima produtividade (Markstrom et al., 2002).

O processo de atresia usualmente difere entre folículos pré-antrais e antrais. Em folículos pré-antrais as primeiras alterações indicativas de atresia ocorrem no ovócito, como por exemplo, retração da cromatina nuclear e fragmentação ovocitária, o que desencadeia o processo de eliminação irreversível dos folículos ovarianos neste estágio de desenvolvimento (Morita & Tilly, 1999). É importante ressaltar que após a formação da cavidade antral ocorre uma alteração na sensibilidade do ovócito e das células da granulosa. A partir deste estágio o ovócito torna-se altamente resistente e as primeiras alterações indicativas de atresia são observadas nas células da granulosa (Jorio et al., 1991).

#### 2.4.2. Apoptose

A apoptose, também conhecida como morte celular programada, é um evento geneticamente determinado, ou seja, depende do balanço de genes pró e anti-apoptóticos, e é observada nos folículos ovarianos durante toda a vida, incluindo a fase pré-natal (Hussein, 2005). A apoptose é geralmente mediada por mecanismos intrínsecos, podendo também ser influenciada por fatores extrínsecos (Johnstone et al., 2002). Dentre os fatores que podem levar a apoptose destacam-se o estresse oxidativo, irradiação, ativação de genes promotores de apoptose, bem como danos no DNA, citocinas, proteínas virais e a deficiência de fatores de sobrevivência da célula (Johnson et al., 2002).

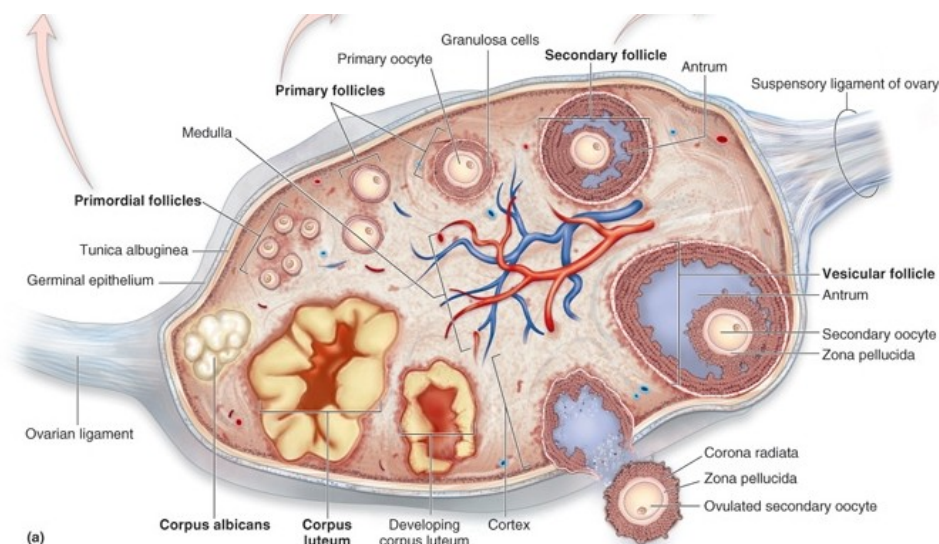
As características morfológicas da apoptose são condensação periférica da cromatina nuclear seguida pelo rompimento do citoesqueleto (Blondin et al., 1996). Em seguida, os corpos apoptóticos são fagocitados pelas células vizinhas, sem ocorrer processo inflamatório. Durante todo o processo a permeabilidade celular permanece inalterada e as organelas mantêm sua integridade morfofuncional.

#### 2.5. Ovário Mamífero

O ovário mamífero (Figura 2) é um órgão composto por muitos tipos de células diferenciadas, dentre elas, ovócitos, células da granulosa, da teca, luteais e do estroma ovariano. Todos os componentes ovarianos trabalham em conjunto para promover um ambiente ideal para que a gônada exerça as suas funções exócrina e endócrina (Hafez & Hafez, 2004). A função exócrina consiste da liberação de ovócitos maduros aptos para a fecundação, enquanto a endócrina envolve a produção de hormônios esteróides responsáveis pelo desenvolvimento das características sexuais secundárias femininas, pela atividade reprodutiva cíclica e pela manutenção da gestação (Knight & Glister, 2006).

O ovário é composto de medula e córtex, sendo sua superfície envolta pelo epitélio germinativo. Entre o córtex e o epitélio germinativo encontra-se a túnica albugínea rica em fibras colágenas e desprovida de vasos sanguíneos. No córtex ovariano se encontra a grande maioria dos folículos nos diferentes estádios de desenvolvimento, corpos hemorrágico, lúteo e *albicans*. A região medular está localizada na porção mais interna do ovário, com exceção dos equídeos, sendo constituída por tecido conjuntivo como fibroblastos, fibronectina, colágeno e fibras reticulares, células musculares lisas, nervos, vasos sanguíneos e linfáticos, responsáveis pela nutrição e sustentação do ovário, sua vascularização modifica-se de acordo com o perfil hormonal e é alterada durante o período pré-ovulatório. As modificações hemodinâmicas

parecem ser importantes no controle da função e duração do corpo lúteo. Modificações no fluxo sanguíneo precedem o declínio na secreção de progesterona, portanto sua redução do causa regressão do corpo lúteo (Hafez & Hafez, 2004).



[http://academic.kellogg.edu/herbrandsonc/bio201\\_mckinley/f28-4a-d\\_ovary\\_c.jpg](http://academic.kellogg.edu/herbrandsonc/bio201_mckinley/f28-4a-d_ovary_c.jpg)

Figura 2. Ilustração de ovário mamífero com suas principais estruturas

## 2.6. Ovário Equino

Ao ovário equino podem ser atribuídas duas superfícies (medial e lateral), duas bordas (dorsal ou fixada e ventral ou livre), e dois pólos ou extremidades (cranial ou tubárico e caudal ou uterino). O ovário tem forma de rim ou feijão com uma depressão muito proeminente, a fossa da ovulação, na região do bordo ventral. Os pólos são arredondados e o cranial está conectado a uma parte das fímbrias do oviduto. Pelo ligamento próprio do ovário o pólo caudal se liga a um ponto na extremidade do corno uterino (Ginther, 1992).

### *Estrutura interna*

Por definição o córtex de um órgão é a porção mais externa e a medula é a área vascularizada e mais central como nos rins, glândulas supra-renais, o cérebro ou o ovário das demais espécies. O ovário da égua adulta, no entanto, se destaca por sua disposição peculiar. A camada cortical, também conhecida como zona parenquimatosa, localiza-se na porção central do órgão. Já a camada medular está presente na porção externa, fornecendo ao órgão

equino sua distinta forma invertida (Figura 3). Desta forma, a ovulação nos equinos ocorre apenas na fossa da ovulação e o epitélio germinativo está limitado a essa reduzida região do ovário, que consiste no pequeno espaço onde o córtex alcança a superfície do órgão (Ginther, 1992).

Na potra recém-nascida, entretanto, os ovários têm formato oval e o epitélio germinativo cobre uma parte da superfície (Ginther, 1992). Walt et al. (1979) relatam que a formação da fossa da ovulação no feto começa no início da gestação, quando a camada cortical contrai-se da região do hilo do ovário para o pólo oposto. O restante da superfície do ovário caracteriza-se por tecido conjuntivo e mesotélio não modificado que tem como função prevenir a ovulação em outro local que não na fossa da ovulação.

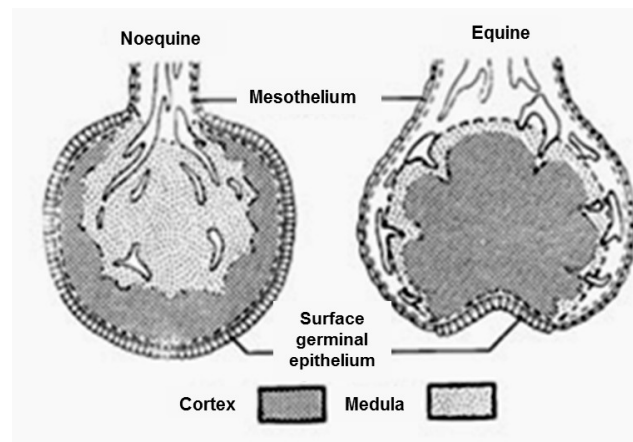


Figura 3. Comparação entre ovário não equino e equino, evidenciando a presença da fossa da ovulação e a inversão das regiões medular e cortical no ovário equino. Fonte: Ginther (1992)

## 2.7. Conservação de folículos pré-antrais

Visando evitar a enorme perda folicular que ocorre naturalmente *in vivo*, vem sendo desenvolvida a biotécnica de manipulação de ovócitos inclusos em folículos pré-antrais (MOIFOPA), que consiste no isolamento, conservação e cultivo folicular *in vitro* (Santos et al., 2004).

Animais de alto valor genético, geralmente, se encontram em locais distantes de laboratórios especializados, portanto, quando existe a necessidade de se coletar material germinativo, um protocolo adequado para o transporte deve ser adotado de forma a minimizar ao máximo os danos celulares.

Na dependência da distância e forma de remessa do material utilizado, o transporte pode requerer um período maior de tempo. Nestes casos, o resfriamento é usado, pois a redução da temperatura tecidual proporcionará ao folículo uma diminuição do metabolismo celular, consequentemente reduzindo o consumo de energia e retardando o processo de degeneração (Roy & Treacy, 1993). Portanto, o objetivo da preservação consiste em garantir que as células permaneçam com uma baixa taxa metabólica durante o período de estocagem, a fim de que possam ser resgatadas para continuar o seu desenvolvimento *in vitro*. Entretanto, para que isso seja possível, mesmo após longos períodos de preservação, alguns fatores essenciais para a sobrevivência das células devem ser levados em consideração, tais como: escolha do meio utilizado durante o processo de resfriamento, temperatura e tempo de preservação (Santos et al., 2004).

Diferentes soluções e meios têm sido utilizados para a preservação de folículos pré-antrais, podendo ser citados como exemplos: solução Braun-Collins (Carvalho et al., 2001), PBS (Santos et al., 2002), solução à base de água de coco (Lucci et al., 2004), solução salina 0,9% (Matos et al., 2004) e TCM 199 (Costa et al., 2005). Dentre os meios de conservação empregados, o Meio Essencial Mínimo (MEM) tem sido usado também no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais em diferentes espécies mantendo a viabilidade folicular (Jewgenow et al., 1998) e ativação de folículos primordiais (Martins et al., 2005). Técnicas para armazenamento de ovários por um curto período foram desenvolvidas para caprinos (Silva et al., 2000), ovinos (Andrade et al., 2002), bovinos (Lucci et al., 2004) e suínos (Lucci et al., 2007). Nesses estudos as temperaturas de 4, 20 e 39°C foram testadas para preservação de folículos pré-antrais e, em geral, a mais satisfatória é a de 4°C. Os protocolos eficientes de conservação de tecido ovariano em diferentes espécies estão relacionados no Quadro 1

Quadro 1. Protocolo de conservação de tecido ovariano em curto prazo, nas diferentes espécies, temperaturas, tempos e soluções

| Espécie   | Temperatura | Tempo                      | Solução                       | Autor                                                                                           |
|-----------|-------------|----------------------------|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| CAPRINO   | 4°C         | 12 h                       | - Solução Salina              | Silva et al. (2000)<br>Carvalho et al. (2001)<br>Ferreira et al. (2001)<br>Santos et al. (2002) |
|           |             |                            | - Braun-Collins               |                                                                                                 |
|           |             | 24 h                       | - Água de coco                |                                                                                                 |
|           |             |                            | - PBS                         |                                                                                                 |
|           | 20°C        | 4 h                        | - TCM 199                     |                                                                                                 |
|           |             |                            | - Água de coco                |                                                                                                 |
|           |             |                            | - Solução Salina              |                                                                                                 |
|           |             |                            | - TCM 199                     |                                                                                                 |
|           |             |                            | - Braun-Colins                |                                                                                                 |
|           |             |                            | - PBS                         |                                                                                                 |
|           | 39°C        | Resultados insatisfatórios |                               |                                                                                                 |
| BOVINO    | 4°C         | 18 h                       | - Solução salina              | Lucci et al. (2004)                                                                             |
|           | 20°C        | 6 h                        | - Água de coco                |                                                                                                 |
|           | 4°C         | 24 h                       | - Solução Salina              | Celestino et al. (2007)                                                                         |
|           |             |                            | - TCM 199                     |                                                                                                 |
|           | 20°C        | 4 h                        | - Solução Salina              |                                                                                                 |
|           |             | 6 h                        | - TCM 199                     |                                                                                                 |
|           | 39°C        | 2 h                        | - Solução Salina              |                                                                                                 |
| - TCM 199 |             |                            |                               |                                                                                                 |
| OVINO     | 4°C         | 24 h                       | - Solução Salina<br>- TCM 199 | Matos et al. (2004)                                                                             |

|       |      |      |                                    |
|-------|------|------|------------------------------------|
|       | 20°C | 24 h | - TCM 199                          |
|       |      | 12 h | - Solução Salina                   |
|       |      | 18 h |                                    |
|       | 4°C  |      |                                    |
| SUÍNO |      |      | Solução Salina Lucci et al. (2007) |
|       | 20°C | 6 h  |                                    |

Além das espécies relacionadas no Quadro 1., a manutenção da viabilidade de folículos pré-antrais também foi avaliada na espécie canina. Em experimento testando meio a base de água de coco em pó e PBS de 3 a 9°C, por 12, 24 e 36 h, Lima et al. (2010) verificaram que a solução a base de água de coco mantém a viabilidade folicular por até 36 h, enquanto a conservação da integridade destas células em PBS é mantida por até 24 h.

Durante o transporte dos ovários para o laboratório a ausência de aporte vascular interrompe o suprimento de oxigênio e energia para os ovários (Wongsrikeao et al., 2005). Com o intuito de reduzir esses efeitos, a hipotermia gerada pelas baixas temperaturas (4 e 20°C) provoca uma redução do metabolismo celular, aumentando a resistência de folículos à diminuição da oferta de nutrientes e oxigênio durante a preservação *in vitro* (Silva et al., 2003). Entretanto, a temperatura do metabolismo fisiológico (39°C) associada à baixa tensão de oxigênio, em estudos *in vitro*, leva à degeneração folicular em ovários bovinos (Celestino et al., 2007).

## 2.8. Manipulação de Folículo Pré-antral Equino

A utilização de ovócitos provenientes de folículos pré-antrais em técnicas de criopreservação e posterior cultivo *in vitro* é uma excelente alternativa para a preservação e propagação de reprodutoras valiosas como éguas de alto valor genético e de animais em vias de extinção, visto que estas células são mais tolerantes ao processo de criopreservação por possuírem algumas características que as tornam menos vulneráveis às crioinjúrias, como por exemplo, o pequeno tamanho do ovócito, menor número de células foliculares, baixo metabolismo do ovócito, menor quantidade de lipídeos intracitoplasmáticos, ausência de zona

pelúcida nos estádios iniciais e o núcleo em vesícula germinativa (Oktay et al., 1998). Entretanto, um fator limitante consiste na manutenção da qualidade folicular após remoção e transporte dos ovários. Além disso, é inviável a manipulação dos folículos isolados em curto período de tempo, afetando, desta forma, a viabilidade antes do cultivo *in vitro*. Assim, o desenvolvimento de protocolos de conservação de folículos pré-antrais é fundamental para o sucesso da criopreservação e/ou cultivo folicular *in vitro*.

Neste sentido, a necessidade de implantar e desenvolver os procedimentos de manipulação de tecido ovariano na espécie equina é da maior importância uma vez que os equinos estão inseridos em contextos sócio-econômicos e culturais da população mundial. Métodos visando à conservação de folículos pré-antrais foram desenvolvidos para as diversas espécies de animais domésticos, no entanto, até o presente momento não há relatos da adoção desta biotecnologia para o ovário equino.

O objetivo do presente trabalho foi testar o efeito de diferentes temperaturas e tempos de conservação sobre a morfologia de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano equino.



### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTINI, D.F.; COMBELLES, C.M.; BENECHCHI, E.; CARABATSOS M.J. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**, v.121, p.647-653, 2001.

AMORIM, C.A.; RODRIGUES, A.P.R.; LUCCI, C.M.; FIGUEIREDO, J.R.; GONÇALVES, P.B.D. Effect of sectioning on the number of isolated ovine preantral follicles. **Small Ruminant Research**, v.37, p.269-277, 2000.

AMSTERDAM, A.; SASSON, R.; KEREN-TAL, I.; AHARONI, D.; DANTES, A.; RIMON, E.; LAND, A.; COHEN, T.; DOR, Y.; HIRSH, L. Alternative pathways of ovarian apoptosis: death for life. **Biochemical Pharmacology**, v.66, p.1355-1362, 2003.

ANDRADE, E.R.; AMORIM, C.A.; MATOS, M.H.T.; RODRIGUES, A.P.R.; SILVA, J.R.V.; DODE, M.A.N.; FIGUEIREDO, J.R. Evaluation of saline and coconut water solutions in the preservation of sheep preantral follicles in situ. **Small Ruminant Research**, v.43, p.235-243, 2002.

BLONDIN, P.; DUFOUR, M.; SIRARD, M.A. Analysis of atresia in bovine follicles using different methods: flow cytometry, enzyme-linked immunosorbent assay, and classic histology. **Biology of Reproduction**, v.54, p.631-637, 1996.

BRAW-TAL, R.; YOSSEFI, S. Studies *in vivo* and *in vitro* on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.109, p.165-171, 1997.

BUKOVSKI, A.; CAUDLE, M.R.; SVETLIKOVA, M.; UPADHYAYA, B. Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.4, p.2-20, 2005.

CARRIJO JR, O.A.; MARINHO, A.P.S.; CAMPOS, A.A.; AMORIM, C.A.; BÁO, S.N.; LUCCI, C.M. Morphometry, estimation and ultrastructure of ovarian preantral follicle population in queens. **Cells Tissues Organs**, v.191, p.152-160, 2010.

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.

CELESTINO, J.J.H.; SANTOS, R.R.; MARTINS, F.S.; MATOS, M.H.T.; FIGUEIREDO, J.R.; COSTA, S.H.F.; SILVA, J.R.V.; RODRIGUES, A.P.R. Conservação de folículos pré-antrais bovinos em solução salina 0,9% ou TCM 199. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p.591-599, 2007.

CORTVRINDT, R.; SMITZ, J.E.J. *In vitro* follicle growth: Achievements in mammalian species. **Reproduction in Domestic Animal**, v.36, p.3-9, 2001.

COSTA, S.H.F.; ANDRADE, E.R.; SILVA, J.R.V.; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; LÔBO, R.N.B.; OHASHI, O.M.; FIGUEIREDO, J.R. Preservation of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue in saline or TCM 199 solutions. **Small Ruminant Research**, v.58, p.189-193, 2005.

DRIANCOURT, M.A.; PARIS, A.; ROUX, C.; PALMER, M.E. Ovarian follicular populations in pony and saddle-type mares. **Reproduction Nutrition Development**, v.22, p.1035-1047, 1982.

EPPIG, J.J.; O'BRIEN, M.J. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. **Biology of Reproduction**, v.54, p.197-207, 1996.

ERICKSON, G.F. An analysis of follicles development and ovum maturation. **Seminars in Reproductive Endocrinology**, p.233-254, 1986.

FERREIRA, M.A.L.; BRASIL, A.F.; SILVA, J.R.V.; ANDRADE, E.R.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Effects of storage time and temperature on atresia of goat ovarian preantral follicles held in M199 with or without indole-3-acetic acid supplementation. **Theriogenology**, v.55, p.1607-1617, 2001.

FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; SILVA, J.R.V. Manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais. In: Gonçalves, P.B.D.; Figueiredo, J.R.; Freitas, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Roca, 2. ed., p.303-327, 2008.

GILCHRIST, R.B.; RITTER, L.J.; ARMSTRONG, D.T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.431-446, 2004.

GINTHER, O.J. Reproductive anatomy. In: Ginther, O.J. **Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects**. 2. ed., Wisconsin, USA: Equiservices, 1992, p.16-17.

GLAMOCLIIJA, V.; VILOVIC, K.; SARAGA-BABIC, M.; BARANOVIC, A.; SAPUNAR, D. Apoptosis and active caspase-3 expression in human granulosa cells. **Fertility and Sterility**, v.83, p.426-431, 2005.

GORDON, I. Prenatal development of the bovine ovary. In: Gordon, I. Laboratory production of cattle embryos. Cambridge: CAB International: Raven Press, p.4349, 1994.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed., São Paulo: Manole, p.13-29, 2004.

HULSHOF, S.C.J.; FIGUEIREDO, J.R.; BECKERS, J.F.; BEVERS, M.M.; VAN DEN HURK, R. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **The Veterinary Quarterly**, v.16, p.78-80, 1994.

HUSSEIN, M.R. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. **Human Reproduction Update**, v.11, p.162-178, 2005.

JEWGENOW, K.; PENFOLD, L.M.; MEYER, H.H.; WILDT, D.E. Viability of small preantral ovarian follicles from domestic cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.112, p.39-47, 1998.

JOHNSON, C.A.; THOMPSON, Jr.D.L.; CARTMILL, J.A. Pituitary responsiveness to GnRH in mares following deslorelin acetate implantation to hasten ovulation. **Journal of Animal Science**, v.80, p.2681-2687, 2002.

JOHNSON, J.; CANNING, J.; KANEKO, T.; TILLY, J.L. Germ line stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. **Nature**, v.428, p.145-150, 2004.

JOHNSTONE, R.J.; RUEFFI, A.A.; LOWE, S.W. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. **Cell**, v.108, p.153-164, 2002.

JORIO, A.; MARIANA, J.C.; LAHLOU-KASSI, A. Development of the population of ovarian follicles during the prepubertal period in D`man and Timahdite sheep. **Animal Reproduction Science**, v.26, p.239-250, 1991.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.432-442, cap.22, 2004.

KSIAZKIEWICZ, L.K. Recent achievements in *in vitro* culture and preservation of ovarian follicles in mammals. **Reproductive Biology**, v.6, p.3-16, 2006.

KNIGHT, P.G.; GLISTER, C. TGF- $\beta$  super family members and ovarian follicle development. **Reproduction**, v.132, p.191-206, 2006.

LIMA, G.L.; COSTA, L.L.M.; CAVALCANTI, D.M.L.P.; RODRIGUES, C.M.F.; FREIRE, F.A.M.; FONTENELE-NETO, J.D.; SILVA A.R. Short-term storage of canine preantral ovarian follicles using a powdered coconut water (ACP<sup>®</sup>)-based medium. **Theriogenology**, v.74, p.146-152, 2010.

LUCCI, C.M.; KACINSKIS, M.A.; RUMPF, R.; BÁO, 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.

LUCCI, C.M.; AMORIM, C.A.; BÁO, S.N.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; SILVA, J.R.; GONÇALVES, P.B.D. Effect of the interval of serial sections of ovarian in the tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v.56, p.39-49, 1999.

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 preantral follicles. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, p.76-82, 2007.

MARKSTROM, E.; SVENSSON, E.C.; SHAO, R.; SVANBERG, B.; BILLIG, H. Survival factors regulating ovarian apoptosis – dependence on follicle differentiation. **Reproduction**, v.123, p.23-30, 2002.

MARTINS, F.S.; VAN DEN HURK, R.; SANTOS, R.R.; SILVA, J.R.V.; MATOS, M.H.T.; CELESTINO, J.J.H.; RODRIGUES, A.P.R.; PESSOA, C.; FERREIRA, F.V.A.; FIGUEIREDO, J.R. Development of goat primordial follicles after *in vitro* culture of ovarian tissue in Minimal Essential Medium supplemented with coconut water. **Animal Reproduction Science**, v.2, n.2, p.106-113, 2005.

MATOS, M.H.T.; ANDRADE, E.R.; LUCCI, C.M.; BÁO, S.N.; SILVA, J.R.V.; SANTOS, R.R.; FERREIRA, M.A.L.; 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.

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento MAPA. Equídeos. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/Internet-MAPA/paginainicial/animal/especies/equideos>>. Acesso em: 12 novembro 2011.

MORITA, Y.; TILLY, J.L. Oocyte apoptosis: Like sand through and hourglass. **Developmental Biology**, v.213, p.1-17, 1999.

NUTTINCK, F.; MERMILLOD, P.M.; DESSY, F. Characterization of *in vitro* growth of bovine preantral ovarian follicles: a preliminary study. **Theriogenology**, v.39, p.811-821, 1993.

OJETA, S.R.; ROMERO, C.; TAPIA, V.; DISSEN, G.A. Neurotrophic and cell-cell dependent control of early follicular development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.163, p.67-71, 2000.

OKTAY, K.; NEWTON, H.; AUSBARD, Y.; SALHA, O.; GOSDEN, R.G. Cryopreservation of immature human oocytes and ovarian tissue: an emerging technology? **Fertility and Sterility**, v.353, p.1-7, 1998.

OTALA, M.; ERKKILÄ, K.; TUURI, T.; SJÖBERG, J.; SOUMALAINEN, L.; SUIKKARI, A-M., PENTIKÄINEN, V.; DUNKEL L. Cell death and its suppression in human ovarian tissue culture. **Molecular Human Reproduction**, v.8, p.228-236, 2002.

PIMENTEL, C.A.; CARNEIRO, G.F. Biotécnicas Aplicadas à Reprodução de Equinos. In: Gonçalves, P.B.D.; Figueiredo, J.R.; Freitas, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2. ed. São Paulo, Roca, p.145-159, cap.8, 2008.

ROY, S.K.; TREACY, B.J. Isolation and long-term culture of human preantral follicles. **Fertility and Sterility**, v.59, p.783-790, 1993.

SANTOS R.R.; SILVA J.R.V.; COSTA S.H.F.; RODRIGUES A.P.R.; LÔBO R.N.B.; FIGUEIREDO J.R. Effect of 0,9% saline solution and phosphate buffer saline at different temperatures and incubation times on the morphology of goat preantral follicles. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.39, p.254-259, 2002.

SANTOS, R.R.; RODRIGUES, A.P.R.; FERREIRA, M.A.L.; LÔBO, R.N.B.; FIGUEIREDO, J.R. Conservação de folículos pré-antrais ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, p.32-39, 2003.

SANTOS, R.R.; RODRIGUES, A.P.R.; MARTINS, F.S.; MATOS, M.H.T.; CELESTINO, J.J.H.; FIGUEIREDO, J.R. Preservação de folículos pré-antrais de pequenos ruminantes. **Ciência Animal**, v.14, n.1, p.7-19, 2004.

SAUMANDE, J. Ovogenèse et folliculogenèse. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, v.157, p.29-38. 1981.

SENEDA, M.M.; BORDIGNON, V. Novos conceitos em foliculogênese. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, p.857-868, 2007.

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

SILVA, J.R.V.; LUCCI, C.M.; CARVALHO, F.C.A.; BÁO, 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.

SILVA, J.R.V.; BRASIL, A.F.; SANTOS, R.R.; COSTA, S.H.F.; RODRIGUES, A.P.R.; FERREIRA, M.A.L.; MACHADO, V.P.; FIGUEIREDO, J.R. Degeneration rate of goat primordial follicles maintained in TCM 199 or PBS at different temperatures and incubation times. **Ciência Rural**, v.33, p.913-919, 2003.

SILVA, V. B.; ZÚCCARI, C.E.S.N.; SILVA, E.V.C. Fatores de crescimento envolvidos no desenvolvimento de folículos pré-antrais. **Veterinária em Foco**, v.8, n.2, p.121-131, 2011.

SILVA-SANTOS, K.C; SANTOS, G.M.G.; SILOTO, L.S.; HERTEL, M.F.; ANDRADE, E.R.; RUBIN, M.I.B.; STURION, L.; MELO-STERZA, F.A.; SENEDA, M.M. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. **Theriogenology**, v.76, p.1051-1057, 2011.

VAN DEN HURK, R.; BEVERS, J. F. *In vivo* and *in vitro* development of preantral follicles. **Theriogenology**, v.47, p.73-82, 1997.

WALT, M.L.; STABENFELDT, G.H.; HUGHES, NEELY D.P.; BRADBURY R. Development of the equine ovary and ovulation fossa. **Journal of Reproduction and Fertility**, suppl.27, p.471-477, 1979.

WONGSRIKEAO, P.; OTOI, T.; KARJA, N.W.K.; AGUNG, B.; NII, M.; NAGAI, T. Effects of ovary time and temperature on DNA fragmentation and development of porcine oocytes. **Journal of Reproduction and Development**, v.51, p.87-97, 2005.

## **Conservação de tecido ovariano equino em diferentes temperaturas e períodos de tempo**

*Conservation of equine ovarian tissue at different temperatures and periods of time*

**V. Bento-Silva<sup>1</sup>, C.E.S.N. Zúccari<sup>2,3</sup>**

<sup>1</sup>Mestranda do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UFMS, Campo Grande, MS, Brasil

<sup>2</sup>Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campo Grande, MS, Brasil

<sup>3</sup>Correspondência: [carmem.zuccari@ufms.br](mailto:carmem.zuccari@ufms.br)

### **Resumo**

O objetivo do trabalho foi testar o efeito de diferentes temperaturas e tempos de conservação em PBS (*Phosphate buffer saline*) sobre a morfologia de folículos pré-antrais (FPA) inclusos em tecido ovariano equino. Foram utilizados ovários de sete éguas de diferentes idades, os quais foram divididos em fragmentos e distribuídos nos tratamentos: controle; 4°C - por 18, 24 ou 30 h; 18°C - por 4, 8 ou 12 h e; 39°C - por 2, 4 ou 6 h. Para o estudo *in situ* os fragmentos ovarianos foram fixados em Carnoy e processados para rotina histológica, sendo utilizada a técnica do PAS para destaque da membrana basal. As avaliações foram feitas sob microscopia de luz. Considerando o pequeno número de FPA encontrados nos diferentes tratamentos, foram usadas análises não paramétricas. Na comparação dos tempos dentro de cada temperatura, pelo teste de Kruskal-Wallis, verificou-se que não houve variação significativa para o número de FPA dentro da classificação morfológica. Foi observada variação significativa entre éguas quanto ao número de FPA encontrados e sua distribuição dentro das classes morfológicas. Conclui-se que devido ao pequeno número de folículos pré-antrais encontrado nos fragmentos de ovário equino, não foi possível avaliar os efeitos das diferentes temperaturas e tempos na conservação dessas estruturas.



Palavras-chave: égua, folículo ovariano, refrigeração

### **Abstract**

The aim of this study was to test the effect of different temperatures and storage times in PBS (phosphate buffered saline) on the morphology of preantral follicles (FPA) enclosed in mare ovarian tissue. Ovaries from seven mares of different ages were used, which were divided into fragments and distributed among treatments: control, 4°C - for 18, 24 or 30 h, 18°C - for 4, 8 or 12 h, 39°C - 2, 4 or 6 h. For *in situ* study ovarian fragments were fixed in Carnoy and processed for classical histology, using the PAS technique for analysis of the basement membrane. Evaluations were made under light microscopy. Considering the small number of preantral follicles found in the different treatments, non-parametric tests were used. Comparing the times within each temperature, using the Kruskal-Wallis test, we found that there was no significant difference related with the number of preantral follicles in the morphological classification. We observed difference ( $p < 0.05$ ) among mares on the number and distribution of FPA found within morphological classes. It was concluded that due to low number of preantral follicles found in the equine ovary, it was not possible to assess the effects of different temperatures and times in the conservation of these structures.

Keywords: mares, ovarian follicle, cooling

### **Introdução**

Os folículos pré-antrais constituem o *pool* de reserva ovariano não renovável que será utilizado ao longo da vida reprodutiva da fêmea (Silva-Santos et al., 2011), armazenando assim a grande maioria dos ovócitos presentes nos ovários de mamíferos. A utilização de ovócitos provenientes destes folículos em técnicas de reprodução assistida é uma excelente alternativa para a preservação e posterior propagação de animais valiosos e daqueles em vias de extinção. Entretanto, um fator limitante consiste na manutenção da qualidade folicular após

remoção e transporte dos ovários, pois, na maioria das vezes, esses animais encontram-se distantes dos laboratórios de reprodução (Figueiredo et al., 2008). Assim, o desenvolvimento de protocolos de conservação de folículos pré-antrais é fundamental para o sucesso da criopreservação e/ou cultivo folicular *in vitro*.

Sendo assim o método de conservação em curto prazo vem sendo utilizado na tentativa de minimizar os danos na qualidade folicular causados durante o transporte dos ovários. Dentre os protocolos empregados, a manutenção do tecido ovariano vem sendo realizada a 4, 20 ou 39°C, por períodos que variam de 2 a 24 h, usando diferentes meios como solução à base de água de coco (Silva et al., 2000), Braun-Collins (Carvalho et al., 2001), TCM 199 (Ferreira et al., 2001), solução salina 0,9% (Santos et al., 2002) e tampão fosfato salina (*phosphate buffer saline* – PBS; Silva et al., 2002). Esses meios também foram utilizados na preservação de folículos pré-antrais à temperatura fisiológica (39°C), destacando-se a importância de uma solução enriquecida e o curto tempo (2 h) de transporte para a manutenção da viabilidade folicular (Matos et al., 2004). Protocolos para a estocagem a baixas temperaturas foram desenvolvidos para cabras (Silva et al., 2001), ovelhas (Andrade et al., 2002) e vacas (Lucci et al., 2004), porém até o momento não há nenhum registro de um protocolo para a conservação de tecido ovariano equino. É de grande importância o desenvolvimento de pesquisas neste sentido, visto que, o Brasil possui o maior rebanho de equinos da América Latina e ocupa o quarto lugar no cenário mundial, com papel econômico de destaque ao movimentar R\$ 7,3 bilhões ao ano, somente com a produção de cavalos, além do Agronegócio Cavalo ser responsável pela geração de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos (MAPA, 2011).

O objetivo do presente trabalho foi testar o efeito de diferentes temperaturas e tempos de conservação sobre a morfologia de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano equino.

## **Material e Métodos**

### *Coleta dos ovários*

Os ovários foram coletados de éguas pertencentes a diferentes categorias e idades, submetidas à necropsia durante as aulas práticas da disciplina de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FAMEZ/UFMS. Foram utilizados os ovários direitos provenientes de cinco éguas (E), uma potra (P) e um feto (F). A idade das éguas foi estimada a partir da avaliação de sua arcada dentária, sendo de 23, 18, 14, 2 e 8 anos para as éguas E1, E2, E3, E4 e E5, respectivamente, além da potra de 6 meses (P6) e um feto com cerca de 7 meses de gestação (F7).

Para avaliar o efeito da temperatura e tempo de conservação sobre a morfologia dos folículos pré-antrais inclusos no ovário equino, foram obtidos fragmentos com aproximadamente 3 mm de espessura, mediante cortes longitudinais seriados feitos paralelamente à fossa da ovulação. Durante a manipulação dos ovários estes permaneceram imersos em PBS (*phosphate buffer saline*) e mantidos sobre placa aquecedora a uma temperatura de 38°C. Os fragmentos do tratamento controle foram fixados em Carnoy imediatamente após sua obtenção e os demais distribuídos nos seguintes tratamentos: 4°C - por 18, 24 ou 30 h; 18°C - por 4, 8 ou 12 h e; 39°C - por 2, 4 ou 6 h (Fig. 1). A manutenção dos fragmentos nas temperaturas de 4 e 18°C foi realizada em *containers* para transporte de sêmen equino e os fragmentos submetidos a 39°C foram mantidos em banho-maria. As amostras permaneceram em PBS. Após cada período de conservação os fragmentos foram imediatamente fixados em Carnoy por 12 horas e, a seguir, mantidos por 2 horas em álcool

70% que, após esse período, foi substituído por uma solução nova e nela permaneceu até o processamento histológico.

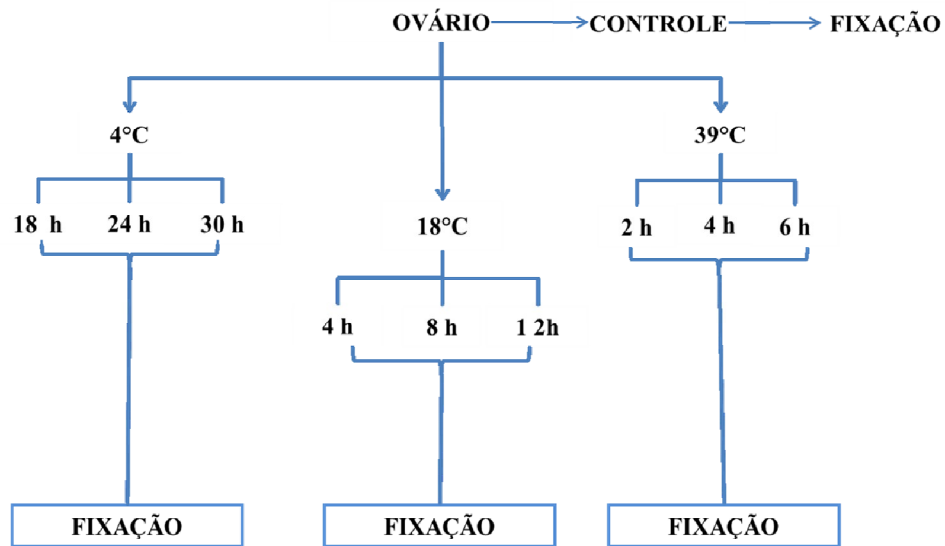


Figura 1. Esquema da metodologia de conservação de tecido ovariano equino em diferentes temperaturas e períodos de tempo

#### *Processamento histológico e classificação dos folículos*

Os fragmentos ovarianos foram desidratados em etanol, clarificados em xilol, embebidos em parafina e seccionados à espessura de 5  $\mu\text{m}$ . Foram montadas lâminas com secções retiradas a cada 50  $\mu\text{m}$  de espessura, até se completarem 300  $\mu\text{m}$ , a fim de evitar a contagem do mesmo folículo, portanto foram confeccionadas de duas a três lâminas por grupo contendo em geral três fragmentos cada. As secções foram submetidas à reação histoquímica de PAS (Ácido Periódico de Schiff), para avaliação morfológica e evidenciação da membrana basal.

À quantificação e avaliação morfológica dos FPA foi usada a microscopia de luz, em aumento de 100x para a localização dos folículos e de 400x para sua classificação. Foram analisados somente os FPA que apresentavam o núcleo do ovócito evidente na secção

observada. Os folículos pré-antrais foram classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento em primordial, ovócito circundado uma camada de células da pré-granulosa pavimentosa, primário, ovócito circundado por uma camada de células da granulosa de forma cúbica, e secundário quando o ovócito é circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa de forma cúbica (Hulshof et al., 1994). De acordo com as características histológicas foram considerados como normais ou degenerados segundo a morfologia e densidade das células da granulosa, integridade do ovócito e da membrana basal e, presença ou ausência de corpos picnóticos (Silva et al., 2001; Quadro 1).

À morfometria dos FPA foi utilizada a microscopia de captura de imagem e foram medidos apenas folículos classificados como normais observados nas lâminas da fêmea P6. Foi avaliado o diâmetro do folículo e do ovócito, de 80 folículos primordiais, 40 primários e 44 primários “iniciais”.

Quadro 1. Classificação morfológica de folículos pré-antrais de éguas de acordo com as características histológicas de normalidade e graus de degeneração após reação histoquímica com Ácido Periódico de Schiff (PAS)

| Classes           | Características histológicas                                                                                                     |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Normal            | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ovócito intacto</li> <li>- Células da granulosa organizadas e núcleo íntegro</li> </ul> |
| Degenerado Tipo 1 |                                                                                                                                  |
|                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ovócito pode se encontrar retraído</li> </ul>                                           |
| T1A               | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Núcleo picnótico</li> <li>- Membrana basal íntegra</li> </ul>                           |
|                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Ovócito pode se encontrar retraído</li> </ul>                                           |
| T1B               | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Núcleo picnótico</li> <li>- Membrana basal lesada</li> </ul>                            |
| Degenerado Tipo 2 |                                                                                                                                  |
|                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Picnose do ovócito</li> </ul>                                                           |
| T2A               | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Desorganização das células da granulosa</li> <li>- Membrana basal íntegra</li> </ul>    |
|                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Picnose do ovócito</li> </ul>                                                           |
| T2B               | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Desorganização das células da granulosa</li> <li>- Membrana basal lesada</li> </ul>     |

Fonte: adaptado de Silva et al. (2001)

#### *Análise estatística*

Considerando o pequeno número de folículos pré-antrais encontrados nos diferentes tratamentos foram usadas análises não paramétricas. Para comparar o efeito de tempo dentro das diferentes temperaturas utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis, em nível de 5% de significância. O estágio de desenvolvimento (primordial e primário) e as classes morfológicas (N, T1A, T1B, T2A, T2B) dos folículos avaliados foram comparados utilizando o teste de

*Bonferrone* em ANOVA de duas vias considerando os efeitos de égua e tratamento. O diâmetro médio dos folículos e ovócitos foi comparado pelo teste t de *Student*.

### Resultados e Discussão

Foram analisados 390 fragmentos ovarianos, distribuídos em 150 lâminas, constituindo-se um universo amostral médio de  $55,71 \pm 62,5$  fragmentos por égua, e comparando-se os tempos dentro de cada temperatura verificou-se que não houve variação significativa para o número de folículos pré-antrais em nenhum estágio de desenvolvimento folicular (Tab. 1).

Tabela 1. Número médio ( $\pm$  erro padrão) de folículos pré-antrais de éguas, de acordo com o estágio de desenvolvimento, em diferentes temperaturas e tempos de conservação do tecido ovariano

|                       |      | Estádio de desenvolvimento folicular |                     |
|-----------------------|------|--------------------------------------|---------------------|
| Temperaturas / Tempos |      | Primordial                           | Primário            |
| Controle              |      | $0,14 \pm 0,14$                      | $0,86 \pm 0,70$     |
| T 4°C                 | 18 h | $14,71 \pm 11,90$                    | $43,00 \pm 40,36$   |
|                       | 24 h | $84,57 \pm 79,99$                    | $121,14 \pm 115,88$ |
|                       | 30 h | $6,43 \pm 2,93$                      | $5,14 \pm 3,32$     |
|                       |      |                                      |                     |
| T 18°C                | 4 h  | $4,29 \pm 3,66$                      | $10,14 \pm 9,81$    |
|                       | 8 h  | $0,43 \pm 0,30$                      | $1,14 \pm 0,70$     |
|                       | 12 h | $0,57 \pm 0,57$                      | $1,71 \pm 1,71$     |
|                       |      |                                      |                     |
| T 39°C                | 2 h  | $1,00 \pm 1,00$                      | $2,43 \pm 1,63$     |
|                       | 4 h  | $32,86 \pm 30,38$                    | $111,14 \pm 100,46$ |
|                       | 6 h  | $1,71 \pm 1,04$                      | $4,71 \pm 2,54$     |
|                       |      |                                      |                     |

Kruskal-Wallis ( $p > 0,05$ )

Da mesma forma, não houve variação significativa do número de FPA, avaliados *in situ*, dentre as classes morfológicas, bem como para os estádios de desenvolvimento folicular, frente às diferentes temperaturas e tempos testados (Tab. 2).

Tabela 2. Número médio ( $\pm$  erro padrão) de folículos primordiais e primários nas classes morfológicas, de acordo com diferentes temperaturas e tempos de conservação

| Temperatura/<br>Tempo | Classificação morfológica |                   |                 |                   |                   |
|-----------------------|---------------------------|-------------------|-----------------|-------------------|-------------------|
|                       | N                         | T 1A              | T 1B            | T 2A              | T 2B              |
| Folículo Primordial   |                           |                   |                 |                   |                   |
| Controle              | 0,00 $\pm$ 0,00           | 0,00 $\pm$ 0,00   | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,14 $\pm$ 0,14   | 0,00 $\pm$ 0,00   |
| T 4°C                 |                           |                   |                 |                   |                   |
| 18 h                  | 1,43 $\pm$ 0,97           | 7,29 $\pm$ 7,29   | 0,00 $\pm$ 0,00 | 3,14 $\pm$ 2,49   | 2,86 $\pm$ 1,26   |
| 24 h                  | 3,14 $\pm$ 2,98           | 52,17 $\pm$ 51,81 | 4,43 $\pm$ 4,43 | 5,57 $\pm$ 4,94   | 19,29 $\pm$ 16,00 |
| 30 h                  | 0,43 $\pm$ 0,30           | 1,71 $\pm$ 0,92   | 0,00 $\pm$ 0,00 | 1,00 $\pm$ 0,53   | 3,29 $\pm$ 2,19   |
| T 18°C                |                           |                   |                 |                   |                   |
| 4 h                   | 0,00 $\pm$ 0,00           | 0,86 $\pm$ 0,86   | 0,14 $\pm$ 0,14 | 0,86 $\pm$ 0,86   | 2,43 $\pm$ 1,97   |
| 8 h                   | 0,00 $\pm$ 0,00           | 0,00 $\pm$ 0,00   | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,00 $\pm$ 0,00   | 0,43 $\pm$ 0,30   |
| 12 h                  | 0,00 $\pm$ 0,00           | 0,43 $\pm$ 0,43   | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,14 $\pm$ 0,14   | 0,00 $\pm$ 0,00   |
| T 39°C                |                           |                   |                 |                   |                   |
| 2 h                   | 0,14 $\pm$ 0,14           | 0,57 $\pm$ 0,57   | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,00 $\pm$ 0,00   | 0,29 $\pm$ 0,29   |
| 4 h                   | 0,57 $\pm$ 0,57           | 12,29 $\pm$ 12,12 | 0,29 $\pm$ 0,29 | 7,71 $\pm$ 7,39   | 12,0 $\pm$ 10,06  |
| 6 h                   | 0,00 $\pm$ 0,00           | 0,00 $\pm$ 0,00   | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,14 $\pm$ 0,14   | 1,57 $\pm$ 0,92   |
| Folículo Primário     |                           |                   |                 |                   |                   |
| Controle              | 0,00 $\pm$ 0,00           | 0,00 $\pm$ 0,00   | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,14 $\pm$ 0,14   | 0,00 $\pm$ 0,00   |
| T 4°C                 |                           |                   |                 |                   |                   |
| 18 h                  | 2,00 $\pm$ 1,84           | 11,57 $\pm$ 11,24 | 0,57 $\pm$ 0,57 | 14,14 $\pm$ 13,23 | 14,71 $\pm$ 13,39 |
| 24 h                  | 2,71 $\pm$ 2,40           | 41,86 $\pm$ 40,87 | 3,57 $\pm$ 3,41 | 26,86 $\pm$ 26,69 | 46,14 $\pm$ 42,57 |
| 30 h                  | 0,00 $\pm$ 0,00           | 0,14 $\pm$ 0,14   | 0,00 $\pm$ 0,00 | 1,14 $\pm$ 0,63   | 3,86 $\pm$ 3,21   |
| T 18°C                |                           |                   |                 |                   |                   |
| 4 h                   | 0,00 $\pm$ 0,00           | 1,29 $\pm$ 1,29   | 0,00 $\pm$ 0,00 | 3,14 $\pm$ 3,14   | 5,71 $\pm$ 5,38   |
| 8 h                   | 0,29 $\pm$ 0,18           | 0,14 $\pm$ 0,14   | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,14 $\pm$ 0,14   | 0,57 $\pm$ 0,43   |
| 12 h                  | 1,00 $\pm$ 1,00           | 0,14 $\pm$ 0,14   | 0,00 $\pm$ 0,00 | 0,00 $\pm$ 0,00   | 0,00 $\pm$ 0,00   |
| T 39°C                |                           |                   |                 |                   |                   |
| 2 h                   | 0,00 $\pm$ 0,00           | 0,43 $\pm$ 0,43   | 0,29 $\pm$ 0,29 | 0,00 $\pm$ 0,00   | 1,71 $\pm$ 0,94   |
| 4 h                   | 3,71 $\pm$ 3,39           | 36,43 $\pm$ 35,76 | 1,57 $\pm$ 1,57 | 35,71 $\pm$ 32,44 | 33,71 $\pm$ 27,42 |
| 6 h                   | 0,14 $\pm$ 0,14           | 0,14 $\pm$ 0,14   | 0,14 $\pm$ 0,14 | 1,00 $\pm$ 0,69   | 3,29 $\pm$ 1,70   |

Kruskal-Wallis ( $p > 0,05$ ). N- Normal: ovócito intacto, células da granulosa organizadas e núcleo íntegro; T1A – degenerado tipo 1A: ovócito pode se encontrar retraído, núcleo picnótico e membrana basal íntegra; T1B – degenerado tipo 1B: ovócito pode se encontrar retraído, núcleo picnótico e membrana basal lesada; T2A – degenerado tipo 2A: picnose do ovócito, desorganização das células da granulosa e membrana basal íntegra; T2B – degenerado tipo 2B: picnose do ovócito, desorganização das células da granulosa e membrana basal lesada

O número total de folículos analisados neste estudo foi 3.137, similar ao relatado para vacas, de 4.901 (Lucci et al., 2004) e 3.881 (Celestino et al., 2007); em cabras foram aproximadamente 2.060, (Silva et al., 2001) e 3.948 (Carvalho et al., 2001) e; em porcas



2.166 folículos pré-antrais (Lucci et al., 2007). Entretanto, no presente trabalho os problemas encontrados foram tanto a ausência de folículos pré-antrais nos fragmentos analisados dentro de cada tratamento, como a enorme variação individual observada (Tab. 3), o que não permitiu detectar possíveis diferenças entre os tratamentos. Esta dificuldade não foi relatada pelos autores citados, permitindo a eles a avaliação morfológica destes folículos e definição da melhor temperatura e tempo de manutenção da viabilidade folicular para cada espécie. Além disso, estimando a população total de folículos pré-antrais, Driancourt et al. (1982), para fêmeas equinas de 6 anos de idade, obteve uma variação individual de 5.000 a 70.000 folículos pré-antrais por ovário.

Apesar do número de folículos pré-antrais encontrados no presente estudo, não foi observada a presença de folículos secundários em nenhum fragmento analisado. Müller et al. (2009), ao estudarem a angiogênese do ovário equino, constataram que os folículos secundários apresentam um tamanho pequeno, sua ocorrência não é frequente e seu tempo de vida é curto, provavelmente sendo esta a razão pela qual não foi possível sua contagem.

Tabela 3. Número médio ( $\pm$  erro padrão) de folículos pré-antrais *in situ* observados por égua de acordo com o estágio de desenvolvimento

| Fêmeas | Idade estimada (anos) | Estádio de desenvolvimento folicular |      |                                  |      | Total |
|--------|-----------------------|--------------------------------------|------|----------------------------------|------|-------|
|        |                       | Primordial                           | n    | Primário                         | n    |       |
| E1     | 23                    | 0,00 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>         | 0    | 0,5 $\pm$ 0,22 <sup>b</sup>      | 5    | 5     |
| E2     | 18                    | 1,10 $\pm$ 0,60 <sup>a</sup>         | 11   | 0,20 $\pm$ 0,13 <sup>b</sup>     | 2    | 13    |
| E3     | 14                    | 1,60 $\pm$ 0,72 <sup>a</sup>         | 16   | 0,70 $\pm$ 0,42 <sup>b</sup>     | 7    | 23    |
| E4     | 2                     | 1,30 $\pm$ 1,09 <sup>a</sup>         | 13   | 1,20 $\pm$ 0,63 <sup>b</sup>     | 12   | 25    |
| E5     | 8                     | 7,10 $\pm$ 2,77 <sup>a</sup>         | 71   | 13,7 $\pm$ 3,47 <sup>ab</sup>    | 137  | 208   |
| P6     | 6 meses               | 86,50 $\pm$ 57,43 <sup>a</sup>       | 865  | 181,90 $\pm$ 101,36 <sup>a</sup> | 1819 | 2684  |
| F7     | 7 meses gestação      | 5,10 $\pm$ 2,66 <sup>a</sup>         | 51   | 12,80 $\pm$ 7,03 <sup>ab</sup>   | 128  | 179   |
| Total  |                       |                                      | 1027 |                                  | 2110 | 3137  |

Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa pelo teste de *Bonferrone* ( $p < 0,05$ )

E=égua; P=potra; F= feto

Resultados obtidos por Lucci et al. (2004), para ovários de vacas zebuínas, foram semelhantes aos encontrados em caprinos onde os folículos puderam ser estocados com sucesso a 4°C por até 18 h e a 20°C por apenas 6 h, sem danos morfológicos dos folículos pré-antrais. Neste mesmo trabalho foram analisados 3.873 folículos primordiais (79,0%), 766 primários (15,6%) e 262 secundários (5,4%).

É possível observar nos resultados descritos por Lucci et al. (2004) que o número de folículos primordiais analisados foi maior que o de folículos primários. Este resultado também foi descrito por Carvalho et al. (2001), encontrando em cabras 3.385 folículos primordiais, 372 primários e 191 secundários e por Lucci et al. (2007), em porcas, 1.805 folículos primordiais e 361 em crescimento, incluindo primários e secundários.

Diferindo dos resultados obtidos pelos pesquisadores citados, o número de folículos primordiais (1.027) encontrados no presente trabalho foi inferior ao de primários (2.110). Esta diferença pode estar relacionada à forma como os folículos foram classificados, visto que, segundo Figueiredo et al. (2008) existe uma categoria conhecida como folículos intermediários, caracterizados pela presença de células da granulosa tanto de forma pavimentosa quanto cúbica circundando o ovócito. Esta classe folicular não foi levada em consideração durante a análise das lâminas, sendo classificados como folículos primários todos aqueles que apresentavam células da granulosa de forma cúbica, portanto superestimando assim a população de folículos primários.

Outra hipótese para esta diferença é que contrastando com a classificação adotada aqui, alguns autores consideram como folículos primordiais aqueles que apresentam uma camada de células da granulosa de forma pavimentosa ou pavimentosa-cúbica ao redor do ovócito (Munhoz & Luna, 2008; Carrijo Jr et al., 2010; Lima et al., 2010; Silva-Santos et al., 2011).

Em estudo sobre a constituição folicular do ovário de elefante africano, Stansfield et al. (2011) observaram que o *pool* de reserva desta espécie é constituído por folículos primários “iniciais”, que apresentam ovócito circundado por uma camada de células pavimentosas e ao menos uma célula cúbica, representando cerca de 75% dos folículos pré-antrais presentes no ovário, enquanto que os folículos primordiais representam menos de 2% desta população.

A partir do presente estudo pode-se supor que na espécie equina este tipo de folículo primário “inicial”, da mesma forma como descrito em elefantes (Stansfield et al., 2011), também constitua o principal *pool* de reserva de folículos pré-antrais, fato sugerido através dos resultados obtidos, pois o número de folículos primários foi superior ao de primordiais.

A avaliação morfométrica dos folículos pré-antrais da potra de 6 meses de idade revelou que o diâmetro médio dos folículos primários (n=40) e intermediários (n=44; primários “iniciais”) foi  $47,78 \pm 8,52$  e  $44,44 \pm 3,99$   $\mu\text{m}$ , respectivamente ( $p < 0,05$ ). Já os folículos primordiais apresentaram diâmetro significativamente inferior aos demais, sendo de  $38,88 \pm 3,57$   $\mu\text{m}$ , facilitando a identificação destas células. Do mesmo modo, variação significativa ocorreu entre os diâmetros dos ovócitos de folículos primordiais e primários ( $32,07 \pm 3,76$  vs  $36,99 \pm 6,64$   $\mu\text{m}$ ;  $p < 0,05$ ), enquanto os intermediários ( $35,51 \pm 4,17$   $\mu\text{m}$ ) não diferiram dos demais estádios de desenvolvimento.

Szlachta & Tischner (1998), avaliando a distribuição de folículos pré-antrais no ovário de éguas de 6 anos de idade, encontraram 821 folículos, distribuídos em fragmentos de cortes transversais (567 folículos) e longitudinais (256 folículos). Segundo os autores os folículos apresentaram grande dispersão podendo ser encontrados isolados ou agrupados “em ninhos” de dois a sete folículos, além disso, foram observados em todo o parênquima ovariano, independente do tipo de corte feito no ovário. No entanto, as fêmeas utilizadas no presente

trabalho tinham idade variando de 7 meses de gestação (feto) até os 23 anos, e a maior quantidade de folículos pré-antrais foi detectada na potra de 6 meses de idade. O padrão de distribuição descrito por esses autores não foi observado nos ovários usados neste experimento, o mesmo sendo verificado em todos os tratamentos (Tab. 4). Em relação à disposição dos folículos pré-antrais no parênquima, estes também foram encontrados isolados ou em “ninhos”.

1 Tabela 4. Número médio ( $\pm$  erro padrão) de folículos primordiais e primários por égua de acordo com a classificação morfológica

| Fêmeas    | Folículo Primordial (n) |    |                      |     |                   |    |                      |     |                      |     |
|-----------|-------------------------|----|----------------------|-----|-------------------|----|----------------------|-----|----------------------|-----|
|           | N                       | n  | T 1A                 | n   | T 1B              | n  | T 2A                 | n   | T 2B                 | n   |
| E1        | $0,00 \pm 0,00^a$       | 0  | $0,00 \pm 0,00^a$    | 0   | $0,00 \pm 0,00^a$ | 0  | $0,00 \pm 0,00^b$    | 0   | $0,00 \pm 0,00^a$    | 0   |
| E2        | $0,00 \pm 0,00^a$       | 0  | $0,00 \pm 0,00^a$    | 0   | $0,10 \pm 0,10^a$ | 1  | $0,20 \pm 0,20^b$    | 2   | $0,80 \pm 0,42^a$    | 8   |
| E3        | $0,10 \pm 0,10^a$       | 1  | $0,00 \pm 0,00^a$    | 0   | $0,00 \pm 0,00^a$ | 0  | $0,20 \pm 0,13^b$    | 2   | $1,30 \pm 0,62^a$    | 13  |
| E4        | $0,00 \pm 0,00^a$       | 0  | $0,60 \pm 0,60^a$    | 6   | $0,00 \pm 0,00^a$ | 0  | $0,40 \pm 0,30^{ab}$ | 4   | $0,30 \pm 0,21^a$    | 3   |
| E5        | $0,50 \pm 0,22^a$       | 5  | $1,10 \pm 0,48^a$    | 11  | $0,00 \pm 0,00^a$ | 0  | $0,80 \pm 0,42^{ab}$ | 8   | $4,70 \pm 2,19^a$    | 47  |
| P6        | $3,20 \pm 2,12^a$       | 32 | $49,90 \pm 36,01^a$  | 499 | $3,30 \pm 3,08^a$ | 33 | $10,50 \pm 5,92^a$   | 105 | $19,60 \pm 12,67^a$  | 196 |
| F7        | $0,20 \pm 0,20^a$       | 2  | $1,10 \pm 0,67^a$    | 11  | $0,00 \pm 0,00^a$ | 0  | $1,00 \pm 0,63^{ab}$ | 10  | $2,80 \pm 1,49^a$    | 28  |
| TOTAL (n) |                         | 40 |                      | 527 |                   | 34 |                      | 131 |                      | 295 |
| Fêmeas    | Folículo Primário (n)   |    |                      |     |                   |    |                      |     |                      |     |
|           | N                       | n  | T 1A                 | n   | T 1B              | n  | T 2A                 | n   | T 2B                 | n   |
| E1        | $0,00 \pm 0,00^b$       | 0  | $0,00 \pm 0,00^b$    | 0   | $0,00 \pm 0,00^a$ | 0  | $0,00 \pm 0,00^b$    | 0   | $0,50 \pm 0,22^b$    | 5   |
| E2        | $0,00 \pm 0,00^b$       | 0  | $0,00 \pm 0,00^b$    | 0   | $0,00 \pm 0,00^a$ | 0  | $0,00 \pm 0,00^b$    | 0   | $0,20 \pm 0,13^b$    | 2   |
| E3        | $0,00 \pm 0,00^b$       | 0  | $0,10 \pm 0,10^b$    | 1   | $0,00 \pm 0,00^a$ | 0  | $0,00 \pm 0,00^b$    | 0   | $0,60 \pm 0,43^b$    | 6   |
| E4        | $0,00 \pm 0,00^b$       | 0  | $0,10 \pm 0,10^b$    | 1   | $0,00 \pm 0,00^a$ | 0  | $0,50 \pm 0,30^b$    | 5   | $0,60 \pm 0,31^b$    | 6   |
| E5        | $1,00 \pm 0,70^{ab}$    | 10 | $1,80 \pm 0,70^{ab}$ | 18  | $0,50 \pm 0,22^a$ | 5  | $1,30 \pm 0,80^b$    | 13  | $9,10 \pm 2,99^{ab}$ | 91  |
| P6        | $5,50 \pm 2,85^a$       | 55 | $61,70 \pm 35,58^a$  | 617 | $3,90 \pm 2,50^a$ | 39 | $51,20 \pm 27,97^a$  | 512 | $59,60 \pm 33,82^a$  | 596 |
| F7        | $0,40 \pm 0,22^b$       | 4  | $1,30 \pm 1,94^{ab}$ | 13  | $0,00 \pm 0,00^a$ | 0  | $4,50 \pm 2,34^{ab}$ | 45  | $6,60 \pm 3,80^{ab}$ | 66  |
| TOTAL (n) |                         | 69 |                      | 650 |                   | 44 |                      | 575 |                      | 772 |

2 Letras diferentes na coluna indicam diferença significativa pelo teste de *Bonferrone* ( $p < 0,05$ )

3 E=égua; P=potra; F= feto

4 N- Normal: ovócito intacto e células da granulosa organizadas e núcleo íntegro; T1A – degenerado tipo 1A: ovócito pode se encontrar retraído, núcleo  
 5 picnótico e membrana basal íntegra; T1B – degenerado tipo 1B: ovócito pode se encontrar retraído, núcleo picnótico e membrana basal lesada; T2A –  
 6 degenerado tipo 2A: picnose do ovócito, desorganização das células da granulosa e membrana basal íntegra; T2B – degenerado tipo 2B: picnose do ovócito,  
 7 desorganização das células da granulosa e membrana basal lesada

Esta menor quantidade de folículos, principalmente naquelas éguas de idade mais avançada (14, 18 e 23 anos), segundo Ginther (1992), pode ser explicada pela atresia e/ou apoptose, além da ovulação que ocorre ao longo da vida, promovendo uma significativa diminuição na população de folículos pré-antrais disponíveis no ovário como um todo. Hipoteticamente, se uma égua tem originalmente 40.000 folículos primordiais e cicla continuamente por 25 anos, recrutando 100 folículos / ciclo, ela iria esgotar sua reserva de folículos primordiais ( $100 \text{ folículos / ciclo} \times 16 \text{ ciclos / ano} \times 25 \text{ anos} = 40.000 \text{ folículos primordiais}$ ). Presumivelmente, o *pool* de folículos primordiais é finito e não pode se reconstituir, além disso, mitose de oogônias não tem sido relatada em potras ou éguas. Já em ovário de mulheres Buskovsky et al. (2004), observaram a formação de novos folículos primários (incluindo primordiais e intermediários,  $< 50 \mu\text{m}$ ) a partir de células da granulosa e de células mesenquimais precursoras da túnica albugínea, formando durante o período de reprodução uma população dinâmica destes folículos, com diferenciação e regressão destas estruturas.

Esta redução da população folicular em éguas adultas também pode ser explicada por fatores ambientais, visto que no Brasil, frequentemente os cavalos são alojados em estreita proximidade com seres humanos, com exposição a muitos fatores que podem afetar a reprodução e a fertilidade destes animais (Carnevale et al., 2008). Estes ambientes não explicam a total falta de folículos na maioria dos fragmentos ovarianos analisados, mas podem ter influenciado na redução destes nas éguas estudadas, visto que eram animais comuns de trabalho criados de forma extensiva e sem suplementação alimentar.

Em relação ao ovário do feto com cerca de 7 meses de gestação, foi observado um pequeno número de folículos pré-antrais. Este resultado pode ser explicado por uma redução natural dos folículos neste período ou ainda pela grande quantidade de ovogônias presentes no

córtex, pois segundo Naves et al. (2008), em pesquisa com fetos equinos, para caracterizar histologicamente o desenvolvimento ovariano pré-natal, a presença de folículos primordiais ocorre a partir de 60 – 69 dias de gestação, com a maior quantidade observada aos 70 dias, seguida de sua redução aos 116 – 135 dias (23-29 cm de distância cefalococcígea), quando foram encontrados folículos em crescimento. Assim, como no presente trabalho, esses autores relataram a presença de grande quantidade de ovogônias no córtex ovariano. Do mesmo modo, em fetos de búfalo, Santos et al. (2011) encontraram, através da estimativa da população folicular ovariana, uma quantidade menor de folículos pré-antrais em fetos de 35 – 60 cm de comprimento, além de uma grande variação entre indivíduos e com a idade, e segundo Santos-Silva et al. (2011), aglomerados de células germinativas aparecem em maior quantidade no início da vida fetal e desaparecem gradualmente à medida que mais folículos primordiais são formados.

Uma hipótese quanto à distribuição heterogênea dos folículos pré-antrais no ovário equino está na própria morfologia deste órgão, já que, diferente das demais espécies de mamíferos, o epitélio germinativo eqüino está confinado à região da fossa da ovulação em razão da inversão de posição entre as porções medular e cortical, sendo que a zona periférica de tecido conjuntivo fibroso (medula) está ao redor de uma zona central parenquimatosa (córtex) contendo folículos ovarianos em desenvolvimento, em atresia, corpos lúteos e *corpus albicans*, dando ao ovário o formato de feijão que o caracteriza (Ginther, 1992). Além disso, quando comparado às outras espécies domésticas o ovário equino também é fibroso, mas possui poucos ovócitos inclusos, cerca de 35.000 folículos primordiais (Driancourt et al., 1982).

De forma surpreendente, apesar do expressivo universo amostral analisado não foi encontrada uma quantidade suficiente de folículos pré-antrais, nos diferentes tratamentos,

para que fosse possível definir um protocolo de conservação de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano equino.

### **Conclusão**

Devido ao pequeno número de folículos pré-antrais encontrado nos fragmentos de ovário equino, não foi possível detectar possíveis efeitos das diferentes temperaturas e períodos de tempo na conservação *in situ* dos folículos pré-antrais de éguas.

### **Referências Bibliográficas**

- Andrade ER, Amorim CA, Matos MHT, Silva JRV, Dode MAN, Figueiredo JR.** Evaluation of saline and coconut water solutions in the preservation of sheep preantral follicles in situ. *Small Ruminant Research*, v.43, p.235-43, 2002.
- Bukovsky A, Caudle MR, Svetlikova M, Upadhyaya NB.** Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.2, p.1-30, 2004.
- Carnevale EM.** The mare model for follicular maturation and reproductive aging in the woman. *Theriogenology*, v.69, p.23-30, 2008.
- Carrijo Jr OA, Marinho APS, Campos AA, Amorim CA, Bão SN, Lucci CM.** Morphometry, estimation and ultrastructure of ovarian preantral follicle population in queens. *Cells Tissues Organs*, v.191, p.152-160, 2010.
- Carvalho FCA, Lucci CM, Silva JRV, Andrade ER, Bão SN, Figueiredo JR.** 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.



**Celestino JJH, Santos RR, Martins FS, Matos MHT, Figueiredo JR, Costa SHF, Silva JRV, Rodrigues APR.** Conservação de folículos pré-antrais bovinos em solução salina 0,9% ou TCM 199. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.59, p.591-599, 2007.

**Driancourt MA, Paris A, Roux C, Palmer ME.** Ovarian follicular populations in pony and a saddle-type mares. *Reproduction Nutrition Development*, v.22, p.1035-1047, 1982.

**Ferreira MAL, Brasil AF, Silva JRV, Andrade ER, Rodrigues APR, Figueiredo JR.** Effects of storage time and temperature on atresia of goat ovarian preantral follicles held in M199 with or without indole-3-acetic acid supplementation. *Theriogenology*, v.55, p.1607-17, 2001.

**Figueiredo JR, Rodrigues APR, Amorim CA, Silva JRV.** Manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: ROCA, 2. ed., p.303-327, cap.16, 2008.

**Ginther OJ.** Characteristics of the ovulatory season. In: Ginther, OJ. *Reproductive biology of the mare: basic and applied aspects*. 2. ed. Wisconsin, USA: Equiservices, p.176-177, 1992.

**Hulshof SCJ, Figueiredo JR, Beckers JF, Bevers MM.** Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. *The Veterinary Quarterly*, v.16, p.78-80 1994.

**Lima GL, Costa LLM, Cavalcanti DMLP, Rodrigues CMF, Freire FAM, Fontenele-Neto JD, Silva AR.** Short-term storage of canine preantral ovarian follicles using a powdered coconut water (ACP<sup>®</sup>)-based medium. *Theriogenology*, v.74, p.146-152, 2010.

**Lucci CM, Kacinskis MA, Rumpf R, Bão SN.** Effects of lowered temperatures and media on short-term preservation of zebu (*Bos indicus*) preantral ovarian follicles. *Theriogenology*, v.61, p.461-472, 2004.

**Lucci CM, Schreier LL, Machado GM, Amorim CA, Bão SN, Dobrinsky JR.** Effects of storing pig ovaries at 4 or 20°C for different periods of time on the morphology and viability of preantral follicles. *Reproduction in Domestic Animals*, v.42, p.76-82, 2007.

**Matos MHT, Andrade ER, Lucci CM, Bão SN, Silva JRV, Santos RR, Ferreira, MAL, Figueiredo JR.** Morphological and ultrastructural analysis of sheep primordial follicles preserved in 0.9% saline solution and TCM 199. *Theriogenology*. v.62, p.65–80, 2004.

**Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA.** Equídeos. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/portal/page/portal/Internet-MAPA/paginainicial/animal/especies/equideos>>. Acesso em: 12 novembro 2011.

**Müller K, Ellenberger C, Schoon HA.** Histomorphological and immunohistochemical study of angiogenesis and angiogenic factors in the ovary of the mare. *Research in Veterinary Science*, v.87, p.421-431, 2009.

**Munhoz ALR, Luna HS.** Morfometria e número de células da granulosa de folículos pré-antrais bovinos submetidos ao estresse calórico *in vitro*. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.2, p.85-88, 2008.

**Naves CS, Vieira RC, Diniz EG, Jacomini JO, Belletti ME, Oliveira RC.** Desenvolvimento morfológico dos ovários em fetos equinos sem raça definida. *Ciência Rural*, v.38, n.2, p.416-422, 2008.

**Santos RR, Rodrigues APR, Andrade ER, Ferreira MAL, Lôbo RNB, Figueiredo JR.** Conservação de folículos pré-antrais ovinos em solução salina 0,9% e PBS. *Revista Brasileira de Reprodução Anima.*, v.27, p.32-39, 2003.

**Santos RR, Silva JRV, Costa SHF, Rodrigues APR, Lôbo RNB, Figueiredo JR.** Effect of 0,9% saline solution and phosphate buffer saline at different temperatures and incubation

times on the morphology of goat preantral follicles. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.39, p.254-259, 2002.

**Santos SSD, Ferreira MAP, Lima MYS, Sampaio RV, Cordeiro MS, Silva TVG, Costa NN, Miranda MS, Ohashi OM.** Quantification, morphology and ultrastructure of preantral follicles of Buffalo (*Bubalus bubalis*) fetuses. *Reproduction in Domestic Animals*, v.46, p. e17–e22, 2011.

**SAS – Statistical Analysis System.** SAS/STAT software, Version 8.02, Cary: 2001.

**Silva JRV, Lucci CM, Carvalho FCA, Bão SN, Costa SHF, Santos RR, Figueiredo JR.** 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.

**Silva JRV, Bão SN, Lucci CM, Carvalho FC, Andrade ER, Ferreira MA, Figueiredo JR.** Morphological and ultrastructural changes occurring during degeneration of goat preantral follicles preserved *in vitro*. *Animal Reproduction Science*, v.66, p.209-223, 2001.

**Silva JRV, Ferreira MAL, Costa SHF, Santos RR, Carvalho FCA, Rodrigues APR, Lucci CM, Bão SN, Figueiredo JR.** Degeneration rate of preantral follicles in the ovaries of goat. *Small Ruminant Research*, v.43, p.203-209, 2002.

**Silva-Santos KC, Santos GMG, Siloto LS, Hertel MF, Andrade ER, Rubin MIB, Sturio L, Melo-Sterza FA, Seneda MM.** Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. *Theriogenology*, v.76, p.1051-1057, 2011.

**Stansfield FJ, Pictonb HM, Nöthlinga JO.** Early primary-rather than primordial follicles constitute the main follicular reserve in the African elephant (*Loxodonta africana*). *Animal Reproduction Science*, v.123, p.112–118, 2011.

**Szlachta M, Tischner M.** Morphology and distribution of preantral follicles in mare ovaries. *Medycyna Weterynaryjna*, v.54, p.679-682, 1998.