



## Comunicação

[Communication]

### Morfometria e população de folículos pré-antrais de vacas Nelore vazias, gestantes e de fetos nos terços inicial, médio e final da gestação

[Morphometry and population of preantral follicles of not pregnant Nelore cows, pregnant and fetus in the initial, medium and final third of pregnancy]

C.G.P. Gonçalves<sup>1</sup>, S.M.T. Tironi<sup>2\*</sup>, K.M. Silva<sup>2</sup>, E.R.. Silva Junior<sup>2</sup>,  
V.M. Codognoto<sup>2</sup>, A.G. Souza<sup>2</sup>, N.F.S. Marques<sup>2</sup>,  
S. Brochine<sup>2</sup>, A.F. Vieira<sup>2</sup>, E. Oba<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Programa de graduação - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista - Botucatu, SP

<sup>2</sup>Programa de pós-graduação, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista - Botucatu, SP

<sup>3</sup>Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista - Botucatu, SP

Os procedimentos de maturação e fertilização *in vitro* (FIV) de oócitos têm progredido significativamente nas últimas décadas, buscando por melhorias nos índices reprodutivos na pecuária de corte brasileira. A aspiração folicular, quando realizada não se levando em consideração a fase do desenvolvimento folicular, recupera aproximadamente 85% de folículos ovarianos considerados atresícos, fato esse que afeta a competência oocitária e a qualidade do oócito (Castilho *et al.*, 2007).

Do ponto de vista funcional, o folículo deve proporcionar um ambiente adequado para a manutenção da viabilidade, o crescimento e a maturação do oócito. Assim, o isolamento e o cultivo de folículos pré-antrais (FOPA), aliados ao emprego de crescimento e maturação *in vitro*, possibilitam ampliar a seleção, o melhoramento genético animal e os índices de fertilidade do rebanho (Mello *et al.*, 2016), uma vez que 99,99% de todos os oócitos são perdidos ao longo da vida reprodutiva, em um processo natural conhecido como atresia folicular (Hansen *et al.*, 2008).

Bovinos são utilizados como modelo experimental em estudos que envolvem a foliculogênese inicial e a reserva de gametas inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. Isso

ocorre devido à semelhança entre o ciclo reprodutivo da vaca com as demais espécies, sendo um exemplo a espécie humana (Araújo *et al.*, 2014). Observando-se a importância do assunto, o objetivo deste estudo foi descrever a população folicular e as características morfológicas de folículos pré-antrais de vacas vazias e de vacas gestantes e fetos nos terços inicial (I), médio (M) e final (F) de gestação, buscando descrever em quais categorias animais a aspiração folicular pode ser empregada, de modo que os folículos aspirados sejam utilizados para maturação, cultivo e fertilização *in vitro*, para posterior transferência de embrião.

O experimento foi conduzido no Departamento de Reprodução e Radiologia Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (Unesp), *campus* de Botucatu (22° 53' 09" S de latitude e 48° 26' 42" O de longitude), Brasil. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (Ceua) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Unesp, na data de 11 de março de 2019. Foram utilizados 10 ovários de cinco vacas Nelore vazias, 18 ovários de nove vacas gestantes e 18 ovários de nove fetos, sendo seis de cada terço da gestação (inicial, médio e final), todos adquiridos no abatedouro Frigol, situado no município de Lençóis Paulista-SP.

Recebido em 14 de março de 2019

Aceito em 15 de maio de 2019

\*Autor para correspondência (*corresponding author*)

E-mail: [smttironi@hotmail.com](mailto:smttironi@hotmail.com)

Os ovários foram lavados com álcool 70% por 10 segundos, submetidos a dois banhos sucessivos em solução salina (NaCl 0,9%), fixados em formol 10% por 24 horas e embebidos em parafina. Os blocos de parafina foram seccionados em micrótomo em cortes longitudinais de 3µm de espessura, montando uma lâmina a cada 120 cortes, e corados pelo método hematoxilina-eosina. Dessa forma, o número de folículos pré-antrais foi estimado pela contagem de folículos a cada 120 seções, sendo contados somente os folículos que tiveram núcleo evidente, facilmente visível e bem delimitado. Foram considerados folículos primordiais aqueles que possuíam um oócito ainda imaturo circundado por uma única camada de células da granulosa de forma pavimentosa, com núcleo ocupando a periferia do folículo e diâmetro médio de 36µm. Folículos primários apresentavam camada da granulosa cúbica, com seu núcleo no centro do folículo, e diâmetro médio de 47µm. Folículos secundários foram considerados com duas ou mais camadas de células cúbicas, presença de zona pelúcida e diâmetro de aproximadamente 150µm.

Folículos com diâmetro maior que 200µm de diâmetro e com intensa proliferação das células da granulosa foram desconsiderados, pois foram classificados como terciários, antral ou de Graaf. Folículos que se encontravam em desenvolvimento, apresentando células em formato misto ou células com formato

correspondente a dois estágios, foram considerados folículos em transição. Os folículos também foram classificados, de acordo com o seu grau de viabilidade, em: folículos íntegros (oócito com não mais de três vacúolos citoplasmáticos, vesícula germinativa e nucléolo intactos), folículos em atresia inicial (estágio I: oócito com mais de três vacúolos citoplasmáticos e em início de descondensação da cromatina), folículos em atresia moderada (estágio II: oócito com nucléolo e citoplasma em fragmentação e alta descondensação da cromatina) ou folículos com atresia acentuada (estágio III: oócito completamente fragmentado ou ausente).

Foi realizada análise descritiva dos folículos pré-antrais de vacas vazias; gestantes e fetos foram dimensionados por meio do programa de análise de imagens KS300 – versão 3.0, obtendo-se o perímetro, os eixos maior e menor de seus núcleos, os oócitos e os folículos pré-antrais. Para análise estatística, foi realizado o teste de Tukey para comparação de médias, sendo considerados significativos valores de  $P < 0,05$ . Na contagem geral de folículos em vacas e fetos, observou-se maior porcentagem de folículos primordiais em todas as categorias avaliadas, demonstrando significância, não se observando, para os demais estágios de crescimento folicular (primordial em transição, primário, primário em transição e secundário), diferença estatística, como demonstrado na Tab. 1.

Tabela 1. População de folículos pré-antrais em vacas Nelore vazias, gestantes e em fetos bovinos (%)

Categoria	Primordial (%)	Primordial em transição (%)	Primário (%)	Primário em transição (%)	Secundário (%)
Vacas vazias	65,217 <sup>a</sup>	18,116 <sup>b</sup>	8,696 <sup>b</sup>	2,174 <sup>b</sup>	5,797 <sup>b</sup>
Vacas terço I	86,726 <sup>a</sup>	9,735 <sup>b</sup>	0,000 <sup>b</sup>	3,540 <sup>b</sup>	0,000 <sup>b</sup>
Vacas terço M	75,000 <sup>a</sup>	20,370 <sup>b</sup>	1,852 <sup>b</sup>	0,926 <sup>b</sup>	1,852 <sup>b</sup>
Vacas terço F	69,444 <sup>a</sup>	19,444 <sup>b</sup>	4,630 <sup>b</sup>	2,778 <sup>b</sup>	3,704 <sup>b</sup>
Feto terço I	76,404 <sup>a</sup>	22,472 <sup>b</sup>	1,124 <sup>b</sup>	0,000 <sup>b</sup>	0,000 <sup>b</sup>
Feto terço M	81,503 <sup>a</sup>	16,579 <sup>b</sup>	2,368 <sup>b</sup>	0,000 <sup>b</sup>	0,000 <sup>b</sup>
Feto terço F	78,689 <sup>a</sup>	16,628 <sup>b</sup>	3,747 <sup>b</sup>	0,937 <sup>b</sup>	0,000 <sup>b</sup>

\*Letras diferentes indicam diferença significativa entre as populações foliculares, sendo considerado  $P < 0,05$ . I: inicial, M: médio, F: final.

### Morfometria e população...

Em relação à quantificação de folículos primordiais de ovários de fetos, houve diminuição de 81,5% do terço médio da gestação para 78,6% no terço final. Essa diminuição de folículos primordiais com o avanço da gestação está de acordo com os resultados encontrados por Antonino *et al.* (2017), que encontraram diminuição de folículos primordiais durante a vida fetal, aos 210 dias, e consequente aumento na proporção de folículos primários e secundários. Esse aumento de folículos primários e secundários pode ocorrer devido ao recrutamento, ao crescimento e à seleção folicular (Lima *et al.*, 2016).

Folículos secundários foram visualizados em vacas gestantes a partir do terço médio de gestação. Contudo, não foram observados folículos secundários em vacas do terço inicial de gestação e nos ovários dos fetos, independentemente do terço gestacional. Isso

pode ser explicado pela ausência do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (Caetano e Caetano Júnior, 2015), o qual se desenvolve por volta de 18 a 24 meses de idade, em novilhas zebuínas, período em que o animal atinge sua maturidade sexual (Schillo *et al.*, 1992). Erickson (1966) relatou que os folículos já estão presentes no feto bovino nos estágios iniciais da gestação. Nos fetos em terço final de gestação, foram observados 78% de folículos primordiais, 16% de primários e 0% de secundários, o que demonstra maior representatividade de folículos primordiais nessa fase da gestação. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados por Santos *et al.* (2013), os quais verificaram 37% de folículos primordiais, 23% de primários e 2,9% de secundários em ovários de fetos bovinos aos 120 dias. As mensurações dos folículos pré-antrais de vacas vazias, gestantes e de fetos encontram-se descritas na Tab. 2.

Tabela 2. Morfometria de folículos pré-antrais das vacas Nelore vazias, das gestantes e dos fetos

Categoria	Perímetro ( $\mu\text{m}$ )	Eixo menor ( $\mu\text{m}$ )	Eixo maior ( $\mu\text{m}$ )
Vacas vazias	240,333 <sup>a</sup>	61,168 <sup>a</sup>	81,499 <sup>a</sup>
Vacas terço I	158,995 <sup>b</sup>	41,488 <sup>b</sup>	53,125 <sup>b</sup>
Vacas terço M	157,047 <sup>b</sup>	39,985 <sup>b</sup>	53,567 <sup>b</sup>
Vacas terço F	195,786 <sup>b</sup>	47,978 <sup>b</sup>	66,104 <sup>b</sup>
Feto terço I	117,442 <sup>b</sup>	29,838 <sup>b</sup>	40,559 <sup>b</sup>
Feto terço M	130,965 <sup>b</sup>	32,326 <sup>b</sup>	45,964 <sup>b</sup>
Feto terço F	115,593 <sup>b</sup>	28,851 <sup>b</sup>	40,430 <sup>b</sup>

\*Letras diferentes indicam diferença significativa entre as populações foliculares, sendo considerado  $P < 0,05$ . I: inicial, M: médio, F: final.

As dimensões do perímetro, do eixo maior e eixo menor dos folículos pré-antrais de vacas vazias mostraram-se maiores que as medidas das vacas gestantes nos diferentes terços da gestação, não sendo observadas diferenças entre os terços inicial, médio e final. Pode-se observar, ainda,

que não houve diferença significativa entre os valores dos folículos encontrados nos fetos dos terços inicial, médio e final. Medidas dos oócitos de folículos pré-antrais estão apresentados na Tab. 3.

Tabela 3. Morfometria de oócitos de folículos pré-antrais das vacas Nelore vazias, das gestantes e dos fetos

Categoria	Perímetro ( $\mu\text{m}$ )	Eixo menor ( $\mu\text{m}$ )	Eixo maior ( $\mu\text{m}$ )
Vacas vazias	197,274 <sup>a</sup>	45,991 <sup>a</sup>	68,648 <sup>a</sup>
Vacas terço I	133,250 <sup>b</sup>	29,400 <sup>a</sup>	45,330 <sup>b</sup>
Vacas terço M	132,640 <sup>b</sup>	28,860 <sup>a</sup>	46,610 <sup>b</sup>
Vacas terço F	174,380 <sup>a</sup>	38,590 <sup>b</sup>	60,130 <sup>a</sup>
Feto terço I	112,040 <sup>b</sup>	28,270 <sup>a</sup>	38,844 <sup>b</sup>
Feto terço M	117,172 <sup>b</sup>	27,792 <sup>a</sup>	41,382 <sup>b</sup>
Feto terço F	101,843 <sup>b</sup>	24,120 <sup>a</sup>	36,488 <sup>b</sup>

\*Letras diferentes indicam diferença significativa entre as populações foliculares, sendo considerado  $P < 0,05$ . I: inicial, M: médio, F: final.

Pode-se observar que não houve diferença significativa entre as vacas dos terços inicial e médio da gestação e que os valores foram menores em relação ao terço final. Entretanto, vacas vazias apresentaram valores superiores quando comparadas às gestantes e aos fetos. Kacinskis *et al.* (2005) encontraram valores médios para folículos em estágios primordiais e

primários de 42,25 $\mu\text{m}$  e para oócitos de 29,90 $\mu\text{m}$ . Entretanto, os resultados encontrados no presente estudo foram superiores aos acima citados, devido ao fato de a média ter sido feita entre folículos primordiais, primários e secundários. As dimensões dos núcleos de oócitos de folículos pré-antrais estão descritas na Tab. 4.

Tabela 4. Morfometria dos núcleos dos oócitos de folículos pré-antrais das vacas Nelore vazias, das gestantes e dos fetos

Categoria	Perímetro ( $\mu\text{m}$ )	Eixo menor ( $\mu\text{m}$ )	Eixo maior ( $\mu\text{m}$ )
Vacas vazias	62,773 <sup>a</sup>	26,432 <sup>a</sup>	36,146 <sup>a</sup>
Vacas terço I	37,440 <sup>b</sup>	9,290 <sup>b</sup>	13,460 <sup>b</sup>
Vacas terço M	36,530 <sup>b</sup>	9,000 <sup>b</sup>	13,260 <sup>b</sup>
Vacas terço F	40,680 <sup>a</sup>	10,250 <sup>b</sup>	14,380 <sup>b</sup>
Feto terço I	33,515 <sup>b</sup>	8,958 <sup>b</sup>	11,676 <sup>b</sup>
Feto terço M	33,245 <sup>b</sup>	8,503 <sup>b</sup>	11,856 <sup>b</sup>
Feto terço F	30,018 <sup>b</sup>	7,895 <sup>b</sup>	10,680 <sup>b</sup>

\*Letras diferentes indicam diferença significativa entre as populações foliculares, sendo considerado  $P < 0,05$ . I: inicial, M: médio, F: final.

Em relação às dimensões dos núcleos de oócitos de folículos pré-antrais, não se observaram diferenças significativas entre vacas e fetos dos terços inicial e médio de gestação. Entretanto, vacas no terço final da gestação demonstraram valores maiores para o perímetro do núcleo, e

vacas vazias apresentaram valores maiores para as três mensurações em relação às gestantes e aos fetos. Essa diminuição das mensurações foliculares no terço final da gestação pode ter ocorrido devido à redução na secreção dos pulsos de LH, o que inibiu o crescimento folicular,

induzindo a atresia e a apoptose celular (Crowe *et al.*, 2014).

Quanto à qualidade folicular, vacas vazias apresentaram 69% de folículos em atresia moderada e 23% em atresia inicial. Vacas gestantes apresentaram 85% em atresia moderada e 10% em atresia inicial. Já os ovários dos fetos demonstraram apenas 15% de folículos em atresia moderada e 76% em atresia inicial nos ovários de fetos do terço inicial da gestação. Fetos nos terços médio e final da gestação apresentaram 40% e 50% em atresia moderada e inicial, respectivamente.

Conclui-se que o isolamento de folículos pré-antrais de ovários oriundos de abatedouros foi

eficaz para estimar e descrever as características morfológicas e populacionais de folículos pré-antrais de vacas vazias, gestantes e de fetos, nos três terços da gestação. Segundo o estudo, maior porcentagem de folículos primordiais foi observada em todas as categorias avaliadas, não sendo observados folículos secundários em vacas do terço inicial de gestação e nos ovários dos fetos, independentemente do terço gestacional. Além disso, ficou evidenciado que vacas vazias apresentam menor quantidade de folículos em atresia moderada quando comparadas a vacas gestantes, o que faz delas melhores candidatas para a FIV.

*Palavras-chave:* Bos indicus, *dinâmica folicular, oócito, reprodução*

#### ABSTRACT

*The aim of this study was to describe population and morphological characteristics of preantral follicles of not pregnant cows, pregnant cows and fetus. Ten ovaries of non-pregnant Nelore cows, eighteen ovaries of pregnant cows and eighteen ovaries of fetus were used. For pregnant cows, six ovaries from each third (initial, middle and final) were evaluated, acquired from a slaughterhouse. For fetus, the same methodology and proportion of ovaries were used. Ovaries were washed, fixed and embedded in paraffin. They were then sectioned in longitudinal sections and stained by the Hematoxylin-Eosin method. Preantral follicles were classified according to morphology (primordial, primary and secondary) and degree of viability (intact and in initial, moderate and marked atresia). Descriptive and statistical analyzes were performed through KS300 image analysis program and Tukey's test. A greater proportion of primordial follicles were found in all categories. Secondary follicles were not observed in ovaries of fetus and cows in the initial third of pregnancy. All the ovary dimensions were higher in non-pregnant cows and in the final third of cows' pregnancy, and lower in final third of pregnancy fetus. It was concluded that follicle isolation was effective in describing population and morphological characteristics of preantral follicles of cows and fetus.*

*Keywords:* bos indicus, *follicular dynamic, oocyte, reproduction*

#### REFERÊNCIAS

- ANTONINO, D.C.; SILVA, G.V.; MOHALLEM, R.F.F. *et al.* Morfometria de ovários de fetos bovinos: isolamento e quantificação de folículos pré-antrais. *Rev. Uningá*, v.52, p.18-22, 2017.
- ARAÚJO, V.R.; GASTAL, M.O.; FIGUEIREDO, J.R. *et al.* *In vitro* culture of bovine preantral follicles. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, v.12, p.78, 2014.
- CAETANO, G.A.O.; CAETANO JÚNIOR, M.B. Influência do sistema silvipastoril na puberdade de novilhas. *PubVet*, v.9, p.232-239, 2015.
- CASTILHO, C.; ASSIS, G.S.; GARCIA, J.M. Influência do diâmetro e da fase folicular sobre a competência *in vitro* de oócitos obtidos de novilhas da raça Nelore. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.59, p.288-294, 2007.
- CROWE, M.A.; DISKIN, M.G.; WILLIAMS, E.J. Parturition to resumption of ovarian cyclicity: comparative aspects of beef and dairy cows. *Anim. Int. J Anim. Biosci.*, v.8 Suppl.1, p.40-53, 2014.
- ERICKSON, B.H. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. *J. Reprod. Fert.*, v.10, p.97-105, 1966.

HANSEN, K.R.; KNOWLTON, N.S.; THYER, A.C. *et al.* A new model of reproductive aging: the decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause. *Hum. Reprod.*, v.23, p.699-708, 2008.

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

LIMA, L.F.; BRUNO, J.B.; SILVA, A.M.S. *et al.* Importância das comunicações intercelulares para o desenvolvimento de folículos ovarianos. *Reprod. Climatério*, v.31, p.93-104, 2016.

MELLO, R.R.C.; FERREIRA, J.E.; SOUSA, S.L.G. *et al.* Produção *in vitro* (PIV) de embriões em bovinos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.40, p.58-64, 2016.

SANTOS, S.S.D.; FERREIRA, M.A.P.; PINTO, J.A. *et al.* Characterization of folliculogenesis and the occurrence of apoptosis in the development of the bovine fetal ovary. *Theriogenology*, v.79, p.344-350, 2013.

SCHILLO, K.K.; HALL, J.B.; HILEMAN, S.M. Effects of nutrition and season on the onset of puberty in the beef heifer. *J. Anim. Sci.*, v.70, p.3994-4005, 1992.