

MORFOMETRIA E NÚMERO DE CÉLULAS DA GRANULOSA DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS BOVINOS SUBMETIDOS AO ESTRESSE CALÓRICO *in vitro*

[Morphometry and number of granulosa cells and of bovine preantral follicles submitted *in vitro* heat stress]

Anna Letícia Rigo Munhoz¹, Hélder Silva Luna^{1,*}

¹Laboratório de Biologia Geral, Departamento de Biociências-CPAQ, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul.

RESUMO - O presente estudo teve como objetivo verificar o efeito do estresse calórico *in vitro* na morfometria e número de células da granulosa de folículos pré-antrais bovino. Os ovários foram obtidos em abatedouro e divididos em duas partes, uma para o grupo controle (sem estresse calórico) e uma para o grupo submetido ao estresse calórico (aquecido a 42 °C por 20 min em solução de NaCl a 0,9%). Após tratamento, as amostras foram fixadas em Carnoy e encaminhadas para rotina histológica clássica. Os resultados obtidos indicam que folículos primordiais e primários expostos ao estresse calórico apresentam redução do diâmetro ($P < 0,05$), mas não do número de células da granulosa ($P > 0,05$), quando comparado ao grupo controle. Em conclusão, as análises histológicas mostram que o estresse calórico *in vitro* afeta a morfometria de folículos pré-antrais bovino.

Palavras-Chave: Ovário, histologia, vaca.

ABSTRACT - The present study had the objective to evaluate the effect of heat stress in the morphometry and number of granulosa cells of bovine preantral follicles. The ovaries were obtained from slaughterhouse and divided into two parts, one for the control group (without heat stress) and one for the group subjected to heat stress (heated at 42 °C for 20 min in a solution of NaCl 0.9%). After treatment, the samples were fixed in Carnoy and forwarded to classic histology techniques. The results indicate that primordial and primary follicles exposed to heat stress have reduced in diameter ($P < 0.05$), but not in the number of the granulosa cells ($P > 0.05$) when compared to the control group. In conclusion, the histological analyses show that *in vitro* heat stress affect the morphometry of bovine preantral follicles.

Keywords: Ovarie, histology, cow.

INTRODUÇÃO

O estresse calórico reduz a performance reprodutiva de bovinos, em especial raças de alta produção leiteira (De Rensis & Scaramuzzi, 2003). Entre as causas, destacam-se a diminuição da taxa de detecção deaios, alterações na foliculogênese ovariana e taxas de concepção (Badinga et al., 1985; Badinga et al., 1993; Rodtian et al., 1996). Ainda, o ovário pode ser afetado pelo estresse calórico, alterando a produção de gonadotrofinas, desenvolvimento folicular, desenvolvimento do corpo lúteo e produção de progesterona (Gilad et al., 1993; Wolfenson et al., 1993; Torres-Júnior et al., 2008).

Estudos com estresse calórico em bovinos foram realizados submetendo os animais a temperaturas

elevadas em câmaras bioclimáticas (Ferreira et al., 2006) ou expondo *in vitro* gametas ou embriões ao calor (Ealy et al., 1995; Edwards & Hansen, 1996). O estresse calórico leva a produção de radicais livres em ovócitos e embriões (Edwards et al., 2001; Paula-Lopes & Hansen, 2002). Por outro lado, estudos mostram que as células da granulosa são importantes na proteção dos ovócitos por estimularem a produção de antioxidantes, protegendo-os do estresse calórico (Edwards & Hansen, 1997; Geshi et al., 2000).

Diversas pesquisas foram realizadas com ovócitos antrais de bovinos expostos ao estresse calórico (Payton et al., 2004; Roth & Hansen, 2004). Porém, não em ovócitos pré-antrais que representam cerca de 90% da população folicular ovariana (Saumande, 1991). Estudos histológicos com folículos pré-

* Autor para correspondência. E-mail: hluna@ceua.ufms.br.

antrais podem contribuir na elucidação da ação do estresse calórico na redução da performance reprodutiva de bovinos. O presente estudo teve como objetivo verificar o efeito do estresse calórico *in vitro* na morfometria e número de células da granulosa de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano bovino.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ovários (n=3) foram obtidos em abatedouro e encaminhados ao laboratório à temperatura ambiente. O tempo de transporte entre o local de coleta e o início do processamento do material foi de 50-60 minutos. Os ovários foram lavados em álcool a 70 % por 10 segundos e duas vezes em solução de NaCl a 0,9%. Em seguida, o ovário foi dividido em duas partes, uma encaminhada imediatamente para a fixação em Carnoy (grupo controle) e a outra parte foi acondicionada em frasco de vidro com solução salina e aquecida a 42 °C em banho-maria por 20 minutos, e então, fixada e dirigida para rotina histológica clássica. Foram realizados cortes seriados de 5 µm de espessura e corados por hematoxilina e eosina.

Foram analisados folículos pré-antrais primordiais e primários com o uso de microscópio óptico em aumento de 400 x. Considerou-se folículos primordiais aqueles que apresentavam uma camada de células da granulosa de forma pavimentosa ou pavimentosa-cubóide ao redor do ovócito e folículos primários aqueles com uma única camada de células da granulosa de forma cubóide ao redor do ovócito. Em todas as classes foliculares foram realizadas a contagem do número de células da granulosa e análises morfométricas com o uso de ocular dotada

de escala micrométrica (Kacinskis et al. 2005). Apenas folículos que apresentavam células da granulosa organizadas, ooplasma homogêneo e núcleo não picnótico foram analisados. Para comparações entre os grupos foi realizado ANOVA e teste de Tukey. Foram realizados 3 repetições por tratamento (um ovário por repetição) e considerou-se diferenças significativas quando $P < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram analisados um total de 116 folículos inclusos em tecido ovariano bovino, entre folículos primordiais e primários. Diversos estudos em ovócitos antrais foram realizados com diferentes tipos de estresse celular, como resfriamento (Arav & Roth, 2008), choques osmóticos (Agca et al., 2000) e exposição ao calor (Roth & Hansen, 2004). Entretanto, não há estudos histológicos dos efeitos do estresse calórico *in vitro* em folículos pré-antrais bovino.

Análises morfométricas e estudos das células da granulosa de folículos têm sido realizados (Lundy et al., 1999; Kacinskis et al., 2005). Alterações na aparência morfológica folicular indicam processos degenerativos (Lucci et al., 2004). No presente estudo, verificou-se diferença significativa entre o grupo controle e o grupo submetido ao estresse calórico em relação ao diâmetro dos folículos e ovócitos primordiais e primários ($P < 0,05$). Porém, quanto ao número de células da granulosa não verificou-se diferença significativa entre os grupos ($P > 0,05$). Os resultados quanto aos folículos primordiais e primários, encontram-se nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Média e desvio padrão do diâmetro folicular/ovocitário em micrômetros e número de células da granulosa de folículos primordiais submetidos ao estresse calórico.

Folículos Primordiais	n	Diâmetro do Folículo (variação)	Diâmetro do Ovócito (variação)	Número de Células da Granulosa (variação)
Controle	40	36,58±1,13 (27,5-44,5) ^a	29,18±1,25 (12,5-37,5) ^a	5,57±1,44 (2-11)
Estresse calórico	39	31,51±1,24 (22,5-42,5) ^b	25,92±1,22 (20-40) ^b	6,13±1,47 (4-12)

^{a-b}Sobrescritos diferentes na mesma coluna indicam haver diferença significativa ($P < 0,05$).

Tabela 2. Média e desvio padrão do diâmetro folicular/ovocitário em micrômetros e número de células da granulosa de folículos primários submetidos ao estresse calórico.

Folículos Primários	n	Diâmetro do Folículo (variação)	Diâmetro do Ovócito (variação)	Número de Células da Granulosa (variação)
Controle	18	41,30±1,10 (37,5-50) ^a	34,81±1,20 (25-42,5) ^a	12,9±5,2 (8-22)
Estresse calórico	19	34,58±1,26 (27,5-52,5) ^b	26,93±1,27 (25-37,5) ^b	12,1±3,2 (8-19)

^{a-b}Sobrescritos diferentes na mesma coluna indicam haver diferença significativa ($P < 0,05$).

Kacinskis et al. (2005) realizaram caracterização morfológicas e número de células da granulosa de folículos bovinos de animais zebus, sem nenhum tipo de tratamento, os quais foram similares aos encontrados no grupo controle do presente estudo. O estresse calórico pode afetar animais de alta produção, em especial vacas leiteiras, com efeitos negativos na reprodução como redução da taxa de detecção deaios, alterações na foliculogênese ovariana e taxas de concepção (Badinga et al., 1985; Badinga et al., 1993; Rodtian et al., 1996). No presente estudo, após exposição do tecido ovariano a 42 °C por 20 min, verificou-se redução do tamanho dos folículos pré-antrais (primordial e primário). Discuti-se na literatura a resistência das classes foliculares quanto a susceptibilidade ao estresse celular ocasionado pelo processo de criopreservação. Santos et al. (2006) mostraram que folículos primordiais apresentam maior resistência. Por outro lado, Gandolfi et al. (2006) indicam que folículos primordiais são mais susceptíveis e Lucci et al. (2004) não encontraram diferenças nas classes de foliculares de bovinos (primordiais, primários ou secundários). No presente estudo, mostrou-se que o estresse calórico afeta o folículo pré-antral independente da fase de desenvolvimento. Em relação as células da granulosa estudadas, não houve alterações numéricas, indicando maior resistência deste parâmetro ao estresse calórico do que aspectos morfológicos.

O estresse calórico têm ocasionado apoptose em ovócitos antrais de camundongo (Aroyo et al., 2007) e bovinos (Roth & Hansen, 2004), além ocasionar lesões celulares pela produção de radicais livres. Uma das maneiras de proteção ovocitária aos efeitos do calor são as células da granulosa que circundam o ovócito (Edwards & Hansen, 1997). Geshi et al. (2000) verificaram que ovócitos bovinos envoltos por células da granulosa produzem altos níveis de glutathione durante a maturação *in vitro* quando comparado a ovócitos desnudos (sem as células da granulosa). Esta molécula apresenta importante função antioxidante na célula, assim, contribui na neutralização dos radicais livres produzidos no processo de estresse calórico. Nas condições experimentais, do presente estudo, as células da granulosa apresentaram normalidade numérica, mostrando que curtos períodos de estresse calórico não são suficientes para destruir estas células.

Outro aspecto importante, é a origem genética dos animais. Animais *Bos indicus* demonstram ser mais termorresistentes do que animais *Bos taurus* (Rocha et al., 1998). No presente estudo foram utilizados ovários de animais *Bos indicus*, fato que pode estar relacionado a resistência ao calor das células da

granulosa. Entretanto, mais estudos devem ser realizados com folículos pré-antrais em relação ao estresse calórico, incluindo comparações com animais *Bos taurus*.

Fatores como a estação do ano e a dieta dos bovinos também pode interferir na sensibilidade ao estresse calórico. Ovócitos coletados de vacas holandesas em período do ano com temperatura fria e fecundados *in vitro* apresentam taxas superiores de desenvolvimento à blastocistos quando comparado àqueles coletados no verão (Al-Katanani et al., 2002). Uma explicação para este fenômeno é a constituição lipídica da membrana do ovócito. Zeron et al. (2001) verificaram que durante o verão as membranas dos ovócitos apresentavam maior quantidade de gordura saturada e no inverno maior quantidade de poliinsaturadas, diferenças que foram associadas com o decréscimo da viabilidade e competência do ovócito. Assim, além de efeitos sazonais, dietas ricas em gordura poliinsaturada influenciam na termorresistência de ovócitos (Fouladi-Nashta et al., 2004; Arav & Roth, 2008).

Em função dos resultados obtidos, no presente estudo, evidencia-se que alterações morfológicas dos folículos pré-antrais induzidas pelo estresse calórico afetam fases iniciais de desenvolvimento ovocitário, podendo influenciar na performance reprodutiva de bovinos. O uso de manejo que reduza o estresse calórico e a utilização de animais adaptados são estratégias importantes que devem ser consideradas, em particular vacas leiteiras de alta produção.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que o estresse calórico *in vitro* leva à alterações na morfometria de folículos pré-antrais bovino, mas não no número de células da granulosa.

AGRADECIMENTOS

Ao Frigorífico Buriti pelo fornecimento dos ovários e ao laboratório de Histologia da UFMS em nome da Profa. Iraceles Laura.

REFERÊNCIAS

Agca Y., Liu J., Rutledge J.J., Critser E.S. & Critser J.K. 2000. Effect of osmotic stress on the developmental competence of germinal vesicle and metaphase II stage bovine cumulus oocyte

- complexes and its relevance to cryopreservation. *Mol. Reprod. Dev.* 55: 212-219.
- Al-Katanani Y.M., Paula-Lopes F.F. & Hansen, P.J. 2002. Effect of season and exposure to heat stress on oocyte competence in Holstein cows. *J.Dairy Sci.* 85:390-396.
- Arav A. & Roth, Z. 2008. Do chilling injury and heat stress share the same mechanism of injury in oocytes? *Mol. Cell. Endocrinol.* 282:150-152.
- Aroyo A., Yavin, S., Arav, A. & Roth Z. 2007. Maternal hyperthermia disrupts developmental competence of follicle-enclosed oocytes: in vivo and ex vivo studies in mice. *Theriogenology.* 15:1013-1021.
- Badinga L., Collier R.J., Thatcher W.W. & Wilcox C.J. 1985. Effects of climatic and management factors on conception rate of dairy cattle in subtropical environment. *J. Dairy Sci.* 68:78.
- Badinga L., Thatcher W.W., Dias T., Drost M. & Wolfenson D. 1993. Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating Holstein cows. *Theriogenology.* 39:797-810.
- De Rensis F. & Scaramuzzi R.J. 2003. Heat stress and seasonal effects on reproduction in the dairy cow - a review. *Theriogenology.* 60:1139-1151.
- Ealy A.D., Howell J.L., Monterroso V.H., Aréchiga C.F. & Hansen P.J. 1995. Developmental changes in sensitivity of bovine embryos to heat shock and use of antioxidants as thermoprotectants. *J. Anim. Sci.* 73:1401-1407.
- Edwards J.L. & Hansen P.J. 1997. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. *Mol. Reprod. Dev.* 46:138-145.
- Edwards J.L. & Hansen, P.J. 1996. Elevated temperature increases heat shock protein 70 synthesis in bovine two-cell embryos and compromises function of maturing oocytes. *Biol. Reprod.* 55:340-346.
- Edwards J.L., King W.A., Kawarsky S.J. & Ealy A.D. 2001. Responsiveness of early embryos to environmental insults: potential protective roles of HSP70 and glutathione. *Theriogenology.* 55:209-223.
- Ferreira F., Pires M.F.A., Martinez M.L., Coelho S.G., Carvalho A.U., Ferreira P.M. & Campos W.E. 2006. Parâmetros fisiológicos de bovinos cruzados submetidos ao estresse calórico. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 58:732-738.
- Fouladi-Nashta A.A., Gutierrez C.G., Russell H.F., Garnsworthy P.C. & Webb R. 2004. Effects of dietary fatty acids on oocyte quality and development in lactating dairy cows. *Biol. Reprod.* (Special Issue) (Abstract 107).
- Gandolfi F., Paffoni A., Brambilla E.P., Bonetti S., Brevini T.A.L. & Ragni G. 2006. Efficiency of equilibrium cooling and vitrification procedures for the cryopreservation of ovarian tissue: comparative analysis between human and animal models. *Fert. Steril.* 85:1150-1156.
- Geshi M., Takenouchi N., Yamaguchi N. & Nagai T. 2000. Effects of sodium pyruvate in nonserum maturation medium on maturation, fertilization, and subsequent development of bovine oocytes with or without cumulus cells. *Biol. Reprod.* 63:393-399.
- Gilad E., Meidan R., Berman A., Graber Y. & Wolfenson D. 1993. Effect of heat stress on tonic and GnRH-induced gonadotrophin secretion in relation to concentration of oestradiol in plasma of cyclic cows. *J. Reprod. Fertil.* 99:315-321.
- Kacinskis M.A., Lucci C.M., Luque M.C.A. & Bao S. 2005. Morphometric and ultrastructural characterization of *Bos indicus* preantral follicles. *Anim. Reprod. Sc.* 87:45-57.
- Krinninger C.E., Block J., Al-katanani, Y.M., Rivera R.M., Chase J.R.C.C. & Hansen, P.J. 2003. Differences between Brahman and Holstein cows in response to estrus synchronization, superovulation and resistance of embryos to heat shock. *Anim. Reprod. Sc.* 78:13-24.
- Lucci C.M., Kacinskis M.A., Rumpf R. & Bao S.N. 2004. Effects of lowered temperatures and media on short-term preservation of zebu (*Bos indicus*) preantral ovarian follicles. *Theriogenology.* 61:461-472.
- Lundy T., Smith P., O'Connell A., Hudson N.L. & McNatty K.P. 1999. Population of granulosa cells in small follicles of the sheep ovary. *J. Reprod. Fertil.* 115:251-262.
- Paula-Lopes F.F. & Hansen, P.J. 2002. Heat-shock induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally-regulated phenomenon. *Biol. Reprod.* 66:1169-1177.
- Payton R.R., Romar R., Coy P., Saxton A.M., Lawrence J.L. & Edwards J.L. 2004. Susceptibility of bovine germinal vesicle-stage oocytes from antral follicles to direct effects of heat stress in vitro. *Biol. Reprod.* 71:1303-1308.
- Putney D.J., Mullins S., Thatcher W.W., Droste M. & Gross T.S. 1989. Embryonic development in superovulated dairy cattle exposed to elevated ambient temperatures between the onset of estrus and insemination. *Anim. Reprod. Sc.* 19:37-51.
- Rocha A., Randel R.D., Broussard J.R., Lim J.M., Blair R.M., Roussel J.D., Godke R.A. & Hansel W. 1998. High environmental temperature and humidity decrease oocyte quality in *Bos taurus* but not in *Bos indicus* cows. *Theriogenology.* 49:657-665.
- Rodtian P., King G., Subrod S. & Pongpianchan P. 1996. Oestrous behavior of Holstein cows during cooler and hotter tropical seasons. *Anim. Reprod. Sc.* 45:47-58.
- Roth Z. & Hansen P.J. 2004. Involvement of apoptosis in disruption of developmental competence of bovine oocytes by heat shock during maturation. *Biol. Reprod.* 71:1898-1906.
- Santos R.R., Rodrigues A.P.R., Costa S.H.F., Matos M.H.T., Silva J.R.V., Celestino J.J.H., Martins F.S., Saraiva M.V.A., Melo M.A. & Figueiredo J.R. 2006. Teste de toxicidade e criopreservação de folicúlos pré-antrais ovinos isolados utilizando Glicerol, Etilenoglicol, Dimetilsulfóxido e Propanodiol. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 43:250-255.
- Saumande J. 1991. La folliculogénese chez les ruminants. *Rec. Vet.* 167:205-218.
- Torres-Júnior J.R.S., Pires M.F.A., Sá, W.F., Ferreira, A. M., Viana, J.H.M.,
- Camargo L.S.A., Ramos A.A., Folhadella I.M., Polisseni J., Freitas C., Clemente C.A.A., Sá Filho, M.F., Paula-Lopes F.F. & Baruselli P.S. 2008. Effect of maternal heat-stress on follicular growth and oocyte competence in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology.* 69:155-166.
- Zeron Y., Ocheretny A., Kedar O., Borochoy A., Sklan D. & Arav A. 2001. Seasonal changes in bovine fertility: relation to developmental competence of oocytes, membrane properties and fatty acid composition of follicles. *Reproduction.* 121:447-454.