

PERÍODOS DE DIGESTÃO ENZIMÁTICA PARA O RESGATE DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS EM OVÁRIOS DE FETOS BOVINOS¹

PERIODS OF ENZYMATIC DIGESTION FOR RESCUING PREANTRAL FOLLICLES FROM FETAL BOVINE OVARIES

Silvia Ferreira Carambula² Paulo Bayard Dias Gonçalves³ Luis Fabiano Santos da Costa⁴
José Ricardo Figueiredo⁵ Jairo Pereira Neves³ Rafael Gianella Mondadori²

RESUMO

O presente experimento foi delineado com o objetivo de determinar a influência de diferentes períodos de digestão enzimática nos ovários de fetos bovinos, sobre o número total de folículos pré-antrais resgatados e o número de folículos resgatados em cada estágio de desenvolvimento. A presença da membrana basal, envolvendo o complexo formado pelas células da granulosa e o oócito, foi observada através de um estudo histológico, o que permitiu avaliar a integridade morfológica dos folículos pré-antrais isolados. Para isso, ovários de fetos bovinos, entre 150 e 270 dias de gestação, foram obtidos em frigorífico. No laboratório, os ovários foram seccionados em vários fragmentos com uma tesoura cirúrgica e dissociados com pipetas de Pasteur, com diâmetros aproximados de 1000 e 500µm. Após este processo, os fragmentos foram submetidos à digestão enzimática com colagenase em uma concentração de 200UI/ml de TCM199 modificado, por períodos de 20, 30 ou 40 minutos. Os resultados obtidos com esta técnica permitiram determinar que o número de folículos pré-antrais isolados, assim como, os estágios de desenvolvimento em que esses folículos encontravam-se no momento do isolamento, são similares nos três períodos de incubação enzimática. A estrutura morfológica desses folículos, formada pelo oócito, células da granulosa e membrana basal, manteve-se intacta após o isolamento nos três períodos de digestão enzimática.

Palavras-chave: folículos pré-antrais, bovinos, cultivo *in vitro*.

SUMMARY

The objective of this experiment was to determine the efficiency and the effect of different enzymatic digestion periods on the number and developmental stages of preantral

follICLES isolated from bovine fetal ovaries. The presence of basal membrane, surrounding granulosa cells-oocyte complex, was observed, after digestion, through histological study. For this, ovaries from bovine fetuses, were collected in slaughterhouses, between 150 and 270 days of pregnancy. In the laboratory, the ovaries were cut into several fragments with surgical scissors and dissociated with Pasteur pipette, having either 1000 or 500µm diameter. After these steps, the fragments were submitted to an enzymatic digestion with collagenase in a concentration of 200IU/ml of modified TCM 199, for periods of 20, 30 or 40 minutes. The results showed that determined the total number and the quantity of the different developmental stages of isolated preantral follicles were similar in the three different periods of enzymatic digestion. The histological analyses demonstrated that the enzymatic digestion periods did not affect the morphological structure of the follicles.

Key words: preantral follicles, bovine, *in vitro* culture.

INTRODUÇÃO

A ativação do desenvolvimento dos folículos acontece, nos bovinos, durante o período fetal. Aproximadamente aos 90 dias de prenhez, os folículos primários já estão formados. Aos 240 dias de prenhez, podem ser observados diferentes estágios de desenvolvimento folicular, incluindo folículos com o antro já formado (RÜSSE, 1983). Ao nascimento, existem cerca de 130.000 folículos, sendo que no decorrer da vida, há uma grande perda desses folículos através de processos degenerativos

¹Trabalho realizado com apoio financeiro da FAPERGS e CNPq.

²Médico Veterinário, Mestre.

³Professor Titular, Doutor, Depto. Clínica de Grandes Animais, CCR, UFSM, 97105-900, Santa Maria, RS. E-mail: bayard@lince.hcv.ufsm.br. Autor para correspondência.

⁴Aluno do programa de Pós-graduação da UFSM.

⁵Professor, Doutor, Universidade Estadual do Ceará.

(ERICKSON, 1966a). O folículo pode tornar-se atresico em qualquer fase do seu desenvolvimento (RAJAKOSKY, 1965), com isso, um número reduzido de oócitos viáveis são produzidos durante a vida reprodutiva de uma fêmea bovina. Com intuito de resgatar esses folículos antes que entrem em atresia, técnicas de isolamento começaram a ser desenvolvidas.

Um dos primeiros trabalhos a descrever o isolamento de folículos pré-antrais foi realizado em ovários de camundongos e hamsters, com o auxílio da enzima pronase (GROB, 1964). NICOSIA *et al.* (1975), utilizando a enzima colagenase que atua somente sobre o colágeno dos ovários, conseguiram isolar folículos pré-antrais de ovários de coelhos, mantendo as membranas basais intactas. Em 1977, EPPIG relatou o primeiro protocolo de isolamento e cultivo de folículos pré-antrais para camundongos, conseguindo, posteriormente, o nascimento de um produto dessa espécie, oriundo do desenvolvimento *in vitro* de oócitos que já haviam começado seu crescimento *in vivo* (EPPIG & SCHROEDER, 1989). Esses resultados estimularam a realização de inúmeras pesquisas, inclusive em outras espécies, como em suínos (HIRAO, 1994), felinos (JEWGENOW & PITRA, 1993) e bovinos (FIGUEIREDO *et al.*, 1993), adaptando a técnica utilizada em camundongos ou desenvolvendo novos protocolos.

Em bovinos, foram recentemente realizados experimentos por FIGUEIREDO *et al.* (1993) e HULSHOF *et al.* (1994) que, associando a técnica de digestão enzimática à dissociação mecânica dos ovários, conseguiram o isolamento de folículos pré-antrais morfológicamente intactos. Estes mesmos autores propuseram uma nova classificação dos folículos pré-antrais, isolados de fetos bovinos, de acordo com o seu diâmetro. Além do isolamento, algumas investigações estão sendo realizadas com o cultivo desses folículos, tentando identificar os componentes reguladores (hormônios, fatores de crescimento, etc.) envolvidos no crescimento dos mesmos (NUTTINCK *et al.*, 1993; HULSHOF *et al.*, 1995; WANDJI *et al.*, 1996a). Contudo, a maioria dos protocolos empregados, tanto para o resgate desses folículos como para o cultivo *in vitro*, foram desenvolvidos em animais de laboratório. Em decorrência das diferenças estruturais observadas em ovários e folículos de distintas espécies animais (WANDJI *et al.*, 1996b), foi realizado o presente trabalho com objetivo de testar diferentes períodos de digestão enzimática em ovários de fetos bovinos, considerando o número, o estágio de desenvolvimento e a qualidade dos folículos isolados. No sentido de determi-

nar a integridade folicular, foram realizadas avaliações histológicas após o processo de isolamento desses folículos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Trinta e seis ovários de fetos bovinos de diferentes idades (150, 180, 210, 240 e 270 dias), com diâmetros entre 0,6 e 1,9 centímetros, foram utilizados para este experimento. Os ovários foram obtidos em matadouro e acondicionados para transporte em uma garrafa térmica com solução fisiológica contendo penicilina (100UI/ml) e estreptomicina (50µg/ml) à 30°C. No laboratório, os ovários foram lavados três vezes em solução fisiológica e colocados em tubos de centrifuga, contendo TCM 199 modificado com 25mM de HEPES e 5% de Soro Fetal Bovino (SFB). Quando constatada a presença de folículos terciários na superfície dos ovários, realizou-se a retirada dos mesmos com o auxílio de um bisturi, antes dos ovários serem colocados nos tubos de centrifuga e dar continuidade ao processo de dissociação.

Para a dissociação mecânica, os ovários foram colocados em tubo cônico, contendo 3ml de TCM 199 modificado. Os ovários foram seccionados em fragmentos pequenos e uniformes, empregando-se para este fim uma tesoura cirúrgica, modificação da técnica de dissociação desenvolvida por FIGUEIREDO *et al.* (1993). Com o objetivo de melhorar o processo de dissociação, a solução contendo os fragmentos de ovário foi suspensa 20 vezes com o auxílio de uma pipeta de Pasteur de 1000µm de diâmetro, e mais 20 vezes com uma pipeta de Pasteur de 500µm de diâmetro. Decorrido o processo de dissociação ovariana, a solução foi submetida à passagem por um filtro com poros de 500µm de diâmetro. Os fragmentos que ficaram retidos na malha do filtro foram submetidos a uma segunda dissociação mecânica, utilizando-se o mesmo método descrito acima. Após a segunda dissociação, a solução resultante foi filtrada novamente, porém utilizando-se membranas de filtro com poros de 100µm de diâmetro. Para a filtragem, foram desenvolvidos filtros, a partir de plástico industrial torneado e seringas de 20ml.

Os folículos pré-antrais isolados foram classificados em folículos primordiais (<40µm de diâmetro), primários (diâmetro entre 40 e 60µm) e secundários (> 60µm de diâmetro), de acordo com os estudos realizados por HULSHOF *et al.* (1994). Para a determinação do diâmetro folicular e posterior classificação dos folículos, foi utilizado um mi-

crômetro ocular, acoplado a um microscópio invertido. Após o processo de dissociação mecânica, os fragmentos ovarianos que ficaram retidos na segunda filtragem foram colocados em um volume total de 5ml de TCM 199 modificado para serem submetidos ao tratamento enzimático, utilizado-se a enzima colagenase (*Clostridium histoliticum*, tipo IA, Sigma, St Louis, MO, USA) em uma concentração de 200UI/ml. A solução, contendo TCM 199 modificado, enzima e fragmentos ovarianos, foi homogenizada e dividida em três alíquotas de 1667 μ l cada uma, as quais foram colocadas em banho-maria a uma temperatura de 37°C. Cada alíquota foi submetida a um tempo diferente de exposição enzimática, 20, 30 ou 40 minutos. À medida que finalizavam os períodos de digestão, as alíquotas eram submetidas a três lavagens com TCM 199 modificado e centrifugadas por 2 minutos (700 g/minuto), para remoção da enzima. O próximo passo foi a contagem e classificação dos folículos pré-antrais isolados, semelhante à realizada após a dissociação mecânica.

A avaliação histológica foi feita com as alíquotas contendo TCM modificado e os folículos isolados, as quais foram colocadas em placas de petri e observadas ao microscópio, com o objetivo de retirar alguns fragmentos ovarianos que não tivessem sido digeridos. Retirados os fragmentos não digeridos, cada alíquota foi novamente colocada no tubo de centrífuga e submetida à centrifugação por 2 minutos, para formação de um sedimento rico em folículos pré-antrais. Os sedimentos contendo os folículos foram fixados em solução de "Bouin" por 24 horas, desidratados e incluídos em parafina.

Os blocos de parafina, contendo os folículos, foram submetidos a cortes de 7 μ m de espessura, montados em lâminas histológicas e submetidos à reação do ácido Periódico de Schiff (PAS) contrastado com hematoxilina. Com esse processo de coloração, foi possível a visualização da membrana basal dos folículos e do complexo formado pelo oócito e pelas células da granulosa.

A análise estatística dos resultados obtidos com os diferentes períodos de digestão enzimática, com os estágios de desenvolvimento folicular, em que se encontravam os folículos no momento do isolamento, e com os diferentes tamanhos dos ovários na recuperação de folículos pré-antrais isolados, foi submetida a uma análise de covariância no PROC GLM. Inicialmente, os dados foram submetidos a uma análise de heterogeneidade das curvas, sendo realizada a análise de covariância somente quando constatado homogeneidade das curvas, empregando o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j X_{ij} + \epsilon_{ij}$$

onde Y_{ij} é o número ou a percentagem transformada de folículos pré-antrais isolados, μ é a constante comum a todas as observações, α_i corresponde às diferentes fases de desenvolvimento folicular (primordiais, primários e secundários), β_j é o coeficiente de regressão para a relação entre Y e X , X_{ij} os tempos de incubação enzimática ou o tamanho dos ovários e ϵ_{ij} é o efeito residual.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram isolados 99.300 folículos pré-antrais através da digestão mecânica-enzimática de 36 ovários de fetos, sendo que 34% desses folículos foram resgatados em 20 minutos, 34% em 30 minutos e 32% em 40 minutos de incubação enzimática. Sobre o total de folículos pré-antrais isolados em cada idade fetal, foram calculados os percentuais correspondentes aos períodos de incubação de 20, 30 e 40 minutos. Na Figura 1, podem ser observadas as curvas que representam os percentuais de folículos recuperados em cada período de incubação, nas respectivas idades fetais. Os resultados indicam que não há relação entre as diferentes idades fetais e as percentagens de folículos recuperados nos diferentes períodos de exposição enzimática ($P=0,8723$).

Neste experimento, também foi avaliada a quantidade de folículos recuperados em cada estágio de desenvolvimento folicular (fóliculo primordial, primário e secundário) nos diferentes períodos de digestão enzimática, sendo constatado um número de folículos recuperados em cada estágio de desenvolvimento semelhante nos três períodos de digestão enzimática ($P=0,1457$; Figura 2). Entretanto, quando foram considerados os estágios de desenvolvimento folicular em cada período de digestão, foi possível verificar que os folículos primordiais foram isolados

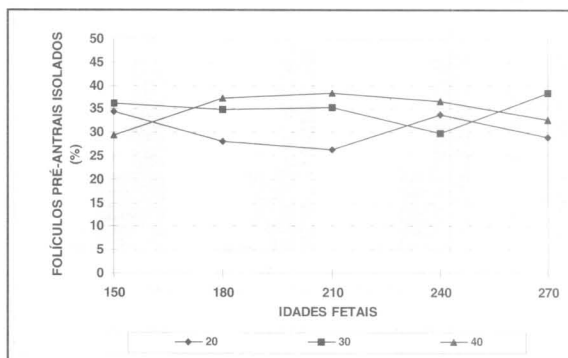


Figura 1 - Isolamento de folículos pré-antrais em diferentes períodos de digestão enzimática (20, 30 ou 40 minutos). As percentagens de folículos recuperados nos diferentes períodos foram semelhantes e independente das idades fetais ($P=0,8723$).

em maior número, se comparado ao número de folículos primários e secundários resgatados, e que o número de folículos primários foi significativamente superior ao número de folículos secundários isolados ($P=0,0001$; Figura 2).

Os períodos de incubação na presença da enzima, testados no presente experimento, foram delineados seguindo os estudos realizados por NICOSIA *et al.* (1975) em ovários de coelhos. Os autores, além de avaliar o efeito das enzimas pronase e colagenase na digestão enzimática dos ovários, avaliaram o efeito de várias concentrações dessas enzimas e diferentes períodos de incubação, em relação ao número e qualidade dos folículos isolados. O período de digestão enzimática considerado ideal por estes autores para o isolamento dos folículos de ovários de coelhos foi de 20 minutos. Tempos superiores a 30 minutos foram considerados impróprios para o isolamento de folículos pré-antrais, quando constatado, através de microscopia eletrônica, que a incubação na presença da enzima por mais de 30 minutos causa lesões nos folículos desta espécie, principalmente na membrana basal. Como em bovinos nenhum experimento desse tipo havia sido realizado, foram estabelecidos três períodos de incubação para testar a digestão enzimática de ovários de fetos, considerando a quantidade e qualidade de folículos pré-antrais isolados. O período de 20 minutos foi avaliado por ser considerado ideal para o isolamento de folículos pré-antrais de coelhos e por ser o período escolhido pelos investigadores que trabalham com o isolamento de folículos realizados na espécie bovina (FIGUEIREDO *et al.*, 1993; WANDJI *et al.*, 1996ab), e os de 30 e 40 minutos para verificar se era possível aumentar o número de folículos pré-antrais resgatados e a existência, ou não, de modificações na estrutura morfológica dos

folículos. A hipótese, de que um maior período de exposição à enzima causaria uma maior dissociação do ovário e com isso um maior número de folículos pré-antrais seriam resgatados, não foi confirmada. Constatou-se que o período de incubação enzimática não está relacionado nem com a quantidade de folículos recuperados, nem com algum desvio no número de folículos resgatados de um determinado estágio de desenvolvimento (Figura 1). Por esse motivo, acredita-se que o fato dos folículos primordiais serem resgatados em maior número, nos três períodos enzimáticos (Figura 2), seja devido a sua maior concentração no ovário e a menor quantidade de colágeno que envolve este estágio folicular (ERICKSON, 1966b).

Além da quantidade de folículos pré-antrais isolados, foi investigada a integridade morfológica do complexo formado pela membrana basal, células da granulosa e oócito. Nos diferentes períodos de incubação enzimática, foram observadas a presença de membrana basal e integridade do complexo folicular nas estruturas examinadas. Contudo, antes de se fazer a indicação de qualquer um dos períodos de digestão enzimática, testados neste experimento, para o resgate de folículos pré-antrais que serão destinados ao cultivo *in vitro*, avaliações mais apuradas da integridade destes folículos, com o uso da microscopia eletrônica, deverão ser realizadas.

Além da idade fetal, o tamanho dos ovários foi avaliado quanto à eficácia dos períodos de digestão enzimática no isolamento de folículos pré-antrais. Os ovários coletados foram distribuídos em classes, de acordo com os seus respectivos diâmetros, que oscilaram entre 0,6 e 1,9cm (Tabela 1). Na classe onde os ovários tinham diâmetro entre 0,60 e 0,79cm, foram coletados seis ovários, dos quais quatro foram de fetos com 150 dias de gestação e dois de fetos com 180 dias. Os ovários, que mediam entre 0,80 e 0,99cm de diâmetro, foram coletados de fetos com 150 (seis ovários), 180 (três ovários) e 240 dias de gestação (três ovários). A classe onde houve a ocorrência de maior variabilidade, em relação às diferentes idades fetais utilizadas, foi a que incluía ovários com diâmetros entre 1,00 e 1,19cm. Nessa classe, foram coletados três ovários de fetos com 180 dias de gestação, quatro ovários de fetos com 210 dias de gestação, um ovário de feto com 240 dias de gestação e um ovário de feto com 270 dias, perfazendo um total de nove ovários. Outra classe que teve um total de nove ovários, foi a classe composta por ovários com diâmetros superiores a 1,19cm, sendo que dois ovários foram de fetos com 210 dias de gestação, dois de fetos com 240 dias de gestação e cinco de fetos com 270 dias de gestação.

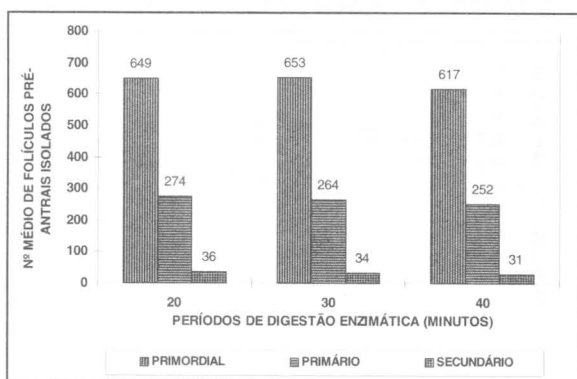


Figura 2- Folículos pré-antrais isolados nas diferentes fases de desenvolvimento nos três períodos de digestão enzimática. O número de folículos recuperados em cada estágio foi semelhante para os três períodos de digestão ($P=0,1457$).

Tabela 1 - Relação entre os diferentes tamanhos de ovários de fetos bovinos e a quantidade de folículos pré-antrais isolados, com o emprego dos métodos de dissociação mecânica e mecânico-enzimática.

TAMANHO DOS OVÁRIOS (cm)	Nº DE REPLICAÇÕES	Nº MÉDIO DE FOLÍCULOS ISOLADOS		
		20min	30min	40min
0,60 a 0,79	6	700	720	920
0,80 a 0,99	12	1693	1985	2650
1,00 a 1,19	9	1960	2375	1226
>1,19	9	2582	1224	2554

Não foi observada diferença estatística considerando colunas e linhas ($p=0,3407$).

Analisando a Tabela 1, verificou-se que o número de folículos isolados independe do tamanho do ovário, ou seja, nenhuma interação foi verificada entre os diferentes tamanhos de ovários e os diferentes períodos de digestão enzimática empregados neste experimento ($P=0,3407$). O diâmetro dos ovários de fetos bovinos oscilaram entre 0,6 e 1,9cm, permitindo supor que a ação dos diferentes tempos de digestão enzimática não fosse similar em todos os tamanhos de ovários utilizados (Tabela 1). Entretanto, verificou-se que o número de folículos pré-antrais isolados nas diferentes classes de tamanho estabelecidas foi similar, tanto aos 20, 30 ou 40 minutos, indicando que a variação de tamanho existente entre os ovários de fetos bovinos não é suficiente para influenciar a eficiência dos diferentes períodos de incubação empregados. Apesar da diferença numérica observada na Tabela 1, a recuperação de folículos pré-antrais nos diferentes tempos de incubação enzimática foi estatisticamente similar, demonstrando que, em caso de aumentar a amostragem, há uma tendência de aproximação desses números obtidos em cada grupo de ovários.

Os resultados permitiram concluir que os períodos de 20, 30 e 40 minutos podem ser empregados na digestão enzimática de fragmentos ovarianos, para a recuperação de folículos pré-antrais de fetos bovinos, com a mesma eficácia. As diferenças encontradas no tamanho dos ovários não interferem no número de folículos pré-antrais obtidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- EPPIG, J.J. Mouse oocyte development *in vitro* with various culture systems. **Dev Biol**, v. 60, p. 371-388, 1977.
- EPPIG, J.J., SCHROEDER, A.C. Capacity of mouse from

preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation and fertilization *in vitro*. **Biol Reprod**, v. 41, p. 268-276, 1989.

ERICKSON, B.H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. **J Anim Sci**, v. 25, p. 800-805, 1966a.

ERICKSON, B.H. Development and radioresponse of the prenatal bovine ovary. **J Reprod Fert**, v. 10, p. 97-105, 1966b.

FIGUEIREDO, J.R., HULSHOF, S.C.J., VAN DEN HURK, R. *et al.* Development of a combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. **Theriogenology**, v. 40, p. 789-799, 1993.

GROB, S.H. Enzymatic dissection of the mammalian ovary. **Science**, v. 146, p. 73-74, 1964.

HIRAO, Y. *In vitro* growth and maturation of pig oocyte. **J Reprod Fert**, v. 100, p. 333-339, 1994.

HULSHOF, S.C., FIGUEIREDO, J.R., BECKERS, J.F. *et al.* Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **Vet Quart**, v. 16, p. 78-80, 1994.

HULSHOF, S.C., FIGUEIREDO, J.R., BECKERS, J.F. *et al.* Effects of fetal bovine serum, FSH and 17 β -estradiol on the culture of bovine preantral follicles. **Theriogenology**, v. 44, p. 217-226, 1995.

JEWGENOW, K., PITRA, C. Hormone-controlled culture of secondary follicles of domestic cats. **Theriogenology**, v. 39, p. 527-535, 1993.

NICOSIA, S.V., EVANGELISTA, I., BATTÀ, S.K. Rabbit ovarian follicle. I. Isolation technique and characterization at different stages of development. **Biol Reprod**, v. 13, p. 423-447, 1975.

NUTTINCK, F., MERMILLOD, P., MASSIP, A. *et al.* Characterization of *in vitro* growth of bovine preantral follicles: A preliminary study. **Theriogenology**, v. 39, p. 811-821, 1993.

RAJAKOSKY, E. Some views on oogenesis in cattle. **Nord Vet Med**, v. 17, p. 285-290, 1965.

RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Biblh Anat**, v. 24, p. 77-92, 1983.

WANDJI, S.A., EPPIG, J.J., FORTUNE, J.E. FSH and growth factors affect the growth and endocrinology function *in vitro* of granulosa cells of bovine preantral follicles. **Theriogenology**, v. 45, p. 817-832, 1996a.

WANDJI, S.A., SRSEN, V., VOSS, A.K. *et al.* Initiation *in vitro* of bovine primordial follicles. **Biol Reprod**, v. 55, p. 942-948, 1996b.