



Conservação de folículos pré-antrais de felinos domésticos (*Felis catus*) refrigerados por 24 h em TCM 199 e PBS

Preservation of preantral follicles of domestic cats (Felis catus) cooled for 24 h in TCM 199 and PBS

D. Missio, F.Q. Rosa, A.C.G. Guimarães, F.G. Leivas¹, D.S. Brum

Laboratório de Biotecnologia da Reprodução (BIOTECH), Universidade Federal do Pampa (Unipampa),
Uruguaiana, RS, Brasil.

¹Correspondência: fabioleivas@unipampa.edu.br

Resumo

Objetivou-se investigar a eficiência dos meios TCM 199 e PBS na conservação de folículos pré-antrais (FOPA) felinos *in situ* a 4°C por 24 h. Foram utilizados 10 pares de ovários de gatas *Felis catus*, sendo a camada cortical fracionada e submetida a três diferentes tratamentos: controle, T1 (fragmentos conservados em TCM 199) e T2 (fragmentos conservados em PBS). Realizou-se a preparação histológica do grupo controle, sendo T1 e T2 mantidos a 4°C, por 24 h, em caixa isotérmica. Ao final dos tratamentos, os FOPA foram classificados em primordiais, primários e secundários, e os oócitos classificados em normais ou degenerados morfológicamente. A avaliação histológica constatou que os FOPA do controle (63%) tiveram maior integridade morfológica ($P > 0,05$) quando comparados ao T2 (55%), sendo semelhantes ao T1 (59%). Não houve diferença ($P < 0,05$) entre T1(59%) e T2 (55%). Os folículos primordiais mantiveram maior integridade morfológica quando comparados aos folículos em desenvolvimento, independentemente do tratamento. Com base nesses resultados, pode-se concluir que é possível a manutenção da integridade morfológica de FOPA em ovários de gatas mantidos a 4°C por 24 h, utilizando o TCM 199 e que os folículos primordiais têm maior viabilidade, quando comparados aos folículos em desenvolvimento.

Palavras-chave: *Felis catus*, folículo pré-antral, gatas, ovários, PBS, TCM 199.

Abstract

The aim of this study was to investigate the efficiency of TCM 199 and PBS mediums in the conservation of feline preantral follicles (PAF) in situ at 4°C for 24 h. Ten pairs of ovaries of Felis catus cats were used, in which the cortical layer was fractioned and submitted to three different treatments: Control, T1 (fragments preserved in TCM 199) and T2 (fragments preserved in PBS). Histological preparation was carried out in the control group, while T1 and T2 were kept at 4°C for 24 h in an isothermal box. After histological preparation of Control, T1 and T2 the PAF were classified as primordial, primary and secondary and the morphology of the oocyte as normal and degenerated. Histological evaluation found that the PAF control group (63%) had a higher morphological integrity ($P > 0.05$) compared to T2 (55%), which was similar to T1 (59%). However, there was no difference ($P < 0.05$) between T1 (59%) and T2 (55%) treatments. Primordial follicles maintained greater morphological integrity when compared to developing follicles, regardless of the treatment. Based on these results, it can be concluded that it is possible to maintain the morphological integrity of PAF in ovaries of cats transported at 4°C for 24 h using TCM 199 and that primordial follicles have a higher viability compared to developing follicles.

Keywords: cats, *Felis catus*, ovaries, PBS, preantral follicles, TCM 199.

Introdução

A família Felidae é composta por 37 espécies, mas apenas o gato doméstico não se encontra em risco de extinção (Bristol-Gould e Woodruff, 2006). Assim, programas de reprodução em criadouros conservacionistas e parques exercem um importante papel para aumentar a preservação de espécies ameaçadas, a fim de manter suas linhagens genéticas e impedir a destruição da biodiversidade. Conforme Jewgenow e Stolte (1996), a capacidade de preservar células germinativas femininas de animais em extinção é um pré-requisito importante para a introdução de técnicas modernas de reprodução em programas de conservação. Considerando esses fatores, o gato doméstico é um modelo ideal para estudar o desenvolvimento folicular nos felídeos selvagens devido à disponibilidade de todas as fases foliculares, particularmente de folículos primordiais (Bristol-Gould e Woodruff, 2006).

O ovário mamífero contém uma reserva folicular que é determinada antes do nascimento, e os folículos pré-antrais (FOPA) representam 90% da população folicular (Saumande, 1991) e constituem uma fonte de gametas, com a possibilidade de fornecer milhares de oócitos para as biotecnologias de reprodução assistida (Figueiredo



et al., 2007), como a manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais (MOIFOPA), o cultivo *in vitro* (Silva et al., 2000), a produção *in vitro* de embriões (PIV) e a clonagem e a transgenia (Lima, 2006). O número de folículos ovarianos total varia nas diferentes espécies, e, conforme Carrijo Jr. et al. (2010), a população folicular da gata doméstica é estimada em mais de 37 mil FOPA por ovário, estando estes divididos em primordiais (87%), primários (10,4%) e secundários (2,3%).

Para a realização das biotécnicas, torna-se difícil a manutenção da qualidade folicular após remoção e transporte dos ovários, visto que geralmente os animais doadores de ovários se encontram distantes dos laboratórios de reprodução. Além disso, depois que os FOPA são isolados do ambiente ovariano, torna-se impossível a manipulação de um grande número desses folículos momentos após a sua extração, sem terem a sua integridade morfológica comprometida. Por essa razão, torna-se fundamental o desenvolvimento de protocolos de conservação, nos quais os FOPA poderiam ser mantidos à temperatura entre 4 e 20°C, no interior do tecido ovariano (Figueiredo et al., 2007).

Na tentativa de aperfeiçoar as condições de conservação *in vitro* de FOPA, vários meios têm sido testados em diferentes temperaturas e tempos de preservação (Gonçalves, 2012). No entanto, a maioria das pesquisas é realizada com ovários de animais de interesse zootécnico e alguns estudos relataram a utilização de solução fisiológica (Otoi et al.; 2001; Karja et al., 2002; Naoi et al., 2007; Evecen et al., 2009) e PBS (Wolfe e Wildt, 1996; Wood et al., 1997) para o transporte de FOPA de felinos. Porém, até o momento, não há nenhum protocolo definitivo e estabelecido para o transporte de ovários felinos, sendo este bastante variável de autor para autor. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi investigar a eficiência dos meios Tissue Culture Medium 199 (TCM 199) e Phosphate-Buffered Saline (PBS) na conservação de FOPA felinos *in situ* em temperatura de 4°C por 24 h.

Material e Métodos

Foram utilizados 10 pares de ovários de gatas (n = 20), com idade entre oito e 24 meses, submetidas ao procedimento de ovariosalpingohisterectomia para controle populacional em uma clínica veterinária local. Os ovários foram transportados até o laboratório em solução fisiológica a 0,9%, a 4°C, em caixas isotérmicas, por um período máximo de duas horas. Após o período de transporte, os ovários foram lavados em solução salina, sendo então a camada cortical de cada ovário fracionada em seis fragmentos de 3 mm³: dois fragmentos para o grupo controle; dois fragmentos conservados em meio TCM 199 (T1; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) e dois fragmentos conservados em meio PBS (T2; Dulbecco Modificado DMPBS Flush - Nutricell- Nutrients Celulares, Campinas, SP, Brasil). Os fragmentos controle foram imediatamente fixados em Carnoy durante quatro horas, desidratados em etanol e fixados em parafina. Os fragmentos ovarianos dos grupos T1 e T2 foram mantidos em tubos contendo 15 mL de meio, de acordo com o tratamento, em caixa isotérmica a 4°C, durante 24 h, sendo posteriormente fixados em parafina pelo mesmo método que o grupo controle. Posteriormente, foram realizados cortes histológicos nas amostras dos três grupos (controle, T1 e T2) utilizando-se um micrótomo. As secções do tecido ovariano foram realizadas com intervalos de 7 µm, e as lâminas coradas pelo método PAS-hematoxilina. Por meio dessas lâminas histológicas, avaliaram-se 400 FOPA de cada tratamento, com o auxílio de um microscópio óptico com aumento de 400x, conforme desenho experimental (Fig. 1).

Os FOPA foram classificados, de acordo com o estágio de desenvolvimento, em primordiais (oócito circundado por uma camada de células da granulosa de formato pavimentoso), primários (oócito circundado por uma camada de células da granulosa de formato cúbico) e secundários (oócito circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa de formato cúbico).

A integridade morfológica dos folículos baseou-se na morfologia do oócito (presença ou ausência de picnose nuclear ou retração citoplasmática), na organização e na presença ou ausência de picnose das células da granulosa e integridade da membrana basal. De acordo com o oócito e as células da granulosa, classificaram-se os folículos como normais (oócitos e células da granulosa intactos) ou degenerados (oócito com picnose nuclear ou retração oocitaria, acompanhados ou não por destacamento das células da granulosa da membrana basal).

Os efeitos do TCM 199 e PBS, com temperatura de 4°C por 24 h, sobre a porcentagem de folículos normais e degenerados nas diferentes classes foliculares (primordiais, primários e secundários) foram analisados pelo teste do qui-quadrado (P < 0,05).

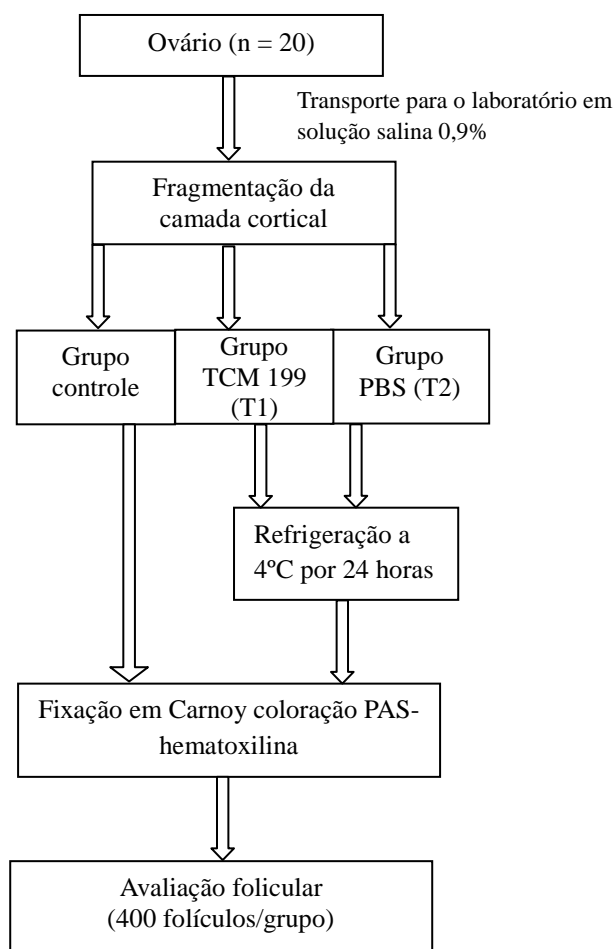


Figura 1. Protocolo experimental utilizado em cada ovário para testar a eficiência dos meios TCM 199 e PBS na conservação de folículos ovarianos pré-antrais de gatas mantidos a 4°C por 24 h.

Resultados e Discussão

Foram avaliados 400 FOPA por tratamento, perfazendo um total de 1200 folículos. A avaliação histológica constatou que a taxa de folículos viáveis transportados durante 24 h foi de 63, 59 e 55%, para o grupo controle, T1 e T2, respectivamente (Tab. 1). A integridade morfológica dos FOPA mantidos em TCM 199 (T1) foi semelhante ao grupo controle, sendo este superior ao T2 (PBS). No entanto, não houve diferença entre os tratamentos T1 e T2 (59 e 55%). Esses resultados evidenciam que a permanência dos FOPA em um meio enriquecido como o TCM 199 possibilita a manutenção da integridade morfológica dos folículos, ocorrendo uma diminuição desta na utilização do PBS quando comparado ao grupo controle.

Tabela 1. Porcentagem de folículos ovarianos pré-antrais de gatas morfológicamente normais após conservação por 24 h a 4°C em Tissue Culture Medium 199 (TCM 199; T1) e Phosphate-Buffered Saline (PBS; T2).

Tratamentos	Folículos pré-antrais			Total % (n)
	Primordial % (n)	Primário % (n)	Secundário % (n)	
Controle	72 (168/234) ^{a,A}	55 (54/98) ^{b,A}	44 (30/68) ^{b,B}	63 ^A (252/400)
TCM 199 (T1)	67 (138/205) ^{a,A}	52 (77/147) ^{b,AB}	42 (20/48) ^{b,B}	59 ^{AB} (235/400)
PBS (T2)	71 (140/196) ^{a,A}	41 (62/150) ^{b,B}	35 (19/54) ^{b,B}	55 ^B (221/400)
Total	70 ^a (446/635)	49 ^b (193/395)	41 ^b (691/170)	59 (708/1200)

^{a,b}Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa. ^{A,B}Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa. (n/n): (folículos normais/folículos totais). (P < 0,05).

Várias soluções têm sido testadas quanto à sua eficiência na conservação das estruturas foliculares. No entanto, até o momento não há nenhum protocolo definitivo e estabelecido para o transporte de ovários felinos. Nesse sentido, o uso de um protocolo de conservação preestabelecido para a espécie poderia otimizar o

transporte de FOPA aos laboratórios especializados em biotécnicas da reprodução animal, garantindo a manutenção da morfologia folicular. Cabe ressaltar que, para a formação de bancos de oócitos de animais em extinção, a preservação da integridade folicular é essencial, pois irá permitir a obtenção de milhares de oócitos viáveis, com capacidade de crescimento e maturação *in vitro* (Celestino et al., 2007).

O PBS é uma solução isosmótica, não tóxica e, embora não seja considerado muito rico em nutrientes, vem sendo utilizado como meio de conservação durante o transporte de folículos ovarianos de bovinos (Solano et al., 1994), caprinos (Santos et al., 2003) e equinos (Gomes et al., 2012). Já o TCM 199 é rico em nutrientes, como glicose, vitaminas e aminoácidos (Migliorisi et al., 1987), e tem sido empregado com sucesso na preservação de complexos *cumulus* oócitos (CCOs) de bovinos (Twagiramungu et al., 1998) durante o transporte destes até o laboratório de produção *in vitro* de embriões.

Os resultados encontrados neste trabalho são semelhantes aos de Ferreira et al. (2001), que, ao avaliarem a conservação de fragmentos ovarianos de caprinos a 4°C, mantidos em TCM 199 por 24 h, constataram a manutenção da porcentagem de folículos morfologicamente normais quando comparada ao grupo controle. Isso pode ser explicado pelo fato de que a diminuição da temperatura durante o transporte dos ovários ao laboratório reduz o metabolismo celular (Roy e Tracy, 1993; Celestino et al., 2007) e, assim, pode minimizar os danos causados aos folículos.

Além disso, a taxa de integridade morfológica folicular similar ao grupo controle obtida quando se utiliza TCM 199 pode ser atribuída ao fato de os FOPA terem duas fontes de nutrientes: uma intracelular e outra extracelular, pois, segundo Andrade et al. (2002), os FOPA podem sobreviver com uma fonte intracelular de nutrientes, por pouco tempo, necessitando de uma fonte extracelular.

Embora tenha sido evidenciado que, comparado ao controle, o transporte em PBS tenha apresentado um maior índice de degeneração, no presente estudo não foi possível verificar diferença na conservação de FOPA quando utilizado o meio TCM 199 ou PBS. Esses resultados corroboram dados da literatura, em que em experimentos realizados em outras espécies, como ovinos (Andrade et al., 2002) e bovinos (Celestino et al., 2007), a manutenção de folículos foi possível tanto em meio TCM 199 como em solução salina, não diferindo estes do grupo controle. Resultados similares foram encontrados por Wolfe e Wildt (1996), que demonstraram que a conservação dos ovários felinos em PBS durante 24, 48 ou 72 h a 4°C não afeta a capacidade de maturação nuclear *in vitro* dos oócitos, bem como a proporção de oócitos degenerados. Do mesmo modo, Wood et al. (1997) não observaram mudanças na deterioração nos complexos foliculo/oócitos após a conservação de ovários de gatos em PBS a 4°C por até 48 h. Além disso, estudos relatam que a conservação de folículos de gatas em solução salina a 4°C por 24 h mantém a capacidade de maturação *in vitro* (Evecen et al., 2009) e o retorno da meiose dos oócitos (Naai et al., 2007).

Com relação às classes foliculares, verificou-se que os folículos primordiais (Fig.2a) mantêm uma maior integridade morfológica quando comparados aos folículos em desenvolvimento (Fig. 2bc), independentemente do meio utilizado. Esses resultados são similares ao de Silva et al. (2003), que afirmam que o PBS é tão eficiente quanto o TCM 199 na conservação de folículos primordiais caprinos *in situ*. Segundo esses autores, a taxa de degeneração diminui em folículos primordiais *in situ* após conservação a 4°C. Essa maior integridade morfológica dos folículos pode estar associada ao fato de eles se encontrarem em aquiescência, apresentando uma menor taxa metabólica e conseqüente redução na necessidade de nutrientes. No entanto, esses resultados diferem de Vanhoutte et al. (2004) e Celestino et al. (2007), que, ao utilizarem solução salina 0,9% e TCM 199, observaram que os folículos em desenvolvimento apresentaram-se mais resistentes que os folículos primordiais a 4°C.

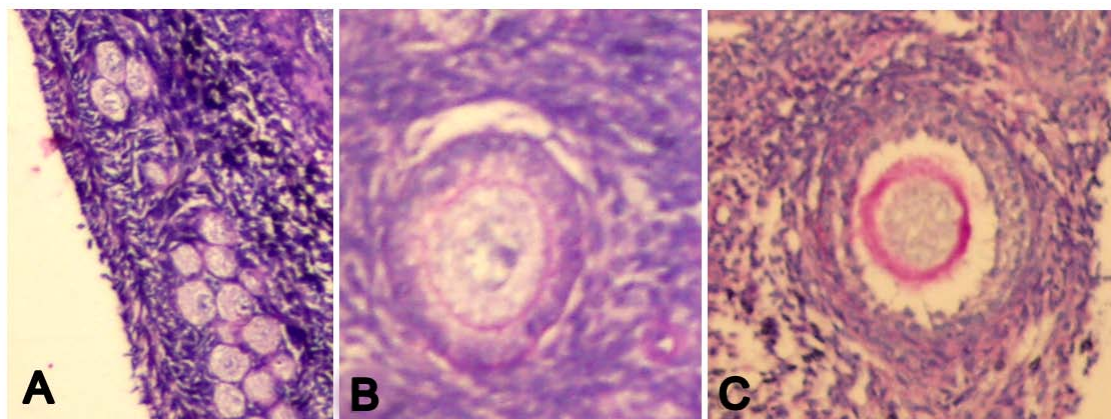


Figura 2. Classificação quanto ao estágio de desenvolvimento de folículos pré-antrais de gatas em cortes histológicos de ovários obtidos após ovariectomia eletiva: (A) folículos primordiais; (B) folículo primário; (C) folículo secundário. Coloração PAS-hematoxilina (400x).



Conclusão

Este estudo comprovou, pela primeira vez, que a manutenção da integridade morfológica de FOPA em ovários de *Felis catus* transportados a 4°C por 24 h, utilizando o meio TCM 199, é viável, o que possibilita a utilização dele em diversas biotecnologias visando à conservação de animais em risco de extinção. Além disso, esses resultados demonstram que independentemente do meio utilizado, os folículos primordiais têm maior integridade morfológica, quando comparados aos folículos em desenvolvimento em uma temperatura de 4°C por 24 h.

Referências

- Andrade ER, Amorim CA, Costa SHF, Ferreira MAL, Rodrigues APR, Dode MAN, Figueiredo JR.** Preliminary study of short-term preservation of ovine ovarian tissue containing preantral follicles in saline solution or TCM 199. *Vet Rec*, v.151, p.452-453, 2002.
- Bristol-Gould S, Woodruff TK.** Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology*, v.66, p.5-13, 2006.
- Carrizo Jr OA, Marinho AP, 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.
- 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. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.59, p.591-599, 2007.
- Evecen M, Cirit Ü, Demir K, Karaman E, Hamzaoglu AI, Bakirer G.** Developmental competence of domestic cat oocytes from ovaries stored at various durations at 4°C temperature. *Anim Reprod Sci*, v.116, p.169-172, 2009.
- 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 índole-3-acetic acid supplementation. *Theriogenology*, v.55, p.1607-1617, 2001.
- Figueiredo JR, Celestino JJH, Rodrigues APR, Silva JRV.** Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção in vitro de embriões em larga escala. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.143-152, 2007.
- Gomes RG, Andrade ER, Lisboa LA, Ciquini A, Barreiros TRR, Fonseca NAN, Seneda MM.** Effect of holding medium, temperature and time on structural integrity of equine ovarian follicles during the non-breeding season. *Theriogenology*, v.78, p.73-736, 2012.
- Gonçalves RJS.** Efeito de diferentes meios e períodos para conservação de ovários caprinos e ovinos sobre a morfologia, a apoptose e o crescimento in vitro de folículos pré-antrais. 2012. 97p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, PE, 2012.
- Jewgenow K, Stolte M.** Isolation of preantral follicles from nondomestic cats-viability and ultrastructural investigations. *Anim Reprod Sci*, v.44, p.183-193, 1996.
- Karja NW, Otoi T, Murakami M, Fahrudin M, Suzuki T.** In vitro maturation, fertilization and development of domestic cat oocytes recovered from ovaries collected at three stages of the reproductive cycle. *Theriogenology*, v.57, p.289-298, 2002.
- Lima AKF.** Determinação da população folicular, criopreservação e cultivo de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais de gata doméstica. 2006. 75p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Veterinária. Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, 2006.
- Migliorisi G, Folkes E, Pawlowski N, Cramer E.** In vitro studies of human monocyte migration across endothelium in response to leukotriene B4 and MetLeuPhe. *Am J Pathol*, v.127, p.157-167, 1987.
- Naoh H, Otoi T, Shimamura T, Karja NWK, Agung B, Shimizu R, Taniguchi M, Nagai T.** Developmental competence of cat oocytes from ovaries stored at various temperature for 24 h. *J Reprod Dev*, v.53, p.271-277, 2007.
- Otoi T, Murakami M, Ooka A, Karja NWK, Suzuki T.** Effect of size and storage temperature on meiotic competence of domestic cat oocytes. *Vet. Rec*, v.148, p.116-118, 2001.
- Roy SK, Treacy BJ.** Isolation and long-term culture of human preantral follicles. *Fertil Steril*, v.59, p.783-790, 1993.
- Santos R, Silva JRV, Costa SHF, Rodrigues APR, Lôbo RNB, Figueiredo JR.** Conservação de folículos pré-antrais ovinos em solução salina 0,9% e PBS. *Rev Bras Reprod Anim*, v.27, p.32-39, 2003.
- Saumande J.** La foliculogênese chez les ruminants. *Rec Med Vet*, v.167, p.205-218, 1991.
- Silva JRV, Brasil AF, Santos RR, Costa SHF, Rodrigues APR, Ferreira MAL, Machado VP, Figueiredo JR.** Taxa de degeneração de folículos primordiais caprinos conservados em TCM 199 ou PBS em diferentes temperaturas e tempos de incubação. *Cienc Rural*, v.33, p.913-919, 2003.
- 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 situ. *Theriogenology*, v.54, p.809-822, 2000.

Solano R, Armas R, Pupo CA, Castro FO. Short term preservation of intrafollicular oocytes at 4°C. *Theriogenology*, v.41, p.299, 1994. Resumo.

Twagiramungu H. Media and time of oocytes transport influence their developmental competence for in vitro production of bovine embryos. *Theriogenology*, v.49, p.299, 1998. Resumo.

Vanhoutte L, Cortvrindt R, Nogueira D, Smitz J. Effects of chilling on structural aspects of early preantral mouse follicles. *Biol Reprod*, v.70, p.1041-1048, 2004.

Wolf BA, Wildt DE. Development of blastocysts of domestic cat oocytes matured and fertilized in vitro after prolonged cold storage. *J Reprod Fertil*, v.106, p.135-141, 1996.

Wood T, Montali RJ, Wildt DE. Follicle oocyte atresia and temporal taphonomy in cold stored domestic cat ovaries. *Mol Reprod Dev*, v.46, p.190-200, 1997.
