

Ocorrência e caracterização de folículos multioócitos em ovelhas portadoras da genética prolífica *FecG^E*

Michele Pereira da Silva¹, Maiana Silva Chaves², Valesca Barreto Luz³, Eduardo de Oliveira Melo⁴,
Samuel Rezende Paiva⁵, Hymerson Costa Azevedo⁶

Resumo - Os folículos multioócitos são relatados em muitas espécies de mamíferos, porém são escassos os trabalhos que descrevem sua ocorrência e características em ovelhas em especial daquelas portadoras de mutações gênicas a exemplo da *FecG^E* que aumenta a taxa de ovulação. O objetivo desse trabalho foi caracterizar morfológicamente os folículos multioócitos e associar sua ocorrência e características à variante genética prolífica *FecG^E* em ovelhas Santa Inês. As ovelhas foram genotipadas para a *FecG^E* e divididas em três grupos genótipos: 19 homozigotas não mutantes (*FecG^{+/+}*), 27 heterozigotas (*FecG^{+E}*) e 11 homozigotas (*FecG^{E/E}*) mutantes. Os ovários das ovelhas foram coletados e destinados para processamento histológico, a fim de realizar a identificação, classificação quanto ao estágio de desenvolvimento e quantidade de oócitos inclusos, viabilidade folicular e, a análise morfométrica dos folículos e, dos oócitos, núcleos e nucléolos dos multioócitos. As médias obtidas em cada variável analisada foram submetidas à ANOVA ou *Kruskal-Wallis* a depender de sua normalidade e homocedasticidade com pós-teste de *Tukey* ou *Dunn*, respectivamente, e as frequências analisadas pelo teste Qui-quadrado, considerando-se 5% como nível de significância. Não foi observada diferença na frequência de multioócitos entre os genótipos: *FecG^{E/E}* (3,5%), *FecG^{+E}* (3,3%) e *FecG^{+/+}* (3,0%). Houve uma maior viabilidade dos multioócitos de transição nas fêmeas *FecG^{E/E}* (95,0%) e *FecG^{+E}* (90,9%) em relação a *FecG^{+/+}* (73,3%). O diâmetro oocitário dos folículos de transição bioócitos de ovelhas portadoras da mutação foi maior que aquele das não mutantes: *FecG^{E/E}* (18,4 µm); *FecG^{+E}* (16,7 µm) e; *FecG^{+/+}* (13,9 µm). Os folículos multioócitos são verificados em ovelhas da raça Santa Inês e sua frequência não é afetada pela mutação *FecG^E*, porém as ovelhas mutantes possuem folículos de transição com maior viabilidade e oócitos com maior diâmetro.

Termos para indexação: GDF-9, mutação, oócito, ovino, polioócito, prolificidade.

Introdução

A ovinocultura contribui com a geração de renda e possibilita a fixação do homem em áreas rurais com diferentes condições edafoclimáticas. Para que essa atividade se torne mais rentável, a melhoria do desempenho reprodutivo dos animais é fundamental, considerando que este fator é limitante para a sua lucratividade (Morais, 2011). Programas de melhoramento genético vêm possibilitando aumentar a frequência de mutações gênicas responsáveis por fenótipos de interesse produtivo, a exemplo do aumento da prolificidade (Milazzotto et al., 2008). Em ovelhas Santa Inês, no gene Fator de Crescimento e Diferenciação- 9 (*Growth Differentiation Factor- 9*, GDF-9), que codifica a proteína de mesmo nome, foi descoberta uma mutação nomeada *Fecundity Gene* - Embrapa (*FecG^E*), responsável por um efeito aditivo na taxa de ovulação (82%) e prolificidade (58%) em homozigose (Silva et al., 2011; Azevedo et al., 2015).

A taxa de ovulação está relacionada com a quantidade de oócitos aptos a serem ovulados por ciclo estral de uma fêmea, sendo normalmente observado que cada gameta está envolvido por células somáticas formando um folículo, o qual lhe disponibiliza um ambiente favorável para sua maturação e posterior fertilização (Hafez; Hafez, 2004). Apesar dessa morfofisiologia característica, trabalhos relatam a ocorrência de folículos contendo mais de um oócito, denominados multioócitos, oriundos de uma incompleta separação das células germinativas no início da foliculogênese ou induzidos por altos níveis de estrógeno durante o desenvolvimento neonatal (Kipp et al., 2007; Tingen et al., 2009).

Os multioócitos estão presentes em muitas espécies de mamíferos, com frequência variável dentro e entre as espécies e, produzindo mais estradiol quando comparados a folículos unioocitários (Payan-Carreira; Pires, 2008; Stankiewicz et al., 2009; Reynaud et al., 2010). Os oócitos dos folículos multioócitos têm uma menor taxa de fertilização *in vitro* quando comparados aos oócitos de folículos

¹Graduanda em Medicina Veterinária, bolsista CNPq/Pibic/Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

²Médica Veterinária, mestre em Sanidade e Reprodução de Ruminantes, bolsista CAPES, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE.

³Médica Veterinária, doutora em Biotecnologia, bolsista de Desenvolvimento Científico e Tecnológico Regional, Fapitec/SE, Aracaju, SE.

⁴Biólogo, doutor em Ciências Biológicas, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

⁵Biólogo, doutor em Genética e Melhoramento, pesquisador da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF.

⁶Médico Veterinário, doutor em Reprodução Animal, pesquisador da Embrapa Tabuleiros Costeiros, Aracaju, SE.

monoocitários, porém com capacidade de produzir embriões no estágio de blastocistos (Stankiewicz et al., 2009). Em ovelhas, os escassos trabalhos que descrevem a ocorrência e características dos multioócitos confirmam a sua viabilidade com possível papel na função ovariana (Hadek, 1958; Oliveira et al., 2017).

Apesar da hipótese de que o aumento da frequência de multioócitos eleva a prolificidade (Spitschak et al., 2007; Payan-Carreira; Pires, 2008) esta relação não tem sido confirmada especialmente no caso das mutações que elevam a taxa de ovulação. Analisar a frequência e caracterizar a população de multioócitos pode elucidar mecanismos de ação gênica como aqueles relacionados à mutação *FecG^E* e servir como base fisiológica para o desenvolvimento de biotecnologias reprodutivas de multiplicação de animais geneticamente superiores, como a produção de embriões in vitro, que têm como finalidade maximizar o desempenho reprodutivo e produtivo dos rebanhos.

O objetivo desse trabalho foi caracterizar morfologicamente os folículos multioócitos e associar sua ocorrência e características à variante genética prolífica *FecG^E* em ovelhas Santa Inês.

Material e Métodos

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), lei n.º. 11794/2008, aprovados na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Embrapa Tabuleiros Costeiros (Número de protocolo: 13072016.006) e ocorreram no período de outubro de 2010 até março de 2018. Foram utilizadas 57 ovelhas pertencentes ao Núcleo de Conservação in situ de Ovinos da Raça Santa Inês da Embrapa Tabuleiros Costeiros, localizado no Campo experimental Pedro Arle (CEPA), município de Frei Paulo, Sergipe, Brasil (Latitude: 10°36'08" Sul e Longitude: 37°38'29" Oeste).

A partir de amostras de sangue (5mL), colhidas através de punção da veia jugular e armazenadas em tubos contendo EDTA, as ovelhas foram genotipadas para o *FecG^E* por Reação de Cadeia da Polimerase – PCR/RFLP (Silva et al., 2011) no laboratório de genética animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília/DF, Brasil. Baseando-se no resultado da genotipagem, as ovelhas foram classificadas em três grupos genótipos: 19 homozigotas não mutantes (*FecG^{+/+}*) e, 27 heterozigotas (*FecG^{+/E}*) e 11 homozigotas (*FecG^{E/E}*) mutantes.

Todos os animais foram abatidos e tiveram seus ovários coletados assepticamente e transportados em meio tamponado com antibiótico até o laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (LABRA), na sede da Embrapa Tabuleiros Costeiros, em Aracaju, Sergipe, Brasil. Fragmentos de tecido (3x3x1 mm) foram retirados em pontos aleatórios do córtex do ovário direito e esquerdo de cada ovelha a fim de serem processados histologicamente: fixados em Carnoy por 12 horas, desidratados em séries crescentes de etanol, diafanizados em xilol, banhados e inclusos em parafina para confecção de lâminas elaboradas a partir de cortes seriados de 7 µm de espessura em micrótomo e, corados utilizando o método hematoxilina e eosina (Behmer et al., 1976).

Com o auxílio de microscópio óptico (400x) e câmera digital, os folículos foram quantificados e classificados quanto à quantidade de oócitos inclusos. Os multioócitos foram analisados quanto à morfologia das células da granulosa que circundavam os oócitos, sendo classificados quanto ao estágio de desenvolvimento: primordiais, presença de células pavimentosas; transição, presença de células pavimentosas e três ou mais células cuboides; primários, presença de uma camada completa de células cuboides; secundários, presença de duas ou mais camadas de células cuboides e; antrais, presença de mais de duas camadas de células cuboides e formação do antro (Ireland et al., 2008; Silva-Santos et al., 2011). Os folículos multioocitários foram classificados morfologicamente como normais ou degenerados com base na integridade da membrana basal do oócito, presença de corpos picnóticos no núcleo do oócito, retração oocitária e, organização das células da granulosa (Carambúla et al., 1999). Por meio das imagens capturadas, realizou-se a mensuração da largura e altura dos folículos, oócitos, núcleos e nucléolos e, a partir da média das duas medidas, foram calculados os diâmetros destas estruturas (Lundy et al., 1999) utilizando-se o software ZEN 2011.

Para análise dos dados, cada ovelha foi considerada uma repetição dentro de cada grupo genótipo e, as características dos multioócitos foram analisadas e comparadas quando apresentavam um número mínimo de repetições (n = 5) segundo a metodologia estatística adotada. Os dados foram submetidos à análise de normalidade (*Shapiro-Wilk*) e homocedasticidade (*Bartlett*) e aqueles com distribuição normal foram submetidos à análise de variância (ANOVA) para verificar se houve influência significativa do genótipo e, ao teste post-hoc de *Tukey* para comparar os grupos genótipos entre si. As características com distribuição não-normal dos dados foram submetidas ao teste de *Kruskal-Wallis* com comparação múltipla de médias e, ao pós-teste *Dunn* para verificar diferenças entre os genótipos. A diferença entre os genótipos quanto às frequências observadas e esperadas de folículos multioócitos normais foi analisada pelo teste de qui-quadrado. As avaliações estatísticas foram realizadas através dos programas computacionais Excel e SISVAR, com 95% de nível de confiança.

Resultados e Discussão

Os trabalhos que estudam folículos multioócitos em ovelhas são escassos e apesar de comprovarem a ocorrência nesta espécie (Hadek, 1958; Oliveira et al., 2017), não relatam a sua relação com mutações gênicas, em especial com a *FecG^E*. Os resultados deste trabalho demonstraram que a *FecG^E* não teve influência sobre a frequência de multioócitos (*FecG^{+/+}* - 3,0%; *FecG^{+/E}* - 3,3% e *FecG^{E/E}* - 3,5%) e, confirmaram sua ocorrência em ovinos Santa Inês, estando presente em 63,1% (36/57) das ovelhas, em 40,3% (46/114) dos ovários e representando 3,2% (315/9.637) do total de folículos observados.

Foram encontrados folículos multioócitos apenas nos estágios iniciais de desenvolvimento (primordial e de transição). Quando analisada a viabilidade desses folículos, foi observado que os multioócitos no estágio de transição sofreram influência do genótipo, com as ovelhas E/E (95,0%) e +/E (90,9%) apresentando uma maior frequência de folículos normais que as ovelhas +/+ (73,3%). O fato dos folículos multioócitos terem maior viabilidade nas ovelhas mutantes pode ter relação com a maior taxa de ovulação verificada como efeito desta mutação (Silva et al., 2011). O GDF-9 tem sido associado à viabilidade e desenvolvimento dos folículos por regular a absorção de substratos energéticos para os oócitos (Sugiura; Eppig, 2005), além de diminuir a apoptose das células da granulosa (Orisaka et al., 2006), mecanismos estes que podem refletir-se na qualidade do folículo.

Foi observada a seguinte frequência de multioócitos de acordo com a quantidade de oócitos inclusos: dois (70,5%), três (20,0%), quatro (6,0%), cinco (2,3%), seis (0,6%) e sete (0,6%) oócitos (Figura 1). A frequência de oócitos por folículo observada neste trabalho está condizente com o relato de Reynaud et al. (2010), os quais identificaram uma menor ocorrência de multioócitos conforme aumenta a quantidade de oócitos. Em coelhas, foi observado que à medida que aumenta a quantidade de oócitos nos multioócitos, uma localização mais centralizada destes gametas está correlacionada com sua viabilidade (Al-Mufit et al., 1998), sendo importante a realização de trabalhos em ovelhas que identifiquem essa relação.

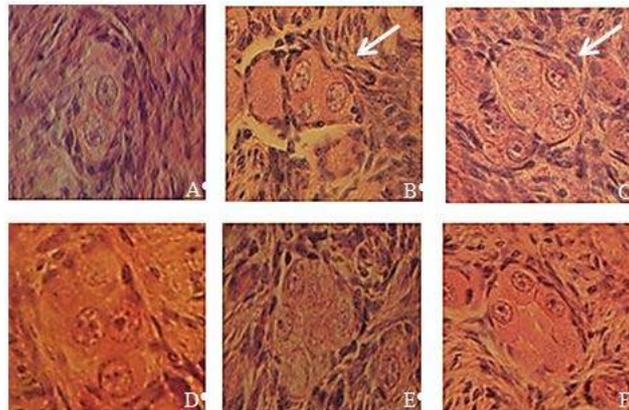


Figura 1. Folículos multioócitos observados em ovelhas *FecG^E*: transição com dois oócitos (A); transição com três oócitos (B); primordial com quatro oócitos (C); primordial com cinco oócitos (D); transição com seis oócitos (E); primordial com sete oócitos (F).

Fonte: Arquivo pessoal.

Na análise morfométrica, a comparação entre os genótipos foi feita apenas nos folículos bioócitos (Tabela 1) devido ao número insuficiente de repetições dos multioócitos com três ou mais oócitos, cujos resultados estão expostos desconsiderando a mutação *FecG^E* (Tabela 2). O genótipo teve influência apenas sobre o diâmetro oocitário dos bioócitos em estágio de transição.

Tabela 1. Diâmetro médio e erro-padrão de folículos, oócitos, núcleos e nucléolos de bioócitos primordiais e de transição de ovelhas Santa Inês em função do genótipo *FecG^E*.

Categoria folicular	Genótipos <i>FecG^E</i>		
	+/+	+/E	E/E
	Diâmetro folicular (µm)		
Primordial	28,7±2,0	29,2±1,5	27,4±4,3
Transição	35,4±1,9	29,7±2,0	30,5±2,9
	Diâmetro oocitário (µm)		
Primordial	14,9±1,0	16,8±0,7	15,9±1,1
Transição	13,9±0,9 ^b	16,7±1,0 ^a	18,4±1,2 ^a
	Diâmetro do núcleo (µm)		
Primordial	9,4±0,3	9,7±0,3	9,9±1,2
Transição	10,0±0,2	9,9±0,4	9,5±0,9
	Diâmetro do nucléolo (µm)		
Primordial	2,2±0,2	2,3±0,1	2,0±0,2
Transição	2,1±0,3	2,2±0,2	2,2±0,3

(+/+): genótipo homocigoto não mutante, (+/E): genótipo heterocigoto mutante e (E/E): genótipo homocigoto mutante. Médias acompanhadas de letras diferentes na mesma linha diferem significativamente ($P < 0,05$).

Tabela 2. Médias e erros padrões dos diâmetros dos folículos, oócitos, núcleos e nucléolos de multioócitos primordiais e de transição de ovelhas Santa Inês em função do número de oócitos.

Categoria folicular	Multioócitos			
	3 oócitos	4 oócitos	5 oócitos	6 oócitos
	Diâmetro folicular (µm)			
Primordial	34,9±1,6	42,1±2,8	*	-
Transição	36,6±1,1	40,4±3,1	50,9±3,3	46,6±9,1
	Diâmetro oocitário (µm)			
Primordial	16,7±0,5	16,7±1,2	*	-
Transição	15,7±0,6	15,8±1,0	16,3±1,9	16,4±1,2
	Diâmetro do núcleo (µm)			
Primordial	9,7±0,4	10,7±0,4	*	-
Transição	10,6±0,3	9,9±0,7	8,7±0,3	10,5±1,2
	Diâmetro do nucléolo (µm)			
Primordial	2,2±0,1	2,0±0,4	*	-
Transição	2,4±0,1	2,0±0,1	2,4±0,4	2,6±0,5

(-) Não foi encontrado. (*) Não foi possível realizar análise descritiva - número de repetições ≤ 5 . OBS: Foram identificados apenas dois folículos primordiais com sete oócitos não sendo analisados morfometricamente por terem pertencido a apenas uma ovelha *FecG^{+/E}*.

Conclusões

Os folículos multioócitos são verificados em ovelhas da raça Santa Inês e possuem características específicas. A frequência dos multioócitos não é afetada pela mutação *FecG^E*, porém as ovelhas mutantes possuem folículos de transição com maior viabilidade e oócitos com maior diâmetro.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado em parte pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq), Fundação de Apoio à Pesquisa e a Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe (Fapitec/SE) - Brasil, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (Capes - Código 001), e Financiadora de Estudos e Projetos - Brasil (Finep).

Referências

- AL-MUFTI, W.; BOMSEL-HELMREICH, O.; CHRISTIDÈS, J. P. Oocyte size and intrafollicular position in polyovular follicles in rabbits. **Journal Reproduction and Fertility**, v. 82, p. 15-25, 1988.
- AZEVEDO, H. C.; PAIVA, S. R.; MELO, E. de O.; SILVA, B. D. M.; OLIVEIRA, A. A. de; MUNIZ, E. N. **Estudos da genética *FecG^E* na prolificidade de ovinos**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2015. 19 p. (/ Embrapa Tabuleiros Costeiros. Documentos, 193).
- BEHMER, A. O.; TOLOSA, E. M. C.; FERITAS-NETO, A. G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. São Paulo: São Paulo University Company, 1976. p. 341.
- CARAMBULA, S. F.; GONCALVES, P. B.; COSTA, L. F.; FIGUEIREDO, J. R.; WHEELER, M. B.; NEVES, J. P.; MONDADORI, R. G. Effect of fetal age and method of recovery on isolation of preantral follicles from bovine ovaries. **Theriogenology**, v. 52, p. 563-571, 1999.
- HADEK, R. Morphological and histochemical study in the ovary of the sheep. **American Journal of Veterinary Research**, v. 19, n. 73, p. 873-881, 1958.
- HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. São Paulo: Manole, 2004.

IRELAND, J. L. H.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; THEMEN, A. P. N.; WARD, F.; LONERGAN, P.; SMITH, G. W.; PEREZ, G. I.; EVANS, A. C. O.; IRELAND J. J. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. **Biology of Reproduction**, v. 79, p. 1219-1225, 2008.

KIPP, J. L.; KILEN, S. M.; BRISTOL-GOULD, S.; WOODRUFF, T. K.; MAYO, K. E. Neonatal exposure to estrogens suppresses activating expression and signaling in the mouse ovary. **Endocrinology**, v. 148, p. 1968-1976, 2007.

LUNDY, T.; SMITH, F.; O'CONNELL, A.; HUDSON, N. L.; MCNATTY, K. P. Populations of granulosa cells in small follicles of the sheep ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 155, p. 251-262, 1999.

MORAIS, L. C. O. de. **Importância do desempenho reprodutivo de bovinos**, 2011. Disponível em:
<https://portais.ufg.br/uploads/67/original_semi2011_Lorraine_Cristina_2c.pdf>. Acesso em: 02 jul. 2018.

MILAZZOTTO, M. P.; VISINTIN, J. A. Biotecnologias da reprodução animal-biologia molecular aplicada à biotecnologia. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 11, p. 145-148, 2008.