



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

WANESSA BLASCHI

**EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE
ÁCIDO 3-INDOL-ACÉTICO NA ATIVAÇÃO E
CRESCIMENTO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIIS
BOVINOS DA RAÇA NELORE**

Londrina
2006

WANESSA BLASCHI

**EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE
ÁCIDO 3-INDOL-ACÉTICO NA ATIVAÇÃO E
CRESCIMENTO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS
BOVINOS DA RAÇA NELORE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (área de concentração em Sanidade Animal).

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda

Londrina
2006

WANESSA BLASCHI

**EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE
ÁCIDO 3-INDOL-ACÉTICO NA ATIVAÇÃO E
CRESCIMENTO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS
BOVINOS DA RAÇA NELORE**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda

Prof. Dr. Cesar Roberto Esper

Profa. Dra. Maria Isabel Mello Martins

Londrina, 20 de fevereiro de 2006.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Virologia Animal e no Laboratório de Anatomia Patológica do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto às agências e órgãos de fomento à pesquisa abaixo relacionados:

1. PROPPG: Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-graduação da Universidade Estadual de Londrina

2. CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Dedicatória

Ao Vovô Archimedes, um homem batalhador que marcou a minha infância com boas recordações, e que deixou grande saudade. (*em memória*)

Aos meus pais pelo amor incondicional

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas oportunidades que me são dadas nesta existência, pelas condições físicas e espirituais para enfrentar os desafios de cada dia.

A Mamãe Silvia e ao Papai Edson, por não medirem esforços para a realização dos meus sonhos, pelo incentivo na minha formação profissional e pelo carinho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda, pela oportunidade de ser sua orientada, pelo exemplo de dedicação e esforço, pela motivação em seguir a área acadêmica, por todo o apoio desde a época da residência. Além da amizade, da paciência, e da disponibilidade tanto para assuntos profissionais quanto pessoais, nos ajudando a manter o equilíbrio emocional para prosseguir nosso trabalho.

A Marcela Prada por ser prestativa e atenciosa.

A Dra. Evelyn R. Andrade, pelo auxílio e total colaboração para execução deste trabalho, pela paciência e dedicação com que ensinou esta biotécnica, pela amizade e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Amauri A. Alfieri e a Profa. Dra. Alice F. Alfieri, por disponibilizarem o laboratório de virologia animal para realização deste trabalho, pelo apoio e auxílio.

A Profa. Dra. Ana Paula Bracarence por disponibilizar o laboratório de anatomia patológica animal, para realização deste trabalho.

Ao meu grande amor Thales, pelo incentivo, momentos de descontração, pelo auxílio na execução deste trabalho e principalmente pela paciência e carinho nos momentos difíceis.

Ao meu irmão Marco Antônio, minha cunhada Claudia pelos momentos maravilhosos que passamos juntos todas as vezes que estou em casa, pela amizade e companheirismo mesmo apesar da distância, e pelo grande presente que me deram: Pedro Henrique meu sobrinho e afilhado (a paixão da tia!)

Aos meus avós Nena, Alice e Silvio, pelo carinho e apoio.

Aos meus queridos tios, tias e primas pela amizade, carinho e grande incentivo.

A D. Marlene e ao Sr. Jacir, por terem me recebido de braços abertos em sua casa, pelo apoio e afeto dedicados a mim (minha segunda família!).

A família Rigo e Barreiros: Tios, primos e minhas cunhadas Thamís e Thais, pelo carinho e apoio.

A minha irmã por afinidade: Fabi, pelo companheirismo, por estar sempre disposta a me ouvir e dar conselhos, pelas risadas, pela amizade.

Aos colegas de residência: Alan, João e Fabíola, pelo incentivo, companheirismo e amizade.

As amigas de república: Flavião e Ju, pelo companheirismo, convivência, harmonia, muitas risadas, pelo conforto nos momentos difíceis, pela grande amizade.

As companheiras de equipe de trabalho: Melina, Carol, Luciana, Marilu: por estarem sempre dispostas a ajudar, pelo interesse e amizade.

A Karina Rubin, companheira de equipe que além de ajudar na execução deste trabalho me acolheu em sua casa quando cheguei a Londrina.

A companheira de equipe Lívia, pelas nossas longas conversas, pela amizade e auxílio.

A Kerley e Claudia, por estarem sempre dispostas a ajudar e pelo apoio técnico para realização deste trabalho.

A Maria, Beti, todos os técnicos e funcionário dos laboratórios, que foram fundamentais para realização deste trabalho.

Ao Brunão, pela disposição com que percorreu comigo todos os departamentos e laboratórios da UEL atrás do “osmometro”, pelo companheirismo nas disciplinas, pela amizade.

Aos meus colegas de pós-graduação, por mostrarem interesse na minha pesquisa, pela convivência agradável nas disciplinas, pela amizade.

BLASCHI, Wanessa. **Efeito de diferentes concentrações de ácido 3-indol-acético na ativação e crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais bovinos da raça Nelore.** 2006. 58f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

RESUMO

Avaliou-se o desenvolvimento de folículos pré-antrais bovinos da raça Nelore, após o cultivo *in vitro* do córtex ovariano em várias concentrações de ácido 3-indol acético (VETEC[®]) (IAA). O córtex ovariano foi dividido em fragmentos de aproximadamente 5x5mm. Dois fragmentos foram imediatamente fixados em Carnoy (fragmentos não-cultivados) e os demais destinados individualmente ao cultivo em placas com 24 orfícios (NUNCLON[®]) contendo meio essencial mínimo suplementado (MEM+) (GIBCO[®]) acrescido de 10, 40, 100, 500 ou 1000 ng/mL de IAA. O período de cultivo foi de dois e seis dias a 39 °C e 5% de CO₂ em ar. Após o cultivo *in vitro*, observou-se redução significativa de folículos primordiais e aumento de folículos em desenvolvimento (P<0,05), para o MEM+ acrescido de 10 ng/mL de IAA. Em relação aos folículos dos fragmentos não-cultivados, houve redução de folículos primordiais histologicamente normais no cultivo por dois e seis dias (P<0,05). Após dois dias de cultivo, a redução de folículos normais em desenvolvimento foi observada nos folículos suplementados com 1000 ng/mL de IAA. Após seis dias de cultivo, a redução de folículos normais em desenvolvimento foi observada apenas nos folículos suplementados com 100 ng/mL e 500 ng/mL de IAA. Conclui-se que, folículos pré-antrais bovinos da raça Nelore podem ser ativados *in vitro* após seis dias de cultivo em MEM+ suplementado com 10 ng/mL de IAA.

Palavras-chave: Folículos pré-antrais. Cultivo *in vitro*. Ácido 3-indol acético. Bovino. Nelore.

BLASCHI, Wanessa. **Effect of different concentrations of indol acetic acid in the activation and growth of Nelore preantral follicles.** 2006. 58f. Dissertation (Master Degree of Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the development of Nelore preantral follicles after *in vitro* culture of ovarian cortex in different concentrations of indol acetic acid (VETEC[®]) (IAA). The ovarian cortex was divided into fragments of approximately 5x5 mm. Two fragment was immediately fixed in Carnoy (fragments no-cultured) where as the other fragments were cultured individually in culture dishes with 24 holes (NUNCLON[®]) content minimum essential medium supplemented (MEM+) (GIBCO[®]) and add with 10, 40, 100, 500 or 1000 ng/mL of IAA. The culture period was two and six days at 39 °C with 5% CO₂ in air. After six days of *in vitro* culture, the MEM+ added of 10 ng/ml of IAA presented meaningful reduction of primordial follicles and increase of developing follicles (P<0.05). The culture of ovarian cortex for two and six days, in all tested media, reduced the percentages of healthy primordial follicles when compared to fragments no-cultured (P<0.05). After two days of culture the reduction of healthy development follicles was observed in the follicles treated with 1000 ng/ml of IAA. After six days of culture the reduction of healthy development follicles was only observed in the follicles treated with 100 ng/mL and 500 ng/mL of IAA. In conclusion, Nelore bovine primordial follicles may be successfully activated *in vitro* after six days culturing in MEM+ containing 10 ng/mL of IAA.

Keywords: Preantral follicles. *In vitro* culture. Indol acetic acid. Nelore.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Esquema ilustrando do ovário na espécie bovina com suas principais estruturas.
(Adaptado de MAX *et al.* 2004)..... 17
- Figura 2** – Representação esquemática do desenvolvimento dos folículos ovarianos.
(Adaptado de RODGERS *et al.* 1999) 20

Artigo para publicação

- Figura 1** – Protocolo experimental para o cultivo *in vitro* de folículos primordiais bovinos da raça Nelore na presença ou ausência de IAA..... 43
- Figura 2** – Folículo primordial viável em fragmento de córtex ovariano de novilha Nelore, cultivado *in vitro* por 6 dias em MEM+ 10 ng/mL de IAA..... 46
- Figura 3** – Folículos primordiais e em desenvolvimento viáveis em fragmento de córtex ovariano de novilha Nelore, cultivado *in vitro* por 6 dias em MEM+ 10 ng/mL de IAA 46
- Figura 4** – Folículos primordiais degenerados, em fragmento de córtex ovariano de novilha Nelore, cultivado *in vitro* por 6 dias em MEM+ 1000 ng/mL de IAA..... 48
- Figura 5** – Folículo primordial degenerado, em fragmento de córtex ovariano de novilha Nelore, cultivado *in vitro* por 6 dias em MEM+ 1000 ng/mL de IAA..... 48
- Figura 6** – Folículos primários degenerados em fragmento de córtex ovariano de novilha Nelore, cultivado *in vitro* por 2 dias em MEM+ 1000 ng/mL de IAA..... 51
- Figura 7** – Folículos primários degenerados em fragmento de córtex ovariano de novilha Nelore, cultivado *in vitro* por 2 dias em MEM+ 1000 ng/mL de IAA..... 51

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Porcentagem de folículos primordiais e em desenvolvimento nos fragmentos de córtex não cultivados e nos fragmentos cultivados *in vitro* por dois e seis dias nos diferentes tratamentos, em ovários de novilhas Nelore, Londrina 2006, 2006 45
- Tabela 2** – Viabilidade de folículos primordiais em fragmentos de córtex ovariano não-cultivados e nos fragmentos após cultivo *in vitro* por dois e seis dias nos diferentes tratamentos, em ovários de novilhas Nelore, Londrina, 2006 47
- Tabela 3** – Viabilidade de folículos em desenvolvimento em fragmentos de córtex ovariano não cultivado e no tecido após cultivo *in vitro* por dois e seis dias nos diferentes tratamentos, em ovários de novilhas Nelore, Londrina, 2006 50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BrdU	Bromodesoxiuridina
CGP	Células Germinativas Primordiais
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
FIV	Fertilização <i>In Vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
HE	Hematoxilina-Eosina
IA	Inseminação Artificial
IAA	Ácido 3 Indol Acético
ITS	Insulina + Transferrina + Selenio
IGF	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina
MEM	Meio Essencial Mínimo
MEM+	Meio Essencial Mínimo suplementado
MOIFOPA	Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré- Antrais
TE	Transferência de Embrião
UI	Unidade Internacional

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 O OVÁRIO BOVINO	16
2.1.1 Oogênese	18
2.1.2 Foliculogênese	19
2.2 ATRESIA	21
2.3 POPULAÇÃO FOLICULAR EM OVÁRIOS MAMÍFEROS	22
2.4 ATIVAÇÃO E CRESCIMENTO DOS FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS <i>IN VITRO</i>	22
2.5 CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS	23
2.6 DESENVOLVIMENTO FOLICULAR <i>IN VITRO</i>	24
2.7 ÁCIDO 3-ÍNDOL-ACÉTICO (IAA)	24
2.8 TÉCNICAS UTILIZADAS PARA COMPROVAR A ATIVAÇÃO E O CRESCIMENTO DE FOLÍCULOS PRIMORDIAIS.....	25
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
4 JUSTIFICATIVA	34
5 HIPÓTESE CIENTÍFICA	35
6 OBJETIVOS	36
6.1 OBJETIVO GERAL	36
6.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	36
7 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	37
Resumo	38
Abstract.....	38
1 Introdução.....	40
2 Material e Métodos.....	42
3 Resultados.....	45

4 Discussão.....	52
5 Referências bibliográficas	55
6 Conclusões.....	58

1 INTRODUÇÃO

Diversas biotécnicas na área da reprodução animal vêm sendo desenvolvidas, visando o melhoramento da produção e reprodução de animais domésticos, principalmente nas espécies de interesse econômico. Dentre estas biotécnicas, podemos destacar a Inseminação Artificial (I.A.), a Transferência de Embriões (T.E.), a Fecundação *In Vitro* (F.I.V.), a transgênese e a clonagem. Nas duas últimas décadas, a biotécnica denominada Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais (MOIFOPA), tem se mostrado promissora por permitir o isolamento dos oócitos inclusos nesses folículos, o seu cultivo *in vitro*, e sua criopreservação. Em associação com outras biotécnicas reprodutivas, como a FIV e TE, a MOIFOPA poderá não somente otimizar, como também conservar o material genético de animais de alto valor econômico e zootécnico, e de espécies raras ou em extinção.

O ovário de diferentes espécies de mamíferos contém milhares de oócitos inclusos em folículos primordiais e apenas 0,01% destes folículos desenvolvem-se até o estágio de folículo pré-ovulatório (EPPIG; O'BRIEN, 1996), a biotécnica de MOIFOPA tem por objetivo recuperar os oócitos inclusos nesses folículos e cultivá-los *in vitro* até sua completa maturação, evitando a atresia. A ativação é a primeira etapa para fazer com que os folículos primordiais que estavam em repouso iniciem seu crescimento. Neste contexto, o desenvolvimento de um sistema eficiente de cultivo *in vitro* é um ponto crucial para a ativação desses folículos, permitindo o desenvolvimento de um grande número de folículos pré-antrais, o que possibilitará uma melhor compreensão dos diversos fatores implicados na foliculogênese e no processo de atresia (FIGUEIREDO, 1995). Também poderá ser uma alternativa para o fornecimento de milhares de oócitos viáveis, inclusos em folículos pré-antrais em diferentes estágios de desenvolvimento, para as biotécnicas de FIV e clonagem (TELFER, 1996).

As fêmeas da raça Nelore têm se destacado no cenário reprodutivo nacional, devido ao sucesso da biotécnica de FIV associada à valorização desta raça. Uma possível explicação seria que animais da raça Nelore, ou vacas zebuínas em geral apresentam normalmente um maior número de folículos recrutados por onda, em comparação com vacas da raça européia (RUBIN et al., 2005). Este fato despertou o interesse de pesquisadores nacionais e internacionais. Com o advento da MOIFOPA, os fatores envolvidos na

foliculogênese da raça Nelore poderão ser esclarecidos, além de preservar o material genético destes animais pela criopreservação.

A revisão de literatura a seguir aborda aspectos relacionados ao ovário da espécie bovina, oogênese, foliculogênese, população folicular, atresia, a ativação e crescimento de folículos pré-antrais cultivados *in vitro*, o ácido 3 indol-acético, bem como, a importância das técnicas utilizadas para comprovar a ativação e crescimento de folículos pré-antrais bovinos *in vitro*. Finalmente, será mostrada a contribuição deste trabalho sob a forma de artigo científico referente ao cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais bovinos da raça Nelore.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O OVÁRIO BOVINO

O ovário mamífero é um órgão complexo, composto de vários tipos celulares que incluem oócitos, células da granulosa, da teca, do estroma e do epitélio da superfície ovariana. Estes tipos celulares estão localizados na região cortical do ovário e, posteriormente, se diferenciam em vários subtipos. Por exemplo, as células da granulosa diferenciam-se em células do *cúmulus*, murais ou luteais, enquanto que as células da teca desenvolvem-se em camadas internas e externas (ERICKSON; SHIMASAKI, 2003). A região medular é localizada na porção mais interna do ovário, sendo constituída por tecido conjuntivo (fibroblastos, fibronectina e fibras colágenas do tipo I e II), nervos, vasos sanguíneos e linfáticos responsáveis pela nutrição e sustentação do ovário (Figura 1). Outros fatores produzidos pelos diferentes tipos celulares descritos contribuem para a formação de um sistema bastante complexo que regula as funções do ovário, que incluem a produção de gametas e hormônios (ERICKSON; SHIMASAKI, 2003).

As fêmeas mamíferas nascem com um determinado número de oócitos formados durante a vida fetal, como consequência dos processos de oogênese e foliculogênese (SAUMANDE, 1981).

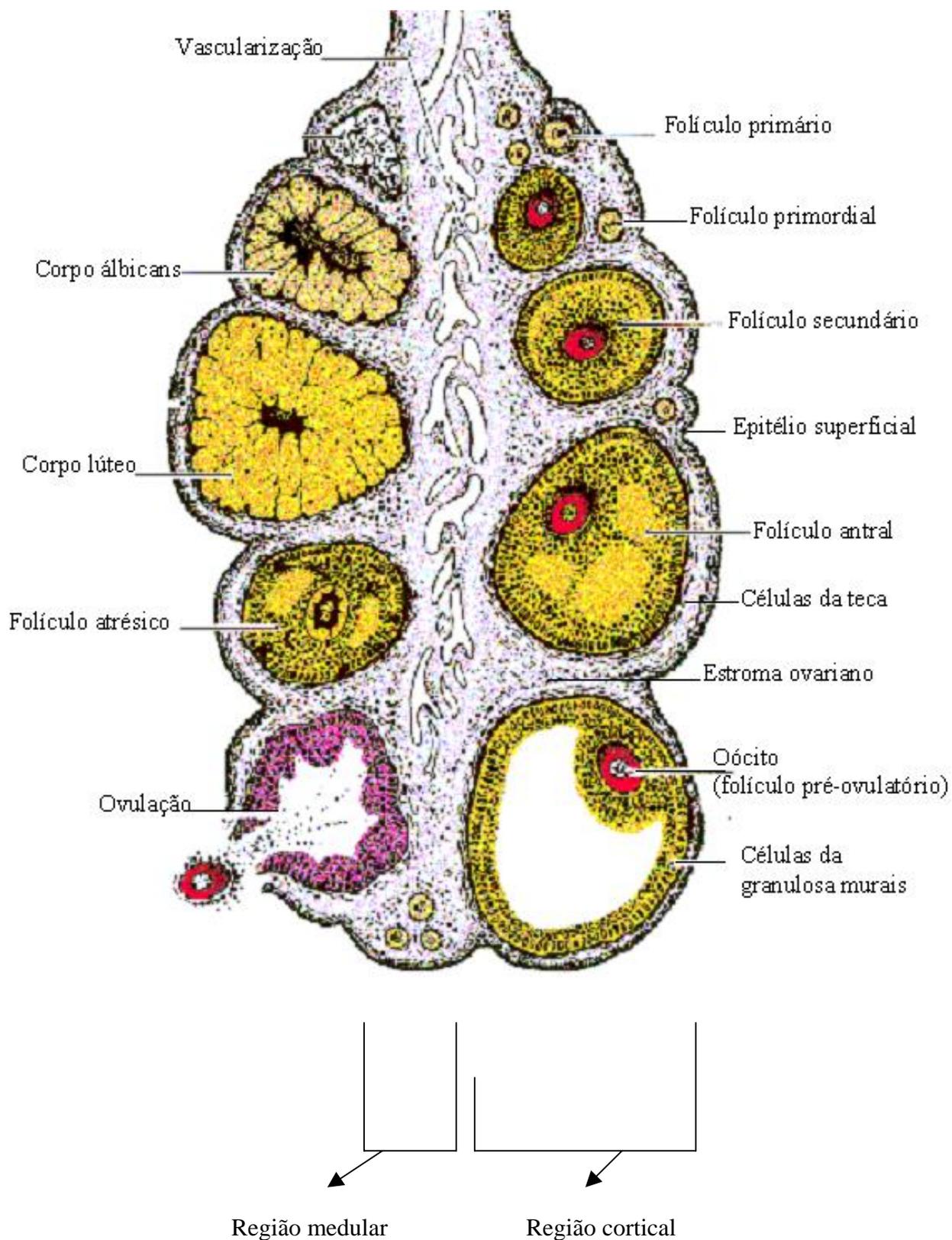


Figura 1 – Esquema ilustrando do ovário na espécie bovina com suas principais estruturas. (Adaptado de MAX et al. 2004).

2.1.1 Oogênese

A oogênese em mamíferos pode ser definida como uma seqüência de eventos pelo qual as células germinativas primordiais (CGP) desenvolvem-se e diferenciam-se até a formação do oócito haplóide até ser fecundado (RUSSE, 1983). A oogênese inicia-se na vida fetal, mas somente poderá ser completada meses ou anos mais tarde no animal adulto, após a fecundação (WASSARMAN, 1988).

A fase de multiplicação das CGP que culmina com a formação de oogônias, ocorre nos ovinos e bovinos no 31° e 42° dias de gestação, respectivamente (RUSSE, 1983). A transformação de oogônia em oócito é marcada pela replicação final do DNA durante o estágio de pré-leptóteno (interfase que segue a última divisão mitótica da oogônia), preparando a célula para a divisão meiótica (GORDON, 1994). A seguir, as oogônias iniciam a prófase da meiose e diferenciam-se em oócitos (HIRSHFIELD, 1991).

A meiose é iniciada aos 55° e 82° dias de gestação, respectivamente em ovinos (RUSSE, 1983) e bovinos (ERICKSON, 1966). Entretanto, no oócito primário, o processo meiótico é interrompido (1ª interrupção meiótica) e o núcleo permanece no estágio de diplóteno (ERICKSON, 1966), conhecido como estágio de dictióteno ou de vesícula germinativa (GORDON, 1994). Os oócitos permanecem em estágio de dictióteno por vários anos, até que a maturidade sexual seja alcançada na puberdade e comecem os ciclos reprodutivos, ou seja, permanecem no estágio de prófase I até imediatamente antes da ovulação, quando então a meiose é retomada (MOORE; PERSAUD, 1994), passando do estado de vesícula germinativa para diacinese (HIRSHFIELD, 1991). O núcleo do oócito começa a segunda divisão meiótica, resultando na formação do oócito secundário, mas avança apenas até a metáfase II, quando então a segunda divisão meiótica é interrompida (GORDON, 1994). Esta somente será retomada caso um espermatozóide penetre no oócito (MOORE; PERSAUD, 1994).

Apesar desses critérios amplamente aceitos, Johnson et al (2004) propuseram a constante renovação de gametas nas fêmeas mamíferas jovens e adultas. A possível explicação seria a origem extragonadal das células germinativas, a partir da medula óssea (JOHNSON et al., 2005). Entretanto, estas informações tornaram-se motivo de questionamento e controvérsias no meio acadêmico (BYSKOV et al., 2005).

2.1.2 Foliculogênese

A foliculogênese, evento iniciado na vida pré-natal na maioria das espécies, caracteriza-se pela formação, crescimento e maturação folicular. Este evento inicia-se com a formação do folículo primordial e culmina com a formação do folículo maduro, pré-ovulatório ou de De Graaf (SAUMANDE, 1991; MOORE; PERSAUD, 1994).

O folículo primordial é formado quando uma camada de células somáticas pavimentosas conhecidas como células da pré-granulosa, originadas do tecido celômico, envolve o oócito (RUSSE, 1983; WANDJI et al., 1992). Ainda na fase pré-natal, alguns folículos primordiais são ativados, crescem e diferenciam-se em folículos primários (oócito circundado por uma camada de células da granulosa de forma cubóide); secundários (oócito circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa de forma cúbica (HULSHOF et al., 1994) e terciários (oócitos circundados pela zona pelúcida, células foliculares, uma cavidade antral e células tecais (FORTUNE, 1994; FIGUEIREDO, 1995). Na espécie ovina, os folículos primordiais, primários, secundários e terciários são formados aos 90, 95, 103 e 150 dias de gestação, respectivamente (RÜSSE, 1983; CLARCK et al., 1996). Os folículos antrais na espécie bovina começam a aparecer no 250º dia de gestação (ERICKSON, 1966). Somente na vida pós-natal, sob efeito hormonal, os folículos podem atingir o estágio pré-ovulatório (FORTUNE, 1994).

A população folicular ovariana é bastante heterogênea (SAUMANDE, 1981). De acordo com seu grau de evolução, os folículos podem ser divididos em: a) folículos pré-antrais ou não cavitários, que abrangem os folículos primordiais, primários e secundários, e b) folículos antrais ou cavitários, compreendendo os folículos terciários, de De Graaf ou pré-ovulatório (HULSHOF et al., 1994).

As diferentes categorias de folículos ovarianos estão esquematicamente apresentados na Figura 2.

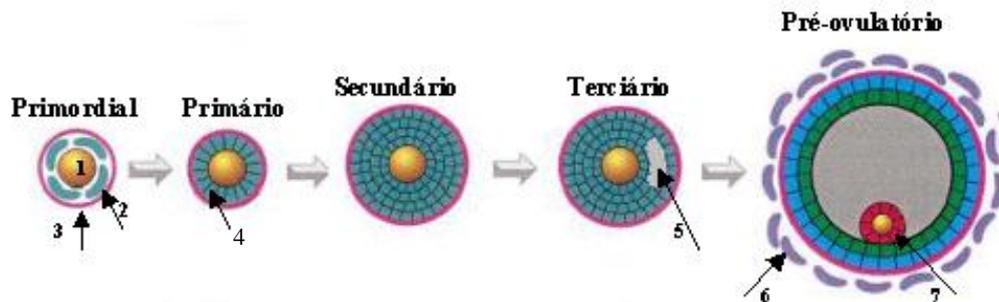


Figura 2 – Representação esquemática do desenvolvimento dos folículos ovarianos. (Adaptado de RODGERS et al. 1999). 1. Oócito primário; 2. Célula da Pré-granulosa; 3. Membrana basal; 4. Células da Granulosa; 5. Cavidade antral; 6. Célula da teca e 7. Oócito secundário.

a) Folículos pré-antrais

Os folículos pré-antrais compreendem os folículos primordiais, primários e secundários (HULSHOF et al., 1995). Estas três classes foliculares podem ser diferenciadas basicamente pelo número e forma das camadas de células da granulosa que circundam o oócito.

a.1) Folículos primordiais

Denominados ainda de folículos de reserva ou quiescentes os folículos primordiais compreendem cerca de 90% a 95% de toda a população folicular presente no ovário (ERICKSON, 1986) e são constituídos por um oócito central circundado por uma camada de células da pré-granulosa de forma pavimentosa. O diâmetro médio dos folículos primordiais varia de acordo com a espécie animal, sendo 35,2, 18,0 e 21,5 μm em bovinos (BRAW-TAL; YOSSEFI, 1997), ovinos (AMORIM et al., 2000) e caprinos (LUCCI et al., 1999a), respectivamente.

a.2) Folículos primários

Estes são constituídos por um oócito central circundado por uma única camada de células da granulosa de forma cúbica (HULSHOF et al., 1994). Na espécie bovina, ovina e caprina, o diâmetro médio encontra-se em torno de 55,06 (BRAW-TAL; YOSSEFI, 1997), 35,01 (AMORIM et al., 2000) e 34,7 μm (LUCCI et al., 1999a), respectivamente.

a.3) Folículos Secundários

São caracterizados por um oócito central circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa de forma cúbica. Nos estágios mais avançados, os folículos secundários apresentam as fibras do tecido conjuntivo organizadas paralelamente à membrana basal, para formar a camada de células tecais (VAN DEN HURK et al., 1997), podendo ainda ser encontrada a membrana hialinizada ou zona pelúcida (FIGUEIREDO, 1995). Nas espécies bovina, ovina e caprina, os folículos secundários possuem um diâmetro médio de 165,5 (BRAW-TAL; YOSSEFI, 1997), 66,03 (AMORIM et al., 2000) e 58,94 μm (LUCCI et al., 1999a), respectivamente.

b) **Folículos antrais**

Folículos antrais podem ser classificados como folículos terciários e folículos de De Graaf, denominados por maduros ou pré-ovulatórios.

b.1) Folículos terciários

Os folículos terciários são constituídos de um oócito circundado pela zona pelúcida, várias camadas de células da granulosa, uma pequena cavidade antral, uma membrana basal e duas camadas de células tecais conhecidas como teca interna e teca externa (GORDON, 1994).

b.2) Folículo de De Graaf ou pré-ovulatório

O folículo de De Graaf ou pré-ovulatório, representa o estágio terminal do desenvolvimento folicular (HULSHOF et al., 1994). O diâmetro dos folículos pré-ovulatórios pode variar de 1mm em ratas a 20mm de diâmetro na mulher (FORTUNE, 1994).

2.2 ATRESIA

Os folículos ovarianos pré-antrais representam cerca de 90% da população folicular (SAUMANDE, 1991) e são responsáveis pela constante renovação de folículos antrais no ovário (IRELAND, 1987). No entanto, cerca de 99,9% dos folículos de um ovário não ovulam, sofrem um processo fisiológico conhecido como atresia, que causa a morte do folículo, por via degenerativa (SAUMANDE, 1991) e/ou apoptótica (FIGUEIREDO, 1995).

A atresia acomete todas as espécies domésticas e pode ocorrer em qualquer estágio do desenvolvimento folicular (IRELAND, 1987). Segundo Ingran (1962), vários são os fatores que podem influenciar o processo de atresia, como idade, ciclo reprodutivo, gestação, lactação, hipofisectomia, ovariectomia unilateral, hormônios e nutrição. A atresia reduz de maneira significativa o número de oócitos potencialmente ovuláveis, apesar de ser um fenômeno natural e independentemente da fase na qual ocorra, tem como consequência a diminuição da produção de oócitos viáveis durante a vida reprodutiva de um animal.

2.3 POPULAÇÃO FOLICULAR EM OVÁRIOS DE MAMÍFEROS

Na espécie bovina, ao nascimento a população folicular está em torno de 235.000 folículos por ovário (BETTERIDGE et al., 1989). Nas espécies caprina, ovina e na mulher, este número foi estimado em 37.646 (LUCCI et al., 1999b), 160.000 (DRIANCOURT, 1991) e 2.000.000 (ERICKSON, 1986), respectivamente. No entanto, outros fatores como idade (RUSSE, 1983), raça (CAHILL et al., 1979), níveis hormonais (PETERS, 1976), genética (ERICKSON 1966) e estágio reprodutivo (ERICKSON et al., 1976) podem exercer influência sobre a população folicular ovariana.

2.4 ATIVAÇÃO E CRESCIMENTO DOS FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS *IN VITRO*

Para que o crescimento dos folículos primordiais ocorra, é necessário, primeiramente, que eles sejam ativados. A ativação dos folículos primordiais é um processo que se dá pela passagem dos folículos do *pool* de reserva ou folículos quiescentes para o *pool* de folículos em crescimento (primário, secundário, terciário e/ou pré-ovulatório; RUSSE, 1983). O primeiro sinal de ativação dos folículos primordiais é a retomada da proliferação das células da granulosa, ou seja, o folículo primordial, o qual apresenta-se circundado por uma camada de células da granulosa de formato pavimentoso e cúbico (BRAW-TAL; YOSSEFI, 1997) transforma-se em folículo primário (VAN DEN HURK et al., 1997), circundado por somente uma camada de células cubóides. Além da mudança da forma das células da granulosa, os volumes citoplasmático e nuclear do oócito aumentam consideravelmente

(HIRSHFIELD, 1991). O conhecimento sobre os fatores e mecanismos envolvidos na regulação e ativação dos folículos primordiais são escassos, entretanto, existem hipóteses de que o número de folículos primordiais que deixa o *pool* de folículos quiescentes é pré-determinado e, que o FSH age sobre a ativação folicular (BETTERIDGE et al., 1989). Hirsfield (1991) sugeriu que a ativação e o crescimento dos folículos primordiais devem ser controlados tanto por fatores endócrinos (gonadotrofinas), como por fatores intraovarianos (fatores de crescimento). A ativação dos folículos primordiais continua assim que é iniciada, independentemente da fase do ciclo, idade e gestação (JEWGENOW; PITRA, 1993).

No tocante à ativação de folículos primordiais *in vitro*, Eppig e O'Brien (1996) obtiveram sucesso após cultivo de ovários de camundongas recém-nascidas, onde um grande número de folículos primordiais iniciou seu crescimento e desenvolveram-se até o estágio de folículos secundários. Da mesma forma, a ativação de folículos primordiais bovinos (WANDJI et al., 1996; BRAW-TAL; YOSSEFI, 1997) e babuínos (FORTUNE et al., 1998) também foi alcançada com êxito após cultivo de pequenos fragmentos de córtex ovariano de fetos.

2.5 CULTIVO *in vitro* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAI

Notável progresso tem sido observado no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais em diferentes espécies animais. Em felinos (JEWGENOW; STOLT, 1996) e marsupiais (BUTCHER; ULLMAN, 1996) já foi observado o crescimento de folículos ovarianos pré-antrais isolados após o cultivo *in vitro*, porém, sem a formação de antro. Em felinos, a adição de FSH ao meio de cultivo estimulou o crescimento folicular (JEWGENOW; PITRA, 1993), enquanto a adição do Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) e Insulina + Transferrina + Selenium (ITS) ao meio, resultou na manutenção da integridade dos folículos pré-antrais cultivados *in vitro* (JEWGENOW; GORITZ, 1995). Nas espécies ovina (CECCONI et al., 1999), bovina (GUTIERREZ et al., 2000; McCAFFERY et al., 2000) e caprina (HUANMIN; YONG, 2000) folículos pré-antrais isolados desenvolveram-se *in vitro* até o estágio antral. O desenvolvimento de folículos antrais a partir de folículos pré-antrais foi igualmente obtido para humanos (ROY; TREACY, 1993). Em suínos, folículos secundários crescidos *in vitro* chegaram até a ovulação e tiveram seus oócitos fecundados *in vitro* (HIRAO et al., 1994), com desenvolvimento até o estágio de blastocisto (WU et al., 2001).

Apesar do grande avanço no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais com as referidas espécies supracitadas, os resultados mais satisfatórios têm sido observado em animais de laboratório. Daniel et al. (1989) relataram a produção *in vitro* de embriões de ratos a partir da fecundação de oócitos oriundos de folículos ovarianos pré-antrais cultivados *in vitro*. Em camundongos, o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais foi descrito por vários autores (EPPIG, 1997; QVIST et al., 1990; CARROLL et al., 1991; NAYÜDU; OSBORN, 1992). Entretanto, os melhores resultados foram observados por Eppig e O' Brien (1996) que obtiveram o nascimento de camundongos a partir de folículos pré-antrais desenvolvidos, maturados e fecundados *in vitro*. Carroll et al. (1990) obtiveram também o nascimento de camundongos *in vitro* após congelamento e descongelamento de folículos pré-antrais.

2.6 DESENVOLVIMENTO FOLICULAR *in vitro*

A composição do meio de cultivo é um importante fator para a obtenção de sucesso durante o cultivo de folículos pré-antrais *in vitro*. Figueiredo et al. (1994) descreveram que a sobrevivência dos folículos pré-antrais bovinos *in vitro* foi reduzida na ausência de hipoxantina e substratos energéticos, tais como piruvato e glutamina. Também foi demonstrado que a adição de uma mistura de piruvato (0,23 mM), glutamina (2 mM) e hipoxantina ao meio de cultivo de base denominado controle (Meio Essencial Mínimo - MEM) suplementado com antibióticos: penicilina – 20 UI/mL, estreptomicina – 200 µg/mL, 10% de soro fetal bovino e ITS (insulina – 6,25 µg/mL, transferrina – 6,25 ng/mL e selênio – 6,25 ng/mL) aumentou significativamente a porcentagem de folículos morfologicamente normais de 29,4% (meio controle) para 78,0% (meio tratado). Jewgenow (1998) também mostrou que a adição de piruvato, glutamina e hipoxantina ao MEM é essencial para o crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais felinos.

2.7 ÀCIDO 3-INDOL-ACÉTICO (IAA)

O Ácido 3-Indol-Acético (IAA) é uma molécula pertencente ao grupo das auxinas isolada da água de coco, que tem ação benéfica sobre os espermatozoides (NUNES e

COMBARNOUS, 1995). O IAA é um hormônio que atua no crescimento de vegetais (BARBIER-BRYGOO, 1995), ligando-se às proteínas solúveis da seiva, sendo transportado a receptores transmembranários, provocando, direta ou indiretamente, respostas celulares variadas (TONIOLLI et al., 1996), tais como o aumento da plasticidade da parede celular, aumento da entrada de água na célula e alteração do metabolismo dos ácidos nucléicos e da respiração celular (GALSTON; PURVES, 1960) promovendo o crescimento da célula (BARBIER-BRYGOO, 1995). Toniolli et al. (1996), utilizaram o IAA para conservar sêmen suíno a 15°C e obtiveram resultados satisfatórios. O IAA também foi utilizado para conservar folículos pré-antrais caprinos a 4°C por até 24 h (FERREIRA et al., 2001). Andrade et al. (2005), observaram indução da ativação em folículos ovarianos pré-antrais ovinos, cultivados *in vitro*, por dois ou seis dias em MEM suplementado e acrescido de 40 ng/ mL de IAA.

2.8 TÉCNICAS UTILIZADAS PARA COMPROVAR A ATIVAÇÃO E O CRESCIMENTO DE FOLÍCULOS PRIMORDIAIS

Após a ativação dos folículos primordiais, ocorrem importantes mudanças no oócito e nas células da granulosa. A análise morfológica, por meio de histologia, tem sido de grande valor para avaliar a integridade folicular. Associada à técnicas de coloração específicas, como o PAS-hematoxilina, a histologia auxilia principalmente na detecção da membrana basal ao redor do folículo (FIGUEIREDO et al., 1994; 1995).

Na análise histológica, as alterações indicativas de atresia em folículos pré-antrais ocorrem primariamente no oócito, sendo a picnose nuclear o primeiro sinal de atresia (WOOD et al., 1997). Mais recentemente, SILVA et al. (2002) demonstraram que oócitos de folículos primordiais caprinos são mais sensíveis à degeneração do que as células da granulosa. Já em folículos antrais, a picnose nuclear e a vacuolização citoplasmática ocorrem primariamente nas células da granulosa (HAY et al., 1976). Em seguida, ocorre o aparecimento de alterações degenerativas nas células tecais (O`SHEA et al., 1978) e, finalmente, no oócito (HAY et al., 1976).

Entretanto, o sucesso dos estudos sobre o início do crescimento de folículos primordiais depende da disponibilidade de marcadores sensíveis para detectar o princípio do crescimento folicular (WANDJI et al., 1996). O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) é uma proteína produzida por células em multiplicação, e que está

relacionado com o início de crescimento folicular (WANDJI et al., 1996). Neste contexto, FORTUNE et al. (1998) demonstraram que o PCNA pode ser utilizado com sucesso como marcador para detectar o início do crescimento de folículos primordiais de bovinos e babuínos. Por outro lado, a incorporação de marcadores radioativos (H^3 -timidina) ou não radioativos (Bromodesoxiuridina – BrdU) no DNA de células com atividade proliferativa também tem sido utilizada com bastante êxito para comprovar o início do crescimento de folículos primordiais bovinos (H^3 -timidina – BRAW-TAL; YOSSEFI, 1997) e felinos (BrdU – JEWGENOW, 1998).

3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, C.A.; LUCCHI, C.M.; RODRIGUES, A.P.R.; CARVALHO, F.C.A.; FIGUEIREDO, J.R.; RONDINA, D.; CECCHI, R.; GIORGETTI, A.; MARTINI A.; GONÇALVES, P.B.D. Quantitative and qualitative analysis of the efficiency of the mechanical method for the isolation of preantral follicles from ovine ovaries. **Theriogenology**, v.53, p.1251-1262, 2000.

ANDRADE, E.R.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A.A.; OLIVEIRA, J.A.; FIGUEIREDO, J.R.; TONIOLLI, R. Efeito de diferentes concentrações de ácido 3-indol-acético na ativação e crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais ovinos. **Arq. Bras. Med. Vet e Zoot.**; v.57, p.334-339, 2005.

BARBIER-BRYGOO, H. Tracking auxin receptors using functional approaches. **Crit Rev Plant.**, v.14, p.1-25, 1995.

BETTERIDGE, K. J.; SMITH, C.; STUBBINGS, R. B.; XU, K. P.; KING, W. A. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes in vitro. **J. Reprod. Fert.**, v.38, p.87-98, 1989.

BRAW-TAL R.; YOSSEFI, S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. **J. Reprod. Fert.**, v.109, p.165-171, 1997.

BUTCHER, L.; ULLMAN, S. Culture of preantral ovarian follicles in the grey, short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. **Reprod. Fertil.**, v.8, p.535-539, 1996.

BYSKOV, A.G.; FADDY, M.J.; LEMMEN, J.G.; ANDERSEN, C.Y. Eggs forever? **Differentiation**, v.73, p.438-446, 2005.

CAHILL, L.P.; MARIANA, J.C.; MAULÉON. Total Follicular Populations in Ewes of High and Low Ovulation Rates. **J. Reprod. Fert.**, v. 55, p. 27-36, 1979.

CARROLL, J.; WHITTINGHAM, D.G.; WOOD, M. J.; TELFER, E.; GOSDEN, R.G. Extraovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. **J. Reprod. Fert.**, v. 90, p. 321-327, 1990.

CARROLL, J.; WHITTINGHAM, D. G.; WOOD, M. J. Effect of gonadotrophin environment on growth and development of isolated mouse primary ovarian follicles. **J. Reprod. Fert.**, v.93, p.71-79, 1991.

CECCONI, S.; BARBONI, B.; COCCIA, M.; MATTIOLI, M. In vitro development of sheep preantral follicles. **Biol. Reprod.**, v.60, p.594-601, 1999.

CLARK, D.E.; TISDALL, D.J.; FIDLER, A.E.; MCNATTY, K.P. Localization of mRNA encoding c-kit during the initiation of folliculogenesis in ovine fetal ovaries **J. Reprod. Fert.**, v.106, p.329-335, 1996.

DANIEL, S. A. J.; ARMSTRONG, D. T.; GORE-LANGTON, R. E. Growth and development of rat oocytes in vitro. **Gamete Res.**, v.24, p.55-63, 1989.

DRIANCOURT, M. A. Follicular dynamics in sheep and cattle. **Theriogenology**, v.33, p.55-73, 1991.

EPPIG, J.J.; O'BRIEN, M.J. Development *in vitro* of Mouse Oocytes from Primordial Follicles. **Biol. Reprod.**, v.54, p.197-207, 1996.

EPPIG, J. J. Mouse oocyte development in vitro with various culture systems. **Dev. Biol.**, v.60, p.371-378, 1997.

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

ERICKSON, B.H.; REYNOLDS, R.A.; MURPHREE, R.L. Ovarian characteristics and reproductive performance of the aged cow. **Biol. Reprod.**, v.15, p.555-560, 1976.

ERICKSON, G.F. An analysis of follicle development and ovum maturation. **Seminars in reproductive endocrinology**; v.4, p.233-254, 1986.

ERICKSON, G.F.; SHIMASAKI, S. The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. **Reprod. Biol. Endoc.**, v.1, p.9, 2003.

FERREIRA, M.A.L.; BRASIL, A.F.; SILVA, J.R.V.; ANDRADE, E.R.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Effects of storage time and temperature on atresia of goat ovarian preantral follicles held in M199 with or without indole-3-acetic acid supplementation. **Theriogenology**, v.55, p.1607-1617, 2001.

FIGUEIREDO, J. R.; HULSHOF, S. C. J.; VAN DEN HURK, R.; NUSGENS, B; BEVERS, M. M.; ECTORS, F. J.; BECKERS, J. F. Preservation of Oocyte and Granulosa Cell Morphology in Bovine Preantral Follicles Cultured in Vitro. **Theriogenology**, v.41, p.1333-1346, 1994.

FIGUEIREDO, J. R. Isolament, caractérisation et culture et follicules préantraux chez lês bovins. **Liege-Belgique: Université de Liège**, These PhD., p.113, 1995.

FIGUEIREDO, J.R.; HULSHOF, S.C.J.; THIRY, M.; VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M.M.; NUSGENS, B.; BECKERS, J.F. Extracellular matrix proteins and basement membrane: their identification in bovine ovaries and significance for the attachment of cultured preantral follicles. **Theriogenology**, v. 43, p. 845-858, 1995.

FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biol. Reprod.**, v.50, p.225-232, 1994.

FORTUNE, J.E.; KITO, S; WANDJI, S.A.; SRSEN, V. Activation of Bovine and Baboon Primordial Follicles *in vitro*. **Theriogenology**, v.49, p.441-449, 1998.

GALSTON, A. W.; PURVES, W.K. The mechanism of action of auxin. **Ann Rev Plant Physiol.**, v.11, p.239-276, 1960.

GORDON, I. **Prenatal development of the bovine ovary**. In: Gordon, I. Laboratory production of cattle embryos. Cambridge: CAB International: *Raven Press*, p. 4349, 1994.

GUTIERREZ, C.G.; RALPH, J.H.; TELFER, E.E.; WILMUT, I.; WEBB, R. Growth and Antrum Formation of Bovine Preantral Follicles in Long-Term Culture *in vitro*. **Biol. Reprod.**, v.62, p.1322-1328, 2000.

HAY, M.F., CRAN, D.G.; MOOR, R.M. Structural Changes Occurring During Atresia in Sheep Ovarian Follicles. **Cell Tiss. Res.**, v. 169, p. 515-529, 1976.

HIRAO, Y.; NAGAI, T.; KUBO, M.; MIYANO, T.; MIYAKE, M.; KATO, S. In vitro growth and maturation of pig oocytes. **J. Reprod. Fertil.**, v.100, p.333-339, 1994.

HIRSHFIELD, A. N. Development of follicles in the mammalian ovary. **Internat. Rew. Cytol.**, v.124, p.43-101, 1991.

HUANMIN, Z.; YONG, Z. In vitro development of caprine ovarian preantral follicles. **Theriogenology**, v.54, p.641-650, 2000.

HULSHOF, S.C.J.; FIGUEIREDO, J.R.; BEKERS, J.F.; BEVERS, M.M.; VAN DEN HURK, R. Isolation and Characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **The Veterinary Quartely**, v.2, p.78-80, 1994.

HULSHOF, S.C.J.; FIGUEIREDO, J.R.; BECKERS, J.F.; BEVERS, M.M.; VAN DER DONK, J.A.; VAN DEN HURK, R. Effects of fetal bovine serum, FSH and 17 β -estradiol on the culture of bovine preantral follicles. **Theriogenology**, v.44, p.217-226, 1995.

INGRAN, D.L., 1962. **Atresia**. In: Zuckerman, S. (Ed.), *The Ovary*. Academic Press, New York, pp. 247–273.

IRELAND, J.J. Control of Follicular Growth and Development. **J. Reprod. Fertil.**, v.34, p.39-54, 1987.

JEWGENOW, K.; PITRA, C. Hormone-Controlled Culture of Secondary Follicles of Domestic Cats. **Theriogenology**, v.39, p.527-535, 1993.

JEWGENOW, K.; GORITZ, F. The recovery of preantral follicles from ovaries of domestic cats and their characterization before and after culture. **Anim. Reprod. Sci.**, v.39, p.285-297, 1995.

JEWGENOW, K.; STOLT, M. Isolation of preantral follicles from nondomestic cats – viability and ultrastructural investigations. **Reprod. Dom. Anim.**, v.44, p.183-193, 1996.

JEWGENOW, K. Role of Media, Protein and Energy Supplements on Maintenance of Morphology and DNA-Syntesis of Small Preantral Domestic Cat Follicles During Short-Term Culture. **Theriogenology**, v.49, p.1567-1577, 1998.

JOHNSON, J.; CANNING, J.; KANEKO, T.; PRU, J.K.; TILLY, J.L. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. **Nature**, v.428, p.145-150, 2004.

JOHNSON, J.; BAGLEY, J.; SKAZNIK-WIKIEL, M.; LEE, H.J.; ADAMS, G.B.; NIIKURA, Y.; TSCHUDY, K.S.; TILLY, J.C.; CORTES, M.L.; FORKERT, R.; SPITZER, T.; LACOMINI, J.; SCADDEN, D.T.; TILLY, J.L. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. **Cell**, v.122, p.303-315, 2005.

LUCCI, C.M.; AMORIM, C.A.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R.; BÁO, S.N.; SILVA, J.R.V.; GONÇALVES, P.B.D. Study of preantral follicles population *in situ* and after mechanical isolation from caprine ovaries at different reproductive stages. **Anim. Reprod. Sci.**, v.56, p.223-236, 1999a.

LUCCI, C.M.; AMORIM, C.A.; BAO, S.N.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; SILVA, J.R.V.; GONÇALVES, P.B.D. Effect of the interval of serial sections of ovarian tissue in the tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. **Anim. Reprod. Sci.**, v.56, p.39-49, 1999b.

MAX, M.; ANDRADE, E.R.; BASSO, A.; FIGUEIREDO, J.R.; SENEDA, M.M. Principais aspectos da manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. **Rev. Educ. Contin. CRMV-SP**. v. 7, p.66-72, 2004.

McCAFFERY, F.H.; LEASK, R.; RILEY, S.C.; TELFER, E.E. Culture of Bovine Preantral Follicles in a Serum-Free System: Markers for Assessment of Growth and Development. **Biol. Reprod.**, v.63, p.267-273, 2000.

MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N. **Início do desenvolvimento humano**. In Moore, K.L. e Persaud, T.V.N. Embriologia Clínica. Guanabara Koogan (Ed.). 5^a ed. p. 13-38, 1994.

NAYUDU, P.L.; OSBORN, S.M. Factors Influencing the Rate os Preantral and Antral Growth of Mouse Ovarian Follicles in Vitro. **J. Reprod. Fert.**, v.95, p.349-362, 1992.

NUNES, J. F.; COMBARNOUS, Y. **Utilização da água de coco e suas frações ativas como diluidor do sêmen dos mamíferos domésticos**. In: I simpósio de biotecnologia da reprodução de animais domésticos. Fortaleza, p.53-63, 1995.

O`SHEA, J.D., HAY, M.F.; CRAN, D.G. Ultrastructural changes in the theca interna during follicular atresia in sheep. **J. Reprod. Fertil.**, v. 54, p. 183-187, 1978.

PETERS, H. The development and maturation of the ovary. **Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.**, v.16, p. 271-278, 1976.

QVIST, R.; BLACKWELL, L.F.; BOURNE, H.; BROWN, J.B. Development of Mouse Ovarian Follicles from Primary to Ovulatory Stages in Vitro. **J. Reprod. Fert.**, v.89, p.169-180, 1990.

RODGERS, R.J.; LAVRANOS, T.C.; VAN WEZEL I.L.; IRVING-RODGERS H.F. Development of the ovarian follicular epithelium. **Mol. Cell. Endoc.**, v.151, p.171-179, 1999.

ROY, S. K.; TREACY, B. J. Isolation and Long-Term Culture of Human Preantral Follicles. **Fertil. Steril.**, v.59, p.783-790, 1993.

RUBIN, K.C.P.; PONTES, J.H.F.; NONATO Jr, I.; ERENO Jr, J.C.; PANSARD, H.; SENEDA, M.M. Influência do grau de sangue nelore na produção *in vitro* de oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, p.183, 2005 (Suplemento 1).

RUSSE, I. Oogenesis in Cattle and Sheep. **Bibl. Anat.**, v.24, p.77-92, 1983.

SAUMANDE, J. Ovogenèse et folliculogenèse. **Rec. Méd. Vét.**, v.157, p.29-38, 1981.

SAUMANDE, J. Folliculogenesis in the ruminants. **Rec. Méd. Vét.**, v.167, p.205-218, 1991.

SILVA, J.R.V, FERREIRA, M.A.L., COSTA, S.H.F., SANTOS, R.R., CARVALHO, F.C.A, RODRIGUES, A.P.R., LUCCI, C.M., BÁO, S.N., FIGUEIREDO, J.R. Degeneration rate of preantral follicles in the ovaries of goats. **Small Rumin. Res.**, 43:203-209, 2002.

TELFER, E.E. The Development of Methods for Isolation and Culture of Preantral Follicles from Bovine and Porcine Ovaries. **Theriogenology**, v. 45, p. 101-110, 1996.

TONIOLLI, R.; BUSSIÈRE, J.; COUROT, M.; MAGISTRINI, M.; COMBARNOUS, Y. Effect of indole-3-acetic-acid (plant auxin) on the preservation at 15°C of boar semen for artificial insemination. **Reprod. Nutr. Dev.**, v.36, p.503-511, 1996.

VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M. M.; BECKER, J. F. In vivo and in vitro development of preantral follicles. **Theriogenology**, v.47, p.73-82, 1997.

WANDJI, S-A.; PELLETIER, G.; SIRARD, M-A. Ontogeny and cellular localization of ¹²⁵I-labelled basic fibroblast growth factor and ¹²⁵I-labelled epidermal growth factor binding sites in ovaries from bovine fetuses and neonatal calves. **Biol. Reprod.**, v.47, p.807-813, 1992.

WANDJI, S.A.; EPPIG, J.J.; FORTUNE, J.E. FSH and Growth Factor Affect the Growth and Endocrine Function *in vitro* of Granulosa Cells of Bovine Preantral Follicles. **Theriogenology**, v.45, p.817-832, 1996.

WASSARMAN, P. M. **The mammalian ovum**. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. The Physiology of Reproduction. Raven Press, New York, p. 69-101, 1988.

WOOD, T.C., MONTALI, R.J., WILDT, D.E. Follicle-oocyte atresia and temporal taphonomy in cold-stored domestic cat ovaries. **Mol. Reprod. Develop.**, v. 46, p. 190-200, 1997.

WU, J.; EMERY, B. R.; CARRELL, D. T. In vitro growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. **Biol. Reprod.**, v.64, p.375-381, 2001.

4 JUSTIFICATIVA

A biotécnica de manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais tem permitido a recuperação de dezenas a milhares de folículos primordiais a partir de um único ovário, com o intuito de evitar a grande perda folicular que, normalmente, ocorre *in vivo*. No entanto, para que estes folículos possam entrar em fase de crescimento é preciso que sejam ativados, ou seja, retomem a proliferação das células da granulosa, aumentem os volumes citoplasmático e nuclear do oócito. Neste contexto, destaca-se a importância do aperfeiçoamento de um sistema de cultivo *in vitro* capaz de ativar esses folículos, e assegurar seu posterior crescimento *in vitro*, otimizando o aproveitamento do potencial oocitário da espécie bovina e incrementando a eficiência da reprodução animal. Esses folículos poderão ainda, ser utilizados em programas de maturação e fecundação *in vitro*, transferência de embriões e/ou criopreservação.

Estudos referentes aos fatores e mecanismos envolvidos na regulação e ativação dos folículos primordiais são escassos, especialmente em animais de produção, como bovinos principalmente na raça Nelore. Diversos autores têm investigado o efeito de vários componentes no cultivo de folículos pré-antrais tanto de animais de laboratórios como animais domésticos como vaca, cabra, ovelha. Substâncias como soro fetal, FSH, 17 β -estradiol, Fator de Crescimento Epidermal (EGF), Fator de Crescimento semelhante a Insulina (IGF) são largamente utilizadas. Entretanto, a utilização do ácido 3-indol acético ainda não foi testada no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais bovinos.

O aperfeiçoamento de um sistema de cultivo *in vitro*, utilizando o IAA poderá fornecer subsídios para uma melhor compreensão acerca dos fatores que regulam a ativação dos folículos primordiais, fatores esses necessários para a sobrevivência e início do crescimento folicular e conseqüentemente a adoção da biotécnica na reprodução animal. Além disso, os oócitos provenientes destes folículos poderão ser usados para fecundação *in vitro* e produzir um grande número de embriões, sendo um fator determinante para otimizar a multiplicação de bovinos de alto valor zootécnico. Os resultados poderão ainda ser extensivamente aplicados a outras espécies de mamíferos, além de contribuir para um melhor conhecimento das particularidades do desenvolvimento folicular da raça Nelore.

5 HIPÓTESE CIENTÍFICA

Diante do exposto na revisão de literatura, a seguinte hipótese foi postulada:

O ácido 3 indol-acético pode estimular a ativação e crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais bovinos da raça Nelore.

6 OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GERAL

- Padronizar e aperfeiçoar um sistema de cultivo *in vitro* para folículos ovarianos pré-antrais bovinos da raça Nelore.

6.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Avaliar a ativação, o crescimento e a viabilidade de folículos pré-antrais bovinos da raça Nelore, na ausência ou na presença de diferentes concentrações de ácido 3 indol-acético por dois e seis dias de cultivo *in vitro*, utilizando a histologia.

7 ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

**Efeito de diferentes concentrações de
ácido 3-indol-acético na ativação e
crescimento
in vitro de folículos pré-antrais bovinos
da raça Nelore**

BLASCHI, Wanessa. **Efeito de diferentes concentrações de ácido 3-indol-acético na ativação e crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais bovinos da raça Nelore.** Londrina : UEL, 2006. (Dissertação de Mestrado em Ciência Animal).

Resumo

Avaliou-se o desenvolvimento de folículos pré-antrais bovinos da raça Nelore, após o cultivo *in vitro* do córtex ovariano em várias concentrações de ácido 3-indol acético (VETEC[®]) (IAA). O córtex ovariano foi dividido em fragmentos de aproximadamente 5x5mm. Dois fragmentos foram imediatamente fixados em Carnoy (fragmentos não-cultivados) e os demais destinados individualmente ao cultivo em placas com 24 orfícios (NUNCLON[®]) contendo meio essencial mínimo suplementado (MEM+) (GIBCO[®]) acrescido de 10, 40, 100, 500 ou 1000 ng/mL de IAA. O período de cultivo foi de dois e seis dias a 39 °C e 5% de CO₂ em ar. Após o cultivo *in vitro*, observou-se redução significativa de folículos primordiais e aumento de folículos em desenvolvimento (P<0,05), para o MEM+ acrescido de 10 ng/mL de IAA. Em relação aos folículos dos fragmentos não-cultivados, houve redução de folículos primordiais histologicamente normais no cultivo por dois e seis dias (P<0,05). Após dois dias de cultivo, a redução de folículos normais em desenvolvimento foi observada nos folículos suplementados com 1000 ng/mL de IAA. Após seis dias de cultivo, a redução de folículos normais em desenvolvimento foi observada apenas nos folículos suplementados com 100 ng/mL e 500 ng/mL de IAA. Conclui-se que, folículos pré-antrais bovinos da raça Nelore podem ser ativados *in vitro* após seis dias de cultivo em MEM+ suplementado com 10 ng/mL de IAA.

Palavras-chave: folículos pré-antrais, cultivo *in vitro*, ácido 3-indol acético, bovino, Nelore

BLASCHI, Wanessa. **Effect of different concentrations of indol acetic acid in the activation and growth of Nelore preantral follicles.** Londrina : UEL, 2006. (Thesis- Master of Animal Science).

Abstract

The aim of this work was to evaluate the development of Nelore preantral follicles after *in vitro* culture of ovarian cortex in different concentrations of indol acetic acid (VETEC[®]) (IAA). The ovarian cortex was divided into fragments of approximately 5x5 mm. Two fragment was immediately fixed in Carnoy (fragments no-cultured) where as the other fragments were cultured individually in culture dishes with 24 holes (NUNCLON[®]) content minimum essential medium supplemented (MEM+) (GIBCO[®]) and add with 10, 40, 100, 500 or 1000 ng/mL of IAA. The culture period was two and six days at 39 °C with 5% CO₂ in air. After six days of *in vitro* culture, the MEM+ added of 10 ng/ml of IAA presented meaningful reduction of primordial follicles and increase of developing follicles (P<0.05). The culture of ovarian cortex for two and six days, in all tested media, reduced the percentages of healthy primordial follicles when compared to fragments no-cultured (P<0.05). After two days of culture the reduction of healthy development follicles was observed in the follicles treated with 1000 ng/ml of IAA. After six days of culture the reduction of healthy development follicles was only observed in the follicles treated with 100 ng/mL and 500 ng/mL of IAA. In conclusion, Nelore bovine primordial follicles may be successfully activated *in vitro* after six days culturing in MEM+ containing 10 ng/mL of IAA.

Key words: preantral follicles, *in vitro* culture, indol acetic acid, Nelore

1. Introdução

O ovário de mamíferos contém milhares de oócitos inclusos em folículos primordiais, e apenas 0,01% destes folículos desenvolvem-se até o estágio de folículo pré-ovulatório (EPPIG; O'BRIEN, 1996). Os folículos ovarianos pré-antrais representam cerca de 90% da população folicular (SAUMANDE, 1991), e cerca de 99,9% dos folículos de um ovário não ovulam, sofrem um processo fisiológico conhecido como atresia, que causa a morte do folículo, por via degenerativa (SAUMANDE, 1991) e/ou apoptótica (FIGUEIREDO, 1995).

Apesar desses critérios amplamente aceitos, Johnson et al (2004) propuseram a constante renovação de gametas nas fêmeas mamíferas jovens e adultas. A possível explicação seria a origem extragonadal das células germinativas, a partir da medula óssea (JOHNSON et al., 2005). Entretanto, estas informações tornaram-se motivo de questionamento e controvérsias no meio acadêmico (BYSKOV et al., 2005).

Independente da controvérsia, a aplicação da biotécnica de manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA) tem por objetivo recuperar um grande número de oócitos inclusos nesses folículos e cultivá-los *in vitro* até sua completa maturação, evitando a atresia. A ativação é a primeira etapa para fazer com que os folículos primordiais que estavam em repouso iniciem seu crescimento (FORTUNE et al., 2000).

Neste contexto, o desenvolvimento de um sistema eficiente de cultivo *in vitro* é um ponto crucial para a ativação desses folículos, permitindo o desenvolvimento de um grande número de folículos pré-antrais, o que possibilitará uma melhor compreensão dos diversos fatores implicados na foliculogênese e no processo de atresia (FIGUEIREDO, 1995). Também poderá ser uma alternativa para o fornecimento de milhares de oócitos viáveis, inclusos em folículos pré-antrais em diversos estágios de desenvolvimento, para as biotécnicas de fecundação *in vitro* e clonagem (TELFER, 1996).

As fêmeas da raça Nelore têm se destacado no cenário reprodutivo nacional, devido ao sucesso da biotécnica de FIV associada à valorização desta raça. Uma possível explicação seria que animais da raça Nelore, ou vacas zebuínas em geral apresentam normalmente um maior número de folículos recrutados por onda, em comparação com vacas da raça européia (RUBIN et al., 2005). Este fato despertou o interesse de pesquisadores nacionais e internacionais. Com o advento da MOIFOPA, os fatores envolvidos na foliculogênese da raça Nelore poderão ser esclarecidos, além de preservar o material genético destes animais pela criopreservação.

Para o cultivo *in vitro* de córtex ovariano bovino, o meio essencial mínimo (MEM) tem sido utilizado com sucesso (BRAW-TAL; YOSSEFI, 1997).

O Ácido 3-Indol-Acético (IAA) é uma molécula pertencente ao grupo das auxinas isolada da água de coco, que tem ação benéfica sobre os espermatozoides (NUNES; COMBARNOUS, 1995). O IAA é um hormônio que atua no crescimento de vegetais (BARBIER-BRYGOO, 1995), ligando-se às proteínas solúveis da seiva, sendo transportado a receptores transmembranários, provocando, direta ou indiretamente, respostas celulares variadas (TONIOLLI et al., 1996), tais como o aumento da plasticidade da parede celular, aumento da entrada de água na célula e alteração do metabolismo dos ácidos nucléicos e da respiração celular (GALSTON; PURVES, 1960) promovendo o crescimento da célula (BARBIER-BRYGOO, 1995).

A adição do IAA em MEM viabilizou a conservação de sêmen caprino (NUNES; COMBARNOUS, 1995), suíno (TONIOLLI et al., 1996) e humano (NUNES, 1998). O IAA também foi utilizado para conservar folículos pré-antrais caprinos a 4° C por até 24 h (FERREIRA et al., 2001).

No cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais ovinos, o MEM adicionado de 40 ng/mL de IAA demonstrou indução de ativação (ANDRADE et al., 2005). Entretanto, o papel

do MEM suplementado com IAA no desenvolvimento folicular permanece desconhecido em bovinos.

O presente estudo objetivou estabelecer condições de cultivo *in vitro* para manter o crescimento e a sobrevivência de folículos pré-antrais bovinos da raça Nelore, com diferentes concentrações de IAA.

2. Material e métodos

Foram coletados quatro ovários oriundos de novilhas da raça Nelore em abatedouros da região de Londrina, norte do estado do Paraná. Imediatamente após a coleta, os ovários foram lavados em álcool 70% e, posteriormente, duas vezes em solução fisiológica 0,9%. Após este procedimento, os ovários foram depositados em tubos de 50 mL, contendo solução fisiológica 0,9% suplementada com penicilina (SIGMA[®]; 200 UI/mL) e estreptomicina (VETEC[®]; 200 mg/mL) e transportados para o laboratório a 39 °C em recipiente térmico. O tempo entre a coleta dos ovários e a chegada ao laboratório foi inferior à uma hora.

No laboratório, em condições assépticas foram retirados os ligamentos e tecido circundante dos ovários. Em seguida, com a utilização de bisturi cirúrgico, cada gônada foi seccionada longitudinalmente para retirada da medula, grandes folículos antrais e corpos lúteos. O córtex foi dividido em 16 fragmentos de aproximadamente 5 x 5 mm. Dois fragmentos não cultivados, escolhidos aleatoriamente, foram fixados em Carnoy (BEHMER et al., 1976) para análise histológica. Os outros 14 fragmentos foram cultivados individualmente em placas de cultivo de 24 orifícios (NUNCLON[®]), cada um contendo 1mL dos seguintes meios: MEM suplementado (MEM+) com penicilina (SIGMA[®]; 200 UI/mL), estreptomicina (VETEC[®]; 200 mg/mL), albumina sérica bovina (SIGMA[®]; 1,25 mg/mL), ITS (insulina, 6,25 µg/mL; transferrina, 6,25 µg/mL e selênio, 6,25 ng/mL; GIBCO[®]),

piruvato (NUCLEAR[®]; 0,23 mM), glutamina (GIBCO[®]; 2mM) e hipoxantina (SIGMA[®]; 2 mM). O tratamento 1 (T1) consistiu de 1 mL de MEM+ sem a adição do IAA; os demais tratamentos foram suplementados com 10 ng/mL de IAA (T2); 40 ng/mL de IAA (T3); 100 ng/mL de IAA (T4); 500 ng/mL de IAA (T5) e 1000 ng/mL de IAA (T6), como apresentado na Figura 1.

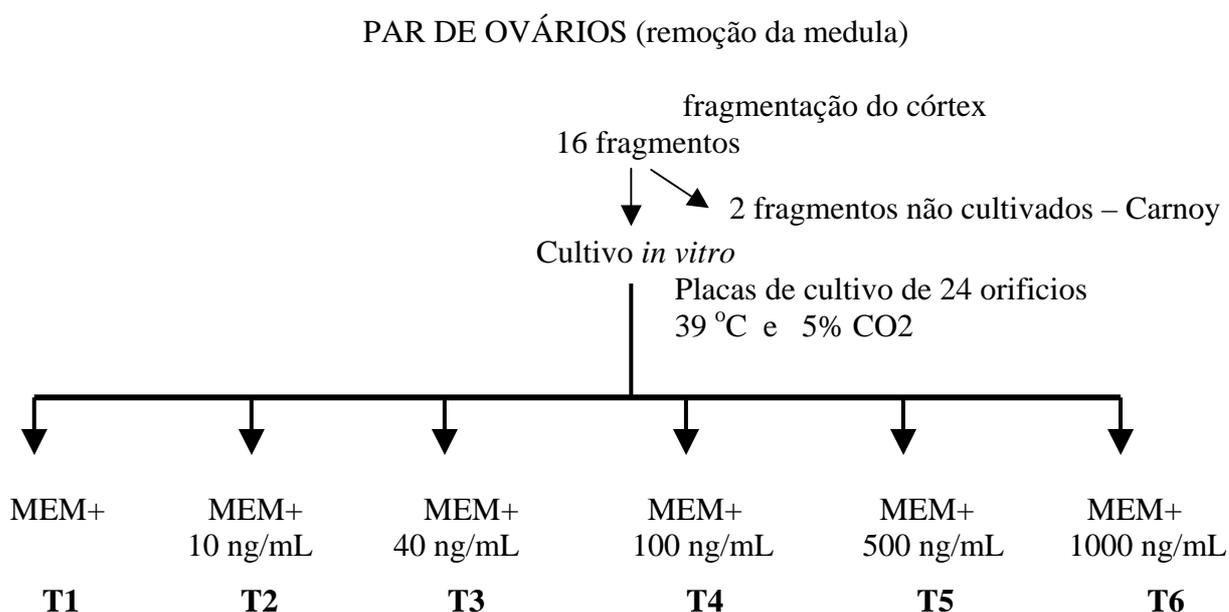


Figura 1. Protocolo experimental para o cultivo *in vitro* de folículos primordiais bovinos da raça Nelore na presença ou ausência de IAA.

O cultivo *in vitro* dos folículos pré-antrais contidos nos fragmentos de córtex ovariano, foi realizado a 39 °C em atmosfera com 5% CO₂ em ar, durante dois e seis dias, conforme o tratamento. Foram realizadas quatro réplicas de cada tratamento. Os fragmentos de córtex ovariano não cultivados, e os cultivados por dois e seis dias em cada tratamento foram destinados ao processamento para histologia. Após a fixação em Carnoy (BEHMER et al., 1976) por 24 h, os fragmentos de córtex ovariano foram desidratados em etanol, diafanizados em Xilol e imergidos em parafina. Cada fragmento foi cortado de forma seriada a cada 5 µm.

As secções resultantes foram montadas em lâminas e coradas pelo método hematoxilina-eosina (HE – BEHMER et al., 1976).

Os folículos foram classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento. Considerou-se aqueles com uma camada de células da granulosa de formato pavimentoso envolvendo o oócito, como primordiais. Três categorias foram consideradas como folículos em desenvolvimento. Os folículos primários iniciais apresentavam uma camada de células da granulosa de formato pavimentoso-cúbico envolvendo o oócito. Nos folículos primários, observou-se uma camada de células da granulosa de formato cúbico envolvendo o oócito. A terceira categoria a dos folículos secundários, os oócitos estavam envolvidos por duas ou mais camadas de células da granulosa de formato cúbico, de acordo com Fortune et al. (1998). A morfologia folicular foi avaliada de acordo com a integridade da membrana basal, a densidade celular, a ocorrência de corpos picnóticos e a integridade do oócito. Cada folículo foi classificado como morfologicamente normal (viável) ou degenerado. Foram avaliados 120 folículos por tratamento, sendo 30 por réplica.

A eficiência na indução da ativação foi considerada pelo aumento do percentual de folículos em desenvolvimento e redução do percentual de folículos primordiais. Esta análise foi realizada a partir da comparação dos folículos do grupo não cultivado e folículos dos diferentes tratamentos aos dois e seis dias de cultivo.

A viabilidade dos folículos foi considerada a partir do percentual de folículos primordiais e em desenvolvimento, morfologicamente normais. A comparação foi realizada entre os folículos do grupo não cultivado e os folículos dos diferentes tratamentos nos dias dois e seis de cultivo.

A eficiência para indução da ativação e a viabilidade dos folículos foram comparadas pelo teste de Tukey (SAS System) ao nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

3. Resultados

Os resultados foram dispostos na forma de tabela, sendo que a Tabela 1 demonstra a porcentagem de folículos primordiais (55,8%) e em desenvolvimento (44,2%) nos fragmentos de córtex ovariano não cultivados. Em seis dias de cultivo, o tratamento suplementado com 10 ng/mL de IAA, demonstrou uma redução significativa ($p < 0,05$) da porcentagem de folículos primordiais concomitante com o aumento da porcentagem de folículos em desenvolvimento.

Ao se comparar a porcentagem de folículos primordiais e em desenvolvimento entre os tratamentos aos dois e seis dias de cultivo, não foi detectada diferença significativa.

Tabela 1. Porcentagem de folículos primordiais e em desenvolvimento nos fragmentos de córtex não-cultivados, e nos fragmentos cultivados *in vitro* por dois e seis dias nos diferentes tratamentos, em ovários de novilhas Nelore, Londrina, 2006.

	% folículos primordiais		% folículos em desenvolvimento	
Fragmentos não-cultivados	55,8		44,2	
Fragmentos cultivados	dia 2	dia 6	dia 2	dia 6
MEM+	53,3 ^{aA}	55,0 ^{aA}	46,7 ^{aA}	45,0 ^{aA}
MEM+ IAA 10	60,0 ^{aA}	40,0 ^{bA *}	40,0 ^{bA}	60,0 ^{aA *}
MEM+ IAA 40	53,3 ^{aA}	53,3 ^{aA}	46,7 ^{aA}	46,7 ^{aA}
MEM+ IAA 100	48,3 ^{aA}	56,7 ^{aA}	51,7 ^{aA}	43,3 ^{aA}
MEM+ IAA 500	45,8 ^{aA}	51,7 ^{aA}	54,2 ^{aA}	48,3 ^{aA}
MEM+ IAA 1000	60,8 ^{aA}	50,0 ^{aA}	39,2 ^{aA}	50,0 ^{aA}

* difere significativamente do tecido não cultivado

a b – valores com letras diferentes, na mesma linha, são estatisticamente diferentes ($P < 0,05$)

A B – valores com letras diferentes, na mesma coluna, são estatisticamente diferentes ($P < 0,05$)

A Figura 2 e 3 ilustra folículos primordiais e em desenvolvimento morfológicamente normais contidos em fragmento de córtex ovariano de novilha Nelore, cultivado *in vitro* por 6 dias em MEM+ 10 ng/mL de IAA.

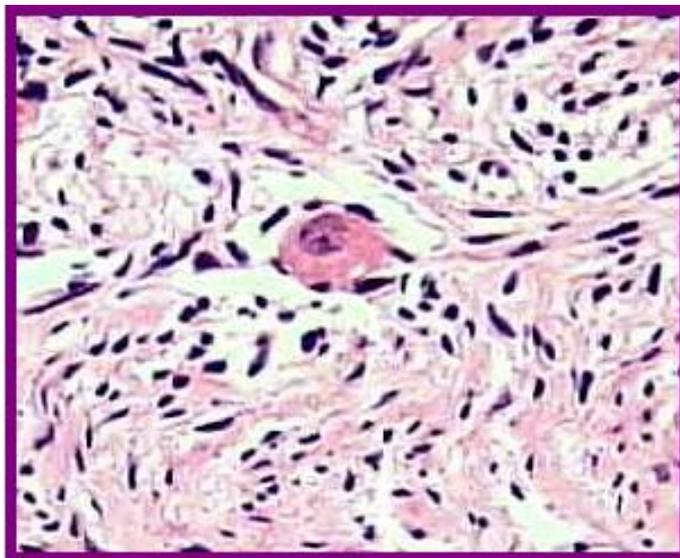


Figura 2: Folículo primordial viável em fragmento de córtex ovariano de novilha Nelore, cultivado *in vitro* por 6 dias em MEM+ 10 ng/mL de IAA. Corte histológico corado por HE, MOC aumento de 40x

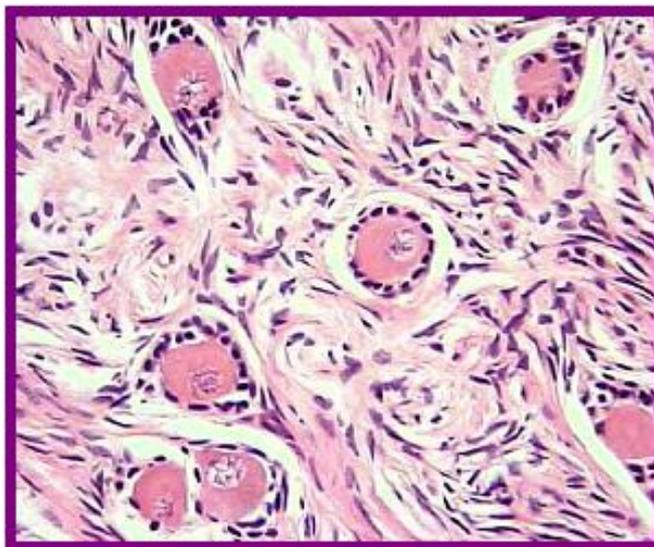


Figura 3: Folículos primordiais e em desenvolvimento viáveis em fragmento de córtex ovariano de novilha Nelore, cultivado *in vitro* por 6 dias em MEM+ 10 ng/mL de IAA. Corte histológico corado por HE, MOC aumento de 40x.

A Tabela 2 apresenta a porcentagem de folículos primordiais viáveis nos fragmentos de córtex ovariano não cultivados e após o cultivo *in vitro* por dois e seis dias nos diferentes tratamentos.

O cultivo dos fragmentos de córtex ovariano por dois e seis dias, em todos os tratamentos testados, reduziu significativamente a porcentagem de folículos primordiais viáveis quando comparados aos fragmentos não cultivados ($p < 0,05$).

A comparação entre os diferentes tratamentos para cada período de cultivo não demonstrou diferença significativa na porcentagem de folículos primordiais viáveis. Resultados similares foram observados na comparação entre os períodos de cultivo em cada tratamento.

Tabela 2. Viabilidade de folículos primordiais em fragmentos de córtex ovariano não-cultivados e nos fragmentos após cultivo *in vitro* por dois e seis dias nos diferentes tratamentos, em ovários de novilhas Nelore, Londrina, 2006.

Viabilidade folicular		
Fragmentos não-cultivados	39,2 %	
Fragmentos cultivados	dia2	dia 6
MEM+	18,3 ^{a A *}	23,3 ^{a A *}
MEM+ IAA 10	25,0 ^{a A *}	21,7 ^{a A *}
MEM+ IAA 40	17,5 ^{a A *}	21,7 ^{a A *}
MEM+ IAA 100	19,2 ^{a A *}	23,3 ^{a A *}
MEM+ IAA 500	15,0 ^{a A *}	19,2 ^{a A *}
MEM+ IAA 1000	21,7 ^{a A *}	15,0 ^{a A *}

* difere significativamente do tecido não cultivado

Nas figuras 4 e 5 observou-se folículos degenerados, contidos em fragmento de córtex ovariano de novilha Nelore, cultivado *in vitro* por 6 dias em MEM+ 1000 ng/mL de IAA.

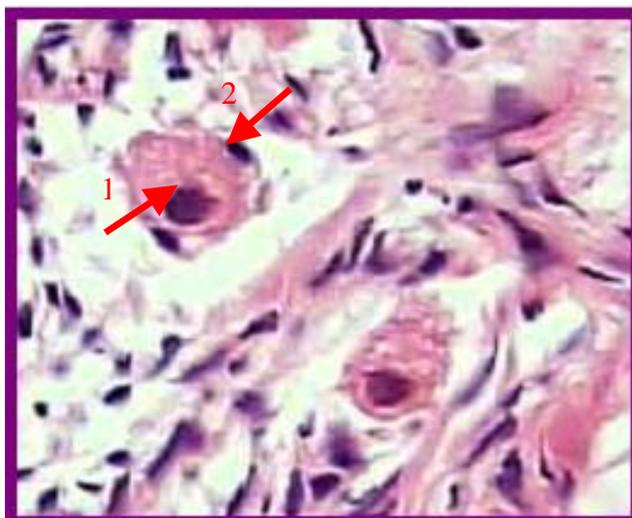


Figura 4: Folículos primordiais degenerados, em fragmento de córtex ovariano de novilha Nelore, cultivado *in vitro* por 6 dias em MEM+ 1000 ng/mL de IAA. Corte histológico corado por HE, MOC aumento de 40x. Legenda: 1- Ausência de células da granulosa; 2- Núcleo picnótico.



Figura 5: Folículo primordial degenerado, em fragmento de córtex ovariano de novilha Nelore, cultivado *in vitro* por 6 dias em MEM+ 1000 ng/mL de IAA. Corte histológico corado por HE, MOC aumento de 40x. Legenda: 1- Ausência de células da granulosa; 2- Retração nuclear.

A Tabela 3 apresenta a porcentagem de folículos viáveis em desenvolvimento nos fragmentos de córtex ovariano não cultivados e após o cultivo *in vitro* por dois e seis dias nos diferentes tratamentos.

Quanto ao efeito do período de cultivo sobre a viabilidade dos folículos, após seis dias de cultivo, os tratamentos com 100 e 500 ng/mL de IAA mostraram as reduções mais significativas na porcentagem de folículos viáveis em desenvolvimento, quando comparados aos folículos dos fragmentos não-cultivados ($p < 0,05$). O mesmo aspecto, em relação a redução de folículos viáveis em desenvolvimento, também foi verificado nos fragmentos de córtex ovariano cultivados por dois dias em 1000 ng/mL de IAA.

Após seis dias de cultivo, o MEM+ suplementado com 10 ng/mL de IAA apresentou o melhor resultado, pois não houve redução na porcentagem de folículos viáveis em desenvolvimento, diferindo significativamente ($p < 0,05$) dos tratamentos com 100 e 500 ng/mL de IAA).

Tabela 3. Viabilidade de folículos em desenvolvimento em fragmentos de córtex ovariano não-cultivados e no tecido após cultivo *in vitro* por dois e seis dias nos diferentes tratamentos, em ovários de novilhas Nelore, Londrina, 2006.

Viabilidade folicular		
Fragmentos não-cultivados	22,5 %	
Fragmentos cultivados	dia2	dia 6
MEM+	15,8 ^{a A}	15,8 ^{a A B}
MEM+ IAA 10	15,8 ^{a A}	25,0 ^{b A}
MEM+ IAA 40	21,7 ^{a A}	16,7 ^{a A B}
MEM+ IAA 100	18,3 ^{a A}	7,5 ^{b B *}
MEM+ IAA 500	18,3 ^{a A}	8,3 ^{b B *}
MEM+ IAA 1000	10,0 ^{a A *}	15,8 ^{a A B}

* difere significativamente do tecido não cultivado

a b – valores com letras diferentes, na mesma linha, são estatisticamente diferentes (P<0,05)

A B – valores com letras diferentes, na mesma coluna, são estatisticamente diferentes (P<0,05)

As Figuras 6 e 7, demonstram folículos em desenvolvimento degenerados, contidos em fragmento de córtex ovariano de novilha Nelore, cultivado *in vitro* por 2 dias em MEM+ 1000 ng/mL de IAA.

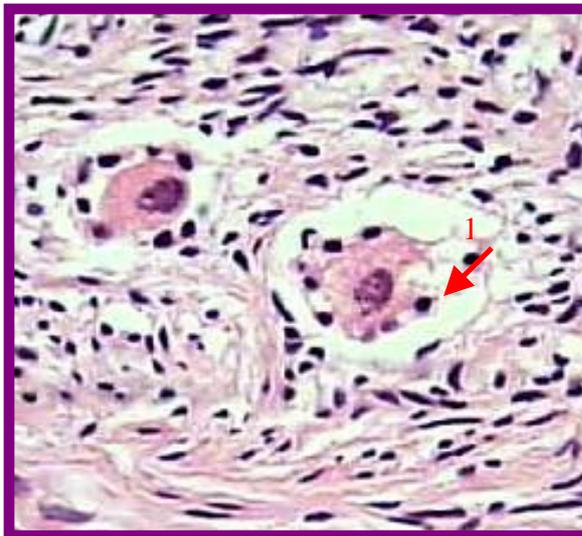


Figura 6: Folículos primários degenerados em fragmento de córtex ovariano de novilha Nelore, cultivado *in vitro* por 2 dias em MEM+ 1000 ng/mL de IAA. Corte histológico corado por HE, MOC aumento de 40x. Legenda: 1- Extravasamento citoplasmático.

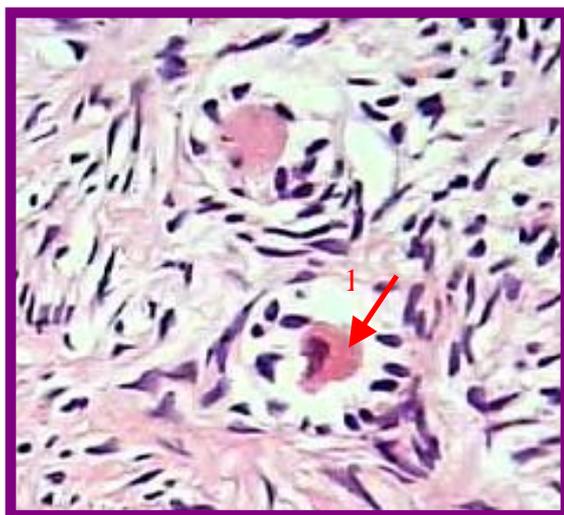


Figura 7: Folículos primários degenerados em fragmento de córtex ovariano de novilha Nelore, cultivado *in vitro* por 2 dias em MEM+ 1000 ng/mL de IAA. Corte histológico corado por HE, MOC aumento de 40x. Legenda: 1- Retração nuclear e citoplasmática do oócito

4. Discussão

Os resultados deste trabalho evidenciam a relação dose resposta do IAA no cultivo *in vitro* dos folículos pré-antrais bovinos. Observou-se ativação e crescimento folicular após seis dias de cultivo *in vitro* com o tratamento de 10 ng/mL de IAA. De acordo com Matos et al. (2005), a concentração de 10 e 20 ng/mL de IAA adicionados ao meio essencial mínimo (MEM) no cultivo *in vitro* de fragmentos do córtex ovariano de caprinos, demonstraram um aumento no diâmetro oocitário folicular após cinco dias de cultivo.

Em ovinos, a ativação e crescimento folicular foi observada após dois e seis dias de cultivo *in vitro* na presença de 40 ng/mL de IAA (ANDRADE et al., 2005). Esta concentração é a mesma da auxina ativa encontrada na água-de-coco (DUA e CHANDRA, 1993). Esta semelhança na concentração é a provável razão do sucesso da utilização desse fluido natural nos protocolos de conservação de folículos pré-antrais caprinos (SILVA et al., 2000) e ovinos (ANDRADE et al., 2002).

Estes resultados permitiram considerar que a concentração ideal de IAA para induzir ativação e crescimento dos folículos pré-antrais diferiu entre as espécies, ovina (ANDRADE et al., 2005), caprina (MATOS et al., 2005) e bovina.

O mecanismo responsável pela ativação desses folículos não foi completamente esclarecido. Em condições naturais, o processo de ativação ocorre regularmente ao longo da vida reprodutiva da fêmea (NILSSON et al., 2002). Os processos de cultivo *in vitro* poderiam acelerar a ativação dos folículos primordiais, pela maior disponibilidade de nutrientes e oxigênio (WANDJI et al.; 1997; WEZEL; RODGERS, 1996). Outra hipótese seria a presença de um inibidor da ativação folicular presente na porção medular do ovário. Esta inibição cessaria com a separação do córtex e da medula, primeira etapa do procedimento *in vitro* (WANDJI et al., 1996). Esta hipótese é sustentada pelos resultados de Eppig e O'Brien

(1996). Estes autores observaram um reduzido percentual de ativação de folículos primordiais quando ovários inteiros foram cultivados *in vitro*. No entanto, a ativação não foi inibida quando fragmentos de córtex ovariano bovino foram cultivados na presença de tecido medular (DERRAR et al., 2000).

Constatou-se redução da porcentagem de folículos primordiais viáveis nos fragmentos de córtex ovarianos cultivados por dois e seis dias em todos os tratamentos testados. A avaliação histológica de fragmentos de córtex ovariano de feto bovino, após dois, quatro e sete dias de cultivo *in vitro* em meio MB 752/1 suplementado, também demonstrou decréscimo na proporção de folículos primordiais viáveis em todos os períodos de cultivo (WANDJI et al., 1996). Entretanto, Derrar et al (2000) não observaram diferença na proporção de folículos primordiais viáveis em fragmentos de córtex ovariano de feto bovino, cultivados *in vitro* por dois e oito dias em meio MB 752/1.

Quanto aos folículos viáveis em desenvolvimento, os meios contendo IAA nas concentrações de 100 ng/mL e 500 ng/mL após seis dias de cultivo, apresentaram redução da viabilidade folicular. Após dois dias de cultivo, a redução de folículos viáveis em desenvolvimento foi observada somente nos folículos suplementados com 1000 ng/mL de IAA. Resultados semelhantes foram descritos em ovinos por Andrade et al. (2005). Estes autores observaram decréscimo na porcentagem de folículos pré-antrais ovinos viáveis cultivados *in vitro* por apenas dois dias em meio contendo IAA nas concentrações de 500 ng/mL e 1000 ng/mL. Da mesma forma, Ferreira et al. (2001), observaram redução na porcentagem de folículos pré-antrais caprinos viáveis conservados em meio de cultivo TCM 199 com 100 ng/mL por 24 horas.

Em relação aos demais tratamentos, o MEM+ acrescido de 10 ng/mL de IAA após seis dias de cultivo, apresentou o melhor resultado, devido a menor redução de folículos viáveis em desenvolvimento. Estes resultados foram semelhantes aos relatados por Matos et al.

(2005), onde apesar dos bons resultados observados com a histologia, a microscopia eletrônica de transmissão mostrou que a concentração de 20 ng/mL não manteve a integridade morfológica dos folículos pré-antrais caprinos após cinco dias de cultivo.

Os efeitos deletérios do IAA são pouco conhecidos. Formas reativas de oxigênio podem ser formadas após sua peroxidação, gerando produtos citóxicos (PIRES DE MELO et al., 1992; FOLKES; WARDMAN, 2001). Pires de Melo et al. (1997) relataram o efeito moderadamente citotóxico do IAA em neutrófilos. A morte celular foi relacionada à atividade de peroxidases endógenas, causando alterações ultra-estruturais e produção elevada de radicais superóxido e peróxido de hidrogênio. Células HL60 humanas perderam aproximadamente 25,0 % da viabilidade, 72h após o cultivo por 1h com IAA (FOLKES et al., 1998). O IAA em altas concentrações pode ligar-se à glutathione S-transferase (GST), reduzindo sua atividade em substratos nos tecidos vegetais (BILANG; STURM, 1995). Ressalta-se que a GST tem importante atuação na proteção contra o dano oxidativo em tecidos vegetais e animais (IRZYK; FUERST, 1993).

Conclui-se que folículos pré-antrais bovinos da raça Nelore podem ser ativados *in vitro* com sucesso após seis dias de cultivo em MEM+ suplementado com 10 ng/ml de IAA e que concentrações mais elevadas desse ácido podem ser deletérias para estes folículos.

5. Referências bibliográficas

ANDRADE, E.R.; AMORIM, C.A.; MATOS, M.H.T. et al. Evaluation of saline and coconut water solutions in the preservation of sheep preantral follicles in situ. **Small Rum. Res.**, v.43, p.235-243, 2002.

ANDRADE, E.R.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A.A. et al. Efeito de diferentes concentrações de ácido 3-indol-acético na ativação e crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais ovinos. **Arq. Bras. Med. Vet e Zoot.**; v.57, p.334-339, 2005.

BEHMER, O.A.; TOLOSA, E.M.C.; FREITAS NETO, A.G. **Manual de técnicas para histologia normal e patológica**. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, edart-São Paulo livraria e editora Ltda, 1976.

BILANG, J.; STURM, A. Cloning and characterization of a glutathione S-transferase that can be photolabeled with 5-azido-indole-3-acetic acid. **Plant Physiol.**, v.109, p.253-260, 1995.

BRAW-TAL, R.; YOSSEFI, S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. **J. Reprod. Fertil.**, v.109, p.165-171, 1997.

BYSKOV, A.G.; FADDY, M.J.; LEMMEN, J.G.; et al. Eggs forever? **Differentiation**, v.73, p.438-446, 2005.

DERRAR, N.; PRICE, C.A.; SIRARD, M.A. Effect of growth factors and co-culture with ovarian medulla on the activation of primordial follicles in explants of bovine ovarian cortex. **Theriogenology**, v.54, p.587-598, 2000.

DUA, L.S.; CHANDRA, M. The identification and isolation of plant growth regulating substances from the liquid endosperm of *Cocos nucifera*. **Coconut Res. Dev.**, p.219-227, 1993.

EPPIG, J. J.; O'BRIEN, M. J. Developmental in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. **Biol. Reprod.**, v.54, p.197-207, 1996.

FERREIRA, M.A.L.; BRASIL, A.F.; SILVA, J.R.V. et al. Effects of storage time and temperature on atresia of goat ovarian preantral follicles held in M199 with or without indole-3-acetic acid supplementation. **Theriogenology**, v.55, p.1607-1617, 2001.

FIGUEIREDO, J. R. Isolament, caractérisation et culture et follicules préantraux chez les bovins. **Liege-Belgique: Université de Liège**, These PhD., p.113, 1995.

FOLKES, L.K.; CANDEIAS, L.P.; WARDMAN, P. Toward targeted "oxidation therapy" of cancer: peroxidase-catalysed cytotoxicity of indole-3-acetic acids. **Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.**, v.42, p.917-920, 1998.

FOLKES, L.K.; WARDMAN, P. Oxidative activation of indole-3-acetic acids to cytotoxic species – a potential new role for plant auxins in cancer therapy. **Biochem. Pharmac.**, v.61, p.129-136, 2001.

FORTUNE, J.E.; KITO, S., WANDJI, S.A. et al. Activation of bovine and baboon primordial follicles in vitro. **Theriogenology**, v.49, p.441-449, 1998.

FORTUNE, J.E.; CUSHMAN, R.A.; WAHL, C.M. et al. The primordial to primary follicle transition. **Mol. Cell. Endocr.**, v.163, p.53-60, 2000.

GALSTON, A.W.; PURVES, W.K. The mechanism of action of auxin. **Ann. Rev. Plant Physiol.**, v.11, p.239-276, 1960.

IRZYK, G.P.; FUERST, E.P. Purification and characterization of a glutathione S-transferase from benoxacor-treated maize (*Zea mays*). **Plant Physiol.**, v.102, p.803-810, 1993.

JOHNSON, J.; CANNING, J.; KANEKO, T., et al. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. **Nature**, v.428, p.145-150, 2004.

JOHNSON, J.; BAGLEY, J.; SKAZNIK-WIKIEL, M. et al. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. **Cell**, v.122, p.303-315, 2005.

MATOS, M.H.T.; MARTINS, F.S.; SANTOS R.R. et al. Efeito do ácido 3-indol-acético sobre o desenvolvimento de folículos pré-antrais caprinos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.33, p.170, 2005. (resumo)

NILSSON, E.E.; KEZELE, P.; SKINNER, M.K. Leukemia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries. **Mol. Cell. Endocr.**, v.188, p.65-73, 2002.

NUNES, J.F. Utilização da Água de Coco como Diluidor do Sêmen de Animais Domésticos e do Homem. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.22, p.109-112, 1998.

PIRES DE MELO, M.; ESCOBAR, J.A.; METODIEWA, D. et al. Horseradish peroxidase-catalysed oxidation of indole-3-acetic acid II: oxygen uptake and chemiexcitation. **Arch. Biochem. Biophys.**, 296:34-39, 1992.

PIRES DE MELO, M.; CURI, T.C.P.; CURI, R. et al. Peroxidase activity may play a role in the cytotoxic effect of indole acetic acid. **Photochem. Photobiol.**, v.65, p.338-341, 1997.

RUBIN, K.C.P.; PONTES, J.H.F.; NONATO Jr, I.; et al. Influência do grau de sangue nelore na produção *in vitro* de oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, p.183, 2005 (Suplemento 1).

SAUMANDE, J. Folliculogenesis in the ruminants. **Rec. Méd. Vét.**, v.167, p.205-218, 1991.

SILVA, J.R.V.; LUCCI, C.M.; CARVALHO, F.C.A. et al. 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.

TELFER, E.E. The Development of Methods for Isolation and Culture of Preantral Follicles from Bovine and Porcine Ovaries. **Theriogenology**, v. 45, p. 101-110, 1996.

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

WANDJI, S.A.; SRSEN, V.; NATHANIELSZ, P.W. et al. Initiation of growth of baboon primordial follicles in vitro. **Human Reprod.**, v.12, p. 1993-2001, 1997.

WEZEL, I.L.; RODGERS, R.J. Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment in vivo. **Biol. Reprod.**, v.55, p.1003-1011, 1996.

6 Conclusões

A avaliação histológica permitiu concluir:

- Folículos pré-antrais bovinos da raça Nelore podem ser ativados *in vitro* e manter sua viabilidade por até seis dias quando cultivados em MEM+ suplementado com 10 ng/mL de IAA.
- Concentrações mais elevadas (100 e 500 ng/mL) de IAA podem ser deletérias para os folículos em desenvolvimento, em seis dias de cultivo.
- A concentração de 1000 ng/mL de IAA foi prejudicial para os folículos de bovinos da raça Nelore em desenvolvimento em apenas dois dias de cultivo.