

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

JAMILY BEZERRA BRUNO

UTILIZAÇÃO DE SORO NO CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIIS
CAPRINOS

FORTALEZA

2006

JAMILY BEZERRA BRUNO

**UTILIZAÇÃO DE SORO NO CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS
CAPRINOS**

Dissertação submetida ao Curso de Mestrado em Ciências Veterinárias do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias – Faculdade de Veterinária, da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciências Veterinárias

Área de concentração: Reprodução Animal
Orientação: Profa. Dra. Ana Paula Ribeiro Rodrigues

FORTALEZA

2006

Bruno, Jamily Bezerra
Utilização de soro no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos/ Jamily Bezerra Bruno.
Fortaleza, 2006.
64p.
Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Ribeiro Rodrigues.
Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias)
Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

JAMILY BEZERRA BRUNO

**UTILIZAÇÃO DE SORO NO CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS
CAPRINOS**

Dissertação submetida ao Curso de Mestrado em Ciências Veterinárias do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias – Faculdade de Veterinária, da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciências Veterinárias

Defesa em: 15/ 12/ 2006

Conceito obtido: _____

Nota: _____

Banca Examinadora

Profa. Dra. Ana Paula Ribeiro Rodrigues (Orientadora)
Universidade Estadual do Ceará

Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo (Examinador)
Universidade Estadual do Ceará

Prof. Dr. Cláudio Cabral Canpello (Examinador)
Universidade Estadual do Ceará

Ao meu marido, Affonso Bruno Neto

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, por tudo que tenho na minha vida.

Aos meus pais, Marcos Antônio Campos Bezerra e Marta Maria de Sousa Bezerra, pelo amor e dedicação. Não existem palavras que sejam capazes de expressar todo o meu amor por vocês.

Ao meu marido, Affonso Bruno Neto, pelo amor e carinho. Obrigada pela presença e apoio constantes em minha vida e pela união que nos torna cada vez mais ligados.

Aos meus irmãos, Emmanuelle de Sousa Bezerra, Bruna de Sousa Bezerra e Marcos Antônio Campos Bezerra Júnior, por tudo que passamos juntos. Amo vocês!

Ao Dr. José Ricardo de Figueiredo e Dra. Ana Paula Ribeiro Rodrigues, por terem acreditado em mim para assumir responsabilidades de sua confiança. Eu os agradeço pelo incentivo, paciência, orientação e acima de tudo amizade.

Ao Dr. José Roberto Viana Silva e Dr. Cláudio Cabral Campello, pela disponibilidade e prestatividade.

À propriedade “Lar Antônio de Pádua” juntamente com Anália Bueno de Melo e Maria Gorete Flores Salles, por estarem sempre de portas abertas para realização de nossos experimentos.

À Dra. Sônia Nair Bão, por sempre colocar o Laboratório de Microscopia Eletrônica de Transmissão da UnB, à disposição da equipe LAMOFOPA.

Ao Dr. Manoel Odorico de Moraes Filho e Dra. Cláudia Do Ó Pessoa, bem como ao Hélio Vitoriano Nobre Júnior e Flávio Damasceno Maia, pela colaboração.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), pelo conhecimento e experiência compartilhados.

Aos meus amigos Isabel Bezerra Lima Verde, Fabrício Sousa Martins, Maria Helena Tavares de Matos e João Carlos Paula Souza, por todos os momentos que passamos juntos. Vocês foram essenciais durante essa caminhada, não sei se teria conseguido sem a ajuda de vocês. Obrigada pela amizade e por nunca terem me faltado quando eu precisei de vocês.

Ao Cláudio Afonso Pinho Lopes, pela amizade, momentos de descontração e apoio na realização desse trabalho.

À Juliana Jales de Hollanda Celestino, Márcia Viviane Alves Saraiva e Roberta Nogueira Chaves, pelas palavras, ensinamentos e atenção dispensada no decorrer desse período.

Aos demais membros do LAMOFOPA (José Erisvaldo Maia Júnior, Karla Daniely Bastos dos Santos, Guilherme Ferreira de Sousa Meneses, Francisco José de Moraes e Silva Filho, Janaína da Costa Correia, Priscilla Gillian Uchoa, Rebeca Magalhães Pedrosa Rocha, Mônica Aline Parente Melo, Camila Cardoso Diogo, Gerlane Modesto da Silva, Josman Silva dos Santos, Sarah Bezerra Honório) pela amizade, apoio, ajuda e paciência. Meus agradecimentos especiais para José Erisvaldo Maia Júnior e Camila Cardoso Diogo, pela inestimável ajuda no decorrer desse período.

Aos colegas Artur, Gabriel, Iran, Suiany, Régis, Marcelo, Bárbara, Mônica, por me ajudarem a crescer pessoal e profissionalmente.

À amiga Iara Tércia Freitas Macedo pela amizade sincera e por estar sempre presente compartilhando todos os momentos de minha vida.

À dedicação e competência das secretárias e dos funcionários do PPGCV, cujo auxílio e cooperação foram de grande valia para a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro concedido na forma de bolsa de estudo.

“N3o se cruza o mar sentando-se para admirar a 3gua”

Rabindranath Tagore

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da adição de diferentes tipos e concentrações de soro no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais (FOPA) caprinos sobre a viabilidade, desenvolvimento folicular e produção de nitrito. Para isso, o par ovariano de 4 cabras sem raça definida foi dividido em 29 fragmentos, sendo um destinado ao controle ou tecido não cultivado. Os demais fragmentos foram cultivados por 1 ou 7 dias em Meio Essencial Mínimo suplementado (MEM⁺) ou MEM⁺ adicionado de 10 ou 20% de Soro Fetal Bovino (SFB), Soro de Cabra em Estro (SCE) ou Soro de Cabra em Diestro (SCD). Após o cultivo, o meio foi analisado para verificar a produção de nitrito e, os fragmentos ovarianos foram submetidos à análise histológica e ultra-estrutural. De acordo com os dados histológicos, a ultra-estrutura foi realizada somente nos fragmentos do controle, bem como naqueles fragmentos onde os FOPA foram considerados morfológicamente normais. Após 7 dias de cultivo, apenas o tratamento com 10% de SFB apresentou percentual de FOPA normais similar ao MEM⁺ ($P > 0,05$). Quando comparado ao MEM⁺, após 1 dia de cultivo, o tecido ovariano cultivado com 20% de SCE mostrou simultaneamente uma redução e um aumento significativos na porcentagem de folículos primordiais e em desenvolvimento, respectivamente ($P < 0,05$). Além disso, este mesmo tratamento após 7 dias de cultivo apresentou diâmetro folicular significativamente superior ao controle ($P < 0,05$). A análise ultra-estrutural dos folículos cultivados por 7 dias em MEM⁺ ou MEM⁺ adicionado de 10% de SFB mostrou danos oocitários, porém células da granulosa apresentaram-se normais. No entanto, os folículos cultivados na presença de 20% de SCE, mostraram-se completamente degenerados. A análise do meio de cultivo revelou uma correlação positiva entre a viabilidade folicular e a produção de nitrito. Apesar dos resultados deste estudo terem revelado que a suplementação com soro não melhora a viabilidade de FOPA, este é o primeiro relato da produção de nitrito durante o cultivo de FOPA caprinos cultivados *in vitro*, o qual mostrou que os níveis deste componente no meio de cultivo podem ser um bom indicador da viabilidade das células da granulosa.

PALAVRAS-CHAVE: Folículo pré-antral, caprino, cultivo *in vitro*, soro, nitrito.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of the addition of different serum types and concentrations in the *in vitro* culture of caprine ovarian preantral follicles (PAF) on the viability, follicular development and nitrite production. Each ovarian pair of 4 crossbreed goats was divided into 29 fragments and one was destined to the control or non-cultured tissue. The remaining fragments were cultured for 1 or 7 days in Minimal Essential Medium supplemented (MEM⁺) or MEM⁺ with 10 or 20% of Bovine Fetal Serum (BFS), Estrous Goat Serum (EGS) or Diestrous Goat Serum (DGS). After culture, the medium was analyzed to verify nitrite production and the ovarian fragments were submitted to histological and ultra structural analysis. Based on histological observation, the ultrastructural analysis was performed only in fragments from control and from those which showed PAF morphologically normal. After 7 days of culture, only treatment with 10% BFS showed the percentage of normal PAF similar to MEM⁺ ($P > 0.05$). In comparison to MEM⁺, after 1 day, ovarian tissue cultured with 20% EGS showed a significant decrease and an increase on percentages of primordial and developing follicles, respectively ($P < 0.05$). Furthermore, this same treatment after 7 days of culture showed a significantly higher follicular diameter when compared to control ($P < 0.05$). The ultrastructural analysis of follicles cultured for 7 days in MEM⁺ or MEM⁺ with 10% BFS showed some oocyte damage, although the granulosa cells were normal. However, follicles cultured with 20% EGS showed complete degeneration. Analysis of culture medium revealed a positive correlation between follicular viability and nitrite production. Despite the results showed that supplementation with serum did not improve the viability of PAF, this is the first study of nitrite production on *in vitro* culture of goat PAF, showing that nitrite levels in culture medium works as a good indicator of granulosa cells viability.

KEYWORDS: Preantral follicle, caprine, *in vitro* culture, serum, nitrite.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	17
2.1. Ovário mamífero.....	17
2.2. Foliculogênese e características dos folículos ovarianos.....	17
2.3. População folicular ovariana.....	18
2.4. Atresia folicular.....	19
2.5. Cultivo <i>in vitro</i> de FOPA.....	20
2.6. Utilização de soro no cultivo <i>in vitro</i> de FOPA caprinos.....	21
2.7. Métodos de avaliação da viabilidade folicular.....	23
2.8. Mensuração de nitrito.....	23
3. JUSTIFICATIVA.....	26
4. HIPÓTESE CIENTÍFICA.....	27
5. OBJETIVOS.....	28
5.1. Objetivo geral.....	28
5.2. Objetivos específicos.....	28
6. MATERIAL E MÉTODOS.....	29
7. RESULTADOS.....	33
8. DISCUSSÃO.....	39
9. CONCLUSÃO.....	41
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
11. ANEXO.....	49

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Secção histológica de tecido ovariano cultivado por 7 dias em 10% SFB mostrando um folículo normal e outro degenerado.....33
- Figura 2. Percentagem (média \pm e. p.) de folículos pré-antrais morfologicamente normais no controle (não cultivado) e após cultivo *in vitro* por 1 ou 7 dias na ausência ou presença de soro34
- Figura 3. Fotomicrografia de um folículo (A) normal (controle não cultivado) e (B) degenerado (cultivado por 7 dias em MEM+)37
- Figura 4. Mensuração da produção de nitrito (média \pm e. p.) após cultivo *in vitro* por 1 ou 7 dias na ausência ou presença de soro.....38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Percentagem (média \pm e. p.) de folículos primordiais e em desenvolvimento no controle (não cultivado) e após cultivo *in vitro* por 1 ou 7 dias na ausência ou presença de soro35

Tabela 2. Diâmetro folicular (média \pm e. p.) no controle (não cultivado) e após cultivo *in vitro* por 1 ou 7 dias na ausência ou presença de soro36

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANOVA	: Análise de variância
BMP-15	: Proteína Morfogenética do Osso-15
°C	: Graus Celsius
CaCl ₂	: Cloreto de Cálcio
Cl ⁻	: Íon Cloreto
CO ₂	: Dióxido de carbono
CG	: Células da Granulosa
DNA	: Ácido Desoxirribonucléico
eNOS	: Óxido Nítrico Sintetase Endotelial
EGF	: Fator de Crescimento Epidermal
e. p.	: Erro padrão
Fig.	: Figura
FOPA	: Folículos Ovarianos Pré-Antrais
g	: Grama
GDF-9	: Fator de Crescimento de Diferenciação- 9
gl	: Gota lipídica
h	: Horas
HC	: Histologia Clássica
H ₃ PO ₄	:Ácido fosfórico
IAA	: Ácido 3-indol acético
iNOS	: Óxido Nítrico Sintetase Indutora
ITS	: Insulina, Transferrina e Selênio
Kit-Ligand	: KL
LAMOFOPA	: Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-Antrais
L	: Litro
m	: Mitocôndria
MEM	: Meio Essencial Mínimo
MEM ⁺	: Meio Essencial Mínimo suplementado
MET	: Microscopia Eletrônica de Transmissão

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

mg	: Miligrama
min.	: Minutos
MIV	: Maturação <i>In Vitro</i>
mL	: Mililitro
mM	: Milimolar
mm ³	: Milímetros Cúbicos
NADPH	: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
nm	: Nanômetro
nNOS	: Óxido Nítrico Sintetase Neuronal
NO	: Óxido Nítrico
np	: núcleo do oócito picnótico
nu	: Núcleo do oócito normal
O	: Oócito
PAS	: Ácido periódico de Schiff
pH	: Potencial Hidrogeniônico
PLSD	: Protected Least Significant Difference
P < 0,05	: Probabilidade de erro menor do que 5%
P > 0,05	: Probabilidade de erro maior do que 5%
R	: Coeficiente de correlação
re	: Retículo endoplasmático
rpm	: Rotações por minuto
RNAm	: Ácido Ribonucléico Mensageiro
SCD	: Soro de Cabra em Diestro
SCE	: Soro de Cabra em Estro
SFB	: Soro Fetal Bovino
Tab.	: Tabela
v	: Vesícula
ZP	: Zona Pelúcida
µg	: Microgramas

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μL	: Microlitro
μm	: Micrômetro
%	: Percentagem
~	: Aproximadamente
100x	: Aumento de 100 vezes
400x	: Aumento de 400 vezes
4000x	: Aumento de 4000 vezes
6000x	: Aumento de 6000 vezes

1. INTRODUÇÃO

No ovário mamífero, durante o desenvolvimento do folículo, a morfologia folicular normal é alterada, uma vez que o oócito cresce e suas células circundantes se diferenciam, mantendo a funcionalidade normal do órgão para garantir a capacidade fecundante da fêmea. Por outro lado, sabe-se também que, paralelamente a esse processo, numerosos folículos tornam-se atrésicos, levando a uma perda folicular de 99,9% ao longo da vida reprodutiva do animal (MAO et al., 2002). As altas taxas de morte folicular observadas no ovário reduzem, consideravelmente, o potencial reprodutivo da fêmea mamífera. Portanto, estudos *in vitro* que permitam conhecer as substâncias e fatores envolvidos na manutenção da viabilidade, ativação, crescimento e morte folicular podem, seguramente, contribuir para a maximização do potencial reprodutivo de fêmeas mamíferas.

Vários sistemas de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais (FOPA) têm sido sugeridos por diferentes pesquisadores, porém os resultados em relação à viabilidade e ao desenvolvimento folicular são bastante variáveis, sobretudo no que se refere ao meio de cultivo utilizado. Muitos trabalhos têm relatado a adição de soro, como fonte de nutrientes, hormônios e fatores de crescimento, ao meio de cultivo de FOPA, sendo, no entanto, os resultados desta adição bastante controversos. Em várias espécies foi verificado que o soro promove efeitos benéficos durante o cultivo *in vitro* de FOPA (humanos: WRIGHT et al., 1999; bovinos: SAHA et al., 2000; suínos: TELFER et al., 2000), porém outros observaram que em bovinos o soro é prejudicial tanto no cultivo *in vitro* de FOPA (THOMAS et al., 2001) como de embriões (MUCCI et al., 2006). A maioria dos estudos mostra a utilização de soro fetal bovino na concentração 10% durante o cultivo *in vitro* de FOPA (CECCONI et al., 1999; ZHOU e ZHANG, 2005), porém, outros tipos e concentrações de soro também têm sido utilizados (WRIGHT et al., 1999; MAO et al., 2002). Entretanto, especialmente em caprinos, não se tem relato acerca do uso de diferentes concentrações de soro oriundo de cabras em estro ou em diestro sobre a viabilidade e desenvolvimento de FOPA cultivados *in vitro*.

A avaliação da viabilidade e do desenvolvimento folicular *in vitro* tem sido demonstrada principalmente por meio das análises histológica e ultra-estrutural, as quais revelam apenas as características morfológicas superficiais e mais profundas, respectivamente, sem, contudo, comprovar a função normal do folículo. No entanto, uma outra ferramenta que também pode ser utilizada é a detecção no meio de cultivo dos níveis de nitrito, um dos produtos do metabolismo oxidativo do óxido nítrico (NO). O NO é um mensageiro intracelular de produção endógena que previne a apoptose em vários tipos

celulares, tais como células endoteliais (DIMMELER et al., 1997) e folículos ovarianos (CHUN et al., 1995), podendo ser utilizado como indicativo de normalidade dessas estruturas.

Nas seções seguintes, serão abordados aspectos relacionados ao ovário mamífero, foliculogênese, população e atresia folicular, cultivo *in vitro*, soro e métodos de avaliação folicular. A contribuição científica deste trabalho será apresentada sob a forma de um artigo científico submetido à revista *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ovário mamífero

O ovário mamífero é um órgão composto por vários tipos celulares diferenciados, os quais trabalham em conjunto promovendo um ambiente ideal para realização de suas funções exócrina e endócrina (BRISTOL-GOULD e WOODRUFF, 2006).

Como na maioria das espécies mamíferas, o ovário caprino é composto de uma medula e um córtex circundado por uma superfície epitelial, comumente conhecida como epitélio germinal. A medula ovariana consiste de um arranjo irregular de tecido conjuntivo fibroelástico e um extensivo sistema nervoso e vascular. O córtex contém folículos ovarianos e corpo lúteo em vários estádios de desenvolvimento ou regressão. O tecido conectivo do córtex consiste de fibroblastos, colágeno e fibras reticulares (SILVA et al., 2005).

2.2. Foliculogênese e características dos folículos ovarianos

A foliculogênese, evento iniciado na vida pré-natal na maioria das espécies, pode ser definida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular, iniciando-se com a formação do folículo primordial e culminando com o estágio de folículo pré-ovulatório (VAN DEN HURK E ZHAO, 2005).

O folículo é considerado a unidade morfológica e funcional do ovário mamífero, cuja função é proporcionar um ambiente ideal para o crescimento e maturação do oócito (CORTVRINDT e SMITZ, 2001), bem como produzir hormônios e peptídeos (ADASHI, 1994). O folículo é composto por um oócito circundado por células somáticas (granulosa e tecais), e durante a foliculogênese, a morfologia folicular é alterada uma vez que o oócito cresce e as células da granulosa circundantes se diferenciam (BRISTOL-GOULD e WOODRUFF, 2006). De acordo com o grau de evolução, os folículos podem ser classificados em pré-antrais (primordiais, primários e secundários) ou antrais (terciários e pré-ovulatórios) (FIGUEIREDO et al., 2002). Os folículos primordiais são constituídos por um oócito quiescente, esférico ou oval, circundado por células da granulosa de formato pavimentoso. O núcleo do oócito é relativamente grande e ocupa uma posição central a excêntrica mostrando seu nucléolo evidente. A zona pelúcida nesse estágio ainda não é observada, verificando-se apenas uma justaposição do oócito e células da granulosa, sem nenhuma junção específica

(LUCCI et al., 2001). Os folículos primordiais permanecem quiescentes até a ativação para o grupo de folículos em crescimento (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005).

Os folículos primários são formados por um oócito circundado por células da granulosa de formato cubóide dispostas em uma única camada. A partir desse estágio o oócito passa a manter um estreito contato com essas células mediado por endocitose. A membrana plasmática do oócito apresenta projeções que penetram entre as células da granulosa adjacentes, e algumas microvilosidades aparecem na superfície oocitária (LUCCI et al., 2001).

Os folículos secundários são formados por um oócito circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa de formato cubóide. O núcleo do oócito assume uma posição excêntrica e as organelas começam a mover-se para a periferia. Com o desenvolvimento dos folículos, também aumenta o número de microvilos e inicia-se a formação da zona pelúcida (LUCCI et al., 2001), bem como a formação das células da teca externa a partir do estroma intersticial (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005). As células da teca interna são definidas quando os folículos apresentam 4 ou mais camadas de células da granulosa (LUCCI et al., 2001).

Com o crescimento dos folículos secundários e organização das células da granulosa em várias camadas, ocorre a formação de uma cavidade repleta de líquido denominada antro. A partir deste estágio, os folículos passam a ser denominados terciários ou antrais. Durante o desenvolvimento folicular, a produção de fluido antral é intensificada pelo aumento da vascularização folicular e permeabilidade dos vasos sanguíneos, os quais estão fortemente relacionados com o aumento do folículo antral. O desenvolvimento dos folículos antrais é caracterizado por uma fase de crescimento, recrutamento, seleção e dominância (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005) sendo a formação de folículos pré-ovulatórios um pré-requisito para a ovulação e formação do corpo lúteo, bem como manutenção da fertilidade (DRUMMOND, 2006).

Ao longo do ciclo reprodutivo, folículos ovarianos em todas as fases de desenvolvimento estão presentes e geralmente podem ser classificados em três estágios, ou seja, folículos quiescentes, em crescimento ou atresícos. Os sinais que interrompem a latência do folículo primordial quiescente e induzem o início de seu crescimento em direção à ovulação ou atresia ainda não são completamente conhecidos (BRISTOL-GOULD e WOODRUFF, 2006).

2.3. População folicular ovariana

A população folicular ovariana é estabelecida ainda na vida fetal em humanos ou no período pós-natal em roedores (SKINNER, 2005). No entanto, recentemente pesquisadores propuseram a existência de formação de novas células germinativas em mulheres (BUKOVSKY et al., 2004) e camundongas (JOHNSON et al., 2005) adultas.

O número total de folículos por ovário varia entre espécies, sendo de aproximadamente 1.500 na camundonga (SHAW et al., 2000); 33.000 na ovelha (AMORIM et al., 2000); 35.000 na cabra (LUCCI et al., 1999) e aproximadamente 2.000.000 na mulher (ERICKSON, 1986). Ao longo da vida do animal, ocorre uma redução ordenada, geralmente exponencial, no número de folículos pré-antrais (SHAW et al., 2000). Essa redução é devida a dois fenômenos que ocorrem naturalmente no ovário, ou seja, a ovulação e a atresia ou morte folicular (SKINNER, 2005). Somente uma pequena parte (0,1%) dos folículos primordiais chega ao estágio de ovulação (NUTTINCK et al., 1993), pois a sua grande maioria (99,9%) torna-se atrésica durante as fases de crescimento e maturação (OTALA et al. 2002).

2.4. Atresia folicular

A atresia é um fenômeno natural que leva à exaustão do pool de folículos pré-antrais (MORITA e TILLY, 1999) e é comum a todas as espécies domésticas, podendo ocorrer em qualquer estágio do desenvolvimento folicular (GLAMOCLIJA et al., 2005). Nos estádios iniciais da foliculogênese, a atresia é iniciada no oócito e em seguida ocorre nas células da granulosa (MORITA e TILLY, 1999), verificando-se o processo inverso em folículos maduros (GLAMOCLIJA et al., 2005).

A atresia pode ocorrer por via degenerativa (SAUMANDE, 1991) e/ou apoptótica (FIGUEIREDO, 1995). Na via degenerativa, a isquemia pode ser uma das principais causas do desencadeamento da morte folicular (FARBER, 1982), resultando em alterações na permeabilidade da membrana celular, aumento de água intracelular, vacuolização citoplasmática e, conseqüentemente, degeneração (BARROS et al., 2001).

No que concerne à apoptose, sabe-se que este é um evento geneticamente determinado, ou seja, depende da expressão de genes pró e anti-apoptóticos, e é observada nos folículos ovarianos durante toda a vida fetal e adulta. Uma característica marcante da apoptose é a ativação de nucleases endógenas que quebram o DNA a cada 180-200 pares de bases (YU et al., 2005). Os aspectos ultra-estruturais da apoptose podem ser caracterizados pela: 1) condensação da cromatina nuclear formando aglomerados circunscritos responsáveis pelo

contorno do espaço nuclear; 2) fragmentação da célula e produção de corpos apoptóticos ligados à membrana, que serão fagocitados pelos macrófagos (HUSSEIN et al., 2005).

Apesar de ao nascimento o ovário mamífero conter milhares de folículos, a grande maioria torna-se atrésica durante o desenvolvimento e maturação, conseqüentemente um número reduzido de oócitos viáveis são produzidos durante a vida útil da fêmea, fazendo com que o potencial do ovário seja fracamente aproveitado. Diante disso, vários estudos (CECCONI et al., 1999; MARTINS et al., 2005; ANDRADE et al., 2005; MATOS et al., 2006ab) têm sido realizados na tentativa de ser desenvolvido um sistema de cultivo que possa promover a ativação e o crescimento folicular *in vitro*, evitando assim as perdas foliculares que ocorrem naturalmente *in vivo*.

2.5. Cultivo *in vitro* de FOPA

O cultivo *in vitro* de FOPA tem como objetivo principal permitir o desenvolvimento folicular, assegurando o crescimento e a maturação dos oócitos, bem como a multiplicação e posterior diferenciação das células da granulosa desses folículos (FIGUEIREDO et al., 2002).

Embora folículos primordiais no córtex ovariano progridam em grande número para o estágio de folículos primários e, que estes se mantenham viáveis por até 20 dias de cultivo (WANDJI et al., 1997), poucos folículos crescem para o estágio secundário, devido à alta sensibilidade desses folículos a atresia. O desenvolvimento de um sistema de cultivo que garanta a ativação e o crescimento folicular até um estágio nos quais os oócitos possam ser maturados e fertilizados *in vitro* é importante para se conhecer os fatores que controlam o crescimento oocitário e a multiplicação das células da granulosa (ANDRADE et al., 2005). HIRSHFIELD (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). Em caprinos, recentemente foi demonstrada a presença de Kit-Ligand (KL), fator de diferenciação de crescimento-9 (GDF-9), proteína morfogenética do osso-15 (BMP-15), ativina, folistatina, fator de crescimento epidermal (EGF) e seus receptores em folículos primordiais, sugerindo que estes fatores podem estar envolvidos no processo de ativação (SILVA et al., 2004ab ; SILVA et al., 2005; SILVA et al., 2006).

É indiscutível que grandes progressos já tenham sido observados no cultivo *in vitro* de FOPA em diferentes espécies animais. A ativação de folículos primordiais caprinos (MARTINS et al., 2005; MATOS et al., 2006ab), ovinos (ANDRADE et al., 2005), bovinos (WANDJI et al., 1996; BRAW-TAL e YOSSEFI, 1997) e babuínos (FORTUNE et al., 1998)

foi alcançada com êxito após cultivo de pequenos fragmentos de córtex ovariano. No tocante ao desenvolvimento folicular, nas espécies ovina (CECCONI et al., 1999), bovina (GUTIERREZ et al., 2000; McCAFFERY et al., 2000) e caprina (HUANMIN e YONG, 2000) folículos secundários isolados atingiram o estágio antral *in vitro*. O desenvolvimento de folículos antrais a partir de folículos primários ou secundários foi igualmente relatado em humanos (ROY e 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 FOPA observados nas espécies supracitadas, os resultados mais satisfatórios têm sido obtidos em animais de laboratório. Em camundongos, o desenvolvimento *in vitro* de FOPA foi descrito por vários autores (EPPIG, 1997; QVIST et al., 1990; CARROLL et al., 1991; NAYÜDU e OSBORN, 1992). Entretanto, os melhores resultados foram observados por O'Brien et al. (2003) que obtiveram o nascimento de 53 camundongos a partir de folículos primordiais desenvolvidos, maturados e fecundados *in vitro*.

No entanto, apesar dos avanços observados em camundongas, o nascimento a partir de FOPA cultivados *in vitro* ainda não foi alcançado em espécies domésticas. Tem-se observado que nessas espécies a composição do meio é um importante fator para a obtenção de sucesso no cultivo *in vitro* de FOPA.

Várias tentativas visando maximizar o número de FOPA viáveis até a ovulação *in vitro* têm sido relatadas. Dentre elas, podemos citar a utilização de várias substâncias adicionadas ao meio de cultivo, tais como água de coco (MARTINS et al., 2005), ácido 3-indol acético (IAA) (ANDRADE et al., 2005), fator de crescimento epidermal (EGF), hormônio foliculo-estimulante (FSH) (SILVA et al., 2004c; TAMILMANI et al., 2005; MATOS et al., 2006a), fator de crescimento fibroblástico (FGF) (MATOS et al., 2006b) e soro fetal bovino (SFB) (SAHA et al., 2000).

2.6. Utilização de soro no cultivo *in vitro* de FOPA caprinos

Muitos trabalhos têm adicionado SFB como fonte de nutrientes, hormônios e fatores de crescimento ao meio de cultivo de FOPA, sendo, contudo, os resultados desta adição bastante controversos. Alguns autores verificaram que o SFB promove efeitos benéficos durante o cultivo *in vitro* de FOPA. A ausência de soro no meio de cultivo folicular tem sido relacionada com a indução da apoptose, comprometendo assim o desenvolvimento folicular

(DEMEESTERE et al., 2005). Telfer et al. (2000) verificaram um aumento significativo na sobrevivência de FOPA suínos após 20 dias de cultivo na presença de 10% de SFB, em relação àqueles cultivados sem soro. Wright et al. (1999) mostraram que em humanos, após 5 dias de cultivo, a proporção de folículos primordiais e em desenvolvimento diminuiu e aumentou, respectivamente, em meio suplementado com 10% de soro humano quando comparado com meio suplementado com albumina sérica bovina. Cecconi et al. (1999) obtiveram um rápido crescimento e uma alta proporção na formação de antro utilizando 10% de SFB durante o cultivo *in vitro* de FOPA de ovelhas.

Por outro lado, outros estudos observaram que a utilização de SFB pode ser prejudicial durante o cultivo *in vitro* de FOPA. Apesar de aumentar o diâmetro em FOPA bovinos, o tratamento com 10% de SFB diminuiu a viabilidade folicular (HULSHOF et al., 1995). Thomas et al. (2001) também verificaram que a suplementação com 10% de SFB promove uma perda significativa da integridade da membrana basal de FOPA bovinos. Mitchell et al. (2002) mostraram que todos os folículos cultivados em soro de rata degeneraram após 9 dias de cultivo *in vitro*. Além disso, foi observado que folículos ovinos criopreservados e cultivados *in vitro* em meio sem soro mantiveram sua viabilidade (NEWTON et al., 1999).

A maioria dos estudos tem relatado a adição de SFB na concentração de 10% durante o cultivo *in vitro* de FOPA em diferentes espécies (bovinos: SAHA et al., 2000; caprinos: HUANMIN e YONG., 2000; ovinos: CECCONI et al., 1999), porém outros tipos e concentrações de soro vêm sendo testados. Katska e Rynska (1998) utilizaram dois tipos de soro (SFB e soro bovino) durante o cultivo *in vitro* de folículos bovino, porém nenhuma diferença foi verificada entre o tipo de soro utilizado no tocante à sobrevivência e ao desenvolvimento folicular. Mao et al. (2002) demonstraram que quando comparado com soro de porca pré-púbere, a utilização de 7,5% de SFB promoveu um maior percentual de folículos antrais suínos. Não somente o tipo, mas também a concentração de soro é importante para o desenvolvimento folicular, haja vista que a suplementação com 7,5% de soro de ratas (WU et al., 2000) ou porcas (WU et al., 2001) promoveu um rápido crescimento folicular em relação às concentrações de 5 e 10%.

O Soro de Cabra em Estro (SCE) vem sendo utilizado com sucesso na maturação *in vitro* (MIV) de oócitos caprinos (KHARCHE et al., 2006). No entanto, em embriões bovinos esse mesmo tipo de soro na concentração de 5% prejudica a taxa de sobrevivência pós-descongelamento (MUCCI et al., 2006).

Mingoti et al. (1995) ainda observaram que a adição de soro bovino ao meio de MIV, seja SFB ou soro de vacas nas diferentes fases do ciclo estral, não influenciou o percentual de oócitos bovinos que atingiram metáfase II.

Como pode ser visto, os resultados são bastante controversos, o que pode ser explicado pelas diferenças entre espécies, protocolos, estágio de desenvolvimento folicular e métodos de avaliação da viabilidade das estruturas analisadas.

2.7. Métodos de avaliação da viabilidade folicular

Existem várias técnicas disponíveis para avaliar a morfologia, ultra-estrutura e viabilidade dos folículos ovarianos pré-antrais. A histologia clássica (HC) permite verificar a mudança na morfologia das células da granulosa, além de analisar a integridade morfológica do oócito e das células da granulosa. A vantagem desta técnica é a possibilidade de avaliar um grande número de folículos, o que a torna uma ferramenta importante quando se quer realizar uma análise quantitativa (MATOS et al., 2004). Alguns autores mostraram que na análise através de HC, as alterações indicativas de atresia em folículos pré-antrais ocorrem primariamente no oócito, sendo a picnose nuclear o primeiro sinal de atresia (HUSSEIN, 2005). No entanto, não é possível avaliar a integridade das organelas citoplasmáticas ou atividade enzimática dos folículos ovarianos através desta técnica (GOSDEN, 2000), podendo então ser utilizada a microscopia eletrônica de transmissão (MET). Esta técnica permite a avaliação de mudanças ultra-estruturais (SALEHNIA et al., 2002) ocorridas durante a atresia folicular, sendo destacada sua importância após conservação *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos e ovinos, mostrando que folículos considerados normais após avaliação histológica podem apresentar alterações degenerativas na sua ultra-estrutura (MATOS et al., 2004; SANTOS et al., 2006).

2.8. Mensuração de nitrito

A avaliação da viabilidade e do desenvolvimento folicular *in vitro* tem sido demonstrada principalmente por meio da HC e MET. Porém, uma outra ferramenta que também pode vir a ser utilizada é a mensuração no meio de cultivo dos níveis de nitrito, um dos produtos do metabolismo oxidativo do óxido nítrico (NO). A mensuração dos níveis de nitrito em amostras biológicas aquosas é utilizada para fornecer indiretamente uma estimativa da produção de NO endógeno (SCHULZ et al., 1999). Essa mensuração pode ser obtida pela

reação de Griess, que é um método de espectrofotometria para análise de nitritos em soluções aquosas (GREEN et al., 1981).

O NO é um gás, cuja molécula é pequena e hidrofóbica e pode passar facilmente através de membranas (KIECHLE e ZHANG, 2002). Trata-se de um mediador importante de processos fisiológicos e patológicos celulares. No entanto, os mecanismos pelos quais o NO induz esses processos permanecem desconhecidos (KIECHLE e ZHANG, 2002). O NO é um mensageiro bioquímico com diversas ações nos sistemas fisiológicos e está envolvido em vários processos reprodutivos nas fêmeas tais como ovulação, implantação embrionária e contração uterina (MAUL et al., 2003). O NO pode ainda prevenir a apoptose em vários tipos celulares tais como células endoteliais (DIMMELER et al., 1997) e folículos ovarianos (CHUN et al., 1995).

O NO é sintetizado a partir do substrato L-arginina por ação das enzimas sintetases, sendo esta reação dependente de oxigênio e NADPH (DIXIT et al., 2001). Existem três tipos de enzimas sintetases: óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS), óxido nítrico sintetase neuronal (nNOS) e óxido nítrico sintetase indutora (iNOS) (VIÑAS et al., 2006). Essas enzimas são classificadas dependendo do tecido de origem e propriedades estruturais e funcionais e estão distribuídas em vários tipos celulares e tecidos (DIXIT et al., 2001). Mitchell et al. (2004) verificaram a presença do RNAm da iNOS predominantemente em células da granulosa e oócitos em folículos de vários tamanhos. Já a eNOS foi detectada em vasos sanguíneos, oócitos e células da teca. Esses resultados demonstram a presença de NOS no ovário, indicando o potencial para produção de NO e uma participação deste no desenvolvimento folicular.

A quantidade de NO produzida pela iNOS é cerca de 1000 vezes maior que a produzida pela eNOS. A iNOS tem sido predominantemente localizada em células da granulosa de folículos imaturos, enquanto que as células da granulosa de folículos maduros saudáveis ou destinados a sofrer atresia são desprovidos dessa enzima (MATSUMI et al., 1998ab). Isso tem sugerido que o NO pode ter ação antiapoptótica em células da granulosa através dos mecanismos autócrinos/parácrinos, prevenindo assim a atresia e, portanto, favorecendo o desenvolvimento folicular. Além disso, os níveis de RNAm da iNOS em ovários imaturos de ratas decresce após administração de gonadotrofinas (MATSUMI et al., 1998a). Esses achados sugerem que a presença de iNOS é um pré-requisito para folículos imaturos permanecerem quiescentes, enquanto que a ausência da iNOS pode sugerir folículos em desenvolvimento ou degenerados. Matsumi et al. (2000) reforçou a hipótese que o NO produzido pela iNOS de folículos imaturos age como um fator citostático, ao demonstrar que

o SNAP, um doador de NO, atenua a síntese de DNA estimulada pelo EGF e a apoptose induzida pela busrelina em células da granulosa cultivadas. Esses achados sugerem uma direta implicação do NO na regulação do desenvolvimento de folículos imaturos.

Recentes estudos demonstraram um efeito inibitório do NO sobre a esteroidogênese de células da granulosa cultivadas *in vitro* (MATSUMI et al., 1998b; PINTO et al., 2003). Dunnam et al. (1999) verificaram que a inibição de NO que ocorre durante o estro é devida ao aumento na produção de estradiol e que o NO age inibindo a produção de estradiol e androstenediona. O NO tem sido considerado antiestrogênico através de mecanismos de inibição direta da atividade da aromatase (ISHIMARU et al., 2001).

3. JUSTIFICATIVA

Os FOPA constituem a maior parte da população folicular presente no ovário mamífero. Dentre esses folículos, 90 a 95% são folículos primordiais, os quais são folículos quiescentes ou em estágio de repouso, sendo considerados o *pool* de reserva folicular ovariano. Para que um folículo primordial chegue a ovular é necessário que seja ativado, inicie a fase de crescimento (primários e secundários) até atingir os estádios de folículos antrais (terciários e pré-ovulatórios). No entanto, durante todo o processo de desenvolvimento folicular a atresia é responsável pela morte de 99,9% de todos os folículos ovarianos, de modo que, *in vivo* apenas 0,1% dos folículos primordiais chegam à ovulação. Neste contexto, diversos pesquisadores têm investigado diferentes sistemas de cultivo *in vitro* de FOPA, tanto de animais de laboratório como de animais domésticos, visando obter melhores condições para promover a ativação e o desenvolvimento folicular e, conseqüentemente, reduzir as perdas foliculares que ocorrem *in vivo*.

Dentre as maiores preocupações dos pesquisadores, destacam-se a composição do meio de cultivo *in vitro*, onde se tem buscado definir os tipos e concentrações de componentes necessários para garantir a viabilidade de um grande número de folículos primordiais que sejam ativados, crescidos e maturados *in vitro*. Um dos suplementos bastante utilizados no meio de cultivo é o soro, o qual contém várias substâncias, tais como aminoácidos, substratos energéticos, vitaminas, proteínas, hormônios e fatores de crescimento, os quais podem favorecer o cultivo folicular. Diferentes tipos de soro são utilizados, dentre eles, o SFB e o soro de animais em diferentes fases do ciclo estral. Apesar desses meios promoverem a ativação e o crescimento folicular, é necessário que também sejam capazes de manter a viabilidade do folículo, o que pode ser detectada por diferentes técnicas. Dentre as técnicas mais comumente utilizadas para avaliar a viabilidade folicular após o cultivo *in vitro*, destacam-se a HC e a MET. A HC permite verificar a morfologia tanto das células foliculares (granulosa e tecais), quanto do oócito, bem como, pode-se ter uma idéia da estrutura da membrana basal. A MET, além de mostrar tudo isso, permite também analisar a qualidade das organelas citoplasmáticas. Embora essas técnicas sejam de grande valor para avaliar a estrutura morfológica do folículo, não se sabe se os componentes foliculares estão desenvolvendo, normalmente suas funções. Dessa forma, uma outra ferramenta que também pode ser utilizada é a detecção no meio de cultivo dos níveis de nitrito, um dos produtos do metabolismo oxidativo do NO, o qual tem sido demonstrado ser produzido por células da granulosa de folículos normais.

4. HIPÓTESE CIENTÍFICA

Baseado na revisão descrita formularam-se as seguintes hipóteses:

- Meio de cultivo suplementado com soro pode manter a viabilidade, bem como promover a ativação e o crescimento *in vitro* de FOPA caprinos;
- Mensuração dos níveis de nitrito pode ser utilizada como uma ferramenta para avaliar a viabilidade folicular.

5. OBJETIVOS

5.1 Geral:

- Cultivar FOPA caprinos presentes no tecido ovariano na ausência ou presença de soro.

5.2 Específicos:

- Avaliar o efeito da origem (soro fetal bovino, soro de cabra em estro e soro de cabra em diestro) e concentração (10 ou 20%) de soro sobre a morfologia, a ativação e o crescimento de FOPA caprinos cultivados *in vitro* no tecido ovariano;
- Analisar morfologicamente e ultra-estruturalmente os FOPA caprinos cultivados *in vitro* na ausência ou presença de soro;
- Mensurar os níveis de nitrito presentes no meio de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Origem e transporte de tecido ovariano

Neste estudo, foram utilizados oito ovários de quatro cabras adultas, sem raça definida, provenientes de abatedouros locais. Imediatamente após o abate, os ovários foram lavados em álcool 70% e, em seguida, em solução salina 0,9%. O par ovariano de cada animal foi transportado dentro de aproximadamente 1 h ao laboratório em solução salina 0,9% à temperatura de aproximadamente 33°C.

6.2 Cultivo *in vitro*

▪ Meio de cultivo

O meio de base utilizado foi o Meio Essencial Mínimo (MEM) (Cultilab, Rio de Janeiro, Brasil) suplementado com ITS (1,0 g/L de insulina, 0,67 mg/L de selênio e 0,55 g/L de transferrina) (Gibco, New York, USA), 100 µg/mL de penicilina e estreptomicina (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), 0,25 µg/mL de anfotericina B, 0,23 mM de piruvato, 2 mM de glutamina e 2 mM de hipoxantina. O MEM adicionado destes suplementos e sem adição de soro foi denominado de MEM⁺. Com exceção das substâncias mencionadas, todas as outras foram adquiridas da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA).

▪ Soro sanguíneo

Para o cultivo *in vitro* foram utilizados Soro Fetal Bovino (SFB) (Nutricell, Campinas, Brasil), Soro de Cabra em Estro (SCE) e Soro de Cabra em Diestro (SCD). O soro de cabras da raça Saanen, em idade reprodutiva, foi obtido a partir da colheita de sangue diretamente da veia jugular desses animais no 1° e 10° dias do ciclo estral, correspondendo ao SCE e SCD, respectivamente.

Para a obtenção do soro, o sangue coletado foi imediatamente centrifugado a 3000 rpm durante 15 min e filtrado através de filtros 0,22 µm. Em seguida, o soro foi inativado em banho-maria a 56°C por 30 min, dividido em alíquotas de 1 mL e estocado em freezer a -20°C até o momento de sua utilização.

▪ **Protocolo experimental e cultivo do córtex ovariano**

No laboratório, foram retirados os tecidos circundantes e ligamentos de cada par ovariano. Posteriormente, cada ovário foi cortado ao meio e a medula, os folículos antrais e os corpos lúteos, quando presentes, foram removidos. De cada par ovariano, foi retirado um pequeno fragmento de 9 mm³ e outro de 1 mm³ para análise histológica e ultra-estrutural, respectivamente, os quais foram imediatamente fixados, constituindo o controle (fragmentos frescos ou não cultivados). Em seguida, o córtex de cada par ovariano foi dividido em 28 fragmentos de aproximadamente 9 mm³, sendo 2 fragmentos por tratamento, e distribuídos aleatoriamente em diferentes meios de cultivo na ausência ou presença de diferentes origens e concentrações de soro, correspondendo aos seguintes tratamentos: MEM⁺ e MEM⁺ suplementado com SFB, SCE e SCD, nas concentrações de 10 ou 20%. Cada fragmento ovariano foi cultivado individualmente por 1 ou 7 dias em placas de 24 poços, contendo 1 mL de meio de cultivo por poço. O cultivo folicular foi realizado em estufa calibrada a 39°C na presença de ar a 5% de CO₂. A cada dois dias, o meio de cultivo foi substituído por meio fresco.

6.3 Análise histológica e avaliação da ativação e crescimento folicular *in vitro*

A fim de avaliar a morfologia dos FOPA caprinos, os fragmentos de tecido ovariano não cultivados, bem como aqueles cultivados por 1 ou 7 dias foram fixados em 10% de formol por 12 h. Após a fixação, os fragmentos ovarianos foram desidratados, diafanizados, incluídos em blocos de parafina e seccionados seriadamente à espessura de 7 µm. Cada 5ª secção foi montada em lâmina e corada pelo método do ácido periódico de Schiff (PAS)-hematoxilina (PAS staining system, Sigma, Inc., St. Louis, MO, USA). Todas as secções foram examinadas utilizando um microscópio ótico (100X e 400X) (Zeiss, Germany).

Foram avaliados 30 FOPA por tratamento, em cada período de cultivo e em cada repetição. De acordo com o estágio de desenvolvimento folicular, os FOPA foram classificados como primordiais (oócito circundado por células da pré-granulosa de formato pavimentoso) e em desenvolvimento (oócito circundado por uma camada de células da pré-granulosa de formato pavimentoso e pelo menos uma célula da granulosa de formato cúbico). A qualidade folicular foi avaliada baseada em parâmetros morfológicos como a integridade do oócito e das células da granulosa. Os FOPA foram classificados ainda como morfológicamente normais (folículos contendo oócito e células da granulosa intactos) ou

folículos degenerados (folículos apresentando oócito com núcleo picnótico ou retração oocitária, acompanhados ou não por destacamento das células da granulosa da membrana basal). A proporção de folículos primordiais e em desenvolvimento foi calculada no dia 0 (controle) e após 1 e 7 dias de cultivo, nos diferentes tratamentos testados. O diâmetro folicular foi mensurado com auxílio de uma ocular micrométrica.

6.4 Análise ultra-estrutural

A análise ultra-estrutural, por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET), foi realizada em FOPA oriundos do controle e naqueles considerados morfologicamente normais provenientes dos diferentes tratamentos testados. Para isto, os pequenos fragmentos de tecido ovariano foram fixados em uma solução contendo 2% de paraformaldeído e 2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio (pH 7,2). Após a fixação, os fragmentos foram pós-fixados em 1% de tetróxido de ósmio, 0,8% de ferricianeto de potássio e 5 mM de CaCl₂ em tampão cacodilato de sódio. Em seguida, as amostras foram desidratadas em acetona e embebidas em resina Spurr. Os cortes ultra-finos (80 nm) foram preparados quando o núcleo do oócito foi observado no corte semi-fino (3 µm). Os cortes semi-finos foram corados com azul de toluidina enquanto os cortes ultra-finos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados em Microscópio Eletrônico de Transmissão (Jeol JEM- 1011, Tokyo, Japan). Na avaliação ultra-estrutural foram observados parâmetros tais como a integridade das organelas citoplasmáticas do oócito e das células da granulosa, o grau de vacuolização citoplasmática, bem como a integridade da membrana nuclear e basal.

6.5 Determinação de Nitrito

Após 1 e 7 dias, 100 µL de meio de cultivo oriundo de cada tratamento foram coletados e armazenados em placas de 96 poços a - 20°C para posterior mensuração dos níveis de nitrito. A concentração de nitrito foi determinada segundo o método de Green et al. (1981), que se baseia em revelar a presença de nitrito em uma amostra (urina, plasma, homogenato tecidual e sobrenadante celular) por uma reação de diazotização que forma um cromóforo de cor rósea, com pico de absorvância de 560 nm. Para esta experiência, 100 µL do reativo de Griess (sulfanilamida a 1%/ cloridrato de N-(1-naftil)-etilenediamina 0.1% / H₃PO₄ em 1% / água destilada, na proporção de 1:1:1:1) foi adicionado a 100 µL do meio de cultivo e incubado à temperatura ambiente por 10 min. A curva padrão foi elaborada com

várias concentrações de NaNO_2 (variando de 0,75 a 100 μM) sob as mesmas condições. Os brancos (controle negativo) foram preparados pela adição de 100 μL do reativo de Griess a 100 μL do meio de base e a absorbância foi medida em leitor de microplacas em 560 nm.

6.6 Análise estatística

As percentagens de folículos normais, primordiais e em desenvolvimento no controle e após cada período de cultivo nos vários tratamentos foram submetidas à transformação angular (arco-seno) e posterior análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste PLSD de Fisher. Os diâmetros foliculares no tecido não cultivado e cultivado não apresentaram homocedasticidade e foram analisados através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Os dados referentes à produção de nitrito nos diferentes tratamentos experimentais foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey. Os resultados foram expressos como média \pm e.p., sendo os valores considerados significativamente diferentes quando $P < 0,05$.

7. RESULTADOS

7.1 Aspectos histológicos de FOPA caprinos cultivados *in vitro*

Os FOPA caprinos presentes no tecido ovariano foram considerados morfológicamente normais quando o oócito apresentava-se esférico ou ligeiramente alongado, núcleo sem evidência de picnose e células da granulosa bem organizadas circundando o oócito. Já os FOPA degenerados apresentavam-se com retração citoplasmática, núcleo do oócito picnótico ou células da granulosa desorganizadas em torno do oócito (Fig. 1).

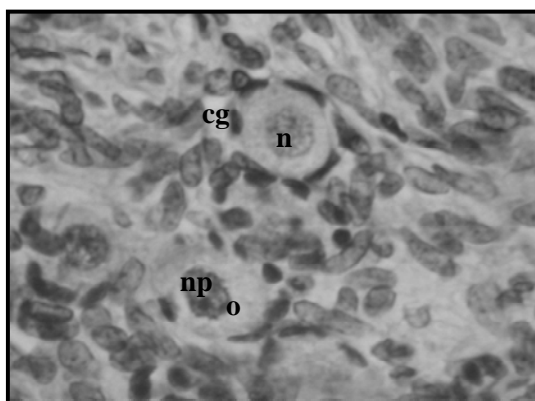


Figura 1. Secção histológica de tecido ovariano cultivado por 7 dias em 10% SFB mostrando um folículo normal e outro degenerado. Observam-se células da granulosa bem organizadas em torno de um oócito. No folículo degenerado nota-se a intensa picnose nuclear. n: núcleo do oócito normal, np: núcleo picnótico, o: oócito, cg: células da granulosa (400X).

7.2 Efeito do soro sobre a percentagem de folículos normais

No presente trabalho foram analisados 120 folículos por tratamento perfazendo um total de 1.800 folículos. A Fig. 2 mostra o percentual de FOPA morfológicamente normais no controle, bem como após cultivo *in vitro* por 1 ou 7 dias. Em quase todos os tratamentos testados, após 1 ou 7 dias de cultivo *in vitro*, foi verificada uma redução significativa ($P < 0,05$) nos percentuais de FOPA normais em relação ao controle, exceto quando se utilizou MEM⁺ sozinho ou com a adição de 10 ou 20% de SFB por 1 dia. Quando os tratamentos foram comparados ao MEM⁺, foi verificada uma redução significativa ($P < 0,05$) nos percentuais de FOPA normais, exceto após 1 dia de cultivo quando o MEM⁺ foi suplementado com 10 ou 20% de SFB ou 10% SCE, e após 7 dias quando foi adicionado 10% de SFB. Comparações entre os tratamentos suplementados com soro mostraram que o aumento da

concentração de SCE e SFB de 10 para 20% causam redução significativa ($P < 0,05$) no percentual de FOPA normais após 1 e 7 dias de cultivo, respectivamente.

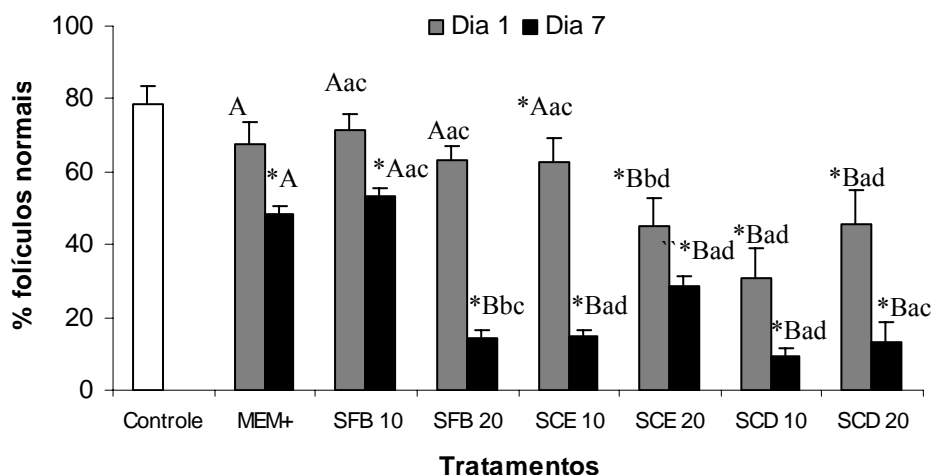


Figura 2. Percentagem (média \pm e. p.) de foliculos pré-antrais morfologicamente normais no controle (não cultivado) e após cultivo *in vitro* por 1 ou 7 dias na ausência ou presença de soro.

* Difere do controle ($P < 0,05$);

A,B Difere significativamente do MEM⁺ dentro de cada dia de cultivo ($P < 0,05$);

a,b Difere significativamente entre a mesma substância em diferentes concentrações ($P < 0,05$);

c,d Difere significativamente entre a mesma concentração em diferentes substâncias ($P < 0,05$).

7.3 Efeito do soro sobre a ativação folicular

A Tab. 1 mostra a percentagem de foliculos primordiais e em desenvolvimento no tecido cortical ovariano antes e após 1 e 7 dias de cultivo. A percentagem de foliculos primordiais e em desenvolvimento no controle foi de 76,4% e 23,6%, respectivamente. Após 1 e 7 dias de cultivo, em todos os tratamentos testados observou-se uma redução e um aumento significativos no percentual de foliculos primordiais e em desenvolvimento, respectivamente, quando comparados ao controle (não-cultivado) ($P < 0,05$), exceto no tratamento MEM⁺ após 1 dia de cultivo ($P > 0,05$). Quando comparados ao MEM⁺, após 1 dia de cultivo, o tecido cortical cultivado com 20% de SCE mostrou simultaneamente uma redução e um aumento significativos na percentagem de foliculos primordiais e em desenvolvimento, respectivamente ($P < 0,05$). Entretanto, após 7 dias, para esse mesmo parâmetro, ambos os tratamentos foram similares ($P > 0,05$).

Tabela 1. Percentagem (média \pm e. p.) de folículos primordiais e em desenvolvimento no controle (não cultivado) e após cultivo *in vitro* por 1 ou 7 dias na ausência ou presença de soro.

	Folículos primordiais		Folículos desenvolvimento	
Controle	76,4 \pm 7,4		23,6 \pm 7,4	
Tratamentos	Dia 1	Dia 7	Dia 1	Dia 7
MEM ⁺	51,2 \pm 11,5 ^A	15,9 \pm 7,5 ^{*A}	48,8 \pm 11,5 ^A	84,1 \pm 7,5 ^{*A}
SFB 10	16,7 \pm 2,8 ^{*Bab}	6,5 \pm 2,7 ^{*Aab}	83,3 \pm 2,8 ^{*Aab}	93,5 \pm 2,7 ^{*Aab}
SFB 20	25,3 \pm 10,8 ^{*Aab}	25,8 \pm 4,3 ^{*Aab}	74,7 \pm 10,8 ^{*Aab}	74,2 \pm 4,3 ^{*Aab}
SCE 10	27,2 \pm 8,8 ^{*Aab}	15,0 \pm 9,5 ^{*Aab}	72,8 \pm 8,8 ^{*Aab}	85,0 \pm 9,5 ^{*Aab}
SCE 20	10,9 \pm 3,9 ^{*Bab}	17,8 \pm 10,7 ^{*Aab}	89,1 \pm 3,9 ^{*Bab}	82,2 \pm 10,7 ^{*Aab}
SCD 10	33,2 \pm 9,7 ^{*Aab}	12,5 \pm 12,5 ^{*Aab}	66,8 \pm 9,7 ^{*Aab}	87,5 \pm 12,5 ^{*Aab}
SCD 20	34,1 \pm 9,0 ^{*Aab}	7,7 \pm 4,4 ^{*Aab}	65,9 \pm 9,0 ^{*Aab}	67,3 \pm 22,7 ^{*Aab}

* Difere do controle (P < 0,05);

A,B Difere significativamente do MEM⁺ dentro de cada dia de cultivo (P < 0,05);

a Difere significativamente entre a mesma substância em diferentes concentrações (P < 0,05);

b Difere significativamente entre a mesma concentração em diferentes substâncias (P < 0,05).

7.4 Efeito do soro sobre o diâmetro folicular

No tocante ao crescimento, a Tab. 2 mostra o diâmetro folicular no tecido ovariano fresco e cultivado por 1 ou 7 dias. Foi observado que apenas os FOPA cultivados em meio com 20% de SCE por 7 dias apresentaram diâmetro folicular significativamente superior ao controle (P < 0,05), porém equivalentes ao tratamento MEM⁺ (P > 0,05).

Tabela 2. Diâmetro folicular (média \pm e. p.) no controle (não cultivado) e após cultivo *in vitro* por 1 ou 7 dias na ausência ou presença de soro.

Diâmetro folicular (μm)		
Controle	57.1 \pm 1.8	
Tratamentos	Dia 1	Dia 7
MEM ⁺	58,55 \pm 2,0 ^A	61,4 \pm 2,5 ^A
SFB 10	52,0 \pm 2,1 ^{Bac}	57,7 \pm 2,0 ^{Aacd}
SFB 20	51,4 \pm 1,7 ^{Bacd}	50,6 \pm 2,0 ^{*Bbc}
SCE 10	60,5 \pm 1,9 ^{Aad}	59,4 \pm 2,2 ^{Aac}
SCE 20	57,7 \pm 2,8 ^{Aad}	64,8 \pm 3,3 ^{*Aad}
SCD 10	53,7 \pm 2,0 ^{Aac}	52,9 \pm 2,3 ^{Bad}
SCD 20	50,2 \pm 2,3 ^{*Bac}	58,0 \pm 2,5 ^{Aae}

* Difere do controle (P < 0,05);

A,B Difere significativamente do MEM⁺ dentro de cada dia de cultivo(P < 0,05);

a,b Difere significativamente entre a mesma substância em diferentes concentrações (P < 0,05);

c,d,e Difere significativamente entre a mesma concentração em diferentes substâncias (P<0,05).

7.5 Aspectos ultra-estruturais de FOPA caprinos cultivados *in vitro*

A análise ultra-estrutural foi realizada somente em FOPA do controle e tratamentos MEM⁺ ou MEM⁺ com 10% de SFB e 20% de SCE, os quais mostraram os melhores resultados de acordo com a análise histológica realizada previamente. Os achados ultra-estruturais demonstraram que apenas os folículos do controle mostraram estruturas normais nos dois compartimentos (oócito e células da granulosa), apresentando núcleo do oócito bem delimitado, membrana nuclear e basal intactas, presença de alguns vacúolos e organelas bem distribuídas no citoplasma (Fig. 4A). Nos tratamentos MEM⁺ ou MEM⁺ com 10% de SFB após 7 dias, os folículos apresentaram condensação da cromatina do oócito, aumento da vacuolização citoplasmática e danos na membrana nuclear e basal, porém as células da granulosa apresentaram-se ultra-estruturalmente normais (Fig. 4B). No entanto, os folículos cultivados na presença de 20% de SCE, mesmo durante a análise das secções semi-finas, mostraram-se completamente degenerados com picnose oocitária e das células da granulosa, aumento da vacuolização citoplasmática e destacamento das células da granulosa.

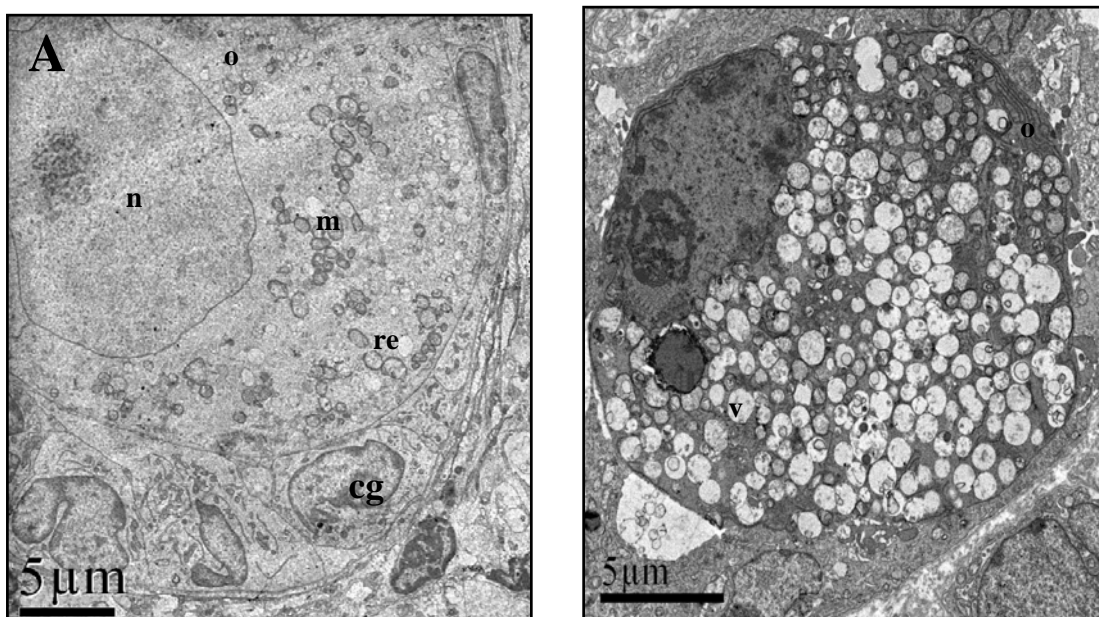


Figura 3. Fotomicrografia de um folículo (A) normal (controle não cultivado) (4000X) e (B) degenerado (cultivado por 7 dias em MEM⁺) (6000X). Observa-se que o citoplasma do folículo normal é homogêneo e possui numerosas mitocôndrias. Por outro lado, notar que o folículo cultivado apresenta extrema vacuolização citoplasmática, o que é indicativo de degeneração. n: núcleo do oócito, o: oócito, m: mitocôndria, re: retículo endoplasmático, cg: células da granulosa, v: vesículas.

7.6 Produção de nitrito durante cultivo *in vitro* de FOPA

A Fig. 3 mostra a produção de nitrito após cultivo *in vitro* de FOPA por 1 ou 7 dias na ausência ou presença de soro. Após 1 dia de cultivo, a concentração de nitrito no tratamento MEM⁺ foi significativamente superior aquelas observadas nos demais tratamentos ($P < 0,05$), exceto quando se utilizou 10% de SFB ou SCE, os quais mostraram resultados similares ao MEM⁺ ($P > 0,05$). Após 7 dias de cultivo, todos os tratamentos apresentaram concentração de nitrito significativamente inferiores ao tratamento MEM⁺ ($P < 0,05$). Quando foram comparados os meios contendo soro após 7 dias, o tratamento com 10% de SFB apresentou níveis de nitrito significativamente superiores aos outros dois tipos de soro (SCE e SCD) nessa mesma concentração ($P < 0,05$). Além disso, foi verificada uma correlação positiva após 1 ($R=0,86$; $P < 0,05$) e 7 dias ($R=0,76$; $P < 0,05$) de cultivo entre os percentuais de viabilidade folicular e a produção de nitrito.

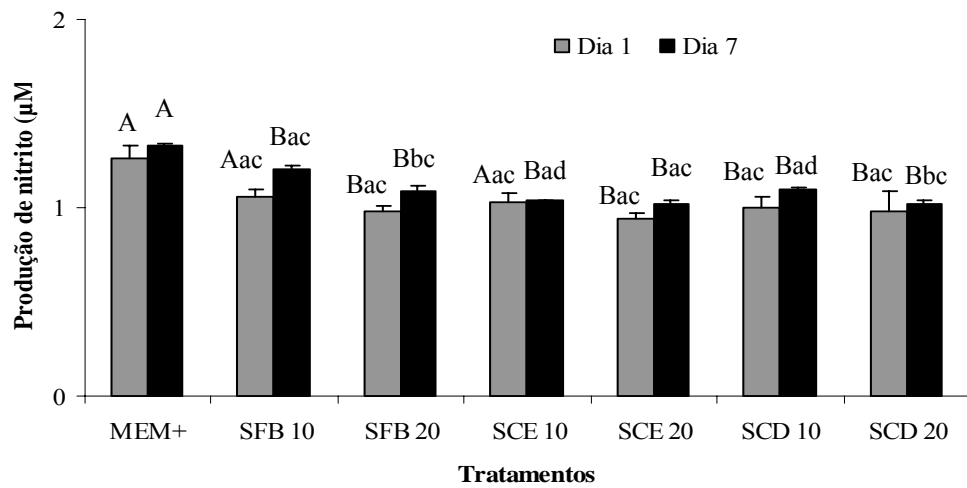


Figura 4. Mensuração da produção de nitrito (média \pm e. p.) após cultivo *in vitro* por 1 ou 7 dias na ausência ou presença de soro.

A,B Difere significativamente do MEM⁺ dentro de cada dia de cultivo ($P < 0,05$);
a,b Difere significativamente entre a mesma substância em diferentes concentrações ($P < 0,05$);
c,d Difere significativamente entre a mesma concentração em diferentes substâncias ($P < 0,05$).

8. DISCUSSÃO

Estudos têm mostrado que a adição de soro, como fonte protéica, ao meio de cultivo *in vitro* de FOPA, pode promover uma maior sobrevivência folicular (TELFER et al., 2000) e uma maior taxa de ativação (WRIGHT et al., 1999). Por outro lado, verifica-se também que a suplementação com soro compromete a integridade folicular e embrionária (THOMAS et al., 2001; MUCCI et al., 2006). No presente trabalho, soro de diferentes origens (SFB, SCE e SCD) e em duas concentrações (10 e 20%) foram utilizados no cultivo *in vitro* de FOPA caprinos por 1 ou 7 dias.

Com relação ao percentual de FOPA normais, após 1 dia de cultivo, apenas os tratamentos MEM⁺ ou MEM⁺ com SFB, em ambas as concentrações utilizadas (10 e 20%), foram capazes de manter percentagens semelhantes às observadas no controle. No entanto, após um período maior de cultivo, ou seja, 7 dias, apenas o tratamento com 10% de SFB apresentou percentagem de FOPA morfologicamente normais similar ao MEM⁺. Alguns trabalhos mostraram o efeito positivo da suplementação com soro ao meio de cultivo. Telfer et al. (2000) verificaram um aumento significativo na sobrevivência de folículos suínos após 20 dias de cultivo na presença de 10% de SFB, em relação aos folículos cultivados sem soro. Cecconi et al. (1999) obtiveram um rápido crescimento e uma alta proporção na formação de antro utilizando 10% de SFB durante o cultivo *in vitro* de FOPA de ovelhas. Esses resultados podem ser devidos aos fatores de crescimento e fatores endócrinos presentes no soro, os quais permitem manter a viabilidade e promover o crescimento de FOPA.

Neste estudo, o cultivo *in vitro* na ausência ou presença de diferentes origens de soro, em ambas as concentrações testadas aumentou significativamente o percentual de folículos ativados em relação ao controle. Além disso, quando comparado ao MEM⁺, após 1 dia de cultivo, o meio contendo 20% de SCE mostrou-se mais eficaz em promover a ativação folicular. Acredita-se que a variação, bem como a concentração dos componentes séricos, de acordo com o status fisiológico da cabra, pode influenciar o desenvolvimento de FOPA caprinos. Neste tratamento, também foi observado um aumento no diâmetro folicular. No entanto, este resultado pode não ser devido ao crescimento normal do folículo, uma vez que a adição de 20% de SCE ao meio de cultivo *in vitro* não foi capaz de manter o percentual de folículos morfologicamente normais similar ao controle. Hulshof et al. (1995) também observaram um aumento significativo do diâmetro de FOPA bovinos cultivados na presença de 17 β -estradiol, substância presente em grandes quantidades no SCE. Entretanto, este resultado foi causado pelo aumento no tamanho das células da granulosa e não devido à

proliferação dessas células. No presente estudo, FOPA cultivados na presença de SCE apresentaram grande quantidade de gotas lipídicas. O acúmulo anormal no número dessas estruturas foi observado em embriões ovinos cultivados com soro (ABE et al., 2002). Mucci et al. (2006) também mostraram que a presença dessas estruturas em embriões bovinos cultivados com soro de vaca em estro parece alterar os mecanismos celulares responsáveis pelo reparo da membrana plasmática, após a criopreservação. Apesar dos folículos cultivados em MEM⁺ ou MEM⁺ com 10% de SFB terem apresentado alterações morfológicas reveladas pela análise ultra-estrutural, estas se localizavam principalmente no oócito, indicando sinais de atresia em estágio inicial. Já os FOPA cultivados com 20% de SCE estavam mais severamente degenerados, sendo essa degeneração observada inclusive nas células da granulosa. Esses achados de degeneração podem ser devidos às concentrações inadequadas de algumas substâncias-chaves envolvidas na regulação do desenvolvimento folicular normal como, por exemplo, o Hormônio Folículo Estimulante. Recentemente, Matos et al. (2006a) demonstraram que a adição desse hormônio na concentração de 50 ng/mL ao meio de cultivo *in vitro* de FOPA caprinos é essencial para a manutenção da viabilidade e crescimento folicular por um período de 7 dias.

O nitrito é um produto resultante do metabolismo do NO durante as reações metabólicas normais, sendo possível relacionar seus níveis nas amostras aquosas com os níveis de NO produzidos (DIXIT E PARVIZI, 2001). No que se refere ao desenvolvimento folicular, o NO tem sido considerado um potencial regulador, pois está envolvido em várias funções fisiológicas no ovário, incluindo a ovulação e a esteroidogênese (MATSUMI et al., 1998; MITSUBE et al., 1999). Estudos demonstraram que a Óxido Nítrico Sintetase indutora (iNOS), uma das enzimas responsáveis pela síntese de NO, tem sido predominantemente localizada nas células da granulosa de grande parte dos folículos antrais imaturos normais, enquanto que as células da granulosa de folículos antrais maduros normais ou de folículos atrésicos são desprovidas dessa enzima (MATSUMI et al., 1998ab). Este foi o primeiro trabalho a relacionar concentrações de nitrito com a viabilidade de FOPA, através do qual se verificou uma correlação positiva entre a percentagem de FOPA morfolologicamente normais e a produção desta substância após 1 e 7 dias de cultivo. Além disso, os tratamentos que apresentaram maiores percentuais de folículos morfolologicamente normais (MEM⁺ ou MEM⁺ com 10% de SFB ou SCE) também foram os que mostraram as maiores concentrações de nitrito, indicando que as células da granulosa desses folículos estavam normais, o que foi confirmado pela análise ultra-estrutural.

9. CONCLUSÃO

Em conclusão, a suplementação do meio de cultivo com soro não melhorou significativamente as taxas de viabilidade e ativação de FOPA capinos cultivados *in vitro*. Um importante achado deste trabalho foi de que os níveis de nitrito no meio de cultivo funcionam como um bom indicador da viabilidade das células da granulosa de FOPA caprinos cultivados *in vitro*.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol Reprod Dev*, 61:57-66, 2002.
- ADASHI, E. Y. Endocrinology of the ovary. *Hum. Reprod.*, 9:815-827, 1994.
- AMORIM, C. A.; RODRIGUES, A. P. R.; LUCCI, C. M.; FIGUEIREDO, J. R.; GONÇALVES, P. B. D. Effect of sectioning on the number of isolated ovine preantral follicles. *J. Small. Rum. Res.*, 37:269-277, 2000.
- ANDRADE, E. R.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A.; OLIVEIRA, J. A.; BRACARENSE, A. P. F. R. L.; FIGUEIREDO, J. R.; TONIOLLI, R. Interactions of indole acetic acid with EGF and FSH in the culture of ovine preantral follicles. *Theriogenology*, 64:1104-1113, 2005.
- BARROS, L. F.; HERMOSILLA, T.; CASTRO, J. Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 130:401-409, 2001.
- BRAW-TAL, R.; YOSSEFI, S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *J. Reprod. Fertil.*, 109:165-171, 1997.
- BRISTOL-GOULD, S.; WOODRUFF, T. K. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology*, 2006. *in press*.
- BUKOVSKI, A.; CAUDLE, M. R.; SVETLIKOVA, M.; UPADHYAYA, N. B. Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 4:2-20, 2004.
- CARROLL, J.; WHITTINGHAN, D. G.; WOOD, M. J. Growth in vitro and acquisition of meiotic competence after the cryopreservation of isolated mouse primary ovarian follicles. *Reproduction, Fertility and Development.*, 3:593-599, 1991.
- CECCONI, S.; BARBONI, B.; COCCIA, M.; MATTIOLI, M. In vitro development of sheep preantral follicles. *Biology of Reproduction*, 60:594-601, 1999.
- CHUN, SANG-YOUNG; EISENHAUER, K. M.; KUBO, M.; HSUEH, A. J. W. Interleukin-1 β Suppresses Apoptosis in Rat Ovarian Follicles by Increasing Nitric Oxide Production. *Endocrinology*, 136:3120-3127, 1995.
- CORTVRINDT, R.; SMITZ, J. E. J. In vitro follicle growth: Achievements in mammalian species. *Reprod. Dom. Anim.*, 36:3-9, 2001.
- DEMEESTERE, I.; CENTNER, J.; GERVY, C.; ENGLERT, Y.; DELBAERE, A. Impact of various endocrine and paracrine factors on in vitro culture of preantral follicles in rodents. *Reproduction*, 130: 147-156, 2005.

- DIMMELER, S.; HAENDELER, J.; NEHLS, M.; ZEIHNER, A. M. Suppression of Apoptosis by Nitric Oxide via Inhibition of Interleukin-1 β -converting Enzyme (ICE)-like and Cysteine Protease Protein (CPP)-32-like Proteases. *J. Exp. Méd.*, 185:601–607, 1997.
- DIXIT, V. D.; PARVIZI, N. Nitric oxide and the control of reproduction. *Animal Reproduction Science*, 65:1–16, 2001.
- DRUMMOND, A. E. The role of steroids in follicular growth. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 4:1-11, 2006.
- DUNNAM, R. C.; HILL, M. J.; LAWSON, D. M.; DUNBAR, J. C. Ovarian hormone secretory response to gonadotropins and nitric oxide following chronic nitric oxide deficiency in the rat. *Biol. Reprod.*, 60:959–963, 1999
- EPPIG, J. J. Mouse oocyte development in vitro with various culture systems. *Developmental Biology*, 60:371-378, 1997.
- ERICKSON, G. F. An analysis of follicles development and ovum maturation. *Seminars in Reproductive Endocrinology*, San Diego-California, p. 233-254, 1986.
- FARBER, J. L. Membrane injury and calcium homeostasis in the pathogenesis of coagulative necrosis. *Lab. Invest.*, 47:114-123, 1982.
- FIGUEIREDO, J. R.; HULSHOF, S. C.; 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*, 5:845-858, 1995.
- FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A. Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais – MOIFOPA. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F.; *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*, São Paulo: Livraria Varela, p. 227-256, 2002.
- FORTUNE, J. E.; KITO, S.; WANDJI, S. A.; SRSEN, V. Activation of Bovine and Baboon Primordial Follicles in vitro. *Theriogenology*, 49:441-449, 1998.
- GLAMOČLIJA, V.; VILOVIĆ, K.; SARAGA-BABIĆ, M.; BARANOVIĆ, A.; SAPUNAR, D. Apoptosis and active caspase-3 expression in human granulosa cells. *Fertility and Sterility*, 83(2):426-431, 2005.
- GOSDEN, R. G. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 163:125-129, 2000.
- GREEN, L. C.; TANNENBAUM, S. R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. *Science*, 212:56-58, 1981.
- 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.*, 62: 1322-1328, 2000.

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

HIRSHFIELD, A. N. Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review of Cytology*, 124:43-101, 1991.

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

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

HUSSEIN, M. R. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Human Reproduction Update*, 11(2):162-178, 2005.

ISHIMARU R. S.; LEUNG K.; HONG L.; LAPOLT P. S. Inhibitory effects of nitric oxide on estrogen production and cAMP levels in rat granulosa cell cultures. *J. Endocrinol.*, 168:249-55, 2001

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.; IACOMINI, J.; SCADDEN, D. T.; TILLY, J. L. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell*, 122:303-315, 2004.

KATSKA, L.; RYFISKA, B. The isolation and in and early antral vitro culture of bovine preantral follicles of different size classes. *Theriogenology*, 50:213-222, 1998.

KIECHLE, F. L.; ZHANG, X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. *Clinica Chimica Acta*, 326:27-45, 2002.

KHARCHE, S. D.; GOEL, A. K.; JINDAL, S. K.; SINHA, N. K. In vitro maturation of caprine oocytes in different concentrations of estrous goat serum. *Small Ruminant Research*, 64: 186-189, 2006.

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

LUCCI, C. M.; SILVA, R. V.; CARVALHO, C. A.; FIGUEIREDO, R.; BÁO, N. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. *Small Ruminant Research*, 41:61-69, 2001.

MAO, J.; WU, G.; SMITH, M. F.; McCAULEY, T. C.; PRATHER, R. S.; DIDION, B. A.; DAY, B. N. Effects of Culture Medium, Serum Type, and Various Concentrations of Follicle-Stimulating Hormone on Porcine Preantral Follicular Development and Antrum Formation In Vitro. *Biology of Reproduction*, 67:1197-1203, 2002.

MARTINS, F. S.; VAN DEN HURK, R.; SANTOS, R. R.; MATOS, M. H. T.; CELESTINO, J. J. H.; RODRIGUES, A. P. R.; PESSOA, C.; FERREIRA, F. V. A.; FIGUEIREDO, J. R. Development of goat primordial follicles after in vitro culture of ovarian tissue in Minimal Essential Medium supplemented with coconut water. *Animal Reproduction*, 2:106-113, 2005.

MATOS, M. H. T.; ANDRADE, E. R.; LUCCI, C. M.; BÁO, S. N.; SILVA, J.R.V.; SANTOS, R. R.; FERREIRA, M. A. L.; COSTA, S. H. F.; CELESTINO, J. J. H.; FIGUEIREDO, J. R. Morphological and ultrastructural analysis of sheep primordial follicles preserved in 0,9% saline solution and TCM 199. *Theriogenology*, 62:65-80, 2004.

MATOS, M. H. T.; LIMA-VERDE, I. B.; LUQUE, M. C. A.; MAIA-JR, J. E.; SILVA, J. R. V.; CELESTINO, J. J. H.; MARTINS, F. S.; BÁO, S. N.; LUCCI, C. M.; FIGUEIREDO, J. R. Influência de diferentes concentrações de FSH sobre o desenvolvimento de folículos primordiais caprinos. In: XX REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 34, 2006, Minas Gerais. *Anais da XX Reunião Anual Da Sociedade Brasileira De Tecnologia De Embriões*. Araxá: [s.n.] 2006a. p.266.

MATOS, M. H. T.; VAN DEN HURK, R.; LIMA-VERDE, I. B.; LUQUE, M. C. A.; SANTOS, K. D. B.; MARTINS, F. S.; BÁO, S. N.; LUCCI, C. M.; FIGUEIREDO, J. R. Efeitos do Fator de Crescimento Fibroblástico – 2 sobre o cultivo in vitro de folículos pré-antrais caprinos. In: XX REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 34, 2006, Minas Gerais. *Anais da XX Reunião Anual Da Sociedade Brasileira De Tecnologia De Embriões*. Araxá: [s.n.] 2006b. p.265.

MATSUMI, H.; YANO, T.; KOJI, T.; OGURA, T.; TSUTSUMI, O.; TAKETANI, Y.; ESUMI, H. Expression and Localization of Inducible Nitric Oxide Synthase in the Rat Ovary: A Possible Involvement of Nitric Oxide in the Follicular Development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 243:67–72, 1998a.

MATSUMI, H.; KOJI, T.; YANO, T.; YANO, N.; TSUTSUMI, O.; MOMOEDA, M.; OSUGA, Y.; TAKETANI, Y. Evidence for an inverse relationship between apoptosis and inducible nitric oxide synthase expression in rat granulosa cells: a possible role of nitric oxide in ovarian follicle atresia. *Endocr.*, 45:745-751, 1998b.

MATSUMI, H.; YANO, T.; OSUGA, Y.; KUGU, K.; TANG, X.; XU, J. P.; YANO, N.; KURASHIMA, Y.; OGURA, T.; TSUTSUMI, O.; KOJI, T.; ESUMI, H.; TAKETANI, Y. Regulation of Nitric Oxide Synthase to Promote Cytostasis in Ovarian Follicular Development. *Biology of Reproduction*, 63:141–146, 2000.

MAUL, H.; LONGO, M.; SAADE, G. R.; GARFIELD, R.E. Nitric oxide and its role during pregnancy: from ovulation to delivery. *Current Pharmaceutical Design*, 9:359-380, 2003.

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. *Biology of Reproduction*, 63:267-273, 2000.

MINGOTI, G. Z.; GARCIA, J. M.; ROSA-E-SILVA, A. A. M. The effect of serum on in vitro maturation, in vitro fertilization and steroidogenesis of bovine oocytes co-cultured with granulosa cells. *Braz. J Med Biol Res Human Reproduction*, 28:213- 217, 1995.

- MITCHELL, L. M.; KENNEDY, C. R.; HARTSHORNE, G. M. Effects of varying gonadotrophin dose and timing on antrum formation and ovulation efficiency of mouse follicles in vitro. *Human Reproduction*, 17: 1181-1188, 2002.
- MITCHELL, L. M.; KENNEDY, C. R.; HARTSHORNE, G. M. Pharmacological manipulation of nitric oxide levels in mouse follicle cultures demonstrates key role of extrafollicular control of ovulation. *Human Reproduction*, 19(8):1705-1712, 2004.
- MITSUBE, K.; MIKUNI, M.; MATOUSEK, M.; BRANNSTROM, M. Effects of a nitric oxide donor and nitric oxide synthase inhibitors on luteinizing hormone-induced ovulation in the ex-vivo perfused rat ovary. *Human Reproduction*, 14 (10): 2537-2543, 1999.
- MORITA, Y.; TILLY, J. L. Oocyte apoptosis: Like sand through and hourglass. *Developmental Biology*, 213:1-17, 1999.
- MUCCI, N.; ALLER, J.; KAISER, G. G.; HOZBOR, F.; CABODEVILA, J.; ALBERIO, R. H. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology*, 65:1551-1562, 2006.
- NAYUDU, P. L.; OSBORN, S. M. Factors Influencing the Rate of Preantral and Antral Growth of Mouse Ovarian Follicles in Vitro. *J. Reprod. Fert.*, 95:349-362, 1992.
- NEWTON, H.; PICTON, H.; GOSDEN, R. G. In vitro growth of oocyte-granulosa cell complexes isolated from cryopreserved ovine tissue. *J. Reprod. Fert.*, 115:141-150, 1999.
- NUTTINCK, F.; MERMILLOD, P. M.; DESSY, F. Characterization of in vitro growth of bovine preantral ovarian follicles: a preliminary study. *Theriogenology*, 39:811-821, 1993.
- O'BRIEN, M. J.; PENDOLA, J. K.; EPPIG, J. J. A revised protocol for in vitro development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. *Biology of Reproduction*, 68:1682-1686, 2003.
- OTALA, M.; ERKKILÄ, K.; TUURI, T.; SJÖBERG, J.; SOUMALAINEN, L.; SUIKKARI, A-M.; PENTIKÄINEN, V.; DUNKEL, L. Cell death and its suppression in human ovarian tissue culture. *Hum. Reprod.*, 8:228-236, 2002.
- PINTO, C. R. F.; PACCAMONTI, D. L.; EILTS, B. E.; VENUGOPAL, C. S.; SHORT, C. R.; GENTRY, L. R.; THOMPSON, D. L. Jr.; GODKE, R. A. Concentrations of nitric oxide in equine preovulatory follicles before and after administration of human chorionic gonadotropin. *Theriogenology*, 60:819-827, 2003.
- 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.*, 89:169-180, 1990.
- ROY, S. K.; TREACY, B. J. Isolation and long-term culture of human preantral follicles. *Fertility and Sterility*, 59:783-790, 1993.

- SAHA, S.; SHIMIZU, M.; GESHI, M.; IZAIKE, Y. In vitro culture of bovine preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, 63:27–39, 2000.
- SALEHNIA, M.; MOGHADAM, E. A.; VELOJERDI, M. R. Ultrastructure of follicles after vitrification of mouse ovarian tissue. *Fert. Steril.*, 78(3):644-645, 2002.
- SANTOS, R. R.; RODRIGUES, A. P. R.; COSTA, S. H. F.; SILVA, J. R. V.; MATOS, M. H. T.; LUCCI, C. M.; BÁO, S. N.; VAN DEN HURK, R.; FIGUEIREDO, J. R. Histological and ultrastructural analysis of cryopreserved sheep preantral follicles. *Anim. Reprod. Sci.*, 91:249-263, 2006
- SAUMANDE, J. La folliculogénèse chez les ruminants. *Recherche Vétérinaire*, 167:205-218, 1991.
- SCHULZ, K.; KERBER, S.; KELM, M. Re-evaluation of the Griess method for determining NO/NO₂- in aqueous and protein-containing samples. *Nitric Oxide* 3:225–234, 1999.
- SHAW, J. M.; ORANRATNACHAI, A.; TROUNSON, A. O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*, 53:59–72, 2000.
- SILVA J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; VAN TOL, H. T. A.; ROELEN, B. A. J.; FIGUEIREDO, J. R. Expression of growth differentiation factor 9 (GDF9), bone morphogenetic protein 15 (BMP15) and BMP receptors in goat ovaries. *Molecular Reproduction and Development*, 70:11-19, 2004a.
- SILVA J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; VAN TOL, H. T. A.; ROELEN, B. A. J.; FIGUEIREDO, J. R. Gene expression and protein localization for activin-a, follistatin and activin receptors in goat ovaries. *Journal of Endocrinology.*, 183:405-415, 2004b.
- SILVA, J. R.V.; VAN DEN HURK, R.; MATOS, M. H. T. M.; SANTOS, R. R.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; FIGUEIREDO, J. R. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during in vitro culture of caprine ovarian cortical tissue. *Theriogenology*, v.61, p.1691-1704, 2004c.
- SILVA, J. R. V. Growth factors in goat ovaries and the role of activin-A in the development of early-staged follicles. *Phd Thesis*, Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine, p.142, 2005.
- SILVA, J. R.; VAN DEN HURK, R.; FIGUEIREDO, J. R. Expression of mRNA and protein localization of epidermal growth factor and its receptor in goat ovaries. *Zygote*, 14:107-117, 2006.
- SKINNER, M. K. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Human Reproduction Update*, 2005.
- TAMILMANI, G.; RAO, B. S.; VAGDEVI, R.; AMARNATH, D.; NAIK, B. R.; MUTHARAO, M.; RAO, V. H. Nuclear maturation of ovine oocytes in cultured preantral follicles. *Small Ruminant Research*, v.60, p.295-305, 2005.

- TELFER, E. E.; BINNIE, J. P.; MCCAFFERY, F. H.; CAMPBELL, B. K. In vitro development of oocytes from porcine and bovine primary follicles. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 163:117–123, 2000.
- THOMAS, F. H.; LEASK, R.; SRSEN, V.; RILEY, S. C.; SPEARS, N.; TELFER, E. E. Effect of ascorbic acid on health and morphology of bovine preantral follicles during long-term culture. *Reproduction*, 122:487–495, 2001.
- VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, 63:1717-1751, 2005.
- VIÑAS, J. L.; SOLA, A.; GENESCA, M.; ALFARO, V.; PÍ, F.; HOTTER, G. NO and NOS isoforms in the development of apoptosis in renal ischemia/reperfusion. *Free Radical Biology & Medicine*, 40:992-1003, 2006.
- WANDJI, S. A.; SRSEN, V.; VOSS, A. K.; EPPIG J. J.; FORTUNE, J. E. Initiation in vitro of growth of bovine primordial follicles. *Biol. Reprod.*, 55:942-948, 1996.
- WANDJI, S. A.; SRSEN, V., NATHANIELSZ, P. W., EPPIG, J. J., FORTUNE, J. E. Initiation of growth of baboon primordial follicles in vitro. *Human Reproduction*, 12:1993-2001, 1997.
- WRIGHT, C. S.; HOVATTA, O.; MARGARA, R.; TREW, G.; WINSTON, R. M. L.; FRANKS, S.; HARDY, K. Effects of follicle-stimulating hormone and serum substitution on the in vitro growth of human ovarian follicles. *Human Reproduction*, 14:1555–1562, 1999.
- WU, J.; NAYUDU, P. L.; KIESEL, P. S.; MICHELMANN, H. W. Luteinizing Hormone has a stage-limited effect on preantral follicle development in vitro. *Biol. Reprod.*, 63:320-327, 2000.
- WU, J.; BENJAMIN, R. E.; CARRELL, D. T. In vitro growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. *Biology of Reproduction*, 64:375-381, 2001.
- YU, Y. S.; LUO, M. J.; HAN, Z. B.; LI, W.; SUI, H. S.; TAN, J. H. Serum and follicular fluid steroid levels as related to follicular development and granulosa cells apoptosis during the estrous cycle of goats. *Small Ruminant Research*, v. 57, p.57-65, 2005.
- ZHOU, H; ZHANG, Y. Regulation of in vitro growth of preantral follicles by growth factors in goats. *Domestic Animal Endocrinology*, 28: 235-242, 2005.

11. ANEXO

ARTIGO (SUBMETIDO)

Característica histológica, ultra-estrutural e produção de nitrito de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro* na ausência ou presença de soro

(Histological and ultrastructural feature and nitrite production of caprine preantral follicles in vitro cultured in the presence or absence of serum)

Artigo submetido ao Periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia dia

09/ 11/ 06

Característica histológica, ultra-estrutural e produção de nitrito de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro* na ausência ou presença de soro

Histological and ultrastructural feature and nitrite production of caprine preantral follicles *in vitro* cultured in the presence or absence of serum

Bruno, J.B.^{1*}; Lima-Verde, I.B.¹; Martins, F.S.¹; Matos, M.H.T.¹; Lopes, C.A.P.¹; Maia-Jr., J.E.¹; Bão, S.N.²; [Nobre Junior, H.V.³](#); [Maia, F.D.³](#); Pessoa, C.³; de Moraes, M.O.³; Silva, J. R. V.¹; Figueiredo, J.R.¹; Rodrigues, A.P.R.¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária, LAMOFOPA, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

²Laboratório de Microscopia Eletrônica, Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, DF, Brasil

³Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

* Endereço para correspondência:

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

Faculdade de Veterinária

Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-Antrais

Universidade Estadual do Ceará-UECE

Av. Paranjana, 1700 – Campus do Itaperi

60740-000 Fortaleza-CE-Brasil

Tel.: 85.3101.9852; Fax: 85.3101.9840

E-mail: jamily_vet@yahoo.com.br (J.B. Bruno)

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da adição de diferentes tipos e concentrações de soro no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais (FOPA) caprinos sobre a viabilidade, desenvolvimento folicular e mensuração de nitrito. Cada par ovariano foi dividido em 29 fragmentos, sendo um destinado ao controle. Os fragmentos foram cultivados por 1 ou 7 dias em Meio Essencial Mínimo suplementado (MEM⁺) ou MEM⁺ com diferentes concentrações (10 ou 20%) de Soro Fetal Bovino (SFB), Soro de Cabra em Estro (SCE) ou Soro de Cabra em Diestro (SCD). Na análise morfológica após 7 dias, apenas o tratamento com 10% de SFB apresentou percentual de FOPA normais similar ao MEM⁺ (P > 0,05). A análise ultra-estrutural dos folículos cultivados por 7 dias com MEM⁺ ou MEM⁺ com 10% de SFB mostrou danos oocitários, porém células da granulosa normais. A análise do meio de cultivo revelou uma correlação positiva entre a viabilidade folicular e a produção de nitrito. Conclui-se que a suplementação com soro não melhorou a viabilidade e a ativação de FOPA. Além disso, os níveis de nitrito no meio de cultivo funcionam como um bom indicador da viabilidade das células da granulosa de FOPA caprinos cultivados *in vitro*.

PALAVRAS-CHAVE: Folículo pré-antral, caprino, cultivo, soro.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of the addition of different serum types and concentrations in the *in vitro* culture of caprine ovarian preantral follicles (PAF) on the viability, follicular development and nitrite measurement. Each ovarian pair was divided in 29 fragments and one was destined to the control. The fragments were cultured for 1 or 7 days in Minimal Essential Medium supplemented (MEM⁺) or MEM⁺ with different concentrations of (10 or 20%) Bovine Fetal Serum (BFS), Estrous Goat Serum (EGS) or Diestrous Goat Serum (DGS). After 7 days, the morphological analysis showed that only treatment with 10% BFS maintained the percentage of normal PAF similar to MEM⁺ (P > 0.05). The ultrastructural analysis of follicles cultured for 7 days in MEM⁺ or MEM⁺ with 10% BFS showed some oocyte damage, although the granulosa cells were normal. Analysis of culture medium revealed a positive correlation between follicular viability and nitrite production. In conclusion, supplementation with serum did not improve the viability and the activation of PAF. Furthermore, nitrite levels in culture medium works as a good indicator of granulosa cells viability from caprine PAF culture *in vitro*.

KEYWORDS: Preantral follicle, caprine, culture, serum.

Introdução

No ovário mamífero, a morfologia folicular normal é alterada uma vez que o oócito cresce e suas células circundantes se diferenciam, mantendo a funcionalidade normal do órgão para garantir a capacidade fecundante da fêmea. Por outro lado, sabe-se também que, paralelamente a esse processo, os folículos tornam-se atresícos, levando a uma perda folicular de 99,9% ao longo da vida reprodutiva do animal (Mao et al., 2002). As altas taxas de atresia observadas no ovário reduzem consideravelmente o potencial reprodutivo da fêmea mamífera. Portanto, estudos *in vitro* que permitam conhecer as substâncias e fatores envolvidos na viabilidade, ativação, crescimento e morte folicular podem, seguramente, contribuir para a maximização do potencial reprodutivo de fêmeas mamíferas.

Vários sistemas de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais (FOPA) têm sido sugeridos por diferentes pesquisadores, porém os resultados em relação à viabilidade e ao

desenvolvimento folicular são bastante variáveis, sobretudo de acordo com o meio de cultivo utilizado. Muitos trabalhos têm adicionado soro, como fonte de nutrientes, hormônios e fatores de crescimento, ao meio de cultivo de FOPA, sendo os resultados desta adição bastante controversos. Alguns autores verificaram que o soro promove efeitos benéficos durante o cultivo *in vitro* de FOPA (humanos: Wright et al., 1999; bovinos: Saha et al., 2000; suínos: Telfer et al., 2000), porém outros observaram que o soro é prejudicial tanto durante o cultivo *in vitro* de FOPA (Thomas et al., 2001) como de embriões bovinos (Mucci et al., 2006). A maioria dos estudos adiciona soro fetal bovino na concentração 10% durante o cultivo *in vitro* de FOPA (Cecconi et al., 1999; Zhou e Zhang, 2005), porém outros tipos e concentrações de soro também são utilizados (Wright et al., 1999; Mao et al., 2002). Entretanto, não se tem relato do efeito de diferentes origens e concentrações de soro sobre a viabilidade e o desenvolvimento de FOPA caprinos cultivados *in vitro*.

A avaliação da viabilidade e do desenvolvimento folicular *in vitro* tem sido demonstrada principalmente por meio da análise histológica e ultra-estrutural. Porém, uma outra ferramenta que também pode vir a ser utilizada é a detecção no meio de cultivo dos níveis de nitrito, um dos produtos do metabolismo oxidativo do óxido nítrico (NO). O NO é um mensageiro intracelular de produção endógena que previne a apoptose em vários tipos celulares, tais como células endoteliais (Dimmeler et al., 1997) e folículos ovarianos (Chun et al., 1995), podendo ser utilizado como indicativo de normalidade dessas estruturas. Até o presente momento não foram mensurados os níveis de nitrito no meio de cultivo de FOPA, nem foi feita uma correlação entre sua produção e a viabilidade folicular. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da adição de diferentes tipos e concentrações de soro no cultivo *in vitro* de FOPA caprinos sobre a viabilidade, o desenvolvimento folicular e a mensuração de nitrito.

Material e Métodos

Neste estudo, foram utilizados oito ovários de quatro cabras adultas, sem raça definida, provenientes de abatedouros locais. Imediatamente após o abate, os ovários foram lavados em álcool 70% e, em seguida, em solução salina 0,9%. O par ovariano de cada animal foi transportado dentro de aproximadamente 1 h ao laboratório em solução salina 0,9% à temperatura de aproximadamente 33°C.

O meio de base utilizado foi o Meio Essencial Mínimo (MEM) (Cultilab, Rio de Janeiro, Brasil) suplementado com ITS (1,0 g/L de insulina, 0,67 mg/L de selênio e 0,55 g/L de transferrina) (Gibco, New York, USA), 100 µg/mL de penicilina e estreptomicina (Vetec,

Rio de Janeiro, Brasil), 0,25 µg/mL de anfotericina B, 0,23 mM de piruvato, 2 mM de glutamina e 2 mM de hipoxantina. O MEM adicionado destes suplementos e sem adição de soro foi denominado de MEM⁺. Com exceção das substâncias mencionadas, todas as outras foram adquiridas da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA).

Para o cultivo *in vitro*, foram utilizados Soro Fetal Bovino (SFB) (Nutricell, Campinas, Brasil), Soro de Cabra em Estro (SCE) e Soro de Cabra em Diestro (SCD). O soro de cabras da raça Saanen, em idade reprodutiva, foi obtido a partir da colheita de sangue diretamente da veia jugular desses animais no 1º e 10º dias do ciclo estral, correspondendo ao SCE e SCD, respectivamente.

Para a obtenção do soro, o sangue coletado foi imediatamente centrifugado a 3000 rpm durante 15 min e filtrado através de filtros 0,22 µm. Em seguida, o soro foi inativado em banho-maria a 56°C por 30 min, dividido em alíquotas de 1 mL e estocado em freezer a –20°C até o momento de sua utilização.

No laboratório, foram retirados os tecidos circundantes e ligamentos de cada par ovariano. Posteriormente, cada ovário foi cortado ao meio e a medula, os folículos antrais e os corpos lúteos, quando presentes, foram removidos. De cada par ovariano, foi retirado um pequeno fragmento de 9 mm³ e outro de 1 mm³ para análise histológica e ultra-estrutural, respectivamente, os quais foram imediatamente fixados, constituindo o controle (fragmentos frescos ou não cultivados). Em seguida, o córtex de cada par ovariano foi dividido em 28 fragmentos de aproximadamente 9 mm³, sendo 2 fragmentos por tratamento, e distribuídos aleatoriamente em diferentes meios de cultivo na ausência ou presença de diferentes origens e concentrações de soro, correspondendo aos seguintes tratamentos: MEM⁺ e MEM⁺ suplementado com SFB, SCE e SCD, nas concentrações de 10 ou 20%. Cada fragmento ovariano foi cultivado individualmente por 1 ou 7 dias em placas de 24 poços, contendo 1 mL de meio de cultivo por poço. O cultivo folicular foi realizado em estufa calibrada a 39°C na presença de ar a 5% de CO₂. A cada dois dias, o meio de cultivo foi substituído por meio fresco.

A fim de avaliar a morfologia dos FOPA caprinos, os fragmentos de tecido ovariano não cultivados, bem como aqueles cultivados por 1 ou 7 dias foram fixados em 10% de formol por 12 h. Após a fixação, os fragmentos ovarianos foram desidratados, diafanizados, incluídos em blocos de parafina e seccionados seriadamente à espessura de 7 µm. Cada 5ª secção foi montada em lâmina e corada pelo método do ácido periódico de Schiff (PAS)-hematoxilina (PAS staining system, Sigma, Inc., St. Louis, MO, USA). Todas as secções foram examinadas utilizando um microscópio ótico (100X e 400X) (Zeiss, Germany).

Foram avaliados 30 FOPA por tratamento, em cada período de cultivo e em cada repetição. De acordo com o estágio de desenvolvimento folicular, os FOPA foram classificados como *primordiais* (oócito circundado por células da pré-granulosa de forma pavimentosa) e *em desenvolvimento* (oócito circundado por uma camada de células da pré-granulosa de forma pavimentosa e pelo menos uma célula da granulosa de formato cúbico). A qualidade folicular foi avaliada baseada em parâmetros morfológicos como a integridade do oócito e das células da granulosa. Os FOPA foram classificados ainda como morfolologicamente normais (foliculos contendo oócito e células da granulosa intactos) ou foliculos degenerados (foliculos apresentando oócito com núcleo picnótico ou retração oocitária, acompanhados ou não por destacamento das células da granulosa da membrana basal). A proporção de foliculos primordiais e em desenvolvimento foi calculada no dia 0 (controle) e após 1 e 7 dias de cultivo, nos diferentes tratamentos testados. O diâmetro folicular foi mensurado com auxílio de uma ocular micrométrica.

Após 1 e 7 dias, 100 µL de meio de cultivo oriundo de cada tratamento foram coletados e armazenados em placas de 96 poços a - 20°C para posterior mensuração dos níveis de nitrito. A concentração de nitrito foi determinada segundo o método de Green et al (1981), que se baseia em revelar a presença de nitrito em uma amostra (urina, plasma, homogenato tecidual e sobrenadante celular) por uma reação de diazotização que forma um cromóforo de cor rósea, com pico de absorvância de 560 nm. Para esta experiência 100 µL do reativo de Griess (sulfanilamida a 1%/ cloridrato de N-(1-naftil)-etilenediamina 0.1% / H₃PO₄ em 1% / água destilada, na proporção de 1:1:1:1) foi adicionado a 100 µL do meio de cultivo e incubado à temperatura ambiente por 10 min. A curva padrão foi elaborada com várias concentrações de NaNO₂ (variando de 0,75 a 100 µM) sob as mesmas condições. Os brancos (controle negativo) foram preparados pela adição de 100 µL do reativo de Griess a 100 µL do meio de base e a absorvância foi medida em leitor de microplacas em 560 nm.

A análise ultra-estrutural, por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET), foi realizada em FOPA oriundos do controle e naqueles considerados morfolologicamente normais provenientes dos diferentes tratamentos testados. Para isto, os pequenos fragmentos de tecido ovariano foram fixados em uma solução contendo 2% de paraformaldeído e 2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio (pH 7,2). Após a fixação, os fragmentos foram pós-fixados em 1% de tetróxido de ósmio, 0,8% de ferricianeto de potássio e 5 mM de CaCl₂ em tampão cacodilato de sódio. Em seguida, as amostras foram desidratadas em acetona e embebidas em resina Spurr. Os cortes ultra-finos (80 nm) foram preparados quando o núcleo

do oócito foi observado no corte semi-fino (3 μm). Os cortes semi-finos foram corados com azul de toluidina enquanto os cortes ultra-finos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados em Microscópio Eletrônico de Transmissão (Jeol JEM- 1011, Tokyo, Japan). Na avaliação ultra-estrutural foram observados parâmetros tais como, a integridade das organelas citoplasmáticas do oócito e das células da granulosa, o grau de vacuolização citoplasmática, bem como a integridade da membrana basal.

As percentagens de folículos normais, primordiais e em desenvolvimento no controle e após cada período de cultivo nos vários tratamentos foram submetidas à transformação angular (arco-seno) e posterior análise de variância (ANOVA), sendo as médias comparadas pelo teste PLSD de Fisher. Os diâmetros foliculares no tecido não cultivado e cultivado não apresentaram homocedasticidade e foram analisados através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Os dados referentes à produção de nitrito nos diferentes tratamentos experimentais foram submetidos à ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey. Os resultados foram expressos como média \pm e.p., sendo os valores considerados significativamente diferentes quando $P < 0,05$.

Resultados

Os FOPA caprinos presentes no tecido ovariano foram considerados morfolologicamente normais quando o oócito apresentava-se esférico ou ligeiramente alongado, núcleo sem evidência de picnose e células da granulosa bem organizadas circundando o oócito. Já os FOPA degenerados apresentavam-se com retração citoplasmática, núcleo do oócito picnótico ou células da granulosa desorganizadas em torno do oócito (Fig. 1).

No presente trabalho foram analisados 120 folículos por tratamento perfazendo um total de 1.800 folículos. A Fig. 2 mostra o percentual de FOPA morfolologicamente normais no controle, bem como após cultivo *in vitro* por 1 ou 7 dias. Em todos os tratamentos após 1 ou 7 dias de cultivo *in vitro* foi verificada uma redução significativa ($P < 0,05$) nos percentuais de FOPA normais em relação ao controle, exceto quando se utilizou MEM⁺ sozinho ou com a adição de 10 ou 20% de SFB por 1 dia. Quando comparado ao MEM⁺, foi verificada uma redução significativa ($P < 0,05$) em todos os tratamentos, exceto após 1 dia de cultivo quando o MEM⁺ foi suplementado com 10 ou 20% de SFB ou 10% SCE, e após 7 dias quando foi adicionado 10% de SFB. No que se refere às comparações entre os tratamentos cujos meios foram suplementados com soro, o aumento da concentração de 10 para 20% do SCE, bem como do SFB, após 1 ou 7 dias respectivamente, levou a um aumento significativo ($P < 0,05$) no percentual de FOPA morfolologicamente normais.

A Tab. 1 mostra a porcentagem de folículos primordiais e em desenvolvimento no tecido cortical ovariano antes e após 1 e 7 dias de cultivo. A porcentagem de folículos primordiais e em desenvolvimento no controle foi de 76,4% e 23,6%, respectivamente. Após 1 e 7 dias de cultivo, em todos os tratamentos testados observou-se uma redução e um aumento significativos no percentual de folículos primordiais e em desenvolvimento, respectivamente, quando comparado ao controle (não-cultivado) ($P < 0,05$), exceto no tratamento MEM⁺ após 1 dias de cultivo ($P > 0,05$). Quando comparado ao MEM⁺, após 1 dia de cultivo, o tecido cortical cultivado com 20% de SCE mostrou simultaneamente uma redução e um aumento significativos na porcentagem de folículos primordiais e em desenvolvimento, respectivamente ($P < 0,05$). Entretanto, após 7 dias, para esse mesmo parâmetro, ambos os tratamentos foram similares ($P > 0,05$).

No tocante ao crescimento, a Tab. 2 mostra o diâmetro folicular no tecido ovariano fresco e cultivado por 1 ou 7 dias. Foi observado que apenas os FOPA cultivados em meio com 20% de SCE por 7 dias apresentaram diâmetro folicular significativamente superior ao controle ($P < 0,05$), porém semelhante ao cultivo com MEM⁺ ($P > 0,05$).

A Fig. 3 mostra a produção de nitrito após cultivo *in vitro* de FOPA por 1 ou 7 dias na ausência ou presença de soro. Após 1 dia de cultivo, a concentração de nitrito no tratamento MEM⁺ foi significativamente superior em relação aos demais tratamentos ($P < 0,05$), exceto quando se utilizou 10% de SFB ou SCE, os quais mostraram resultados similares ao MEM⁺ ($P < 0,05$). Após 7 dias de cultivo, todos os tratamentos apresentaram concentração de nitrito significativamente inferiores ao tratamento MEM⁺ ($P < 0,05$). Quando foram comparados os meios contendo soro, o tratamento com 10% de SFB apresentou níveis de nitrito significativamente superiores aos outros dois tipos de soro (SCE e SCD) nessa mesma concentração ($P < 0,05$). Além disso, foi verificada uma correlação positiva após 1 ($R=0,86$; $P < 0,05$) e 7 dias ($R=0,76$; $P < 0,05$) de cultivo entre os percentuais de viabilidade folicular e a produção de nitrito.

A análise ultra-estrutural foi realizada somente em FOPA do controle e nos tratamentos MEM⁺ ou MEM⁺ com 10% de SFB e 20% de SCE, os quais mostraram os melhores resultados de acordo com a análise histológica realizada previamente. Os achados ultra-estruturais demonstraram que apenas os folículos do controle mostraram estruturas normais nos dois compartimentos (oócito e células da granulosa), apresentando núcleo do oócito bem delimitado, membrana nuclear e basal intactas, presença de alguns vacúolos e organelas bem distribuídas no citoplasma (Fig. 4A). Nos tratamentos MEM⁺ ou MEM⁺ com 10% de SFB após 7 dias, os folículos apresentaram condensação da cromatina do oócito,

aumento da vacuolização citoplasmática e danos na membrana nuclear e basal, porém as células da granulosa apresentaram-se ultra-estruturalmente normais (Fig. 4B). No entanto, os folículos cultivados na presença de 20% de SCE, mesmo durante a análise das secções semi-finas, mostraram-se completamente degenerados com picnose oocitária e das células da granulosa, aumento da vacuolização citoplasmática e destacamento das células da granulosa.

Discussão

Estudos têm mostrado que a adição de soro, como fonte protéica, ao meio de cultivo *in vitro* de FOPA, pode promover uma maior sobrevivência folicular (Telfer et al., 2000) e uma maior taxa de ativação (Wright et al., 1999). Por outro lado, verifica-se também que a suplementação com soro compromete a integridade folicular e embrionária (Thomas et al., 2001; Mucci et al., 2006). No presente trabalho, diferentes origens (SFB, SCE e SCD) em duas concentrações (10 e 20%) de soro foram utilizadas no cultivo *in vitro* de FOPA caprinos por 1 ou 7 dias.

Com relação ao percentual de FOPA normais, após 1 dia de cultivo, apenas os tratamentos MEM⁺ ou MEM⁺ com SFB, em ambas as concentrações utilizadas (10 e 20%), foram capazes de manter percentagens semelhantes às observadas no controle. No entanto, após um período maior de cultivo, ou seja, 7 dias, apenas o tratamento com 10% de SFB apresentou percentagem de FOPA morfolologicamente normais similar ao MEM⁺. Alguns trabalhos mostraram o efeito positivo da suplementação com soro ao meio de cultivo. Telfer et al (2000), por exemplo, verificaram um aumento significativo na sobrevivência de folículos suínos após 20 dias de cultivo na presença de 10% de SFB, em relação aos folículos cultivados sem soro. Cecconi et al (1999) obtiveram um rápido crescimento e uma alta proporção na formação de antro utilizando 10% de SFB durante o cultivo *in vitro* de FOPA de ovelhas. Esses resultados podem ser devido aos fatores de crescimento e fatores endócrinos presentes no soro, os quais permitem manter a viabilidade e promover o crescimento de FOPA.

Neste estudo, o cultivo *in vitro* na ausência ou presença de diferentes origens de soro em ambas as concentrações testadas, aumentou significativamente o percentual de folículos ativados em relação ao controle. Além disso, quando comparado ao MEM⁺, após 1 dia de cultivo, o meio contendo 20% de SCE mostrou-se mais eficaz em promover a ativação folicular. Acredita-se que a variação, bem como a concentração dos componentes séricos, de acordo com o status fisiológico da cabra, pode influenciar o desenvolvimento de FOPA caprinos. Neste tratamento, também foi observado um aumento no diâmetro folicular. No

entanto, este resultado pode não ser devido ao crescimento normal do folículo, uma vez que a adição de 20% de SCE ao meio de cultivo *in vitro* não foi capaz de manter o percentual de folículos morfologicamente normais similar ao controle. Hulshof et al (1995) também observaram um aumento significativo do diâmetro de FOPA bovinos cultivados na presença de 17 β -estradiol, substância presente em grandes quantidades no SCE. Entretanto, este resultado foi causado pelo aumento no tamanho das células da granulosa e não devido à proliferação dessas células. No presente estudo, FOPA cultivados na presença de SCE apresentaram grande quantidade de gotas lipídicas. O acúmulo anormal no número dessas estruturas foi observado em embriões ovinos cultivados com soro (Abe et al., 2002). Mucci et al (2006) também mostraram que a presença dessas estruturas em embriões bovinos cultivados com soro de vaca em estro parece alterar os mecanismos celulares responsáveis pelo reparo da membrana plasmática, após a criopreservação. Apesar dos folículos cultivados em MEM⁺ ou MEM⁺ com 10% de SFB terem apresentado alterações morfológicas reveladas pela análise ultra-estrutural, estas se localizavam principalmente no oócito, indicando sinais de atresia em estágio inicial. Já os FOPA cultivados com 20% de SCE estavam mais severamente degenerados, sendo essa degeneração observada inclusive nas células da granulosa. Esses achados de degeneração podem ser devido às concentrações inadequadas de algumas substâncias-chaves envolvidas na regulação do desenvolvimento folicular normal, como por exemplo, o Hormônio Folículo Estimulante. Recentemente, Matos et al (2006) demonstraram que a adição desse hormônio na concentração de 50 ng/mL ao meio de cultivo *in vitro* de FOPA caprinos é essencial para a manutenção da viabilidade e crescimento folicular por um período de 7 dias.

O nitrito é um produto resultante do metabolismo do NO durante as reações metabólicas normais, sendo possível relacionar seus níveis nas amostras aquosas com os níveis de NO produzidos (Dixit e Parvizi, 2001). No que se refere ao desenvolvimento folicular, o NO tem sido considerado um potencial regulador, pois está envolvido em várias funções fisiológicas no ovário, incluindo a ovulação e a esteroidogênese (Matsumi et al., 1998; Mitsube et al., 1999). Estudos demonstraram que a Óxido Nítrico Sintetase indutora (iNOS), uma das enzimas responsáveis pela síntese de NO, tem sido predominantemente localizada nas células da granulosa de grande parte dos folículos antrais imaturos normais, enquanto que as células da granulosa de folículos antrais maduros normais ou de folículos atresícos são desprovidas dessa enzima (Matsumi et al., 1998a,b). Este foi o primeiro trabalho a relacionar concentrações de nitrito com a viabilidade de FOPA, onde se verificou uma correlação positiva entre a percentagem de FOPA morfologicamente normais e a produção

desta substância após 1 e 7 dias de cultivo. Além disso, os tratamentos que apresentaram maiores percentuais de folículos morfologicamente normais (MEM⁺ ou MEM⁺ com 10% de SFB ou SCE) também foram os que mostraram as maiores concentrações de nitrito, indicando que as células da granulosa desses folículos estavam normais, o que foi confirmado pela análise ultra-estrutural.

Em conclusão, a suplementação do meio de cultivo com soro não melhorou significativamente as taxas de viabilidade e ativação de FOPA caprinos cultivados *in vitro*. Um importante achado deste trabalho foi de que os níveis de nitrito no meio de cultivo funcionam como um bom indicador da viabilidade das células da granulosa de FOPA caprinos cultivados *in vitro*.

Referências Bibliográficas

- ABE, H.; YAMASHITA, S.; SATOH, T.; HOSHI, H. Accumulation of lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Mol. Reproduction Dev.*, v.61, p.57-66, 2002.
- CECCONI, S.; BARBONI, B.; COCCIA, M.; MATTIOLI, M. In Vitro Development of Sheep Preantral Follicles. *Biology of Reproduction*, v.60, p.594–601, 1999.
- CHUN, SANG-YOUNG; EISENHAUER, K. M.; KUBO, M.; HSUEH, A.J.W. Interleukin-1 β Suppresses Apoptosis in Rat Ovarian Follicles by Increasing Nitric Oxide Production. *Endocrinology*, v.136, p.3120–3127, 1995.
- DIMMELER, S.; HAENDELER, J.; NEHLS, M.; ZEIHNER, A. M. Suppression of Apoptosis by Nitric Oxide via Inhibition of Interleukin-1 β -converting Enzyme (ICE)-like and Cysteine Protease Protein (CPP)-32-like Proteases. *J. Exp. Méd.*, v.185, p.601–607, 1997.
- DIXIT, V.D.; PARVIZI, N. Nitric oxide and the control of reproduction. *Animal Reproduction Science*, v.65, p.1–16, 2001.
- GREEN, L.C.; TANNENBAUM, S.R.; GOLDMAN, P. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. *Science*, v.212, p.56-58, 1981.
- HULSHOF, S.C.J.; FIGUEIREDO, J.R.; BECKERS, J.F.; BEVERS, M.M.; DONK, J.A.V.D.; HURK, R.V.D. Effects of fetal bovine serum, FSH and 17 β -estradiol on the culture of bovine preantral follicles. *Theriogenology*, v.44, p.217-226, 1995.
- MATOS, M.H.T.; LIMA-VERDE, I.B.; LUQUE, M.C.A.; MAIA-JR, J.E.; SILVA, J.R.V.; CELESTINO, J.J.H.; MARTINS, F.S.; BÁO, S.N.; LUCCI, C.M.; FIGUEIREDO, J.R. Influência de diferentes concentrações de FSH sobre o desenvolvimento de folículos primordiais caprinos. In: XX REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE

TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 34., 2006, Minas Gerais. *Anais da XX Reunião Anual Da Sociedade Brasileira De Tecnologia De Embriões*. Araxá: [s.n.] 2006. p.266. (Resumo)

MAO, J.; WU, G.; SMITH, M. F.; McCAULEY, T. C.; PRATHER, R. S.; DIDION, B. A.; DAY, B. N. Effects of Culture Medium, Serum Type, and Various Concentrations of Follicle-Stimulating Hormone on Porcine Preantral Follicular Development and Antrum Formation In Vitro. *Biology of Reproduction*, v.67, p.1197–1203, 2002.

MATSUMI, H.; YANO, T.; KOJI, T.; OGURA, T.; TSUTSUMI, O.; TAKETANI, Y.; ESUMI, H. Expression and Localization of Inducible Nitric Oxide Synthase in the Rat Ovary: A Possible Involvement of Nitric Oxide in the Follicular Development. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.243, p.67–72, 1998a.

MATSUMI, H.; KOJI, T.; YANO, T.; YANO, N.; TSUTSUMI, O.; MOMOEDA, M.; OSUGA, Y.; TAKETANI, Y.; Evidence for an inverse relationship between apoptosis and inducible nitric oxide synthase expression in rat granulosa cells: a possible role of nitric oxide in ovarian follicle atresia. *Endocr.*, v.45, p. 745-751, 1998b.

MITSUBE, K.; MIKUNI, M.; BRANNSTROM, M. Effects of a nitric oxide donor and nitric oxide synthase inhibitors on luteinizing hormone-induced ovulation in the ex-vivo perfused rat ovary. *Human Reproduction*, v.14, p.2537–2543, 1999.

MUCCI, N.; ALLER, J.; KAISER, G.G.; HOZBOR, F.; CABODEVILA, J.; ALBERIO, R.H.; Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. *Theriogenology*, v.65, p.1551–1562, 2006.

SAHA, S.; SHIMIZU, M.; GESHI, M.; IZAIKE, Y. In vitro culture of bovine preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, v. 63, p.27–39, 2000.

TELFER, E.E.; BINNIE, J.P.; MCCAFFERY, F.H.; CAMPBELL, B.K. In vitro development of oocytes from porcine and bovine primary follicles. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.163, p.117–123, 2000.

THOMAS, F. H.; LEASK, R.; SRSEN, V.; RILEY, S. C.; SPEARS, N.; TELFER, E.E. Effect of ascorbic acid on health and morphology of bovine preantral follicles during long-term culture. *Reproduction*, v. 122, p.487–495, 2001.

WRIGHT, C.S.; HOVATTA, O.; MARGARA, R.; TREW, G.; WINSTON, R.M.L.; FRANKS, S.; HARDY, K. Effects of follicle-stimulating hormone and serum substitution on the in-vitro growth of human ovarian follicles. *Human Reproduction*, v.14, p.1555–1562, 1999.

ZHOU, H.; ZHANG, Y. Regulation of *in vitro* growth of preantral follicles by growth factors in goats. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 28, p.235–242, 2005.

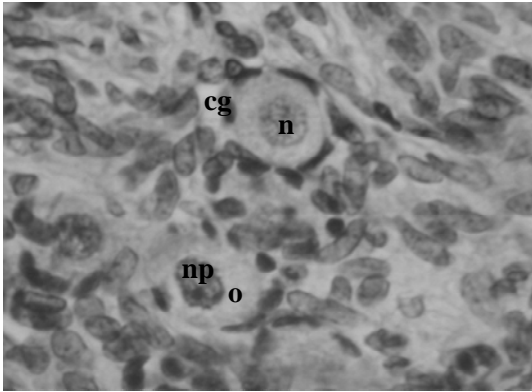


Figura 1. Secção histológica de tecido ovariano cultivado por 7 dias em 10% SFB mostrando um folículo normal e um degenerado. Notar a intensa picnose nuclear no folículo degenerado. n: núcleo do oócito normal, np: núcleo do oócito picnótico, o: oócito, cg: células da granulosa (400X).

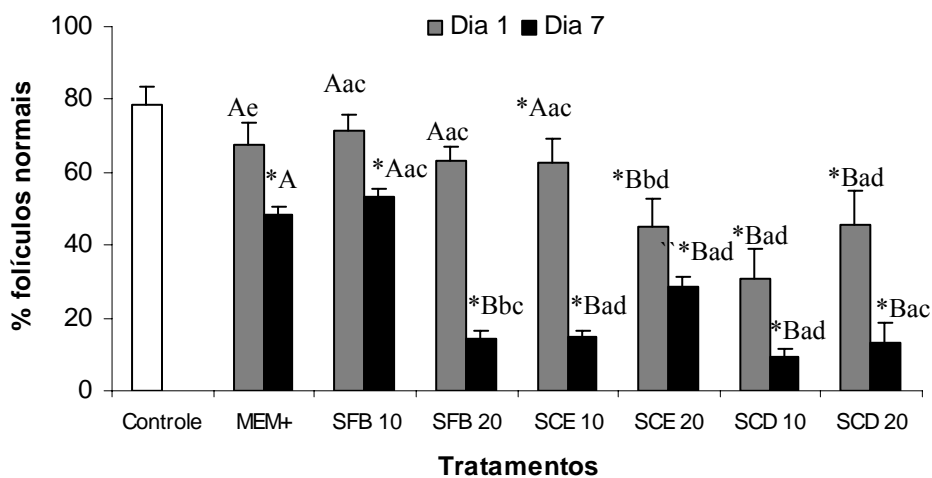


Figura 2. Percentagem (média \pm e. p.) de folículos pré-antrais morfologicamente normais no controle (não cultivado) e após cultivo *in vitro* por 1 ou 7 dias na ausência ou presença de soro.

* Difere do controle ($P < 0,05$);

A,B Difere significativamente do MEM⁺ dentro de cada dia de cultivo ($P < 0,05$);

a,b Difere significativamente entre a mesma substância em diferentes concentrações ($P < 0,05$);

c,d Difere significativamente entre diferentes substâncias na mesma concentração ($P < 0,05$).

Tabela 1. Percentagem (média \pm e. p.) de folículos primordiais e em desenvolvimento no controle (não cultivado) e após cultivo *in vitro* por 1 ou 7 dias na ausência ou presença de soro.

	Folículos primordiais		Folículos desenvolvimento	
Controle	76.4 \pm 7.4		23.6 \pm 7.4	
Tratamentos	Dia 1	Dia 7	Dia 1	Dia 7
MEM ⁺	51.2 \pm 11.5 ^A	15.9 \pm 7.5 ^{*A}	48.8 \pm 11.5 ^A	84.1 \pm 7.5 ^{*A}
SFB 10	16.7 \pm 2.8 ^{*Bab}	6.5 \pm 2.7 ^{*Aab}	83.3 \pm 2.8 ^{*Aab}	93.5 \pm 2.7 ^{*Aab}
SFB 20	25.3 \pm 10.8 ^{*Aab}	25.8 \pm 4.3 ^{*Aab}	74.7 \pm 10.8 ^{*Aab}	74.2 \pm 4.3 ^{*Aab}
SCE 10	27.2 \pm 8.8 ^{*Aab}	15.0 \pm 9.5 ^{*Aab}	72.8 \pm 8.8 ^{*Aab}	85.0 \pm 9.5 ^{*Aab}
SCE 20	10.9 \pm 3.9 ^{*Bab}	17.8 \pm 10.7 ^{*Aab}	89.1 \pm 3.9 ^{*Bab}	82.2 \pm 10.7 ^{*Aab}
SCD 10	33.2 \pm 9.7 ^{*Aab}	12.5 \pm 12.5 ^{*Aab}	66.8 \pm 9.7 ^{*Aab}	87.5 \pm 12.5 ^{*Aab}
SCD 20	34.1 \pm 9.0 ^{*Aab}	7.7 \pm 4.4 ^{*Aab}	65.9 \pm 9.0 ^{*Aab}	67.3 \pm 22.7 ^{*Aab}

* Difere do controle (P < 0,05);

A,B Difere significativamente do MEM⁺ dentro de cada dia de cultivo (P < 0,05);

a Difere significativamente entre a mesma substância em diferentes concentrações (P < 0,05);

b Difere significativamente entre diferentes substâncias na mesma concentração (P < 0,05).

Tabela 2. Diâmetro folicular (média ± e. p.) no controle (não cultivado) e após cultivo *in vitro* por 1 ou 7 dias na ausência ou presença de soro.

Diâmetro folicular (µm)		
Controle	57.1 ± 1.8	
Tratamentos	Dia 1	Dia 7
MEM ⁺	58.55 ± 2.0 ^A	61.4 ± 2.5 ^A
SFB 10	52.0 ± 2.1 ^{Bac}	57.7 ± 2.0 ^{Aacd}
SFB 20	51.4 ± 1.7 ^{Bacd}	50.6 ± 2.0 ^{*Bbc}
SCE 10	60.5 ± 1.9 ^{Aad}	59.4 ± 2.2 ^{Aac}
SCE 20	57.7 ± 2.8 ^{Aad}	64.8 ± 3.3 ^{*Aad}
SCD 10	53.7 ± 2.0 ^{Aac}	52.9 ± 2.3 ^{Bad}
SCD 20	50.2 ± 2.3 ^{*Bac}	58.0 ± 2.5 ^{Aae}

* Difere do controle (P < 0,05);

A,B Difere significativamente do MEM⁺ dentro de cada dia de cultivo(P < 0,05);

a,b Difere significativamente entre a mesma substância em diferentes concentrações (P < 0,05);

c,d,e Difere significativamente entre diferentes substâncias na mesma concentração (P < 0,05).

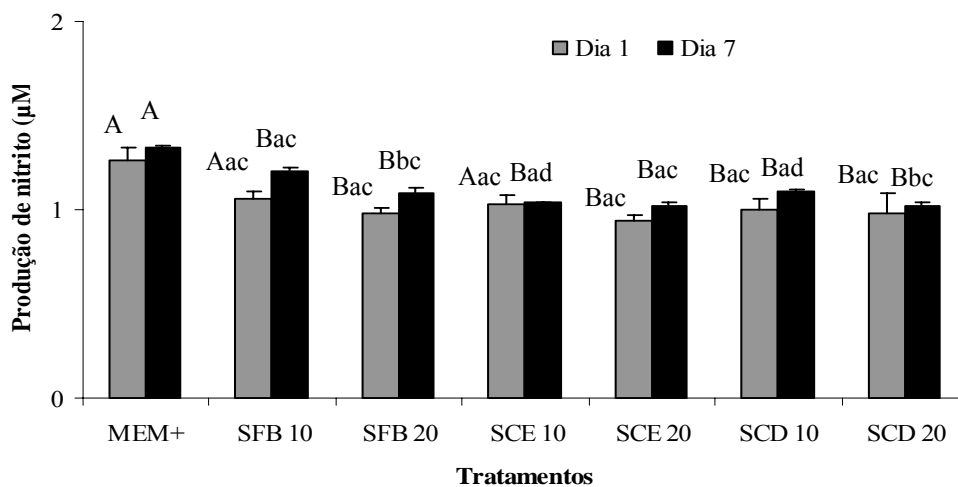


Figura 3. Mensuração da produção de nitrito (média ± e. p.) após cultivo *in vitro* por 1 ou 7 dias na ausência ou presença de soro.

A,B Difere significativamente do MEM⁺ dentro de cada dia de cultivo(P < 0,05);

a,b Difere significativamente entre a mesma substância em diferentes concentrações (P < 0,05);

c,d Difere significativamente entre diferentes substâncias na mesma concentração (P < 0,05).

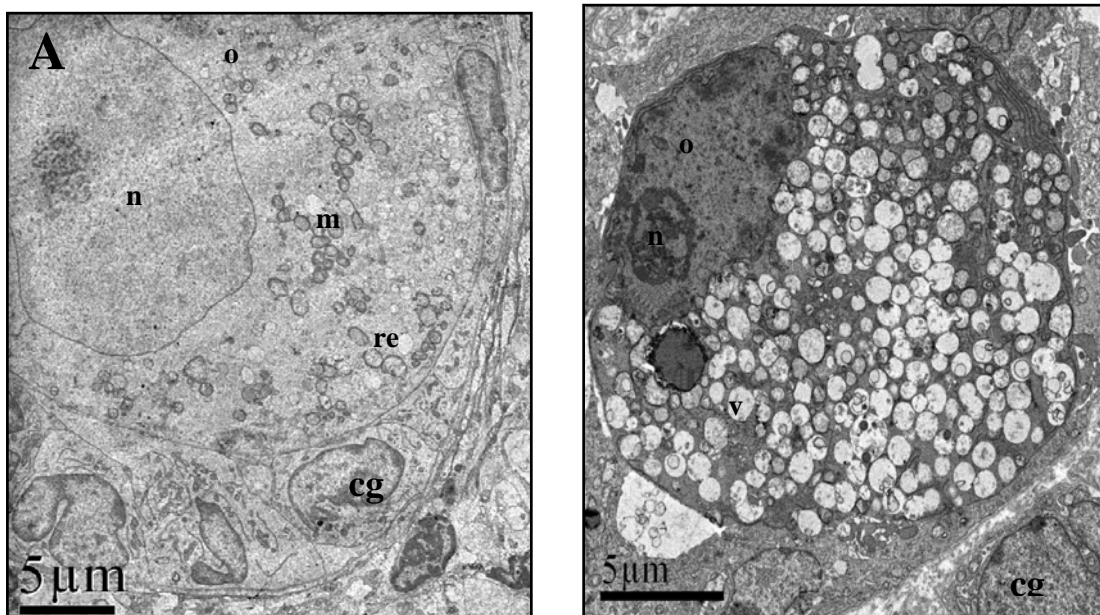


Figura 4. Fotomicrografia de um folículo (A) normal (controle não cultivado) (4000X) e (B) degenerado (cultivado por 7 dias em MEM⁺) (6000X). O citoplasma do folículo normal é homogêneo e possui numerosas mitocôndrias. Por outro lado, notar que o folículo cultivado apresenta extrema vacuolização citoplasmática, o que é indicativo de degeneração. n: núcleo do oócito, o: oócito, m: mitocôndria, re: retículo endoplasmático, cg: células da granulosa, v: vesículas.