

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

GIOVANNA QUINTINO RODRIGUES

EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FSH RECOMBINANTE  
SOBRE O DESENVOLVIMENTO IN VITRO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS  
CAPRINOS E OVINOS ISOLADOS

FORTALEZA  
2009

GIOVANNA QUINTINO RODRIGUES

EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FSH RECOMBINANTE  
SOBRE O DESENVOLVIMENTO IN VITRO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS  
CAPRINOS E OVINOS ISOLADOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

**Área de Concentração:** Reprodução e Sanidade Animal.

**Linha de Pesquisa:** Reprodução e Sanidade de pequenos ruminantes

**Orientador:** Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo

FORTALEZA-CE  
2009

GIOVANNA QUINTINO RODRIGUES

EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FSH RECOMBINANTE SOBRE O DESENVOLVIMENTO IN VITRO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS E OVINOS ISOLADOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: 31/07/ 2009  
Nota: 9,2

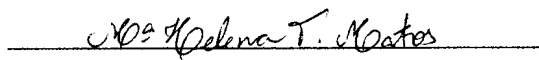
BANCA EXAMINADORA

---

***Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo (Presidente da banca /Orientador)***

Universidade Estadual do Ceará (UECE)

---



Profa. Dra. Maria Helena Tavares de Matos  
Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF)

---

Prof. Dr. Cláudio Cabral Campello  
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

*Aos meus pais, Maria de Lourdes Pinheiro Quintino Rodrigues e Antonio Airton Rodrigues, por  
me ensinarem que a luta diária faz parte da vida e que a conquista e o sucesso são só uma  
consequência disso*

*Dedico*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, Pai de eterna bondade e misericórdia, pelo dom da vida e por tudo o que tenho, por tudo que me dá e por tudo que me nega e que, como se eu não fosse tão pequena me abençoa e me agracia todos os dias da minha vida.

À Universidade Estadual do Ceará (UECE) e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) pela capacitação profissional que me proporcionaram e à CAPES pelo incentivo concedido na forma de bolsa de estudo e ao CNPQ e à FUNCAP pelo auxílio financeiro dessa pesquisa.

Aos meus pais, Maria de Lourdes Pinheiro Quintino Rodrigues e Antonio Airton Rodrigues que sempre me encorajaram e acreditaram em mim mesmo em situações que nos separariam por algum tempo, que nunca mediram esforços para realizar meus sonhos, que sempre souberam dizer sim, mas também souberam dizer não, que me apresentaram a Deus pelo meu batismo e que me amam incondicionalmente.

Às minhas irmãs Camila Quintino Rodrigues e Michelle Quintino Rodrigues, que apesar de às vezes não me darem muito crédito por me acharem meio sem juízo, sempre se preocupam comigo, me amam muito e também acreditam em mim.

Ao meu namorado sempre amado Rodrigo Silva de Carvalho, que está sempre do meu lado, que se preocupa muito comigo, que cuida de mim e me faz muito feliz e que, acima de tudo, me ama e me faz crer nesse amor cada dia mais.

À minha comunidade católica Fraternidade Divina Misericórdia e, Maria Rosa Mystica na pessoa de seu fundador Ir. Emanuel, com quem eu me fortaleço e aprendo cada vez mais que com Deus tudo fica mais fácil e que não há problema que Ele não resolva.

Ao meu orientador Dr. José Ricardo de Figueiredo, por ter acreditado em mim desde o dia em que aceitou ser meu orientador e por me ensinar que a ciência não sobrevive sem fé e que estas estão intimamente ligadas à vida.

Aos Schlüter, minha família alemã, que mesmo com um pouco de rigidez, mas também com amor, me ajudaram a crescer como pessoa através do respeito às diferenças e que me tornaram uma pessoa ainda mais corajosa.

À minha querida amiga Luciana Rocha Faustino, por toda ajuda e apoio, pela amizade, pela companhia nos árduos experimentos, pelas gargalhadas e pelos conselhos.

Ao meu amigo e fiel colaborador Cleidson Manoel Gomes da Silva, por me ensinar muito com sua enorme inteligência e principalmente por nunca ter me abandonado nos difíceis trabalhos do laboratório.

Ao querido amigo Leonardo Correia Pinto, por ter levado alegria e descontração para a execução dos experimentos e também pela colaboração nestes.

À amiga Jamily Bezerra Bruno, por toda ajuda e tempo a mim dedicados, pela amizade e apoio sempre.

Aos amigos Mariza Mota de Carvalho e Adolfo Silva de Carvalho, pais do meu namorado, pelo apoio e incentivo desde o início e por me tratarem sempre com muito carinho como se eu fosse mais uma filha.

À toda equipe LAMOFOPA, ao Dr. Claudio Afonso Pinho Lopes, às professoras Ana Paula Ribeiro Rodrigues e Lílíam Mara Trevisan Tavares e aos professores José Roberto Viana Silva e Cláudio Cabral Campello, por sua marcante colaboração em nossos projetos, aos doutorandos Juliana Jales de Holanda Celestino, Márcia Viviane Alves Saraiva, Deborah Melo Magalhães, Roberta Nogueira Chaves, Isadora Machado Teixeira Lima, Ana Beatriz Graça Duarte, Rafael

Rosseto de Souza, Isabel Bezerra Lima-Verde, Valesca Barreto Luz, Janduí Nóbrega Junior, Fabrício Souza Martins e Anderson Almeida Pinto, aos mestrandos Sanely Lourenço, Ivina Brito, Lívia Shell e Hiédely Kenya, aos estudantes de iniciação científica Márcio Breno, Diego Diógenes, Gerlane Modesto, Rebeca Magalhães, Laritza Lima, Alison André, Anelise Costa, Rafael Fernando e Rochele Falcão pela disponibilidade em ajudar e, também às técnicas Patrícia Magalhães de Andrade e Simone Vieira Castro que com competência e disponibilidade vêm desempenhando suas funções e dando uma excelente contribuição aos trabalhos executados no laboratório.

À Dra. Maria Helena Tavares de Matos, pessoa essencial no LAMOFOPA pré-antrais, exemplo de seriedade e dedicação profissional, por toda sua colaboração, que como membro da banca dessa dissertação veio acrescentar conhecimento e enriquecer o trabalho.

Ao professor Cláudio Cabral Campello, por sua grande colaboração em nossos trabalhos e também por fazer parte da banca de defesa desta dissertação.

À doutora Alzira Amélia Martins Rosa e Silva, pela disponibilidade em participar como membro da banca e trazer novas informações para enriquecer o trabalho.

A todos, muito obrigada!

## RESUMO

O desenvolvimento de um sistema de cultivo *in vitro* capaz de manter a viabilidade e promover o completo crescimento de folículos pré-antrais (folículos pré-antrais) é de fundamental importância para o fornecimento de milhares de oócitos viáveis, aptos a serem fertilizados, visando o aumento na produção de embriões. Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do hormônio folículo estimulante recombinante (FSHr) sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos e ovinos isolados. Para tanto, ovários de cabras e ovelhas sem raça definida foram coletados em abatedouro local e transportados ao laboratório por até uma hora em Meio Essencial Mínimo (MEM) a 4°C contendo HEPES e antibióticos. Os folículos pré-antrais foram isolados por microdissecção com auxílio de agulhas de 26 G sob estereomicroscópio. Em seguida, os folículos isolados foram cultivados em gotas de 25 µL de  $\alpha$ -MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de insulina-transferrina-selênio (ITS), 1% de antibióticos e 50 µg/mL de ácido ascórbico, na ausência (controle) ou presença de FSHr (100 ou 1000 ng/mL), a 39 °C com 5% de CO<sub>2</sub> em ar. Durante o cultivo foram avaliados a morfologia, o crescimento folicular e a formação de antro. Foi observado que, na espécie caprina, o cultivo com FSHr, em ambas concentrações testadas, apresentou percentuais de folículos morfológicamente normais semelhantes ao controle até o 12º dia de cultivo ( $P>0,05$ ), sendo observada uma redução deste parâmetro no 18º dia ( $P<0,05$ ) somente no tratamento com 1000 ng/mL de FSHr. Na espécie ovina, o percentual de folículos morfológicamente normais foi semelhante em todos os tratamentos ( $P>0,05$ ). Com relação ao desenvolvimento folicular, em caprinos, a adição de FSHr, em ambas concentrações, aumentou significativamente a taxa de crescimento em relação ao controle ( $P<0,05$ ). Entretanto, na espécie ovina, este aumento só foi observado no grupo tratado com FSHr na concentração de 1000 ng/mL. No que se refere à formação de antro, em ambas as espécies, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos com FSHr e o grupo controle. Quanto à análise da configuração da cromatina, observou-se que todos os oócitos permaneceram em estágio de vesícula germinativa. Assim, pôde-se concluir que folículos pré-antrais caprinos e ovinos são capazes de manter a sobrevivência e o crescimento *in vitro* até o estágio antral na ausência de FSH. Contudo, este hormônio teve um papel importante no aumento da taxa de crescimento folicular em ambas as espécies.

**Palavras-chave:** Hormônio folículo estimulante. Cultivo *in vitro*. Cabras. Ovelhas. Folículo pré-antral. Oócito.

## ABSTRACT

The development of an in vitro culture system able to maintaining the viability and promote the full growth of preantral follicles is very important for supply thousands of viable oocytes, ready to be fertilized, in order to increase the production of embryos. The aim of this work was to evaluate the effects of recombinant follicle stimulating hormone (rFSH) on the in vitro development of isolated caprine and ovine preantral follicles. For this purpose, ovaries were collected from mixed-breed goats and ewes at a local slaughterhouse and transported to the laboratory in HEPES-buffered Minimum Essential Medium (MEM) with antibiotics at 4°C within 1h. Preantral follicles were isolated under a stereomicroscope using 26 G needles. Afterwards, follicles were individually cultured in 100 µL drops containing  $\alpha$ -MEM supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 1% insulin-transferrin-selenium (ITS), 1% antibiotics and 50 µg/mL ascorbic acid, without (control) or with rFSH at 100 or 1000 ng/mL. The in vitro culture was carried out at 39°C in an humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub> in air. Follicular morphology, growth and antral cavity formation were assessed throughout the culture. The results showed that addition of rFSH to the medium in both tested concentrations had no effect on the percentages of caprine morphologically normal follicles until day 12 of culture as compared with the control ( $P>0.05$ ), but a decrease was observed on day 18 when the hormone ( $P<0.05$ ) was used at concentration of 1000 ng/mL. Regarding ovine studies, percentages of normal follicles were similar in all treatments. Growth rates were increased in caprine follicles by use of rFSH in both concentrations in comparison to the control ( $P<0.05$ ). In ovine follicles, such effect was observed only when rFSH was used at 1000 ng/ml. In regard to antral cavity formation, no difference among treatments was observed for both species. The analysis of chromatin configuration revealed that all oocytes remained at the germinal vesicle stage. In conclusion, caprine and ovine preantral follicles are capable to survive and develop to the antral stage in vitro without FSH. However, this hormone is important for increasing follicular growth rates in both species.

Keywords: follicle stimulating hormone, in vitro culture, goats, ewes, preantral follicle, oocyte.

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 (revisão de literatura) - Classificação folicular ovariana.....                                                                                                                                                                                                                                                         | 18 |
| Figura 1 (artigo técnico) - Folículo morfolologicamente normal, translúcido, com membrana intacta e células da granulosa circundantes homogêneas e brilhantes (A), folículos degenerado, com contorno irregular, escurecimento do oócito e células da granulosa, perda da integridade da membrana e redução do diâmetro (B)..... | 51 |
| Figura 2 - Percentual de folículos caprinos morfolologicamente normais no grupo controle e nos grupos cultivados nas diferentes concentrações de FSHr.....                                                                                                                                                                       | 52 |
| Figura 3 - Percentual de folículos ovinos morfolologicamente normais no grupo controle e nos grupos cultivados nas diferentes concentrações de FSHr.....                                                                                                                                                                         | 53 |
| Figura 4 - Taxa de crescimento diário de folículos pré-antrais caprinos e ovinos durante 18 dias de cultivo.....                                                                                                                                                                                                                 | 54 |
| Figura 5 - Efeito do FSHr sobre o percentual de formação de antro após cultivo de folículos pré-antrais caprinos e ovinos por 18 dias.....                                                                                                                                                                                       | 55 |
| Figura 6. Taxa de recuperação de oócitos com crescimento completo oriundos de folículos pré-antrais cultivados <i>in vitro</i> .....                                                                                                                                                                                             | 56 |
| Figura 7. Oócito morfolologicamente normal com vesícula germinativa intacta. VG – vesícula germinativa, N-nucléolo.....                                                                                                                                                                                                          | 57 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA - Análise de Variância

°C - Graus Celsius

CGP - Células Germinativas Primordiais

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

BMP - Proteína Morfogenética Óssea

BSA - Albumina Sérica Bovina

DNA - Ácido desoxirribonucleico

EGF - Fator de Crescimento Epidermal

FGF - Fator de Crescimento Fibroblástico

Fig. - Figura

folículos pré-antrais - Folículos Ovarianos Pré-Antrais

FSH - Hormônio Folículo Estimulante

FSHr - Hormônio Folículo Estimulante recombinante

FSHp - Hormônio Folículo Estimulante porcino

FSHo - Hormônio Folículo Estimulante ovino

GDF-9 - Fator de Crescimento e Diferenciação-9

H - Horas

IC - Iniciação Científica

IGF - Fator de Crescimento Semelhante à Insulina

KL - Kit Ligand

LAMOFOPA - Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-Antrais

LH - Hormônio Luteinizante

$\alpha$ -MEM - Meio Essencial Mínimo - Alfa

mL - Mililitro

mm - Milímetro

MIV - Maturação *in vitro*

MOIFOPA - Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais

n - Número

ng - nanograma

Pág. - Página

$P < 0,05$  - Probabilidade de erro menor do que 5%

PPGCV - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

SCE - Soro de Cabra em Estro

SFB - Soro Fetal Bovino

SOE - Soro de Ovelha em Estro

SRD - Sem Raça Definida

UECE - Universidade Estadual do Ceará

$\mu\text{g}$  - Micrograma

$\mu\text{L}$  - Microlitro

$\mu\text{m}$  - Micrômetro

% - Percentual

20x - Aumento de 20 vezes

## SUMÁRIO

|                                                                                 |           |
|---------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>                                                        | <b>15</b> |
| <b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                                             | <b>16</b> |
| 2.1 Oogênese.....                                                               | 16        |
| 2.2 Foliculogênese e características dos folículos ovarianos.....               | 16        |
| 2.3 Atresia folicular.....                                                      | 18        |
| 2.4 A biotécnica de MOIFOPA e suas aplicações.....                              | 19        |
| 2.5 Isolamento folicular.....                                                   | 20        |
| 2.6 Cultivo <i>in vitro</i> de folículos pré-antrais.....                       | 20        |
| 2.7 Composição do meio de cultivo e sua influência no desenvolvimento folicular | 22        |
| 2.7.1 Soro.....                                                                 | 23        |
| 2.7.2 Hormônio Folículo Estimulante (FSH).....                                  | 25        |
| 2.8 Maturação oocitária <i>in vitro</i> (MIV).....                              | 27        |
| <b>3 JUSTIFICATIVA.....</b>                                                     | <b>29</b> |
| <b>4 HIPÓTESE CIENTÍFICA.....</b>                                               | <b>30</b> |
| <b>5 OBJETIVOS.....</b>                                                         | <b>31</b> |
| 5.1 Geral.....                                                                  | 31        |
| 5.2 Específicos.....                                                            | 31        |
| <b>6 CAPÍTULO 1.....</b>                                                        | <b>32</b> |
| <b>7 CONCLUSÕES.....</b>                                                        | <b>58</b> |
| <b>8 PERSPECTIVAS.....</b>                                                      | <b>59</b> |
| <b>9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                        | <b>60</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a ovinocaprinocultura apresenta um ciclo de crescimento mundial o qual intensificou-se nas ultimas décadas, sobretudo em países em desenvolvimento, que são os detentores dos maiores rebanhos. Dessa forma, há uma ampla necessidade de incremento na assistência desses animais, tanto para permitir o aumento da eficiência reprodutiva e/ou produtiva dos rebanhos, como para a multiplicação mais eficiente dos genótipos, que pode ser alcançada a partir do desenvolvimento de biotécnicas da reprodução (FONSECA, 2005).

Para maximizar a utilização de gametas femininos, vem sendo desenvolvida a biotécnica de Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais (MOIFOPA), que permite a obtenção de oócitos oriundos de folículos pré-antrais, uma vez que estes representam a maioria da população folicular. O principal objetivo desta biotécnica é recuperar um grande número de oócitos inclusos nesses folículos e cultivá-los *in vitro* até sua completa maturação (FIGUEIREDO et al., 2008).

Nesse sentido, o desenvolvimento de um sistema eficiente de cultivo de folículos pré-antrais é um ponto crucial para o crescimento folicular, contribuindo para uma melhor compreensão dos diversos fatores implicados na foliculogênese e no processo de atresia ou morte folicular (FIGUEIREDO et al., 2008). Até o momento, sabe-se que o crescimento dos folículos presentes no ovário mamífero é regulado por gonadotrofinas e por fatores intra-ovarianos (FORTUNE et al, 2003). As gonadotrofinas são indispensáveis para o desenvolvimento de folículos antrais, entretanto seu papel sobre a foliculogênese inicial ainda não está bem elucidado (FORTUNE et al., 2003). Dentre as gonadotrofinas, o Hormônio Folículo-Estimulante (FSH) tem sido amplamente utilizado no cultivo de folículos pré-antrais caprinos (MATOS et al., 2007) e ovinos (ARUNAKUMARI et al., 2007), permitindo a manutenção da viabilidade e o crescimento folicular.

Para uma melhor compreensão deste trabalho, a revisão de literatura a seguir aborda aspectos relacionados à oogênese, foliculogênese, atresia folicular, aplicações da biotécnica de MOIFOPA, isolamento folicular, cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, composição do meio de cultivo sobre o desenvolvimento folicular e maturação oocitária *in vitro* (MIV).

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Oogênese**

A oogênese é um conjunto de processos que compreende o desenvolvimento e a diferenciação das células germinativas primordiais (CGP) da fêmea até a formação do oócito haplóide fecundado. Inicia-se antes do nascimento e somente alguns oócitos conseguem completar seu desenvolvimento meses ou anos mais tarde, ou seja, quando o animal atinge a puberdade e após a fecundação (FIGUEIREDO et al., 2008).

Durante o início do desenvolvimento fetal, ocorre a migração das CGP do saco vitelínico para a região das gônadas primitivas (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Em seguida, as CGP multiplicam-se e transformam-se em oogônias, as quais possuem uma alta atividade mitótica e transcricional (EPPIG et al., 2004). Então, ocorre a replicação do DNA das oogônias e estas entram em meiose, tornando-se oócitos primários. Estes começam a primeira divisão meiótica, passando pelos estádios da prófase I (leptóteno, zigóteno e paquíteno), permanecendo no estágio de dictióteno ou vesícula germinativa até a puberdade. Neste período, o pico do Hormônio Luteinizante (LH) induz o oócito a retomar a meiose e então, ocorre o rompimento da vesícula germinativa, progressão para metáfase I, anáfase I e telófase I, expulsão do primeiro corpúsculo polar e formação do oócito secundário. Inicia-se a seguir a segunda divisão meiótica, em que o núcleo do oócito evolui até o estágio de metáfase II, quando ocorre a segunda interrupção da meiose (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). O oócito permanece neste estágio até ser fecundado pelo espermatozóide, quando então, completa a meiose e expulsa o segundo corpúsculo polar, formando o oócito haplóide fecundado (MOORE; PERSAUD, 1994).

### **2.2 Foliculogênese e características dos folículos ovarianos**

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

O folículo é considerado a unidade morfofuncional do ovário, proporcionando um ambiente ideal para o crescimento e maturação do oócito (CORTVRINDT; SMITZ, 2001), além de produzir hormônios e peptídeos (ADASHI, 1994). O folículo é composto por um oócito circundado por células somáticas (granulosa e teca) e, durante a foliculogênese, sua morfologia é alterada uma vez que o oócito cresce e as células da granulosa circundantes se diferenciam (BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006).

Os folículos podem ser classificados em pré-antrais (primordiais, primários e secundários) e antrais (terciários e pré-ovulatórios). Os folículos primordiais representam a grande maioria dos folículos presentes no ovário (95%) e encontram-se quiescentes (FORTUNE et al., 2003). Tais folículos contêm um oócito circundado por uma única camada de células da pré-granulosa com morfologia pavimentosa. A transição do estágio primordial para primário pode ser prolongada e folículos com células da granulosa de morfologia pavimentosa e cúbica são frequentemente observados, sendo classificados por alguns autores como folículos de transição (FORTUNE et al., 2003).

Os folículos primários, por sua vez, contêm uma única camada de células da granulosa com morfologia cúbica circundando o oócito e, a partir desse estágio, o oócito passa a manter um estreito contato com essas células mediado por endocitose, acredita-se dessa forma que as trocas de nutrientes entre oócito com as células da granulosa ocorra por pinocitose. Com o crescimento dos folículos primários, ocorre a proliferação das células da granulosa e o crescimento do oócito, sendo formados os folículos secundários (PICKTON et al., 1998). Tais folículos são caracterizados por duas ou mais camadas de células da granulosa cúbicas ao redor do oócito. Com o desenvolvimento desses folículos, 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; ZHAO, 2005). É importante salientar que as proteínas para formação da zona pelúcida começam a ser sintetizadas a partir do início do crescimento dos folículos primordiais, mas tornam-se claramente visíveis em folículos secundários (MATOS et al., 2004; FIGUEIREDO et al., 2008).

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 antrais. Durante o desenvolvimento folicular, a produção de fluido antral é intensificada pelo aumento da vascularização folicular e

permeabilidade dos vasos sanguíneos. O desenvolvimento dos folículos antrais é caracterizado por uma fase de crescimento, recrutamento, seleção e dominância (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005) sendo a formação de folículos pré-ovulatórios um pré-requisito para a ovulação e formação do corpo lúteo (DRUMMOND, 2006).

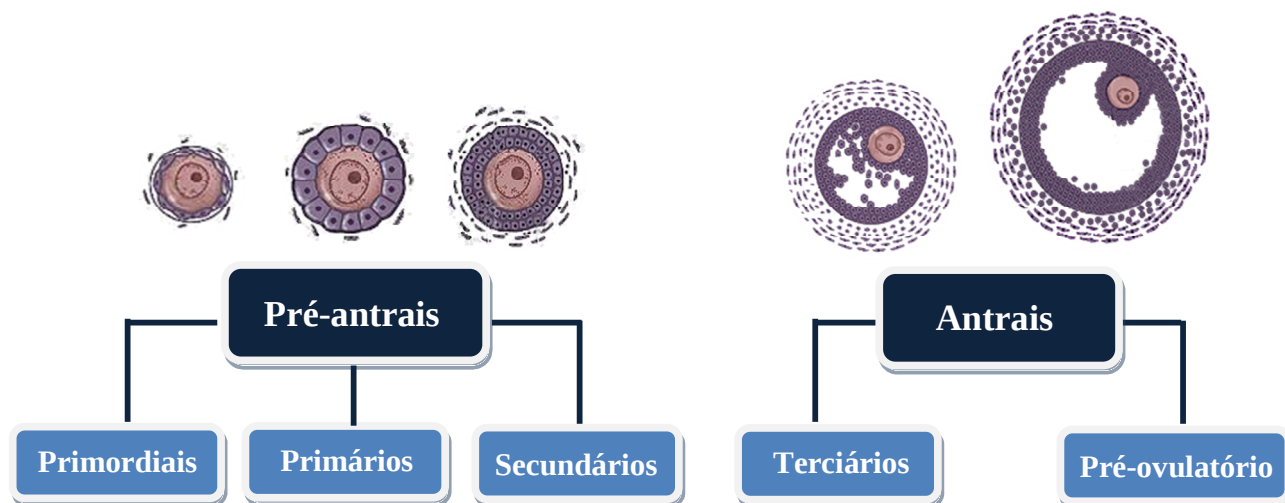


Figura 1. Classificação folicular ovariana

### 2.3 Atresia folicular

Ao longo de toda a vida reprodutiva, folículos ovarianos em todas as fases de desenvolvimento estão presentes, entretanto a grande maioria destes folículos não chega até a ovulação, mas ao contrário, é eliminada por meio de um processo conhecido por atresia folicular (FIGUEIREDO et al., 2008).

A atresia é um fenômeno natural que leva à exaustão do *pool* de folículos pré-antrais (MORITA; TILLY, 1999) e é comum a todas as espécies domésticas, podendo ocorrer em qualquer estágio do desenvolvimento folicular (GLAMOCLIJIA et al., 2005). Nos estádios iniciais da foliculogênese, a atresia é iniciada no oócito e em seguida acomete as células da granulosa (MORITA; TILLY, 1999), verificando-se o processo inverso nos folículos antrais (GLAMOCLIJIA 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 diz respeito à apoptose, sabe-se que este é um evento geneticamente determinado, que depende da expressão de genes pró e anti-apoptóticos, podendo ser 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).

Em virtude da grande perda folicular que ocorre naturalmente *in vivo*, e na tentativa de utilizar de maneira eficiente o potencial de gametas femininos, vem sendo desenvolvida a biotécnica de MOIFOPA.

## **2.4 A biotécnica de MOIFOPA e suas aplicações**

A MOIFOPA visa o isolamento ou resgate de folículos pré-antrais do ambiente ovariano, seguido das etapas de conservação (resfriamento e/ou criopreservação) e/ou cultivo *in vitro* até o estágio de maturação folicular ou oocitária (FIGUEIREDO et al., 2008). Desta forma, esta biotécnica permite a estocagem de gametas femininos, prevenção da ocorrência de atresia, bem como, promove o crescimento, maturação e fecundação *in vitro* dos oócitos previamente inclusos em folículos pré-antrais.

A biotécnica de MOIFOPA é de grande importância para a pesquisa fundamental e para a reprodução animal. No tocante à pesquisa fundamental, esta biotécnica poderá contribuir para elucidação dos mecanismos implicados na foliculogênese na fase pré-antral. Nesse caso, os folículos pré-antrais isolados do ambiente ovariano poderão ser cultivados *in vitro* em presença de diferentes substâncias (matriz extracelular, hormônios, fatores de crescimento, carboidratos, aminoácidos, etc), cujo efeito individual ou associado à gonadotrofinas e outros fatores de crescimento poderá ser avaliado e controlado em diversos experimentos visando o desenvolvimento do projeto “Ovário Artificial”. O Projeto ovário artificial permite acompanhar o crescimento do oócito dentro do folículo desde a pré-antral até a fase antral, contribuindo dessa forma para um melhor entendimento acerca do funcionamento do ovário.

Com relação à reprodução animal, a MOIFOPA poderá, no futuro, permitir o isolamento de milhares de folículos pré-antrais a partir de um único ovário e o posterior cultivo *in vitro* dos oócitos neles inclusos até o estágio de maturação, contribuindo assim para a multiplicação de animais de alto valor zootécnico além de reduzir a utilização de animais vivos em experimentos e testes de laboratório (FIGUEIREDO et al., 2008).

## **2.5 Isolamento folicular**

Para resgatar folículos pré-antrais do ovário, procedimentos de isolamento mecânico e/ou enzimático podem ser utilizados. O isolamento enzimático tem sido realizado em várias espécies, tais como caprinos (RAJARAJAN et al., 2006), bubalinos (GUPTA et al., 2007), ovinos (MURUVI et al., 2005) e murinos (EPPIG; SCHROEDER, 1989). Paralelamente aos procedimentos enzimáticos, métodos mecânicos têm sido mais comumente adotados para o isolamento de folículos pré-antrais de ovários bovinos (ITOH et al., 2002), caprinos (MAO et al., 2002; ARUNAKUMARI et al., 2007) e ovinos (AMORIM et al., 2000). Tais métodos têm proporcionado a recuperação de um grande número de folículos pré-antrais, sendo mais utilizadas a microdissecção que permite isolar folículos maiores que 100µm (LEE et al., 2007; TAMILMANI et al., 2005) e o método que tem como base o tissue chopper, que permite isolar folículos menores que 100 µm (MARTINEZ-MADRID et al., 2004) ou ainda a associação dos métodos mecânico e enzimático (GUPTA et al., 2008).

Uma vez isolados do ambiente ovariano, os folículos pré-antrais podem ser destinados para o cultivo *in vitro*. Vários estudos (CECCONI et al., 2004; WU; TYAN, 2007; ARUNAKUMARI et al., 2007) têm sido realizados na tentativa de se desenvolver um sistema de cultivo que possa promover o crescimento de folículos pré-antrais *in vitro*, evitando as perdas foliculares que ocorrem naturalmente *in vivo*.

## **2.6 Cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais**

O objetivo principal do cultivo *in vitro* (CIV) de folículos pré-antrais é permitir o desenvolvimento folicular, assegurando o crescimento e a maturação dos oócitos, bem como a

multiplicação e a posterior diferenciação das células da granulosa inclusas nestes folículos. O sistema de cultivo ideal deve preencher três requisitos básicos e sequenciais, a saber: preservar a viabilidade dos folículos, conservar sua aparência morfológica pré-existente *in vivo* e, finalmente, desde que mantidas as condições precedentes, assegurar o crescimento e a maturação folicular (FIGUEIREDO et al., 2008).

Diferentes métodos de cultivo têm sido desenvolvidos para manter a viabilidade e promover o crescimento de folículos pré-antrais *in vitro* (HARTSHORNE, 1997). Em roedores, devido ao pequeno tamanho do ovário, utiliza-se frequentemente o cultivo *in vitro* do órgão inteiro, o que permite estudar os fatores que podem afetar a ativação folicular (FORTUNE, 2003). Por outro lado, o tamanho dos ovários de mamíferos domésticos não permite que estes sejam cultivados inteiros, tendo sido desenvolvidos vários métodos para o cultivo *in situ* de fragmentos de córtex ovariano, pois nesta área do ovário está localizado o pool de folículos quiescentes. Estes métodos são importantes para o estudo da ativação de folículos primordiais e do crescimento de folículos primários em várias espécies (bovinos: BRAW-TAL; YOSSEFI, 1997; babuínos: WANDJI et al., 1997; humanos: HOVATTA et al., 1999; caprinos: SILVA et al. 2004a). Diferentemente de folículos primordiais e primários, que comumente são cultivados *in situ*, folículos secundários e antrais, são mais frequentemente cultivados na forma isolada, uma vez que o isolamento geralmente utiliza folículos nestas categorias e isso parece ser importante para o futuro desenvolvimento *in vitro* (PICTON et al., 2008).

Grandes progressos já têm sido observados no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais em diferentes espécies animais. Em felinos (JEWGENOW; STOLTE, 1996) e marsupiais (BUTCHER; ULLMAN, 1996), após o cultivo *in vitro*, já foi observado o crescimento de folículos ovarianos pré-antrais isolados, porém, sem a formação de antro. Nas espécies ovina (CECCONI et al., 1999), bovina (GUTIERREZ et al., 2000; McCAFFERY et al., 2000), e caprina (HUANMIN; YONG, 2000) folículos pré-antrais isolados desenvolveram-se *in vitro* até o estágio antral. Resultados mais satisfatórios foram obtidos com suínos (WU; TIAN, 2007) e bubalinos (GUPTA et al., 2008), em que se alcançou a produção de embriões após cultivo *in vitro* de grandes folículos secundários. Entretanto, os melhores resultados foram observados por Carroll et al. (1990) que obtiveram oócitos maduros após congelamento, descongelamento e cultivo *in vitro* de folículos primários de camundongos. Mais recentemente, O'Brien et al (2003) obtiveram

o nascimento de camundongos a partir de folículos primordiais desenvolvidos, maturados e fecundados *in vitro*.

## **2.7 Influência da composição do meio de cultivo no desenvolvimento folicular**

Para obtenção de sucesso durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, a composição do meio é um fator importante e esta varia enormemente de acordo com o estudo realizado. Apesar disso, alguns componentes como solução salina, antibióticos (penicilina, estreptomicina), tampões (bicarbonato, fosfato, HEPES) e diferentes substratos nutricionais (monossacarídeos, lipídeos, proteínas, aminoácidos, ácidos nucleicos, vitaminas, etc) constituem a base da maioria dos meios disponíveis. Ademais, esses meios são frequentemente enriquecidos com fontes protéicas (soro fetal bovino, soro de vaca em estro, soro de macho castrado, albumina sérica bovina), hormônios, peptídeos e diversos fatores de crescimento em diferentes combinações e concentrações (FIGUEIREDO et al., 2008).

Com relação aos meios de cultivo de base, há uma variedade de meios que são utilizados no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, dentre eles podemos citar o Meio Essencial Mínimo - MEM (MATOS et al., 2007; BRUNO et al., 2008; SILVA et al., 2009), Waymouth (EPPIG; O'BRIEN 1996, MURUVI et al., 2005) e McCoy's (TELFER et al., 2008). O meio de cultivo de base utilizado para o crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais comumente é suplementado com diferentes fatores e substâncias, porém a eficácia desses fatores adicionais na manutenção do crescimento e da sobrevivência folicular depende da espécie estudada, do próprio sistema de cultivo, da concentração desses fatores e da duração do cultivo. Além disso, sabe-se que os folículos podem ser potencialmente influenciados pelos sinais endócrinos produzidos pelas células do estroma e por outros folículos, ou por fatores produzidos dentro dos próprios folículos (hormônios e fatores de crescimento) (FORTUNE et al, 2003).

Assim, diversos autores têm investigado o efeito de vários componentes no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, tanto de animais de laboratórios (O'BRIEN et al., 2003) como animais domésticos (vacas: GUTIERREZ et al., 2000, cabras: MATOS et al., 2007 e ovelhas: ARUNAKUMARI et al., 2007). Silva et al. (2004b) descreveram que houve uma redução da sobrevivência de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in situ* quando a solução a base de água

de côco foi adicionada ao Meio Essencial Mínimo (MEM). No entanto, a adição de ITS (insulina, transferrina e selênio), hipoxantina, piruvato, glutamina e albumina sérica bovina (BSA) ao meio foi capaz de manter a viabilidade folicular após cultivo *in vitro*. Além disso, obteve-se o completo desenvolvimento de oócitos até estarem aptos à maturação e fecundação *in vitro* após cultivo de folículos pré-antrais de búfalas com células do cumulus em MEM (GUPTA et al., 2008). Outra substância que vem sendo utilizada no meio de cultivo de base é o ácido ascórbico. Sua função anti-oxidante (TILLY; TILLY, 1995) permite que ele seja capaz de inibir a apoptose de folículos ovarianos e células da granulosa cultivados *in vitro* (HAROLD et al., 1996), melhorar a qualidade e a sobrevivência de folículos bovinos cultivados *in vitro* (THOMAS et al., 2001) além de manter a viabilidade de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro* por 14 dias (ROSSETTO et al., 2009). Além dos suplementos descritos anteriormente, outras substâncias também vêm sendo testadas no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, tais como hormônios (FSH e LH: SARAIVA et al., 2009, Estradiol: LIMA-VERDE et al., 2009) e fatores de crescimento (GDF-9: Martins et al., 2008, EGF: Celestino et al., 2008).

Nas sessões seguintes, será dada ênfase à importância do Soro e do FSH na suplementação de meios de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais.

### 2.7.1 Soro

Outra substância que também pode ser adicionada ao meio de cultivo *in vitro* é o soro de diferentes origens. De fato, este é um produto biológico indefinido, composto por substâncias ativas tais como aminoácidos (KESKINTEPE et al., 1995; KIM et al., 1993), substratos energéticos, vitaminas (TAKAHASHI et al., 1992), peptídeos, proteínas, hormônios, fatores de crescimento e outros compostos (MINGOTI, 1999). Existem diferentes tipos de soros, tais como Soro Fetal Bovino (SFB), Soro de Cabra em Estro (SCE) e soro de animais castrados. Muitos trabalhos têm adicionado SFB ao meio de cultivo de folículos pré-antrais como fonte de nutrientes, hormônios e fatores de crescimento, contudo, os resultados desta adição são bastante controversos.

O soro fetal bovino (SFB) é um suplemento proteico amplamente utilizado no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais. Ele é composto por diversas substâncias como: proteínas,

carboidratos, aminoácidos, fatores de crescimento e hormônios (PICTON et al., 2008), os quais permitem manter a viabilidade e promover o crescimento de folículos pré-antrais (BRUNO et al., 2008), além de ser uma fonte de precursores para a síntese de esteróides (HULSHOF et al., 1995). Vale ressaltar que a repetibilidade dos resultados, quando se utiliza o SFB, pode variar de acordo com a partida e, por tratar-se de um produto biológico, a contaminação por agentes microbianos deve ser sempre considerada (FREITAS, 2004).

A identificação de diferentes fatores de crescimento e proteínas presentes no soro e que são essenciais para o crescimento folicular ainda são um desafio para o cultivo celular. A presença de altas concentrações de soro durante o cultivo de folículos pré-antrais constitui uma condição inadequada para estudos fisiológicos *in vitro*. De fato, o soro contém numerosas proteínas conhecidas e desconhecidas que podem interagir com outros componentes adicionados ao meio (DEMEESTERE et al., 2005).

Alguns autores verificaram que o SFB promove efeitos benéficos durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais. Em murinos, a ausência de soro no meio de cultivo folicular tem sido relacionada com a indução da apoptose e o comprometimento do desenvolvimento folicular (DEMEESTERE et al., 2005). Telfer et al. (2000) verificaram um aumento significativo na sobrevivência de folículos pré-antrais suínos após 20 dias de cultivo na presença de 10% de SFB em relação àqueles cultivados sem soro. Cecconi et al. (1999) obtiveram um rápido crescimento e uma alta taxa de formação de antro utilizando 10% de SFB durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais de ovelhas. Por outro lado, alguns estudos observaram que a utilização de 10% de SFB diminuiu a viabilidade folicular (HULSHOF et al., 1995) e promoveu uma perda significativa da integridade da membrana basal de folículos pré-antrais bovinos (THOMAS et al., 2001). Além disso, Mitchell et al. (2002) mostraram que todos os folículos cultivados com soro de rata degeneraram após nove dias de cultivo *in vitro*.

O 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% prejudicou a taxa de sobrevivência pós-descongelação (MUCCI et al., 2006). Bruno et al. (2008 no prelo) ainda observaram que a suplementação do meio de cultivo com todos os tipos (SFB, SCE ou soro de cabra em diestro) e concentrações (10 ou 20%) de soro, não foi capaz de manter a viabilidade, embora tenha promovido a ativação de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro*.

Como pôde ser visto, os resultados obtidos com uso de Soro no meio de base em procedimento de cultivo *in vitro* são bastante controversos, o que pode ser explicado pelas diferenças entre os tipos de soro, protocolos, estágio de desenvolvimento folicular e métodos de avaliação da viabilidade das estruturas analisadas. Portanto, faz-se importante o desenvolvimento de um meio de cultivo ideal para o crescimento folicular e, conseqüentemente para a MIV dos oócitos inclusos nesses folículos. Entretanto, apesar destas variações, dependendo do lote utilizado, o soro pode ser uma maneira rápida de se alcançar bons resultados. Além disso, constitui uma fonte de baixo custo de nutrientes, hormônios e fatores de crescimento.

### **2.7.2 Hormônio Folículo Estimulante (FSH)**

O hormônio gonadotrófico FSH é uma glicoproteína heterodimérica produzida na adenohipófise e que, em fêmeas, age primeiramente no folículo ovariano. Existem diversos tipos de FSH, os quais se diferenciam de acordo com a sua origem, como, por exemplo, extrato pituitário de animais domésticos, principalmente suínos (FSHp) e ovinos (FSHo), e urina de mulheres no período de menopausa. Outra fonte de FSH que vem sendo bastante utilizada é obtida a partir da tecnologia de DNA recombinante, a qual utiliza células de ovários de hamsters. O FSH recombinante (FSHr) é mais puro e homogêneo, o que pode propiciar uma alta eficácia nos resultados de crescimento folicular (CALDER et al. 2003).

No que se refere à ação do FSH, esta ocorre diretamente nas células somáticas ovarianas por meio de receptores específicos presentes na superfície dessas células. Tais receptores são denominados RFSH. Em ovelhas, o mRNA para o RFSH pode ser encontrado nas células da granulosa de folículos primordiais e primários e sua expressão é contínua durante a foliculogênese (TISDALL et al., 1995), porém ainda não se sabe os níveis de expressão na espécie caprina.

Com relação aos receptores de FSH, estes são compostos de um grande domínio extracelular N-terminal, sete domínios transmembranários e um domínio C-terminal intracelular acoplado à proteína G (SALESSE *et al.*, 1991). A ligação desta gonadotrofina ao seu receptor ativa as proteínas G associadas, promovendo a conversão de guanosina difosfato (GDP) em guanosina trifosfato (GTP), que se liga à subunidade  $\alpha$  da proteína G, estimulando a adenilciclase

(AC) a gerar AMP cíclico (cAMP). Este por sua vez aciona uma cascata de fosforilação nas proteínas quinases dependentes de cAMP (PK-A). Desta forma, a ativação da PK-A controla múltiplos aspectos da função celular por meio da fosforilação de substratos protéicos. Uma vez que a interação receptor-ligante tenha se estabelecido, o complexo é internalizado por endocitose e degradado pelos lisossomos, sendo o receptor reciclado de volta à membrana celular por exocitose (HILLIER *et al.*, 1996).

Apesar de os receptores de FSH não estarem presentes em folículos primordiais, este hormônio parece exercer um efeito indireto sobre o desenvolvimento folicular inicial através da liberação de fatores parácrinos produzidos por folículos maiores ou pelas células do estroma ovariano (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Alguns trabalhos demonstraram que o FSH regula a expressão de vários fatores de crescimento, tais como Kit Ligand (KL), Fator de Diferenciação e Crescimento 9 (GDF-9) e Proteína Morfogenética Óssea 15 (BMP-15), que possuem papéis importantes na ativação e no posterior crescimento folicular (JOYCE *et al.*, 1999, THOMAS *et al.*, 2005).

*In vivo*, o FSH é essencial para a promoção da esteroidogênese através da estimulação da atividade da enzima aromatase, bem como para a diferenciação das células da granulosa através da indução da expressão de receptores para LH (DEMEESTERE *et al.*, 2005). O FSH também regula a conexão transzonal entre o oócito e as células da granulosa (ALBERTINI *et al.*, 2001).

Vários estudos *in vitro* têm mostrado que o FSH pode promover o desenvolvimento de folículos pré-antrais e a formação de antro (camundongos: SPEARS *et al.*, 1998; ratas: McGEE *et al.*, 1997; mulheres: WRIGHT *et al.*, 1999; vacas: GUTIERREZ *et al.*, 2000; cabras: ZHOU; ZHANG, 2005; ovelhas: CECCONI *et al.*, 1999; porcas: MAO *et al.*, 2002). Além disso, o FSH inibe a apoptose em folículos pré-antrais cultivados *in vitro* (mulheres: ROY; TREACY, 1993; camundongos: BAKER; SPEARS, 1997; ratas: McGEE *et al.*, 1997). Em caprinos, a adição de 50 ng/mL de FSH ao meio de cultivo de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano foi responsável pela manutenção da integridade ultra-estrutural dos folículos e pelo aumento do diâmetro oocitário (MATOS *et al.*, 2007; MAGALHÃES *et al.*, 2009). Por outro lado, Nuttinck *et al.* (1996) cultivaram pequenos folículos pré-antrais bovinos por sete dias e observaram que o FSH aumentou a degeneração oocitária. Além disso, estudos têm mostrado que os folículos ovarianos pré-antrais conseguem se desenvolver, independentemente da ação do FSH. Este fato foi observado em camundongos com deficiência nos genes FSH $\beta$  e RFSH (KUMAR *et al.*, 1997;

DIERICH et al., 1998) e também em pacientes com mutações que suprimiam a função do receptor para FSH (BEAU et al., 1998; TOURAINÉ et al., 1999). Os resultados contraditórios podem estar relacionados às diferenças entre espécies, metodologias e meios de cultivo *in vitro* (por exemplo, substâncias adicionadas ao meio de cultivo e concentrações de FSH utilizadas nos experimentos).

## **2.8 Maturação oocitária *in vitro* (MIV)**

A MIV consiste na maturação de oócitos, preparando-os para a fecundação e subsequente desenvolvimento embrionário. Assim, o indicador mais pontual da completa maturação nuclear e citoplasmática é a capacidade do oócito de ser fecundado e se desenvolver até os estádios embrionários (GONÇALVES et al., 2008).

As características macroscópicas do folículo são importantes para determinar o potencial de maturação nuclear e citoplasmática do oócito. No entanto, os padrões morfológicos adotados variam de acordo com as espécies (GONÇALVES et al., 2008). Em caprinos, a aquisição da competência meiótica dos oócitos tem sido correlacionada com o tamanho do folículo de origem do oócito (MERMILLOID et al., 1999). É importante salientar que, de modo diferente da espécie bovina, os complexos cumulus-oócito (CCO) de caprinos desprendem-se com muita facilidade, tornando-se comum encontrar poucos oócitos completamente circundados por várias camadas do *cumulus*. É também interessante enfatizar que o ooplasma de caprinos apresenta uma coloração bem mais escura do que a normalmente encontrada em outras espécies domésticas (FREITAS et al., 2008). Mesmo com a natureza heterogênea dos oócitos imaturos utilizados para a produção *in vitro* (PIV), a maturação oocitária pode ser influenciada pelos componentes do meio e pelas condições de cultivo utilizadas para a MIV (FREITAS et al., 2008).

O sistema mais comumente empregado para a MIV é um meio de cultivo suplementado com FSH, LH, estradiol e 10% de SFB (COGNIE et al., 2003). Além disso, para a MIV de oócitos ovinos e caprinos, o fluido folicular de grandes folículos (maiores que 5 mm) pode ser utilizado como um suplemento em TCM199 contendo 100 ng/mL de FSH de origem ovina. Durante a MIV de oócitos ovinos e caprinos sob essas condições, a extrusão do primeiro corpúsculo polar (MII) ocorre entre 16 e 24 horas após o início da maturação (COGNIE et al.,

2003). Na espécie caprina, a MIV normalmente é realizada em meio TCM199 acrescido de cisteamina, fator de crescimento epidermal (EGF) e gentamicina (Freitas et al., 2008). Recentemente, Arunakumari et al (2007) obtiveram uma taxa de 47% de oócitos ovinos em MII após cultivo de oócitos oriundos de folículos pré-antrais com TCM199B (TCM199 + bicarbonato) suplementado com tiroxina (T4), FSH, LH, estradiol, gentamicina, BSA e soro de ovelha em estro (SOE).

Como pôde ser visto, grandes progressos do CIV de FOPA já podem observados em algumas espécies animais e os resultados mais satisfatórios foram obtidos em murinos, espécie na qual crias saudáveis nasceram após maturação de oócitos oriundos de folículos pré-antrais cultivados *in vitro*. Apesar dos bons resultados obtidos em animais de laboratório, em animais domésticos ainda não foi desenvolvido um meio de cultivo capaz de manter a viabilidade e promover o crescimento a maturação de FOPA, sobretudo em caprinos e ovinos.

### 3 JUSTIFICATIVA

Os folículos pré-antrais representam cerca de 90 a 95% de toda a população folicular, armazenando assim a grande maioria dos oócitos presentes em ovários mamíferos. Entretanto, a grande maioria desses folículos sofre atresia, reduzindo significativamente o potencial reprodutivo das fêmeas. Devido ao grande potencial dos folículos pré-antrais como material para preservação de espécies animais ameaçadas de extinção ou de alto valor genético, e, ainda, para a preservação da fertilidade em humanos, há um crescente interesse em compreender os mecanismos envolvidos na fase inicial da foliculogênese e posterior crescimento dos oócitos inclusos nestes folículos. Neste contexto, a biotécnica de MOIFOPA permite a recuperação de milhares de folículos pré-antrais a partir de um único ovário, podendo em seguida tais folículos serem criopreservados e/ou cultivados *in vitro*, evitando assim a grande perda folicular que ocorre *in vivo*, maximizando o potencial reprodutivo das fêmeas.

Sabendo-se do grande valor econômico que as espécies caprina e ovina representam para o país, é de extrema importância o desenvolvimento de um sistema de cultivo *in vitro* capaz de promover o crescimento e manter a viabilidade dos folículos pré-antrais caprinos e ovinos, otimizando o aproveitamento do potencial oocitário desses animais e incrementando a eficiência da reprodução animal. Além disso, o desenvolvimento de um sistema de cultivo *in vitro* eficiente poderá fornecer subsídios para uma melhor compreensão sobre os fatores que regulam a foliculogênese inicial nessas espécies.

Tendo em vista os bons resultados utilizando FSH e o Soro no cultivo de folículos pré-antrais em diferentes espécies, faz-se necessário verificar o efeito da associação de tais substâncias sobre no CIV de longa duração de FOPA caprinos e ovinos isolados, bem como sobre a competência meiótica dos oócitos oriundos destes folículos. Já que o soro é uma excelente fonte de nutrientes, hormônios e fatores de crescimento, permitindo a obtenção rápida de ótimos resultados, principalmente se utilizado em associação com outras substâncias como FSHr que é um hormônio com alto grau de pureza.

#### **4 HIPÓTESE CIENTÍFICA**

Diante do exposto formulou-se a seguinte hipótese científica:

- A utilização do FSH recombinante em meio de cultivo contendo SFB estimula o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos e ovinos isolados.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 Geral:

Avaliar os efeitos de duas concentrações de FSHr (100 ou 1000 ng/mL) no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos e ovinos isolados.

### 5.2 Específicos:

- Verificar o efeito do FSHr sobre a morfologia, crescimento e formação de antro em folículos pré-antrais isolados de caprinos e ovinos cultivados *in vitro* por 18 dias;
- Avaliar a configuração da cromatina nuclear após MIV dos oócitos inclusos nos folículos pré-antrais cultivados *in vitro*.

## 6 CAPÍTULO 1

# **Efeito de diferentes concentrações de hormônio folículo-estimulante recombinante sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos e ovinos isolados**

**Effect of different concentrations of recombinant follicle stimulating hormone on the *in vitro* development of preantral follicles isolated from goats and sheeps**

Giovanna Quintino Rodrigues <sup>1</sup>, Cleidson Manoel Gomes Silva <sup>1</sup>, Luciana Rocha Faustino <sup>1</sup>, Jamily Bezerra Bruno <sup>1</sup>, Leonardo Correia Pinto <sup>1</sup>, Claudio Afonso Pinho Lopes <sup>1</sup>, Claudio Cabral Campello <sup>1</sup>, José Ricardo de Figueiredo <sup>1</sup>

**ABSTRACT:** Rodrigues G.Q., Silva C.M.G., Faustino L.R., Bruno J.B., Pinto L.C., Lopes C.A.P., Campello C.C., Figueiredo J.R. 2009. **Effect of different concentrations of recombinant follicle stimulating hormone on the *in vitro* development of preantral follicles isolated from goats and sheeps** *Pesquisa Veterinária Brasileira* 00(0):00-00. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-Antrais, Universidade Estadual do Ceará, Av. Paranjana 1700, Campus do Itaperi, Fortaleza, CE 60740-000, Brazil. \*Corresponding author: [gqrvet@hotmail.com](mailto:gqrvet@hotmail.com) (Giovanna Quintino Rodrigues)

The aim of this work was to evaluate the effects of recombinant follicle stimulating hormone (rFSH) on the *in vitro* development of isolated caprine and ovine preantral follicles. For this purpose, ovaries were collected from mixed-breed goats and ewes at a local slaughterhouse and transported to the laboratory in HEPES-buffered minimum essential medium (MEM) with antibiotics at 4°C within one hour. Preantral follicles were isolated under a stereomicroscope

using 26 G needles. Afterwards, follicles were individually cultured in 100  $\mu$ L drops containing  $\alpha$ -MEM supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 1% insulin-transferrin-selenium (ITS), 1% antibiotics and 50  $\mu$ g/mL ascorbic acid, without (control) or with rFSH at 100 or 1000 ng/mL. The *in vitro* culture was carried out at 39°C in an humidified incubator with 5% CO<sub>2</sub> in air. Follicular morphology, growth and antral cavity formation were assessed throughout the culture. The results showed that addition of rFSH to the medium at either tested concentrations had no effect on the percentages of caprine morphologically normal follicles until day 12 of culture as compared with the control ( $P>0.05$ ), but a decrease was observed on day 18 with the use of the hormone ( $P<0.05$ ) only rFSH (1000 ng/mL). Regarding ovine follicles, percentages of normal follicles were significantly reduced from day 12 onwards in all treatments, which led to similar results. Growth rates were increased in caprine follicles by use of rFSH at either concentrations in comparison to the control ( $P<0.05$ ). In ovine follicles, such effect was observed only when rFSH was used at 1000 ng/mL. With respect to antral cavity formation, no difference among treatments was observed for both species. The analysis of chromatin configuration revealed that all oocytes remained at the germinal vesicle stage. In conclusion, caprine and ovine preantral follicles are capable to survive and develop to the antral stage *in vitro* without FSH. However, this hormone is important for increasing follicular growth rates in both species.

INDEX TERMS: follicle stimulating hormone, *in vitro* culture, goats, ewes, preantral follicle, oocyte.

<sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folicúlos Pré-Antrais (LAMO), Universidade Estadual do Ceará (UECE), Av. Paranjana 1700, Campus do Itaperi, Fortaleza, CE 60740-000, Brazil. \*Corresponding author: gqrvet@hotmail.com

**RESUMO:** [Efeito de diferentes concentrações de hormônio folículo-estimulante recombinante sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos e ovinos isolados.] Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do hormônio folículo estimulante recombinante (FSHr) sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais (folículos pré-antrais) caprinos e ovinos isolados. Para tanto, ovários de cabras e ovelhas sem raça definida foram coletados em abatedouro local e transportados ao laboratório em Meio Essencial Mínimo (MEM) contendo HEPES e antibióticos a 4°C em até uma hora. Os folículos pré-antrais foram isolados por microdissecção com auxílio de agulhas de 26 G sob estereomicroscópio. Em seguida, os folículos isolados foram cultivados em gotas de 25 µL de  $\alpha$ -MEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% de insulina-transferrina-selênio (ITS), 1% de antibióticos e 50 µg/mL de ácido ascórbico, na ausência (controle) ou presença de FSHr (100 ou 1000 ng/mL), a 39 °C com 5% de CO<sub>2</sub> em ar. Durante o cultivo foram avaliados a morfologia, o crescimento folicular e a formação de antro. Foi observado que, na espécie caprina, o cultivo com FSHr, em ambas concentrações testadas, apresentou percentuais de folículos morfolologicamente normais semelhantes ao controle até o 12º dia de cultivo ( $P>0,05$ ), sendo observada uma redução deste parâmetro no 18º dia ( $P<0,05$ ) somente no tratamento com 1000 ng/mL de FSRr. Na espécie ovina, o percentual de folículos morfolologicamente normais foi semelhante em todos os tratamentos, observando-se um decréscimo significativo a partir do 12º dia de cultivo ( $P<0,05$ ). Com relação ao desenvolvimento folicular, em caprinos, a adição de FSHr, em ambas concentrações, aumentou significativamente a taxa de crescimento em relação ao controle ( $P<0,05$ ). Entretanto, na espécie ovina, este aumento só foi observado no grupo tratado com FSHr a 1000 ng/mL. No que se refere à formação de antro, em ambas as espécies, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos com FSHr e o grupo controle. Quanto à análise da configuração da cromatina, observou-se que todos os oócitos permaneceram

em estágio de vesícula germinativa. Assim, pôde-se concluir que folículos pré-antrais caprinos e ovinos são capazes de manter a sobrevivência e o crescimento *in vitro* até o estágio antral na ausência de FSH. Contudo, este hormônio teve um papel importante no aumento da taxa de crescimento folicular em ambas as espécies.

**Termos de indexação:** hormônio folículo estimulante, cultivo *in vitro*, cabras, ovelhas, folículo pré-antral, oócito.

### Introdução

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é comumente realizada a partir de folículos antrais (FA) (Nagano et al. 2007), cuja população compreende apenas cerca de 5 a 10% do total de folículos ovarianos, sendo significativamente menor que a população de folículos pré-antrais (folículos pré-antrais) (Figueiredo et al. 2007). Nesse contexto, diversos trabalhos vêm tentando desenvolver um sistema de cultivo *in vitro* capaz de manter a viabilidade bem como promover o crescimento de folículos pré-antrais, uma vez que o cultivo dessa classe folicular resultaria no fornecimento de milhares de oócitos viáveis, aumentando o rendimento da PIV.

Apesar dos esforços de diversas equipes, apenas alguns estudos têm obtido sucesso no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais em diversas espécies (bubalinos: Gupta et al. 2008, ovinos: Arunakumari et al. 2007, suínos: Wu & Tian, 2007, humanos: Telfer et al. 2008), sendo o mais relevante o trabalho de O'Brien et al. (2003), que obtiveram o nascimento de camundongos saudáveis.

A eficiência do cultivo de folículos pré-antrais pode ser afetada por diferentes fatores, tais como atmosfera gasosa, período de cultivo, tipo de meio e suplementos adicionados. Um suplemento bastante utilizado no meio de cultivo de folículos pré-antrais é o soro fetal bovino

(SFB), o qual é composto por diversas substâncias como proteínas, carboidratos, aminoácidos, fatores de crescimento e hormônios (Picton et al. 2008), além de ser uma fonte de precursores para a síntese de esteróides (Hulshof et al. 1995). Estudos têm demonstrado que o SFB mantém a sobrevivência de folículos pré-antrais suínos (Telfer et al. 2000), além de promover formação de antro em folículos pré-antrais ovinos (Cecconi et al. 1999).

Com relação aos hormônios utilizados no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, pode-se destacar o hormônio folículo estimulante (FSH), uma importante gonadotrofina que desempenha papel fundamental no desenvolvimento folicular e na regulação da esteroidogênese ovariana (Richards 1980, Hsueh et al. 1989), sendo identificada como essencial para o crescimento folicular *in vitro* (Adriaens et al. 2004, Cecconi et al. 1999, Mao et al. 2002). Existem diversos tipos de FSH, os quais se diferenciam de acordo com a sua origem, como, por exemplo, extrato pituitário de animais domésticos, principalmente suínos (FSHp) e ovinos (FSHo), e urina de mulheres no período de menopausa. Outra fonte de FSH que vem sendo bastante utilizada é obtida a partir da tecnologia de DNA recombinante, a qual utiliza células de ovários de hamsters. O FSH recombinante (FSHr) é mais puro e homogêneo, o que pode propiciar uma alta eficácia nos resultados de crescimento folicular (Calder et al. 2003). Apesar disso, o efeito desse hormônio sobre o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais depende de alguns fatores como a espécie a ser estudada, os diferentes sistemas de cultivo e o grau de pureza das preparações comerciais. Nesse sentido, Cecconi et al. (1999) cultivaram folículos pré-antrais de ovino isolados utilizando FSHp (nas concentrações de 100 e 1000 ng/mL) associado a SFB (10%), obtendo formação de antro pela primeira vez nesta espécie. Entretanto, ainda não há relatos do efeito do FSHr no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos e ovinos isolados. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do FSHr sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos e ovinos isolados.

## Material e Métodos

Todos os reagentes utilizados neste estudo foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St Louis, E.U.A.), sendo as exceções devidamente descritas.

Foram utilizados 60 ovários oriundos de cabras (n=30) e ovelhas (n=30) adultas sem raça definida (SRD), provenientes de abatedouros locais. Imediatamente após o abate, os ovários foram lavados em álcool a 70% e, em seguida, duas vezes em Meio Essencial Mínimo (MEM) acrescido de HEPES e antibióticos (75 mg/L de penicilina e 50 mg/L de estreptomicina), no qual foram transportados ao laboratório a 4 °C em até 1 h.

Após remoção do tecido adiposo, ligamentos e medula, o córtex ovariano foi fragmentado (1-2 mm) com auxílio de um bisturi sob condições estéreis. Destes fragmentos, folículos pré-antrais intactos (150-250  $\mu$ m) foram isolados mecanicamente com o auxílio de um estereomicroscópio (SMZ 645 Nikon, Tóquio, Japão) a um aumento de 20X, utilizando-se agulhas de calibre 26 G acopladas a seringas de insulina. Folículos com o oócito visível, circundado por células da granulosa e uma membrana basal intacta, e sem cavidade antral foram selecionados para o cultivo.

O meio de cultivo utilizado foi o  $\alpha$ -MEM (pH 7.2 - 7.4) suplementado com 10% de SFB, 1% de ITS (6.25  $\mu$ g/mL de insulina, 6.25  $\mu$ g/mL de transferrina e 6.25 ng/mL de selênio), antibióticos (75 mg/L de penicilina, 50 mg/L estreptomicina) e 50  $\mu$ g/mL de ácido ascórbico, o qual foi denominado  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>. Os folículos foram cultivados em  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> sozinho ou suplementado com 100 ou 1000 ng/mL de FSHr (Nanocore, Campinas, Brasil). Para cada tratamento, foram selecionados, no mínimo, 30 folículos, os quais foram cultivados individualmente em gotas de 25  $\mu$ L de meio, cobertas com 6 mL de óleo mineral, em estufa a 39 °C com 5% de CO<sub>2</sub> em ar por até 18 dias. A cada dois dias, 15  $\mu$ L de meio de cada gota foi trocado por meio fresco.

Durante todo o período de cultivo, o crescimento folicular foi avaliado de acordo com o aumento do diâmetro e com a formação da cavidade antral, a qual foi definida como uma área clara dentro das camadas de células da granulosa. O diâmetro folicular foi avaliado a cada seis dias com auxílio de uma ocular micrométrica acoplada ao estereomicroscópio, sendo calculado como a média de duas medidas ortogonais (horizontal e vertical). Os folículos foram analisados de acordo com seu aspecto morfológico, sendo considerados viáveis aqueles que se apresentaram translúcidos, com membrana basal intacta, células da granulosa circundantes homogêneas e brilhantes, e sem sinais de degeneração (contorno irregular, escurecimento do oócito e/ou células da granulosa e redução do diâmetro).

Ao final do período de cultivo, os oócitos foram recuperados dos folículos com auxílio de agulhas 26 G, aspirados e lavados duas vezes em meio TCM199 contendo HEPES (TCM199H), suplementado com piruvato e 10% SFB. Em seguida, os oócitos foram cultivados por 26 horas em gotas de 50 µL de meio de MIV, constituído por TCM199 com bicarbonato (TCM199B), suplementado com 5 µg/mL de FSHr, 5µg/mL de LH, 1µg/mL de 17β-estradiol, 1 ng/mL de fator de crescimento epidermal (EGF), 20% de SFB e 0,23 mM de piruvato. O cultivo foi realizado em placas (35 x 15 mm) sob óleo mineral, em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub> em ar a 39°C.

Após o período de incubação, os oócitos foram desnudados das células do cumulus por repetidas pipetagens, lavados em TCM199H, colocados entre uma lâmina e uma lamínula e fixados em uma solução de etanol e ácido acético (3:1) por 24 h. Após esse período, os oócitos foram corados com lacmóide e observados sob microscópio ótico para avaliação da configuração da cromatina.

A taxa de recuperação dos oócitos foi calculada da seguinte forma: o número total de oócitos selecionados ( $\geq 110\mu\text{m}$ ) para a maturação *in vitro* (MIV) dividido pelo número total de folículos pré-antrais cultivados.

Os dados de morfologia, formação de antro e maturação após o cultivo *in vitro* foram comparados pelo teste de Qui-quadrado e os resultados foram expressos como percentuais. Os dados de taxa de crescimento que apresentaram distribuição normal e homocedasticidade foram submetidos à ANOVA seguida do teste t de Student para comparação das médias (SAS, 1999). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), e as diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ .

## Resultados

Com relação à morfologia, após o cultivo, os folículos que se apresentaram translúcidos, com membrana intacta e células da granulosa circundantes homogêneas e brilhantes foram considerados normais (figura 1A), enquanto aqueles com contorno irregular, escurecimento do oócito e/ou células da granulosa, perda da integridade da membrana e redução do diâmetro foram considerados degenerados (figura 1B).

As percentagens de folículos pré-antrais caprinos e ovinos morfologicamente normais após o cultivo *in vitro* são mostradas nas figuras 2 e 3, respectivamente. Com relação à espécie caprina, até o 12º dia de cultivo, o percentual de folículos morfologicamente normais foi similar nos diferentes tratamentos ( $P > 0,05$ ). Entretanto, no 18º dia, esse percentual foi significativamente inferior no grupo tratado com FSHr na concentração de 1000 ng/mL quando comparado ao grupo controle ( $P < 0,05$ ). No grupo tratado com 100 ng/mL de FSHr, houve uma redução do percentual de folículos morfologicamente normais apenas do dia 0 para o dia 6 e do dia 6 para o dia 12 ( $P < 0,05$ ), enquanto que, no grupo tratado com 1000 ng/mL de FSHr, essa redução ocorreu de forma significativa ( $P < 0,05$ ) apenas do dia 0 para o dia 6. No grupo controle, foi observada queda significativa do percentual de folículos morfologicamente normais somente do dia 0 para o

dia 6 (Figura 2). Na espécie ovina, o percentual de folículos morfologicamente normais foi semelhante entre todos os tratamentos em cada dia ( $P>0,05$ ). Houve redução significativa desse percentual nos grupos tratados com FSHr ( $P<0,05$ ) no 12º dia de cultivo em relação ao dia 6 (Figura 3).

No que se refere ao desenvolvimento folicular, a adição de FSHr em ambas as concentrações testadas aumentou significativamente a taxa de crescimento de folículos pré-antrais caprinos quando comparado ao controle (Figura 4). Na espécie ovina, esse aumento somente foi observado no grupo tratado com FSHr na concentração de 1000 ng/mL com relação ao controle ( $P<0,05$ ).

O efeito da adição de FSHr ao meio de cultivo de folículos pré-antrais caprinos e ovinos sobre o desenvolvimento da cavidade antral está descrito na figura 5. Os primeiros folículos antrais foram observados no 6º dia de cultivo tanto no grupo controle como nos tratamentos com FSHr. Com relação à taxa de formação de antro, em cada espécie, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos ( $P>0,05$ ).

A figura 6 mostra o percentual de oócitos destinados à MIV após cultivo *in vitro* na ausência ou presença de FSHr. Não foi observada diferença significativa entre os grupos tratados com FSHr e o grupo controle em relação aos percentuais de oócitos recuperados com diâmetro  $\geq 110 \mu\text{m}$  ( $P>0,05$ ). Além disso, foi verificado que, após o período de cultivo para a MIV, todos os oócitos apresentaram-se morfologicamente normais e em estágio de vesícula germinativa (Figura 7).

### **Discussão**

No presente trabalho, foi avaliado o efeito do FSH sobre o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais de pequenos ruminantes, uma vez que diversos trabalhos têm mostrado efeitos

positivos desse hormônio no crescimento folicular em diversas espécies (humanos: Telfer et al. 2008, murinos: Cecconi et al. 2004, bubalinos: Gupta et al. 2008, suínos: Wu & Tian 2007)

Neste trabalho, o FSHr não teve influência na sobrevivência folicular, uma vez que, em ambas as espécies, os grupos tratados com essa gonadotrofina apresentaram valores semelhantes àqueles cultivado na sua ausência até 18 dias. Resultados similares foram descritos por Silva et al. (2004), que, ao cultivarem folículos pré-antrais caprinos *in situ*, observaram que o FSH porcino (FSHp) na concentração de 100 ng/mL não alterou a taxa de sobrevivência folicular quando comparado ao grupo cultivado sem FSH. Além disso, Rajarajan et al. (2006) observaram uma taxa de degeneração em torno de 40% em folículos pré-antrais caprinos isolados e cultivados na presença de FSHp por 6 dias.

Os resultados obtidos no presente trabalho provavelmente estão relacionados ao fato de ter sido utilizado um meio de base bastante complexo composto por suplementos protéicos, energéticos, antioxidantes, dentre outros. Acredita-se, dessa forma, que esse meio de base proporcionou um microambiente favorável para manutenção da sobrevivência folicular. Além disso, a presença de SFB no meio de cultivo não permitiu efeitos positivos adicionais do FSHr, pois o soro é composto por diversas substâncias como proteínas, carboidratos, aminoácidos, fatores de crescimento e hormônios (Picton et al. 2008), além de ser uma fonte de precursores para a síntese de esteróides (Hulshof et al. 1995).

Cecconi et al. (1999), ao cultivarem folículos pré-antrais ovinos isolados na presença de FSHp na concentração de 1000 ng/mL associado ao SFB, obtiveram uma taxa de sobrevivência folicular de aproximadamente 93% após seis dias de cultivo. Nossos resultados foram similares (94%) nesse mesmo período utilizando essa mesma concentração de FSHr, porém o mesmo não ocorreu com caprinos (32%). Nesta espécie, os melhores resultados foram verificados com a concentração de 100 ng/mL (54%). Com relação ao desenvolvimento folicular, em folículos pré-

antrais caprinos, o FSHr promoveu um aumento significativo da taxa de crescimento diário em relação ao controle em ambas as concentrações testadas, enquanto em folículos pré-antrais ovinos, esse resultado foi observado apenas no grupo tratado com 1000 ng/mL de FSHr . Esses resultados estão de acordo com outros estudos que têm demonstrado que o FSH exerce importante papel no crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais (Campbell et al. 2004; Silva et al. 2004; Wu et al. 2007; Matos et al. 2007). Por outro lado, Rajarajan et al. (2006), utilizando uma concentração fixa de FSHp no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos isolados por no máximo 6 dias não observaram efeitos significativos deste hormônio sobre o desenvolvimento folicular. No presente trabalho, os tratamentos com FSHr promoveram um crescimento acelerado dos folículos, o que pode também ter ocorrido devido à presença de SFB no meio de base. Cecconi et al. (1999) obtiveram um rápido crescimento folicular utilizando 10% de SFB durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais ovinos. Além disso, o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais isolados de ovários de fetos bovinos é mais efetivo em relação ao aumento do diâmetro folicular quando se utiliza SFB que outras fontes de macromoléculas como BSA ou KnockoutSR , um suplemento definido sintético substituto do soro que também pode ser utilizado no cultivo embrionário e na fertilização *in vitro* (Basso et al. 2007). Entretanto, a identificação dos diferentes fatores de crescimento e proteínas presentes no soro que são essenciais para o crescimento folicular ainda é um desafio. De fato, o soro contém numerosas proteínas conhecidas e desconhecidas que podem interagir com outros componentes adicionados ao meio (Demeestere et al. 2005).

As espécies aqui estudadas se comportaram de forma diferente, visto que o FSHr em ambas as concentrações testadas aumentou a taxa de crescimento em folículos caprinos e ovinos, respectivamente. Isto ocorreu provavelmente pelo fato de que os níveis necessários desta gonadotrofina para o crescimento folicular são diferenciados entre as espécies. Estima-se que a

concentração plasmática de FSH *in vivo* na fase estral varia em torno de 250 ng/mL na espécie caprina (Rodello, 2004) e 2000 ng/mL na espécie ovina (Campbell et al. 2009).

Com relação à formação de antro, foram obtidos no presente estudo taxas de até 58% e 72% em caprinos e ovinos, respectivamente. Contudo, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos, em ambas as espécies. Nossos resultados foram superiores aos de Newton et al. (1999), que obtiveram uma taxa de 7% de formação de antro após cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais ovinos na ausência de FSH, além disso, a formação de cavidade antral também foi observada em folículos pré-antrais humanos cultivados sem gonadotrofinas (Wu et al. 1998).

No presente trabalho, em ambas as espécies, o percentual de oócitos destinados à MIV ( $\geq 110 \mu\text{m}$ ) foi semelhante entre os tratamentos testados. Além disso, todos os oócitos destinados à MIV permaneceram em estágio de vesícula germinativa e apresentaram-se morfolologicamente normais. Este fato corrobora com Daniel et al. (1989), os quais mostraram que oócitos são capazes de continuar seu crescimento por até 12 dias de cultivo na ausência de FSH. Ademais, Eppig et al. (1998) relataram que a adição de FSH no co-cultivo *in vitro* de células da granulosa e complexos cumulus-oócito não influenciou a competência meiótica.

Frente às mesmas condições de cultivo, o desempenho de folículos pré-antrais ovinos foi superior ao de folículos pré-antrais caprinos em todos os parâmetros avaliados, exceto na taxa de crescimento diário. De fato, diversos estudos com folículos pré-antrais ovinos têm sido realizados com sucesso (Cecconi et al. 1999, Hemamalini et al. 2003, Talmimani et al. 2007). Nesta espécie oócitos meioticamente competentes já foram obtidos após cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais (Arunakumari et al. 2007, Tamilmani et al. 2005), o que ainda não foi alcançado na espécie caprina. Resultados ainda mais satisfatórios foram relatados por Salle et al. (2002, 2003), que obtiveram o nascimento de crias após autotransplante de ovários criopreservados. As diferenças espécie-específicas envolvem diversos aspectos, tais como: o tempo total para completar a

foliculogênese e a oogênese; tamanho dos folículos e dos oócitos maduros e as diferenças entre as fontes, concentrações e efeitos dos fatores de crescimento que modulam o desenvolvimento dos folículos e oócitos (Picton et al. 2008).

Diante do exposto, pode-se concluir que folículos pré-antrais caprinos e ovinos são capazes de manter a sobrevivência e o crescimento *in vitro* até o estágio antral sem adição de FSH ao meio de cultivo. Contudo, o FSHr teve um papel importante no aumento da taxa de crescimento folicular em ambas as espécies.

### **Agradecimentos**

À Dra. Lílíam Mara Trevisan Tavares e à Msc. Ana Beatriz Graça Duarte pela ajuda na realização da maturação *in vitro* e à CAPES pelo suporte financeiro.

### **Referências**

- Adriaens I., Cortvrindt R., J. Smits. 2004. Differential FSH exposure in preantral follicle culture has marked effects on folliculogenesis and oocyte developmental competence I. Human Reproduction.19: 398-408.
- Arunakumari G., Vagdevi R., Rao B.S., Naik B.R., Naidu K.S., Suresh Kumar R.V., Rao, V.H. 2007. Effect of hormones and growth factors on *in vitro* development of sheep preantral follicles. Small Ruminant Research. 70: 93–100.
- Basso A.C., Garcia J.M., Esper C.R. 2007. Efeitos de diferentes sistemas de cultivo *in vitro* sobre o crescimento de folículos pré-antrais isolados de ovários de fetos bovinos. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 44: 134-143.

- Calder MD, Caveney AN, Smith LC, Watson AJ. 2003. Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation *in vitro*. *Reproductive Biology and Endocrinology*.14: 1-12.
- Campbell B. K., Telfer E. E., Webb R., Baird D. D. T. 2004. Evidence of a Role for Follicle-Stimulating Hormone in Controlling the Rate of Preantral Follicle Development in Sheep. *Endocrinology*. 145: 1870–1879.
- Campbell B. K. 2009. The endocrine and local control of ovarian follicle development in the ewe. *Animal Reproduction*. 6: 159-171.
- Cecconi S., Barboni B., Coccia M., Mattiol, M. 1999. *In vitro* development of sheep preantral follicles. *Biology of Reproduction*. 60: 594-601.
- Cecconi S., Rossi G., Barberi M., Scaldaferri L., Canipari R. 2004. Effect of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Vasoactive Intestinal Polypeptide on Mouse Preantral Follicle Development *in vitro*. *Endocrinology*.145: 2071-2079.
- Daniel S. A. J., Armstrong D. T., Gore-Langton R. E. 1989. Growth and development of rat oocytes *in vitro*. *Gamete Research*. 24: 109–121.
- Demeestere I., Centner J., Gervy C., Englert Y., Delbaere A. 2005. Impact of various endocrine and paracrine factors on *in vitro* culture of preantral follicles in rodents. *Reproduction*. 130: 147–156.
- Eppig J. J., O'Brien M. J., Pendola F. L., Watanabe S. 1998. Factors Affecting the Developmental Competence of Mouse Oocytes Grown *In vitro*: Follicle-Stimulating Hormone and Insulin. *Biology of Reproduction*. 59: 1445–1453.

- Figueiredo J. R., Celestino J. J. H., Rodrigues A. P. R., Silva J. R. V. 2007. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção *in vitro* de embriões em larga escala. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*.31: 143-152.
- Freitas C. P. 2004. Maturação *in vitro* de ovócitos bovinos: meios de cultivo e fatores de crescimento. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.
- Gupta P. S. P., Ramesh H. S., Manjunatha B. M., Nand, S., Ravindra J.P. 2008. Production of buffalo embryos using oocytes from *in vitro* grown preantral follicles. *Zygote*. 16: 57–63.
- Hemamalini N.C., Rao B.S., Tamilmani G., Amarnath D., Vagdevi R., Naidu K.S., Reddy K.K., Rao V.H. 2003. Influence of transforming growth factor- $\alpha$ , insulin-like growth factor-II, epidermal growth factor or follicle stimulating hormone on *in vitro* development of preantral follicles in sheep. *Small Ruminant Research*. 50: 11–22.
- Hsueh A. J. W., McGee E. A., Hayashi M., Hsu S.Y. 1989. Hormonal regulation of early follicle development in the rat ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology*.63: 100.
- Hulshof S.C.J., Figueiredo J.R., Beckers J.F., Bevers M.M., Van Der Donk J.A. and Van Den Hurk R. 1995. Effects of fetal bovine serum, FSH and 17- $\beta$ estradiol on the culture of bovine preantral follicles. *Theriogenology*.44: 217-226.
- Mao J., Wu G., Smith M.F., McCauley T.C., Cantley T.C., Prather R.S., Didion B.A., Day B.N. 2002. Effects of culture medium, serum type, and various concentrations of follicle stimulating hormone on porcine preantral follicle development and antrum formation *in vitro*. *Biology of Reproduction*. 67: 1197-1203.
- 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., Bão S. N., Lucci C. M., Figueiredo J. R. 2007. Essential role of follicle

- stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability *in vitro*. *Zygote*. 15: 173–182.
- Nagano M., Atabay E. P., Atabay E. C., Hishinuma M., Katagiri S., Takahashi Y. 2007. Effect of isolation method and pre-treatment with ethylene glycol or raffinose before vitrification on *in vitro* viability of mouse preantral follicles. *Biomedical Research*. 28: 153-160.
- Newton H., Picton H., Gosden R. G. 1999. *In vitro* growth of oocyte–granulosa cell complexes isolated from cryopreserved ovine tissue. *Journal of Reproduction and Fertility*. 115: 141-150.
- O’Brien M. J., Pendola J.K., Eppig J.J. 2003. A revised protocol for *in vitro* development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. *Biology of Reproduction*. 68: 1682–1686.
- Picton H. M., Harris S. E., Muruvi W., Chambers E. L. 2008. The *in vitro* growth and maturation of follicles. *Reproduction*. 136: 703–715.
- Rajarajan K., Rao B.S., Vagdevi R., Tamilmani G., Arunakumari G. Sreenu M., Amarnath D., Naik B.R., Rao V.H. 2006. Effect of various growth factors on the *in vitro* development of goat preantral follicles. *Small Ruminant Research*. 63: 204–212.
- Richards 1980. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian... Richards *Physiol. Rev.* 60: 51-89.
- Rodello, L. Dinâmica folicular ovariana e seu controle em cabras. 2004. 23 f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.
- Salle B., Demirci B., Franck M., Rudigoz R. C., Guerin J. F., Lornage J. 2002. Normal pregnancies and live births after autograft of frozen-thawed hemi-ovaries into ewes. *Fertility and Sterility*. 77: 403-408.

- Salle B., D., Demirci B., Franck M., Berthollet C., Lornage J. 2003. Long-term follow-up of cryopreserved hemi-ovary autografts in ewes: pregnancies, births, and histologic assessment. *Fertility and Sterility*. 80: 172-177.
- Silva J. R.V., Van Den Hurk R., De Matos M. H.T., Dos Santos R. R., Pessoa, C., Moraes M. O., Figueiredo J. R. 2004. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during *in vitro* culture of caprine ovarian cortical tissue. *Theriogenology*. 61: 1691–1704.
- Tamilmani G., Rao B.S., Vagdevi R., Amarnath D., Naik B.R., Mutharao M., Rao V.H. 2005. Nuclear maturation of ovine oocytes in cultured preantral follicles. *Small Ruminant Research*. 60: 295–305.
- Telfer E.E., Binnie J.P., McCaffery F.H, Campbell B.K. 2000. *In vitro* development of oocytes from porcine and bovine primary follicles. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 163: 117–123.
- Telfer E.E., MCLAughlin M., Kini S., Williams A., Thong K.J. 2008. Development of human preantral follicles *in vitro* is enhanced by timed exposure to activin-A followed by FSH. *Fertility and Sterility*. 90: 54. Page Abstracts of the Scientific Oral & Poster Sessions Program Supplement, American Society for Reproductive Medicine 64th Annual Meeting.
- The development of porcine preantral follicle *in vitro*. 2007. *Zygote*. 15: 233–240.
- Wright C.S., Hovatta O., Margara R., Trew G., Winston R.M.L., Frank S., Hardy K. 1999. Effects of follicle-stimulating hormone and serum substitution on the in-vitro growth of human ovarian follicles. *Human Reproduction*. 14: 1555–1562.
- Wu J., Zhang L., Liu P. 1998. A new source of human oocytes: preliminary report on the identification and maturation of human preantral follicle from follicular aspirates. *Human Reproduction*. 13: 2561-2563.

- Wu, J. & Tian, Q. 2007. Role of follicle stimulating hormone and epidermal growth factor in the development of porcine preantral follicle *in vitro*. *Zygote*.15: 233–240.
- Wu J., Xu Bo., Wang W. 2007. Effects of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone on the developmental competence of porcine preantral follicle oocytes grown *in vitro*. *Journal of Assist. Reprod. Genet.* 24: 419–424.

### Legenda de figuras

Fig. 1. Folículo morfolologicamente normal, translúcido, com membrana intacta e células da granulosa circundantes homogêneas e brilhantes (A), folículo degenerado, com contorno irregular, escurecimento do oócito e células da granulosa, perda da integridade da membrana e redução do diâmetro (B).

Fig. 2. Percentual de folículos caprinos morfolologicamente normais no grupo controle e nos grupos cultivados nas diferentes concentrações de FSHr.

A e B diferem entre os grupos dentro do mesmo dia ( $P < 0,05$ ).

a, b, c, diferem entre os dias dentro do mesmo grupo ( $P < 0,05$ ).

Fig. 3. Percentual de folículos ovinos morfolologicamente normais no grupo controle e nos grupos cultivados nas diferentes concentrações de FSHr.

a, b, c, diferem entre os dias dentro do mesmo grupo ( $P < 0,05$ ).

Fig. 4. Taxa de crescimento diário de folículos pré-antrais caprinos e ovinos durante 18 dias de cultivo.

a e b diferem entre os grupos dentro da mesma espécie ( $P < 0,05$ ).

Fig. 5. Efeito do FSHr sobre o percentual de formação de antro após cultivo de folículos pré-antrais caprinos e ovinos por 18 dias.

Fig. 6. Taxa de recuperação de oócitos com crescimento completo oriundos de folículos pré-antrais cultivados *in vitro*.

Fig. 7. Oócito morfolologicamente normal com vesícula germinativa intacta. VG – vesícula germinativa, N-nucléolo.

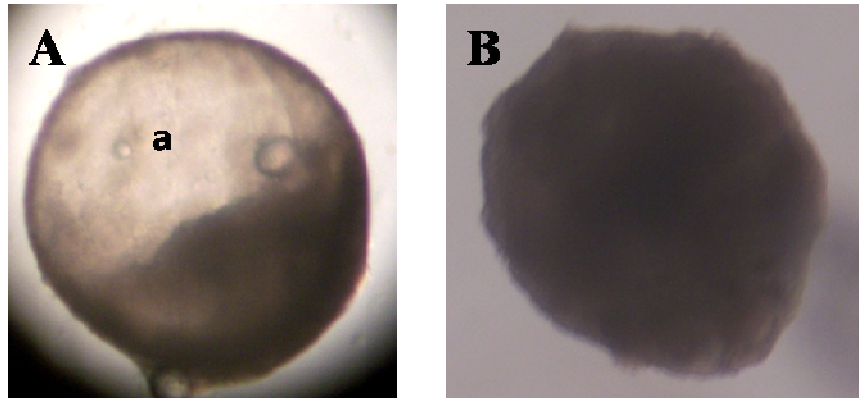


Fig. 1

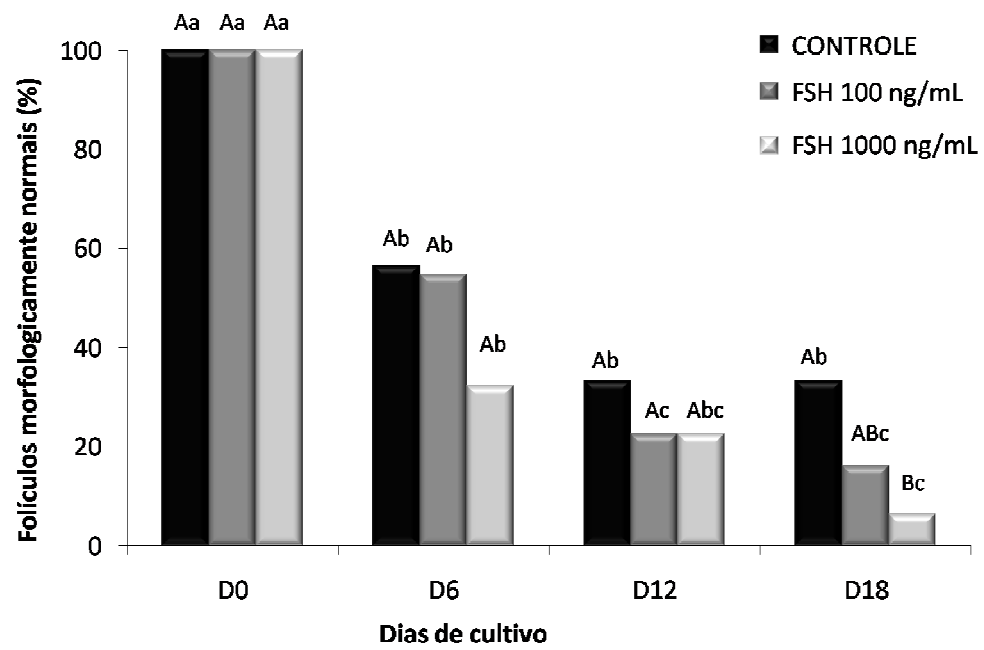


Fig. 2.

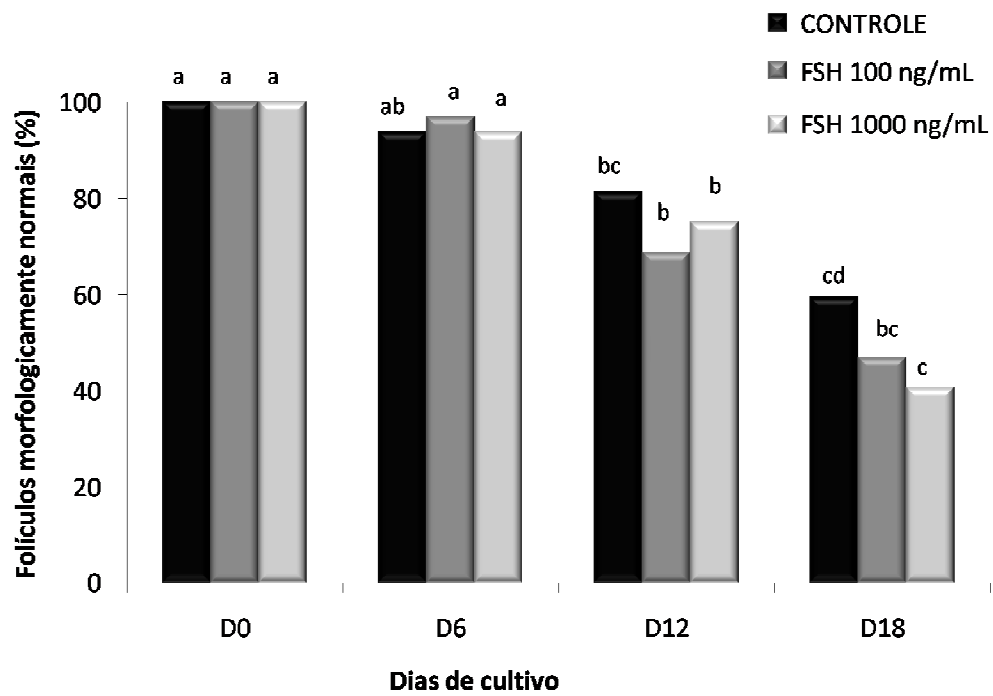


Fig. 3

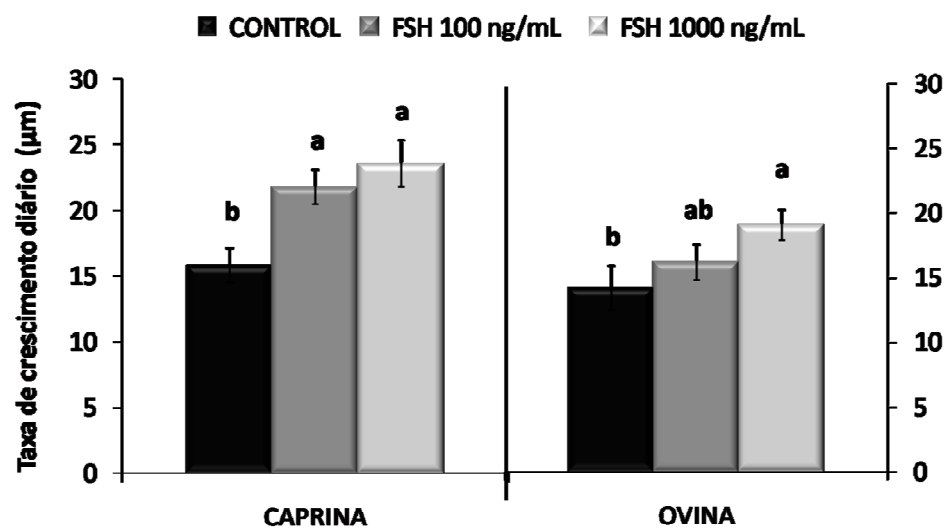


Fig. 4

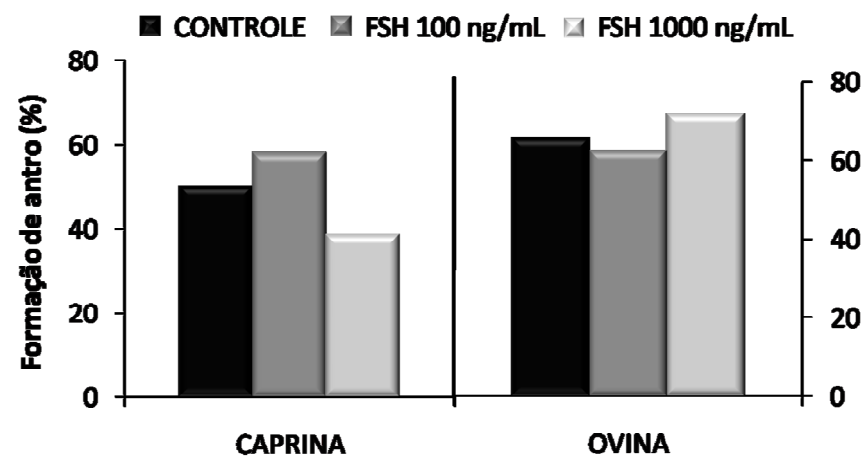


Fig. 5

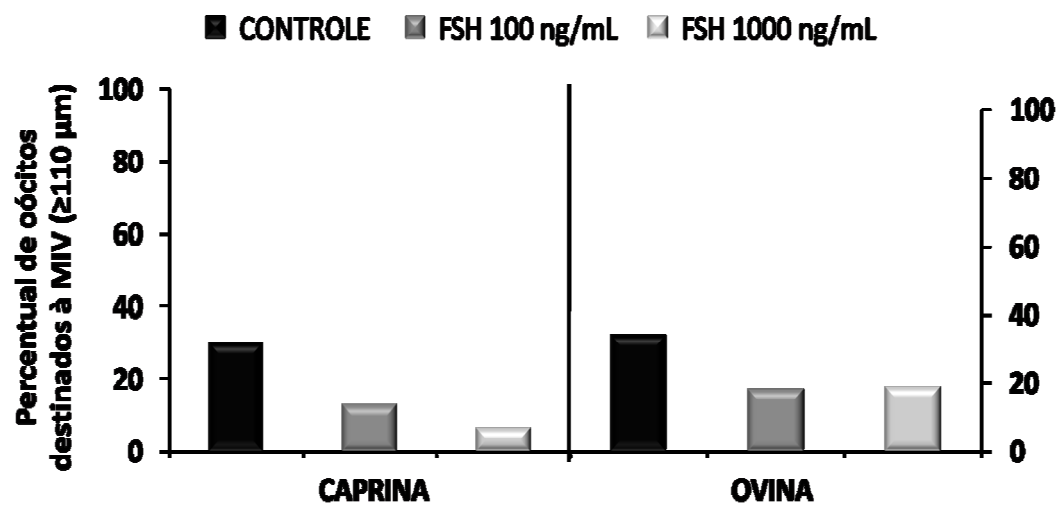


Fig. 6.

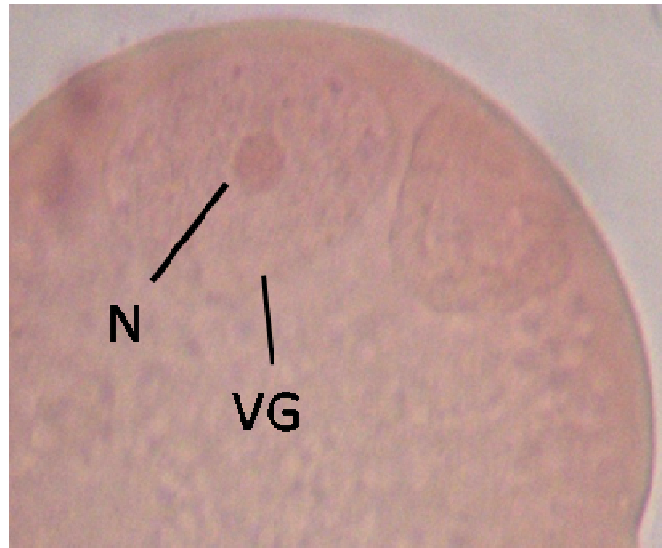


Fig. 7.

## **7 CONCLUSÕES GERAIS**

folículos pré-antrais caprinos e ovinos são capazes de manter a sobrevivência e o crescimento *in vitro* até o estágio antral sem adição de FSH ao meio de cultivo.

O FSHr teve um papel importante no aumento da taxa de crescimento folicular em ambas as espécies.

## **8 PERSPECTIVAS**

Tendo em vista os resultados obtidos com o FSH recombinante neste trabalho, torna-se importante a realização de pesquisas adicionais a fim de verificar se a associação deste hormônio com fatores de crescimento e outras fontes protéicas no meio de cultivo de base melhora a capacidade de desenvolvimento folicular e oocitário nas espécies caprina e ovina.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADASHI, E.Y. Endocrinology of the ovary. *Human Reproduction*, v. 9, p. 815-827, 1994.

ADRIAENS, I.; CORTVRINDT, R.; J. SMITZ. Differential FSH exposure in preantral follicle culture has marked effects on folliculogenesis and oocyte developmental competence I. *Human Reproduction*, v.19, p. 398-408, 2004.

ALBERTINI, D. F.; COMBELLES, C. M.; BENECHCHI, E.; CARABATSOS, M. J. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. *Reproduction*, v. 121, p. 647– 653, 2001.

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

ARUNAKUMARI, G., VAGDEVI, R.; RAO, B. S.; NAIK, B.R.; NAIDU, K. S.; SURESH KUMAR, R.V.; RAO, V.H. Effect of hormones and growth factors on in vitro development of sheep preantral follicles. *Small Ruminant Research*, v. 70, p. 93–100, 2007.

BAKER, S. J.; SPEARS, N. Follicle stimulating hormone inhibits apoptosis in pre- and early-antral murine follicles *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility Abstract*, v. 19, p. 21, 1997.

BARROS, L. F.; HERMOSILLA, T.; CASTRO, J. Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 130, p. 401-409, 2001.

BASSO, A. C.; GARCIA J. M.; ESPER, C. R. Efeitos de diferentes sistemas de cultivo *in vitrosobre* o crescimento de folículos pré-antrais isolados de ovários de fetos bovinos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 44, p. 134-143, 2007.

BEAU, I., TOURAINÉ, P.; MEDURI, G.; GOUGEON, A.; DESROCHES, A.; ATUCHANSKY, C.; MILGROM, E.; KUTTENN, F.; MISRAHI, M. A novel phenotype related to partial loss of function mutations of the follicle stimulating hormone receptor. *Journal of Clinical Investigation*, v.102, p. 1352–1359. 1998.

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

BRISTOL-GOULD, S.; WOODRUFF, T. K. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology*, v. 66, p. 5-13, 2006.

BRUNO, J. B.; LIMA-VERDE, I. B.; MARTINS, F. S.; MATOS, M. H. T.; LOPES, C. A. P.; MAIA-JR. J. E.; BÁO, S. N.; NOBRE JUNIOR, H.V.; MAIA, F. D.; PESSOA, C.; DE MORAES, M.O., SILVA, J. R.V.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Característica histológica, ultra-estrutural e produção de nitrito de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro* na ausência ou presença de soro. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, *in press*, 2008.

BUTCHER, L.; ULLMANN, S. L. Culture of Preantral Ovarian Follicles in the Grey, Short-tailed Opossum, *Monodelphis domestica*. *Reproduction. and Fertility Development*, v. 8, p. 535-9, 1996.

CALDER, M. D.; CAVENEY, A. N., SMITH, L. C.; WATSON, A. J. Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation *in vitro*. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.14, p.1-12, 2003.

CAMPBELL, B. K.; TELFER, E. E., WEBB, R.; BAIRD, D. D. T. Evidence of a Role for Follicle-Stimulating Hormone in Controlling the Rate of Preantral Follicle Development in Sheep. *Endocrinology*. v.145, p. 1870–1879, 2004.

CAMPBELL, B. K. The endocrine and local control of ovarian follicle development in the ewe. *Animal Reproduction*, v. 6, p. 159-171, 2009.

CARROL, J.; WHITTINGAN, D. G.; WOOD, M. J.; TELFER, E.; GOSDEN, R. G. Extra ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 90, p. 321-327, 1990.

CECCONI, S.; BARBON, B.; COCCIA, M.; MATTIOL, M. *In vitro* development of sheep preantral follicles. *Biology of Reproduction*. v.60, p. 594-601, 1999.

CECCONI, S.; ROSSI, G.; BARBER, M.; SCALDAFERRI, L.; CANIPARI, R. Effect of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Vasoactive Intestinal Polypeptide on Mouse Preantral Follicle Development *in vitro*. *Endocrinology*, v.145, p. 2071-2979, 2004.

CELESTINO, J. J.; BRUNO, J. B.; MATOS, M. H. T.; SARAIVA, M. V. A.; CHAVES, R. N.; MARTINS, F. S.; LIMA, L. F.; NAME, K. P. O.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; BAO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Recombinant Epidermal Growth Factor Maintains Follicular

Ultrastructure and Promotes the Transition to Primary Follicles in Caprine Ovarian Tissue Cultured In Vitro. *Reproductive Sciences*, v. 16, p. 239-246, 2009.

COGNIÉ, Y.; BARIL, G.; POULIN, N. Current status of embryo technologies in sheep and goats. *Theriogenology*, v.59, p.171-188, 2003.

CORTVRINDT, R.; SMITZ, J. E. J. *In vitro* follicle growth: Achievements in mammalian species. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 36, p. 3-9, 2001.

DANIEL, S. A. J.; ARMSTRONG, D. T.; GORE-LANGTON, R. E. Growth and development of rat oocytes in vitro. *Gamete Research*, v. 24, p. 109–121, 1989.

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*, v. 130, 147–156, 2005.

DRUMMOND, A.E. The role of steroids in follicular growth. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 4, p. 1-11, 2006.

DIERICH, A.; SAIRAM, M. R.; MONACO, L.; FIMIA, G. M.; GANSMULLER, A.; LEMEURE, M.; SASSONE-CORSI, P. Impairing follicle stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 95, p. 13612-13617, 1998.

EPPIG, J. J.; SCHROEDER, A. C. Capacity of Mouse Oocytes from Preantral Follicles to Undergo Embryogenesis and Development to Live Young after Growth, Maturation, and Fertilization in Vitro. *Biology of Reproduction*, v. 41, p. 268-276, 1989.

EPPIG, J. J.; O'BRIEN, M. J.; PENDOLA, F. L.; WATANABE, S. Factors Affecting the Developmental Competence of Mouse Oocytes Grown *In vitro*: Follicle-Stimulating Hormone and Insulin. *Biology of Reproduction*, v. 59, p. 1445–1453, 1998.

EPPIG, J. J.; VIVEIROS, M. M.; BIVENS, C.M.; DE LA FUENTE, R. Regulation of mammalian oocyte maturation. In: Leung, P.C., Adashi, E.Y. (Eds.), *The Ovary*. 2004.

FARBER, J. L. Membrane injury and calcium homeostasis in the pathogenesis of coagulative necrosis. *Laboratory Investigation*, v. 47, p. 114-123, 1982.

FIGUEIREDO, J. R. **Isolement, caractérisation et culture et follicles préantraux chez les bovins**. 1995. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) Université de Liège, Liege-Belgique, 1995.

FIGUEIREDO, J. R.; CELESTINO, J. J. H.; RODRIGUES, A. P. R.; SILVA J. R. V. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção *in vitro* de embriões em larga escala. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 31, p. 143-152, 2007.

FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; SILVA, J. R. V. Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais. In: **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, 2ª edição, 2008, cap 16, p. 303–327.

FONSECA, J. F. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. In: XVI Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 2005, Goiânia; XVI Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Goiânia. **Anais**, 2005, p. 16.

FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, v.78, p.135-163, 2003.

FREITAS, C. P. 2004. Maturação *in vitro* de ovócitos bovinos: meios de cultivo e fatores de crescimento. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

FREITAS, V. J. F.; OLIVEIRA, M. A. L.; SIMPLÍCIO, A. A.; BARIL, G.; POULIN, N. COGNÍÉ, Y. Produção, criopreservação e transferência de embriões em pequenos ruminantes. In: **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2ª edição, 2008, cap. 13, p.241-260.

GLAMOCLIJ, V.; VILOVIC, K.; SARAGA-BABIC, M.; BARANOVIC, A.; SAPUNAR, D. Apoptosis and active caspase-3 expression in human granulosa cells. *Fertility and Sterility*, v. 83, p. 426-431, 2005.

GONÇALVES, P. B. D.; OLIVEIRA, M. A. L.; MEZZALIRA, A.; MONTAGNER, M. M.; VISINTIN, J. A.; COSTA, L. F. S. Produção *in vitro* de embriões. In: **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, 2ª edição, 2008, cap. 14, p.261-291.

GUPTA, P. S. P.; RAMESH, H. S.; MANJUNATHA, B. M.; NANDI, S.; RAVINDRA, J. P. Production of buffalo embryos using oocytes from *in vitro* grown preantral follicles. *Zygote*, v. 16, p. 57–63, 2008.

GUPTA, P. S. P.; RAMESH, H. S.; NANDI, S.; RAVINDRA, J. P. Recovery of large preantral follicles from buffalo ovary: Effect of season and corpus luteum. *Animal Reproduction Science*, v.101, p.145-152, 2007.

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*. *Biology of Reproduction*, v. 62, p. 1322-1328, 2000.

HARTSHORNE, G. M. In vitro culture of ovarian follicles. *Reviews of Reproduction*, v.2, p. 94–104, 1997.

HAROLD, R. B.; PRESTON, S. L.; ATEN, R. F.; RINAUDO, P.; ZREIK, T. G. Hormone induction of ascorbic acid transport in immature granulosa cells. *Endocrinology*, v.137, p.4316-4321, 1996.

HEMAMALINI, N. C.; RAO, B. S.; TAMILMANI, G.; AMARNATH, D.; VAGDEVI, R.; NAIDU, K. S.; REDDY, K. K.; RAO, V. H. Influence of transforming growth factor- $\alpha$ , insulin-like growth factor-II, epidermal growth factor or follicle stimulating hormone on in vitro development of preantral follicles in sheep. *Small Ruminant Research*, v. 50, p. 11–22, 2003.

HILLIER, S. G.; KITCHNER, H. C.; NEILSON, J. P. Scientific Essentials of reproductive medicine. London: WB Saunders. p. 32-44, 1996.

HOVATTA, O.; WRIGHT, C.; KRAUSZ, T.; HARDY, K.; WINSTON, R. M. L. Human primordial, primary and secondary ovarian follicles in long-term culture: effect of partial isolation. *Human Reproduction*, v. 14, p. 2519–2524, 1999.

HSUEH, A. J. W.; MCGEE, E. A.; HAYASHI, M.; HSU, S.Y. Hormonal regulation of early follicle development in the rat ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 63, p. 100, 1989.

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

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

ITOH, T.; KACCHI, M.; ABE, H.; SENDAI, Y.; HOSHI, H. Growth, Antrum Formation, and Estradiol Production of Bovine Preantral Follicles Cultured in a Serum-Free Medium. *Biology of Reproduction*, v.67, p.1099-1105, 2002.

JEWGENOW, K.; STOLTE, M. Isolation of preantral follicles from nondomestic cats – viability and ultrastructural investigations. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 44, p.183-93, 1996.

JOYCE, I. M.; PENDOLA, F. L.; WIGGLESWORTH, K., EPPIG, J. J. Oocyte regulation of Kit ligand expression in mouse ovarian follicles. *Developmental Biology*, v. 53, p. 214-342, 1999.

KESKINTEPE, L.; BURNLEY, C. A.; BRACKETT, B. G. Production of viable bovine blastocysts in defined *in vitro* conditions. *Biology of Reproduction*, v.52, p. 1410-1417, 1995

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*, v. 64, p. 186-189, 2006.

KIM, J. H.; NIWA, K.; LIM, M. J.; OKUDA, K. Effect of phosphate, energy substrates and amino acids on development *in vitro* matured, *in vitro* fertilized bovine oocyte in a chemically defined, protein-free culture medium. *Biology of Reproduction*, v.48, p.1320-1325, 1993.

KUMAR, T. R.; YAN WANG, Y.; LU, N.; MATZUK, M. M. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nature Genetics*, v.15, p.201-204, 1997.

LEE, S. T.; CHOI, M. H.; GONG, S. P.; HAN, J. Y.; LIM, J. M. Establishment of a basic method for manipulating preantral follicles: effects of retrieval method on *in vitro* growth of preantral follicles and intrafollicular oocytes. *Zygote*, v.15, p.109-116, 2007.

LIMA-VERDE, I. B.; DE MATOS, M. H. T.; SARAIVA, M. V. A.; BRUNO, J. B.; ROSSETTO, R.; TENÓRIO, S.B.; MARTINS, F. S., CUNHA, L. D.; NAME, K. P. O.; BÁO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Interaction between estradiol and follicle stimulating hormone promotes *in vitro* survival and development of caprine preantral follicles. *Cells Tissues Organs*, 2009 (aceito para publicação).

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

MAGALHÃES, D.M.; ARAÚJO, V.R.; LIMA-VERDE, I. B.; DE MATOS, M. H. T.; SILVA, R.C.; LUCCI, C. M.; BÃO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Impact of pituitary FSH purification on in vitro early folliculogenesis in goats. *Biocell* (Mendoza), 2009 (aceito para publicação).

MAO, J.; WU, G.; SMITH, M. F., MCCAULEY, T. C.; CANTLEY, 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 follicle development and antrum formation *in vitro*. *Biology of Reproduction*, v.67, p. 1197-1203, 2002.

MARTINS, F. S.; CELESTINO, J. J.; SARAIVA, M. V. A.; MATOS, M. H. T.; BRUNO, J. B.; ROCHA-JUNIOR, C. M.; LIMA-VERDE, I. B.; LUCCI, CM, BÃO SN, FIGUEIREDO JR. Growth and differentiation factor-9 stimulates activation of goat primordial follicles in vitro and their progression to secondary follicles. *Reproduction, fertility and development*, v.20, p. 916-924, 2008.

MARTINEZ-MADRID, B.; DOLMANS, M. M.; VAN LANGENDONCKT, A.; DEFREERE S.; DONNEZ, J. Freeze-thawing intact human ovary with its vascular pedicle with a passive cooling device. *Fertility and Sterility*, v. 82, p. 1390-1394, 2004.

MATOS, M.H.T., ANDRADE, E.R., LUCCI, C.M., BÃO, 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*, v. 62, p. 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.; BÃO, S. N.; LUCCI, C. M.; FIGUEIREDO, J. R. Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability in vitro. *Zygote*, v. 15, p. 173–182, 2007.

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*, v. 63, p. 267-273, 2000.

McGEE, E.A.; PERLAS, E.; LAPOLT, P. S.; TSAFRIRI, A.; HSUEH, A. J. W. Follicle-stimulating hormone enhances the development of preantral follicles in juvenile rats. *Biology of Reproduction*, v. 57, p. 990–8, 1997.

MERMILLOID, P.; OUSSAID, B.; COGNIÉ, Y. Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.54, p.449-460, 1999.

MINGOTI, G.Z. **Maturação oocitária associada à esteroidogênese. Papel do soro sanguíneo, albumina sérica e hormônios esteróides.** 1999. 53f. Tese (Doutorado em Fisiologia) - Universidade de São Paulo Ribeirão Preto-SP, 1999.

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*, v.17, p. 1181-1188, 2002.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. Início do desenvolvimento humano. In **Embriologia Clínica**, p. 13-38, 1994.

MORITA, Y.; TILLY, J. L. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass. *Developmental Biology*, v.213, p. 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*, v. 65, p.1551–1562, 2006.

MURUVI, W.; PICTON, H. M.; RODWAY, R. G.; JOYCE, I. M. *In vitro* growth of oocytes from primordial follicles isolated from frozen-thawed lamb ovaries. *Theriogenology*, v. 64, p. 1357-70, 2005.

NAGANO, M.; ATABAY, E. P.; ATABAY, E. C.; HISHINUMA, M.; KATAGIRI, S.; TAKAHASHI, Y. Effect of isolation method and pre-treatment with ethylene glycol or raffinose before vitrification on *in vitro* viability of mouse preantral follicles. *Biomedical Research*, v. 28, p. 153-160, 2007.

NEWTON, H.; PICTON, H.; GOSDEN, R. G. *In vitro* growth of oocyte–granulosa cell complexes isolated from cryopreserved ovine tissue. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 115, p. 141-150, 1999.

NUTTINCK, F.; COLETTE, L.; MASSIP, A. Histologic and autoradiographic study of the *in vitro* effects of FGF-2 and FSH on isolated bovine preantral follicles. *Theriogenology*, v. 45, p.1235-1245, 1996.

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*, v 68, p.1682–1686, 2003.

PICTON, H.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R. The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.145, p.27-37, 1998.

PICTON, H. M.; HARRIS, S. E.; MURUVI, W.; CHAMBERS, E. L. The in vitro growth and maturation of follicles. *Reproduction*, v. 136, p. 703–715, 2008.

RAJARAJAN, K.; RAO, B. S.; VAGDEVI, R.; TAMILMANI, G.; ARUNAKUMARI, G.; SREENU, M.; AMARNATH, D.; NAIK, B. R.; RAO, V. H. Effect of various growth factors on the in vitro development of goat preantral follicles. *Small Ruminant Research*, v. 63, p. 204–212, 2006.

RICHARDS, 1980. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiological Reviews*, v. 60, p. 51-89, 1980.

RODELLO, L. Dinâmica folicular ovariana e seu controle em cabras. 2004. 23 f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2004.

ROSSETTO, R.; LIMA-VERDE, I. B. ; DE MATOS, M. H. T.; SARAIVA, M. V. A.; MARTINS, F. S.; FAUSTINO, L. R.; ARAÚJO, V.R.; SILVA, C. M. G.; NAME, K. P. O.; BÃO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R.; BLUME, H. Interaction between ascorbic acid and follicle stimulating hormone maintains follicular viability after long-term in vitro culture of caprine preantral follicles. *Domestic Animal Endocrinology*, in press, 2009.

ROY, S. K.; TREACY, B. J. Isolation and long-term culture of human preantral follicles. *Fertility and Sterility*, v. 59, p. 783–790, 1993.

SALLE, B.; DEMIRCI, B.; FRANCK, M.; RUDIGOZ, R. C.; GUERIN, J. F.; LORNAGE, J. Normal pregnancies and live births after autograft of frozen-thawed hemi-ovaries into ewes. *Fertility and Sterility*, v. 77, p. 403-408, 2002.

SALLE, B.; DEMIRCI, B.; FRANCK, M.; BERTHOLLET, C.; LORNAGE, J. Long-term follow-up of cryopreserved hemi-ovary autografts in ewes: pregnancies, births, and histologic assessment. *Fertility and Sterility*, v. 80, p. 172-177, 2003.

SALESSE, R.; REMY, J.J.; LEVIN, J.M.; JALLAL, B.; GARNIER, J. Towards understanding the glycoprotein hormone receptors. *Biochimie*. v. 73, p. 109–120, 1991.

SARAIVA, M. V. A.; CELESTINO, J. J. H.; CHAVES, R. N.; MARTINS, F. S.; BRUNO, J. B.; LIMA-VERDE, I. B.; DE MATOS, M. H. T.; SILVA, G. M.; PORFIRIO, E. P.; BÁO, S.N.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Influence of different concentrations of Luteinizing Hormone (LH) and Follicle Stimulating Hormone (FSH) on caprine primordial follicle development. *Small Ruminant Research*, v. 78, p. 87-95, 2008.

SAUMANDE, J. La folliculogénèse chez les ruminants, *Recueil de Médecine Vétérinaire*, v. 167, p. 205-218, 1991.

SILVA, J. R.V.; VAN DEN HURK, R.; DE MATOS, M. H.T.; DOS SANTOS, R. R.; PESSOA, C.; 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, 2004a.

SILVA, J.R.S.; VAN DEN HURK, R.; COSTA, S.H.F.; ANDRADE, E. R.; NUNES, A. P. A.; FERREIRA, F. V. A.; LÔBO, R. N. B.; FIGUEIREDO, J. R. Survival and growth of goat primordial follicles after *in vitro* culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. *Anim Rep Sci*, v.81, p.273-286, 2004b.

SILVA, C. M. G.; MATOS, M. H. T.; RODRIGUES, G. Q.; FAUSTINO, L. R.; PINTO, L. C.; CHAVES, R. N.; ARAÚJO, V. R.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. *In vitro* survival and development of goat preantral follicles in two different oxygen tensions. *Animal Reproduction Science*, 2009 (*in press*).

SPEARS, N.; MURRAY, A. A.; ALISSON, V.; BOLAND, N. I.; GOSDEN, R. G. Role of gonadotrofins and ovarian steroids in the development of mouse follicles in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 113, p. 19–26, 1998.

TAKAHASHI, Y.; FIRST, N.L. *In vitro* development of bovine one-cell embryos: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology*, v.37, p.1101-1110, 1992.

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*, v. 163, p. 117–123, 2000.

TELFER, E. E.; MCLAUGHLIN, M.; KINI, S.; WILLIAMS, A.; THONG, K. J. Development of human preantral follicles in vitro is enhanced by timed exposure to activin-A followed by FSH. *Fertility and Sterility*, v. 90, p. 54, 2008.

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.

THOMAS, F. H.; ETHIER, J. F.; SHIMASAKI, S.; VANDERHYDEN, B. C. Folliclestimulating hormone regulates oocyte growth by modulation of expression of oocyte andgranulosa cell factors. *Endocrinology*, v. 146, p. 941-949, 2005.

TILLY, J. L.; TILLY, K. I. Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle- stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. *Endocrinology*, v.136, p.242-252, 1995.

TISDALL, D. J.; WATANABE, K.; HUDSON, N. L.; SMITH, P.; MCNATTY, K. P. FSH receptor gene expression during ovarian follicle development in sheep. *Journal of Molecular Endocrinology*, v.15, p.273–281, 1995.

TOURAINÉ, P.; BEAU, I.; GOUGEON, A.; MEDURI, G.; DESROCHES, A.; PICHARD, C.; DETOEUF, M.; PANIEL, B.; PRIEUR, M.; ZORN, J. R.; MILGROM, E.; KUTTENN, F.; MISRAHI, M. New Natural Inactivating Mutations of the Follicle-Stimulating Hormone Receptor: Correlations between Receptor Function and Phenotype Molecular. *Endocrinology*, v. 13, p. 1844-1854, 1999.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, v.63, p. 1717-1751, 2005.

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*, v. 12, p. 1993–2001, 1997.

WRIGHT, C. S.; HOVATTA, O.; MARGARA, R.; TREW, G.; WINSTON, R. M. L.; FRANK, 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.

WU, J.; ZHANG, L.; LIU, P. A new source of human oocytes: preliminary report on the identification and maturation of human preantral follicle from follicular aspirates. *Human Reproduction*, v.13, p. 2561-2563, 1998.

WU, J.; XU, BO.; WANG, W. Effects of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone on the developmental competence of porcine preantral follicle oocytes grown in vitro. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 24, p. 419–424, 2007.

WU, J.; TIAN, Q. 2007. Role of follicle stimulating hormone and epidermal growth factor in the development of porcine preantral follicle *in vitro*. *Zygote*.15: 233–240.

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.

ZHAO, J.; DORLAND, M.; TAVERNE, M. A.; VAN DER WEIJDEN, G. C.; BEVERS, M. M.; VAN DEN HURK, R. In vitro culture of rat pre-antral follicles with emphasis on follicular interactions. *Molecular Reproduction and Development*. v. 55, p. 65–74, 2000.

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

## ANEXO



Corpo Técnico:  
Dr. Carlos H. M. Viana - CRM/PR 0607 - Diretor Técnico  
Dr. Carlos A. Paschoenli - CRF/PR 3874  
Dra. Melissa S. Romanet - CRF/PR 14.087

Dra. Eliza H. Uemura - CRF/PR 4311 - Responsável Técnica  
Dra. Ana Lucia Monteiro - CRF/PR 5672

### CERTIFICADO DE ANÁLISE

Produto: **SORO FETAL BOVINO**  
Código: 630101  
Lote: 70815013  
Data de Fabricação: 15/08/2007 Data de Validade: 04/08/2009  
Registro na ANVISA: 100.970.10-106

#### 1. Aparência física

Meio líquido translúcido, com coloração levemente amarelada, homogêneo e livre de precipitados ou partículas visíveis.

#### 2. Análise bioquímica

|                | Metodologia          | Dosagem      |
|----------------|----------------------|--------------|
| Ácido Úrico    | Uricase - Peroxidase | 1,50 mg / dl |
| Coolesterol    | Oxidase - Peroxidase | 31,8 mg / dl |
| Creatinina     | Jaffe modificado     | 3,4mg / dl   |
| Glicose        | Oxidase - Peroxidase | 65,8 mg / dl |
| Hemoglobina    |                      | 0,026 g / dl |
| Potássio       | Fotometria de chama  | 11,0 mEq / l |
| Proteína Total | Eletroforese         | 3,73 g / dl  |
| Albumina       | Eletroforese         | 2,53 g / dl  |
| Alfa 1         | Eletroforese         | 1,17 d / dl  |
| Alfa 2         | Eletroforese         | 0,11 g / dl  |
| Beta           | Eletroforese         | 0,27 g / dl  |
| Gama           | Eletroforese         | 0,01 g / dl  |
| Sódio          | Fotometria de chama  | 120,0 Eq / l |
| Triglicéridos  | GPO Trinder          | 59 mg / dl   |
| Uréia          | UV - Bun             | 41,0 mg / dl |

Produto certificado segundo a Norma ISO 15485

Certificação em Boas Práticas de Fabricação e Controle pela ANVISA

Participante do Programa de Excelência para Laboratórios Médicos da SBPC (Sociedade Brasileira de Patologia Clínica)

Participante do Programa Nacional de Controle de Qualidade da SBAC (Sociedade Brasileira de Análises Clínicas)

R. Casemiro de Abreu, 521  
CEP 83321-210 Pinhais / PR

SAC 0800 - 410 - 027  
Home page www.laborclin.com.br  
e-mail: sac@laborclin.com.br

C.B.C. 76.619.113/0001-31  
Inscrição Estadual 13.700.129-28  
Reg. ANVISA 100270

Página 1 de 2 Data: 11/9/2007



Corpo Técnico:  
Dr. Carlos H. M. Viana - CRMVPR 0697 - Diretor Técnico  
Dr. Carlos A. Pasikowski - CRFPR 3874  
Dra. Melissa S. Romanel - CRFPR 14.087

Dra. Eliza H. Uemura - CRFPR 4311 - Responsável Técnica  
Dra. Ana Lucia Monteiro - CRFPR 5672

### 3. Análise enzimática

|                    | Metodologia          | Dosagem    |
|--------------------|----------------------|------------|
| Fosfatase Alcalina | Cinético AACC - 37°C | 326 U / l  |
| SGPT               | Cinético IFCC - 37°C | 6,9 U / l  |
| SGOT               | Cinético IFCC - 37°C | 27,9 U / l |

### 4. Análise física

|              |                                     |                                 |
|--------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| Osmolaridade | 240 - 340 mOsm / KgH <sub>2</sub> O | 304,2 mOsm / KgH <sub>2</sub> O |
|--------------|-------------------------------------|---------------------------------|

### 5. Análise em culturas celulares "IN VITRO"

Linhagens celulares utilizadas: Vero (ATCC CCL - 81) células de rim de macaco verde africano, Hep 2 (ATCC CCL - 23) células de carcinoma de laringe humana.

Resultado: a eficiência de crescimento da amostra de soro Fetal Bovino foi avaliada na concentração de 10% em meio de Eagle no cultivo das linhagens celulares Hep 2 e Vero. Após 4 repiques consecutivos observamos que o número de células triplicou a cada 72 horas. Não foi observado efeito citopático.

### 6. Controle de esterilidade

72 horas em temperatura de 35 a 37°C: ausência de microorganismos.

30 dias em temperatura de 25 a 30°C: ausência de microorganismos.

### 7. Pesquisa de micoplasma

Ausência de micoplasma (testado em U10, MLA e A7).

### 8. Conclusão:

O desempenho do lote analisado foi considerado em conformidade com o esperado frente aos quesitos acima apresentados, sendo portanto considerado **Aprovado para uso**.

OB8: Produto destinado ao uso diagnóstico IN VITRO.

Este certificado antes de ser digitado e impresso foi conferido e aprovado pelo Supervisor do Laboratório de Controle de Qualidade, Melissa S. Romanel - CRFPR 14.087

Produto certificado segundo a Norma ISO 15486

Certificação em Boas Práticas de Fabricação e Controle pela ANVISA

Participante do Programa de Excelência para Laboratórios Médicos da SBPC (Sociedade Brasileira de Patologia Clínica)

Participante do Programa Nacional de Controle de Qualidade da SBAC (Sociedade Brasileira de Análises Clínicas)

R. Cassimiro de Abreu, 521  
CEP 83321-210 Pinhais/PR

SAC 0800 - 410 - 027  
Home page [www.laborclin.com.br](http://www.laborclin.com.br)  
e-mail: [sac@laborclin.com.br](mailto:sac@laborclin.com.br)

C.G.C. 26.619.113/0001-31  
Inscrição Estadual 13.700.129-26  
Reg. ANVISA 100370

Página 2 de 2 Data: 11/9/2007