

CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS ISOLADOS A PARTIR DE OVÁRIOS DE VACAS ZEBUÍNAS (*Bos taurus indicus*)

Grazieli Marinheiro Machado¹, Christiani Andrade Amorim²,
Sônia Nair Bão³, Carolina Madeira Lucci⁴

RESUMO

Dentre as biotecnologias da reprodução, a manipulação de folículos pré-antrais tem sido vista como uma alternativa para a preservação de gametas femininos, uma vez que possibilita o isolamento e o cultivo de um grande número de ovócitos. Assim, o presente estudo teve por objetivo avaliar o crescimento *in vitro* de folículos isolados a partir de ovários de vacas zebuínas. Os folículos foram isolados mecanicamente e cultivados por 4 dias utilizando-se o meio Waymouth MB 752/1 suplementado com piruvato, l-glutamina, hipoxantina, insulina, transferrina, selênio, ácido ascórbico, soro fetal bovino e eCG. Após o período de cultivo, os folículos passaram de $61,0 \pm 18,5$ (D0) para $86,2 \pm 29,6$ mm (D4) de diâmetro. Dos 78 folículos pré-antrais analisados 83,5% apresentavam-se morfológicamente normais no último dia de cultivo, enquanto 11,5% mostravam-se degenerados e 5% rompidos. Um total de 23 folículos foi processado para análise por microscopia de luz. Pela observação de figuras mitóticas constatou-se que 47,8% dos folículos apresentavam proliferação das células da granulosa. Em conclusão, este estudo mostrou que folículos pré-antrais isolados a partir de ovários de vacas zebuínas podem crescer *in vitro*.

Palavras-chave: Crescimento folicular, proliferação celular, células da granulosa, bovino.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a manipulação de folí-

culos pré-antrais tem recebido atenção da comunidade científica. Dentre os procedimentos empregados nesta biotécnica citam-se o isolamento folicular e o cultivo *in vitro*, que podem ser utilizados como uma alternativa para a multiplicação de animais de elevado valor genético, bem como daqueles em via de extinção.

A população de folículos pré-antrais é vasta em todas as fêmeas mamíferas, correspondendo a cerca de 90% da população total de folículos presentes no ovário (SAUMANDE, 1991). Especificamente em vacas, o número de folículos pré-antrais em um único ovário foi estimado em 130.000 para raças européias (ERICKSON, 1966) e 70.500 para zebuínas (LUCCI et al., 2002). No entanto, apesar da grande população de folículos ovarianos 99% deles não chegam a ovular, mas morrem por atresia (SAUMANDE, 1991). A atresia, apesar de ser um processo natural reduz significativamente o potencial reprodutivo da fêmea. A fim de proteger o maior número possível de folículos, antes que sejam atingidos pela atresia faz-se necessário retirá-los do ambiente ovariano e cultivá-los *in vitro*. Um método bastante eficiente para o isolamento consiste na utilização do *tissue chopper*, que proporciona 93,5% de folículos pré-antrais morfológicamente normais após isolamento e análise por microscopia de luz (LUCCI et al., 2002).

Com relação ao cultivo *in vitro*, apesar de estar sendo estudado em diferentes espécies animais há relato de desenvolvimento completo *in vitro* apenas em camundongos (EPPIG; O'BRIEN., 1996). Em bovinos, os primeiros estudos sobre cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais ocorreram na

¹ Acadêmica. Curso de Medicina Veterinária, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília/UnB.

² Médica Veterinária. Pesquisadora Associada/Bolsista PRODOC CAPES. Doutora. Departamento de Genética e Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas/IB, UnB.

³ Bióloga. Professora Titular. Doutora. Departamento de Biologia Celular, IB, UnB.

⁴ Médica Veterinária. Professora Adjunta. Doutora. Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, C.P. 04508 CEP 70910-970, Brasília – DF – cmlucci@unb.br

década de 90 (FIGUEIREDO et al., 1994; NUTTINCK et al., 1996; KATSKA; RYNSKA, 1998). Alguns autores testaram com sucesso o efeito de fatores de crescimento e hormônios no desenvolvimento folicular (HULSHOF et al., 1995; NUTTINCK et al., 1996; WANDJI et al., 1996; GUTIERREZ et al., 2000; TELFER et al., 2000), e a adição de substâncias nutritivas e anti-oxidantes ao meio de cultivo, tais como ácido ascórbico, piruvato, glutamina, hipoxantina, transferrina e selênio (FIGUEIREDO et al., 1994; KATSKA et al., 2000; SAHA et al., 2000; THOMAS et al., 2001) é uma constante. O melhor resultado relatado na espécie bovina até o momento foi a formação de antro (GUTIERREZ et al., 2000; ITOH et al., 2002). É importante ressaltar que os animais utilizados nos trabalhos citados eram de raças européias.

É bem sabido que existem diferenças entre bovinos europeus e zebuínos no tocante à reprodução, incluindo aspectos relacionados à dinâmica folicular (FIGUEIREDO et al., 1995) e às características quali- quantitativas da população folicular (VETROMILA et al., 1995). No Brasil, os bovinos zebuínos ocupam uma larga faixa do rebanho de corte (CRUDELI et al., 1991) e por isso há um grande interesse em otimizar a reprodução e a produção desses animais tão importantes para a economia do país. Assim, o presente estudo teve como objetivo testar um método de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais em vacas zebuínas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Utilizou-se ovários de vacas zebuínas provenientes de um abatedouro local, os quais foram coletados imediatamente após o abate e imersos em solução fisiológica. Transportados ao laboratório à temperatura de 30-34°C, lavados em álcool 70% e submetidos a dois banhos sucessivos em solução salina. Puncionaram-se os folículos antrais e eventuais corpos lúteos e albicans retirados.

O procedimento utilizado para isolar os folículos ovarianos pré-antrais foi baseado no método descrito por Lucci et al. (2002), que consiste resumidamente em: 1) corte do tecido ovariano em pequenos fragmentos com auxílio do *tissue chopper*^a regulado para a realização de cortes seriados a

intervalos de 125 µm; 2) dissociação mecânica dos fragmentos obtidos utilizando-se pipetas Pasteur de 1600 e 600 µm de diâmetro, e 3) separação mecânica dos folículos isolados do restante dos fragmentos ovarianos com auxílio de filtros de náilon de 500 e 100 µm.

A suspensão de folículos em solução de tampão fosfato-salina (PBS) resultante deste processo foi levada ao microscópio invertido para análise e seleção dos folículos a serem colocados em cultivo. Folículos primários e secundários que se apresentavam intactos e sem sinais de degeneração visíveis após o isolamento foram selecionados e 78 colocados em cultivo.

O meio de cultivo consistiu de Waymouth MB 752/1^b suplementado com piruvato^b (0,23 mM), l-glutamina^b (2 mM), hipoxantina^b (2 mM), ITS^b (insulina, transferrina e selênio – 6,25 µg/ml, 6,25 µg/ml, 6,25 ng/ml), ácido ascórbico^b (100 µg/ml), penicilina^b (100 µg/ml), estreptomicina^b (50 µg/ml), 5% de soro fetal bovino^c e 10 mUI de eCG^d.

Os folículos selecionados foram cultivados por 4 dias em uma matriz tridimensional de gel de colágeno Tipo I^e, em placas de 4 poços, em estufa a 38 °C com atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ em ar. O meio de cultivo foi substituído por meio fresco a cada 48 horas.

A avaliação dos folículos ovarianos ocorreu a cada 2 dias sendo seus diâmetros medidos (aumento de 500x) e classificados como saudáveis ou em degeneração (folículos escuros e disformes) de acordo com sua aparência morfológica. No 4º dia 23 folículos foram processados para avaliação por microscopia de luz.

Para a avaliação por microscopia de luz foi utilizada a técnica de histo-resina. Os folículos fixados (em grupos de 3 ou 4) em paraformaldeído a 4% em PBS por 1 hora a 37 °C, desidratadas em concentrações crescentes de álcool e embebidas em resina plástica^f. Os blocos de resina seccionados à espessura de 2-3 µm e os cortes contendo folículos corados com azul de toluidina.

Os dados de diâmetro folicular nos Dias 0, 2 e 4 foram submetidos à Análise de Variância e as médias comparadas pelo teste PLSD de Fisher. A porcentagem de folículos degenerados e rompidos foi comparada à porcentagem de folículos nor-

^a The Mickle Laboratory Engineering Co, Gomshal, Surrey, England.

^b Sigma Chemical Co. St.Louis, MO, USA.

^c Gibco BRL, Rockville, MD, USA.

^d Novormon, Tecnopec, São Paulo, SP.

^e Vitrogen, Cohesion, Palo Alto, CA, USA.

^f Immuno-bed Kit, Polysciences, Warrington, PA, USA.

mais pelo teste do Qui-quadrado. Fez-se as análises pelo programa Stat-View (Windows) e consideradas significativas quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

Os folículos pré-antrais apresentaram diâmetro médio de $61,0 \pm 18,5 \mu\text{m}$ no D0, $77,8 \pm 23,1$

μm no D2, e $86,2 \pm 29,6 \mu\text{m}$ no D4 (Figura 1). Dos 78 folículos pré-antrais analisados, 83,5% manifestavam-se morfologicamente normais no último dia de cultivo, enquanto 11,5% mostravam-se degenerados e 5%, rompidos. Considerando apenas os folículos que se apresentavam normais no D4, a taxa de crescimento folicular média foi de $15,0 \mu\text{m}$ de D0 a D2 e de $10,9 \mu\text{m}$ de D2 a D4.

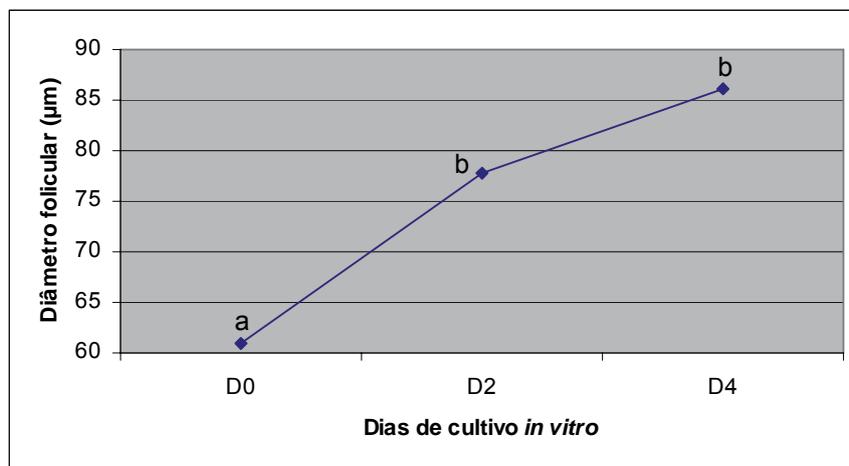


Figura 1. Crescimento folicular médio de ovário de vacas zebuínas durante os 4 dias de cultivo *in vitro*. a,b – letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,001$)

Na análise por microscopia de luz foi possível observar figuras mitóticas nas células da granulosa de 47,8% (11/23) dos folículos ovarianos cultivados por 4 dias (Figura 2), indicando proliferação celular. O núcleo do ovócito pode ser visua-

lizado apenas em alguns folículos analisados (Figura 3). Este fato pode ter ocorrido devido a problemas durante a realização dos cortes histológicos, levando a uma perda dos cortes contendo os ovócitos.

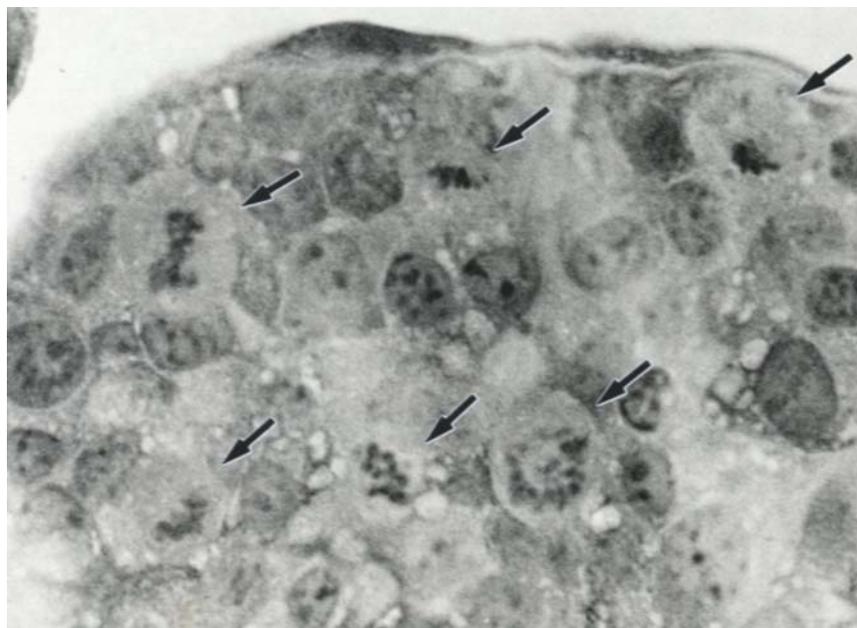


Figura 2. Imagens mitóticas (setas) na camada granulosa de um folículo ovárico pré-antral de vaca zebuína após 4 dias de cultivo *in vitro*. 1250x. Coloração: Azul de toluidina.

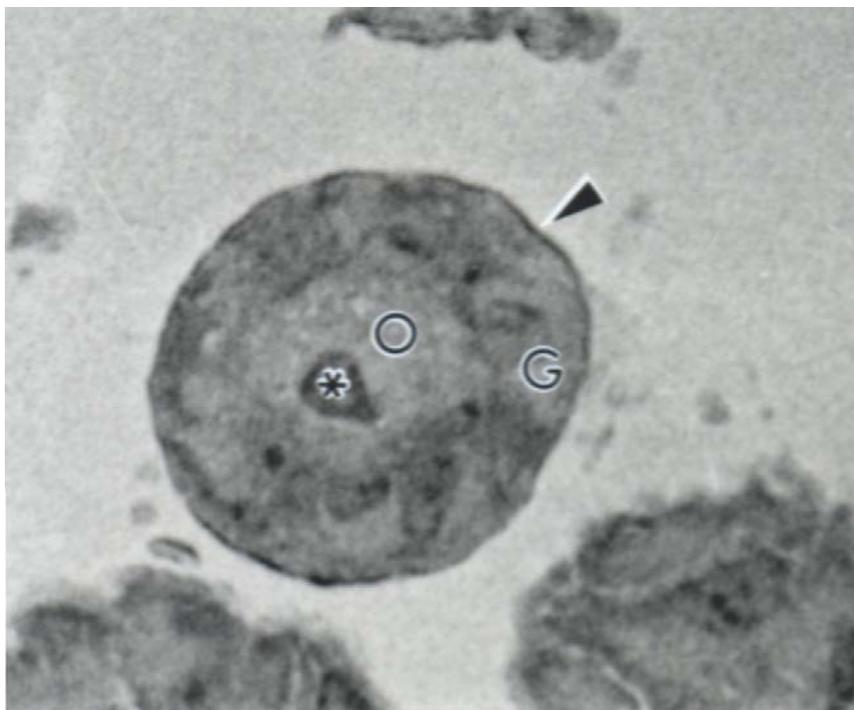


Figura 3. Folículo ovárico de vaca zebuina pré-antral morfologicamente normal após 4 dias de cultivo *in vitro*, apresentando ovócito (O) com núcleo (*), células da granulosa (G) e membrana basal (ponta de seta). 700x. Coloração: Azul de toluidina.

DISCUSSÃO

No presente estudo observou-se o crescimento de folículos pré-antrais de ovários zebuínos cultivados *in vitro* por 4 dias. De acordo com Figueiredo et al. (1994), o aumento do diâmetro folicular pode ser causado pelo crescimento do ovócito e/ou pela multiplicação das células da granulosa. Na investigação proposta foi constatada a presença de figuras mitóticas nas células da granulosa, o que leva a crer que o crescimento observado foi devido à proliferação destas células. Este dado está de acordo com Braw-Tal; Yossefi (1997), os quais relataram que enquanto o crescimento de folículos antrais se deve principalmente à aquisição e expansão da cavidade antral, o crescimento de folículos pré-antrais está relacionado sobretudo ao aumento do número de células da granulosa.

Nos espécimes estudados os folículos pré-antrais (61mm) foram cultivados *in vitro* em presença de gonadotrofina coriônica equina (eCG), e apresentaram aumento de diâmetro e proliferação das células da granulosa. Apesar das gonadotrofinas não serem indispensáveis para ativar o folículo primordial (BRAW-TAL; YOSSEFI, 1997), tornam-se cada vez mais necessárias nos estágios posteriores de desenvolvimento folicular e a sua adição no meio de cultivo tem favorecido o crescimento

dos folículos pré-antrais *in vitro*. Saha et al. (2000) avaliaram o efeito do FSH, só ou em associação com EGF, e relataram o crescimento de pequenos folículos pré-antrais bovinos (40, 60 e 80mm) durante 10 dias de cultivo *in vitro*. Outros estudos também mostraram que o uso de FSH levou ao desenvolvimento folicular e surgimento do antro quando somado a insulina e LH (ITOH et al., 2002) ou a EGF e IGF-I (GUTIERREZ et al., 2000), porém, tais autores submeteram os folículos a longos períodos de cultivo (28 e 13 dias, respectivamente). Os resultados de Gutierrez et al. (2000) e Itoh et al. (2002) foram os melhores obtidos até o presente momento para bovinos, relatando o aparecimento de cavidade antral em folículos pré-antrais cultivados *in vitro*. No entanto, todos os estudos referentes ao cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais bovinos disponíveis na literatura foram realizados com raças européias, e relatos sobre o cultivo de folículos pré-antrais zebuínos ainda são escassos.

A suplementação do meio de cultivo com substâncias tais como ácido ascórbico, hipoxantina, l-glutamina, piruvato, insulina, transferrina e selênio também têm favorecido o crescimento folicular. Katska; Rynska (1998) testaram o cultivo de folículos na presença ou na ausência de algumas dessas substâncias e relataram que o crescimento, bem como a sobrevivência folicular foram negativamente

afetados quando o meio não era suplementado. Katska et al. (2000) relataram que o meio contendo insulina, transferrina, piruvato, hipoxantina, l-glutamina, FSH e estradiol 17 β permitia o crescimento do ovócito em até 14 dias de cultivo. Figueiredo et al. (1994) também obtiveram resultados semelhantes quando adicionaram insulina, transferrina, selênio, piruvato, hipoxantina e l-glutamina ao meio. Thomas et al. (2001) testaram a ação do ácido ascórbico em meio sem soro e relataram um aumento no número de folículos pré-antrais intactos e uma diminuição na porcentagem de degeneração das células da granulosa e da teca.

Os resultados obtidos na presente investigação científica estão de acordo com os trabalhos anteriormente citados, onde a suplementação do meio com hipoxantina, l-glutamina, piruvato, insulina, transferrina, selênio e ácido ascórbico supriu as necessidades dos folículos isolados e cultivados e proporcionou o desenvolvimento folicular com uma baixa taxa de degeneração.

CONCLUSÃO

Observou-se que folículos ováricos, pré-antrais isolados de vacas zebrúinas cresceram durante os 4 dias de cultivo *in vitro*, apresentando proliferação das células da granulosa e baixa taxa de degeneração.

In vitro culture of preantral follicles isolated from ovaries of Zebu cows (Bos taurus indicus)

ABSTRACT

Among the reproduction biotechnologies, manipulation of preantral follicles has been an alternative biotechnique to preserve female gametes, since it allows isolation and culture of a great number of oocytes enclosed in preantral follicles. Therefore, the present study aimed to evaluate *in vitro* growth of isolated preantral follicles from Zebu cow ovaries. The follicles were mechanically isolated and cultured for 4 days using Waymouth MB 752/1 medium supplemented with sodium pyruvate, l-glutamine, hypoxanthine, insulin, transferrin, selenium, ascorbic acid, fetal calf serum and eCG. After *in vitro* culture, follicles grew from 61.0 \pm 18.5 mm (D0) to 86.2 \pm 29.6 mm (D4). Of the 78 analysed follicles, 83.5% were morphologically normal in the last day of culture (D4) while only 11.5% were degenerated and 5% were ruptured. A total of 23 follicles were evaluated by light microscopy. Obser-

vation of mitotic figures demonstrates that 47,8% of the follicles presented granulosa cell proliferation. In conclusion, this study shows that isolated preantral follicles from Zebu cow ovaries can grow *in vitro*. In the future, this technique can guarantee a culture system where it will be possible to obtain a better utilization of female germinative cells, since preantral follicles are in great amount in the ovaries.

Keywords: Follicular growth, cell proliferation, granulosa cells, bovine.

REFERÊNCIAS

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

CRUDELI, G.A.; FONSECA, V.O.; COSTA E SILVA, E.; HERMANN, A. Efeito das características seminais e circunferência escrotal sobre a fertilidade de touros da raça Nelore. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 15, n. 3-4, p. 125-131, 1991.

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

ERICKSON, B.H. Development and senescence of postnatal bovine ovary. **J. Anim. Sci.**, v.25, p. 800-805, 1966.

FIGUEIREDO, J.R.; HULSHOF, S.C.J.; VAN DEN HURK, R.; NUSGENS, B.; BEVERS, M.M., ECTORS, F.J.; BECKERS, J.F. Preservation of oocyte and granulosa cell morphology in bovine preantral follicles cultured *in vitro*. **Theriogenology**, v. 41, p. 1333-1346, 1994.

FIGUEIREDO, R.A.; BARROS, C.M.; ROCHA, G.P.; PAPA, F.O. Prevalência de duas ondas de crescimento folicular ovariano em raças Nelore. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 19, n. 3-4, p. 200-211, 1995.

GUTIERREZ, C.G.; RALPH, J.H.; TELFER, E.E.; WILMUT, I.; WEBB, R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. **Biol. Reprod.**, v. 62, n. 5, p. 1322-1328, 2000.

HULSHOF, S.C.J.; FIGUEIREDO, J.R.; BECKERS, J.F.; DIJISKA, G.; BEVERS, M.M.; VAN DEN HURK,

R. Effects of human recombinant FSH and 17 β estradiol on bovine preantral follicles in vitro. **Theriogenology**, v. 44, p. 217-226, 1995.

ITOH, T.; KACCHI, M.; ABE, H.; SENDAI, Y.; HO-SHI, H. Growth, antrum formation, and estradiol production of bovine preantral follicles cultures in a serum-free medium. **Biol. Reprod.**, v. 67, n. 4, p. 1099-1105, 2002.

KATSKA, L.; ALM, H.; RYNSKA, B. Nuclear configuration of bovine oocytes from fresh and in vitro-cultured preantral and early antral ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 54, n. 2, p. 247-260, 2000.

KATSKA, L.; RYNSKA, B. The isolation and in vitro culture of bovine preantral and early antral follicles of different size classes. **Theriogenology**, v. 50, n. 2, p. 213-222, 1998.

LUCCI, C.M.; RUMPF, R.; FIGUEIREDO, J.R.; BÃO, S.N. Zebu (*Bos indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of an efficient isolation method. **Theriogenology**, v. 57, n. 5, p. 1467-1483, 2002.

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

SAHA, S.; SHIMIZU, M.; GESHI, M.; ISAIKE, Y. In vitro culture of bovine preantral follicles. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 63, n. 1-2, p. 27-39, 2000.

SAUMANDE, J. La folliculogénèse chez les ruminants. **Rec. Med. Vét.**, v. 167, n. 3/4, p. 205-218, 1991.

TELFER, E.E.; BINNIE, J.P.; McCAFFERY, F.H.; CAMPBELL, B.K. In vitro development of oocytes from porcine and bovine primary follicles. **Mol. Cell. Endocr.**, v. 163, n. 1-2, p. 117-123, 2000.

THOMAS, F.H.; LEASK, R.; SRSEN V.; RILEY, S.C.; SPEARS, N.; TELFER, E.E. Effect of ascorbic acid on health and morphology of bovine preantral follicles during long-term culture. **Reproduction**, v. 122, n. 3, p. 487-495, 2001.

VETROMILA, M.A.M.; FERREIRA, A.M.; DE SÁ, W.F. Observações qualitativas e quantitativas na população de folículos de bovinos mestiços Holandês/Zebu. **Rev. Bras. Reprod.**, v. 19, n. 3-4, p. 165-172, 1995.

WANDJI, S.A.; EPPIG, J.J.; FORTUNE, J.E. FSH and growth factors affect the growth and endocrine function *in vitro* of granulosa cells of bovine preantral follicles. **Theriogenology**, v. 45, p. 817-832, 1996.