

CAROLINA RODRIGUEZ JIMENEZ

**EFEITO DOS MEIOS BÁSICOS DE CULTIVO, IGF-1 E GH, NO
DESENVOLVIMENTO IN VITRO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS
BOVINOS INCLUSOS EM TECIDO OVARIANO**

Tese apresentada à Universidade Federal
de Viçosa, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia, para obtenção do título de
Doctor Scientiae.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2014

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

R696e
2014

Rodriguez Jimenez, Carolina, 1983-
Efeito dos meios básicos de cultivo, IGF-1 e GH no
desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais bovinos
inclusos em tecido ovariano / Carolina Rodriguez Jimenez. –
Viçosa, MG, 2014.
xvii, 76f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Ciro Alexandre Alves Torres.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Biotecnologia. 2. Bovinos. 3. Folículo pré-antral.
4. Foliculogênese. 5. Ovário *in situ*. 6. *in vitro*. I. Universidade
Federal de Viçosa. Departamento de Zootecnia. Programa de
Pós-graduação em Zootecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 660.6

CAROLINA RODRIGUEZ JIMENEZ

**EFEITO DOS MEIOS BÁSICOS DE CULTIVO, IGF-1 E GH, NO
DESENVOLVIMENTO IN VITRO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS
BOVINOS INCLUSOS EM TECIDO OVARIANO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de Doctor Scientiae.

APROVADA: 26 de fevereiro de 2014.

Mariana Machado Neves

José Domingos Guimarães

Valdevane Rocha Araújo
(Coorientadora)

Carlos A. de Carvalho Fernandes

Ciro Alexandre Alves Torres
(Orientador)

À minha querida mãe, Yolanda Jimenez de Rodriguez, principal responsável pela minha vida e a quem devo minha dedicação e disciplina ao trabalho.

Aos meus irmãos, Angelica Maria e José Antonio Rodriguez Jimenez, que sempre me apoiaram e confiaram em minha capacidade e me acompanharam na distância.

Aos meus amados sobrinhos, Emely, Amy e Enoc, como exemplo e guia do futuro cheio de sucesso que os espera.

Ao meu querido esposo, Eric Victor, pelo carinho, apoio e guia indispensável para quem decidiu trilhar novos caminhos.

Sem vocês nenhuma conquista valeria a pena.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo o que tenho na minha vida e por ter me dado força e coragem para alcançar meus objetivos e continuar lutando por eles.

À minha mãe, Yolanda Jimenez de Rodriguez, por estar sempre presente me incentivando, apoiando e orientando em todos os momentos. Obrigada por nunca ter me faltado quando eu precisei e por todo o amor e toda a dedicação.

À Universidade Federal de Viçosa, em especial ao Departamento de Zootecnia, pela oportunidade de realização deste curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudo e pelo apoio financeiro aos meus experimentos.

Ao professor Ciro Alexandre Alves Torres, pela oportunidade de ter sido meu orientador, por ter acreditado em mim, pelos ensinamentos, pela convivência, pelos conselhos e pelas sugestões.

À Jovana, ao Renata, ao Erly, à Adriana, à Juliana e ao Jurandy, pelo incondicional auxílio na condução dos experimentos, nas coletas e análises laboratoriais. Pela competência, pela dedicação e pelo compromisso profissional, minha grande gratidão!

À toda a equipe do laboratório de Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Pré-Antrais (LAMOFOPA), da Universidade Estadual de Ceará, pelos bons ensinamentos que enriqueceram meu aprendizado profissional.

Aos funcionários dos Departamentos de Zootecnia e Veterinária, pela colaboração e convivência tão agradável durante estes anos.

Aos Laboratórios de Infectologia Molecular Animal, Histologia e Biologia e Controle de Hematozoários, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde (CCB-UFV), pelo apoio durante a realização dos experimentos.

Aos meus amigos colombianos que fizeram esta caminhada mais acolhedora. Obrigada pela convivência e por ajudar a fazer esta estadia mais feliz longe do meu País.

BIOGRAFIA

CAROLINA RODRIGUEZ JIMENEZ, filha de Yolanda Jimenez de Rodriguez e Jesus Antonio Rodriguez Pineda, nasceu em 24 de fevereiro de 1983, em Cali, Valle, Colômbia.

Em 20 de outubro de 2006, graduou-se em Zootecnia pela Universidade de Cundinamarca, em Fusagasuga, Cundinamarca, Colômbia.

Em março de 2008, iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós-graduação em Zootecnia, na área de Reprodução Animal, na Universidade Federal de Viçosa (UFV), sendo orientada pelo prof. Ciro Alexandre Alves Torres, obtendo seu título em fevereiro de 2010.

Em fevereiro de 2010, ingressou no curso de Doutorado do Programa de Pós-graduação em Zootecnia, na área de Fisiologia e Reprodução Animal na Universidade Federal de Viçosa (UFV), sob a mesma orientação e concluindo-o em fevereiro de 2014.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	Xvi
INTRODUÇÃO GERAL	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	5
CAPÍTULO 1.....	9
MORFOLOGIA, MORFOMETRIA E VIABILIDADE DE FOLÍCULOS PRÉ- ANTRAIS BOVINOS AFETADAS PELOS MEIOS DE CULTIVO DE BASE.....	9
Resumo.....	9
Introdução.....	10
Material e métodos.....	11
Origem, coleta e transporte de ovários	11
Meios de cultivo	12
Processamento histológico	12
Análise morfológica e morfométrica de folículos pré-antrais bovinos	13
Análise de viabilidade	13
Análise estatística	14
Resultados	14
Morfologia e viabilidade de folículos ovarianos pré-antrais bovinos cultivados in situ em α -MEM ⁺ , TCM-199 ⁺ e McCoy's ⁺	14
Morfometria de folículos ovarianos pré-antrais bovinos cultivados in situ em α - MEM ⁺ , TCM-199 ⁺ e McCoy's ⁺	18
Diferenças presentes nos α -MEM, TCM-199 e McCoy's.....	19
Discussão.....	21
Conclusão.....	24
Agradecimentos	24
Referências	24

Página

CAPÍTULO 2	29
OS EFEITOS DO IGF-1 E GH SOBRE O CULTIVO IN VITRO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS BOVINOS SÃO DOSE DEPENDENTE.....	29
Resumo.....	29
Introdução.....	30
Material e métodos.....	32
Fonte de ovários	32
Protocolo experimental	32
Análise morfológica e avaliação in vitro do desenvolvimento folicular.....	33
Avaliação da viabilidade do folículo pré-antral isolado pós-cultivo in situ.....	34
Análise estatística	35
Resultados	35
Experimento 1 – Efeito de diferentes concentrações do IGF-1 sobre o cultivo in vitro de folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano bovino	35
Experimento 2 – Efeito de diferentes concentrações do GH sobre o cultivo in vitro de folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano bovino	40
Discussão.....	45
Fator de crescimento semelhante à insulina1 (IGF-1)	45
Hormônio do crescimento (GH).....	47
Conclusões	49
Agradecimentos	49
Referências	49
CAPÍTULO 3	55
MEIO SEQUENCIAL COM GH E IGF-1 MELHORA O DESENVOLVIMENTO IN VITRO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS BOVINOS INCLUSOS NO TECIDO OVARIANO	55
Resumo.....	55
Introdução.....	56
Material e métodos.....	58
Preparação de tecidos	58
Cultivo in vitro de fragmentos ovarianos bovinos.....	58
Avaliação histológica de folículos pré-antrais	58
Viabilidade de folículos pré-antrais bovinos isolados	60
Análise estatística	60

Resultados	61
Discussão.....	67
Conclusão	71
Referências	71
CONCLUSÃO GERAL	76

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

1	Organograma do protocolo experimental. Frag = fragmentos; d = dia; M* = melhor meio-base determinado; e ** o α -MEM apresenta na sua composição original.....	12
2	Folículos pré-antrais bovinos não cultivados (controle) (a,b) e cultivados após um e sete dias na presença de α -MEM ⁺ (c,d); TCM-199 ⁺ (e,f) e meio McCoy's ⁺ (g,h), respectivamente. o = oócito; n = núcleo; CG = células da granulosa; FP = folículo primordial; FPa = folículo primário; e FS = folículo secundário. Ampliação 400X; PAS-hematoxilina	15
3	Folículos pré-antrais bovinos isolados mecanicamente antes do controle (a,b) e após um (c,d) ou sete (e,f) dias de cultivo em α -MEM ⁺ , corados com azul de tripan (mortos) não corados (vivos).....	17
4	Aminoácidos presentes no meio essencial mínimo (α -MEM-●), meio de cultivo de tecido (TCM-199-○) e meio McCoy's (McCoy's-▼) 199.....	19
5	Vitaminas presentes no meio essencial mínimo (α -MEM-●), meio de cultivo de tecido (TCM-199-○) e meio McCoy's (McCoy's-▼) 199	21

CAPÍTULO 2

1	Organograma do protocolo experimental do experimento1 (IGF-1) e 2 (GH). M* = meio base-padrão (α -MEM ⁺); D1 = dia 1; e D7 = dia 7	33
2	Percentagem de folículos pré-antrais bovinos normais (a) e viáveis (b) do controle e após um e sete dias de cultivo in vitro em α -MEM ⁺ suplementado com IGF-1 (0, 30, 70 e 100 ng/mL). * Diferença com o tratamento-controle (P < 0,05); ^{a,b} Letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos (P < 0,05); ^{A,B} Letras maiúsculas indicam diferença entre os dias de cultivo (P < 0,05)	36
3	Percentagem de folículos pré-antrais bovinos primordiais (a) e em desenvolvimento (b) do controle e após um e sete dias de cultivo in vitro em α -MEM ⁺ suplementado com IGF-1 (0, 30, 70 e 100 ng/mL). * Diferença com o tratamento-controle (P < 0,05); ^{a,b} Letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos (P < 0,05); ^{A,B} Letras maiúsculas indicam diferença entre os dias de cultivo (P < 0,05).....	37

4	Folículos pré-antrais bovinos não cultivados (controle fresco, a,b = primordiais e secundário) e depois de um e sete dias de cultivo em α -MEM ⁺ com: 0 ng/mL de IGF-1 (c,d = primordiais); 30 ng/mL de IGF-1 (e,f = primordial e primário); 70 ng/mL de IGF-1 (g,h = primordial e primário) e 100 ng/mL de IGF-1 (i,j = primordial e primário). Folículos degenerados com retração oocitária (seta branca), retração das células da granulosa (seta preta), células da granulosa desorganizadas (CGD) e núcleo picnótico (np). O = oócito; n = núcleo; CG = células da granulosa. Ampliação 400X; PAS-hematoxilina	38
5	Folículos pré-antrais bovinos mecanicamente isolados avaliados por microscopia de luz. Controle (a = primordial viável) e folículos isolados após sete dias de cultivo in situ em α -MEM ⁺ com: 0 ng/mL de IGF-1 (b,c = primordial viável, secundário não viável); 30 ng/mL de IGF-1 (d,e = primordial viável, secundário não viável); 70 ng/mL de IGF-1 (f,g = primordial viável e não viável); e 100 ng/mL de IGF-1 (h,i = primordial viável e secundário não viável. Corados com azul de Tripán (mortos) não corados (vivos)	39
6	Porcentagem de folículos pré-antrais morfolologicamente normais (a) e viáveis (b). Não cultivado (controle) e após um e sete dias de cultivo in vitro em α -MEM ⁺ com GH (0, 10, 25 e 50 ng/mL). * Diferença significativa com o tratamento-controle (P < 0,05); ^{a,b} Letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos (P < 0,05); e ^{A,B} Letras maiúsculas indicam diferença entre os dias de cultivo (P < 0,05)	40
7	Porcentagem de folículos pré-antrais primordiais (a) e em desenvolvimento (b). Não cultivado (controle) e após um e sete dias de cultivo in vitro em α -MEM ⁺ com GH (0, 10, 25 e 50 ng/mL). * Diferença significativa com o tratamento controle (P < 0,05); ^{a,b} Letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos (P < 0,05); e ^{A,B} Letras maiúsculas indicam diferença entre os dias de cultivo (P < 0,05)	42
8	Folículos pré-antrais bovinos não cultivados (controle, a,b = primário e secundário) e depois de um e sete dias de cultivo em α -MEM ⁺ com 0 ng/mL de GH (c,d; primordiais); 10 ng/mL de GH (e, f = primordiais e primário); 25 ng/mL de GH (g,h; primordial e primários); e 50 ng/mL de GH (i,j = primordiais e secundário). Folículos degenerados com retração oocitária (seta branca), células da granulosa desorganizadas (CGD), vacúolos (v) e núcleo picnótico; o = oócito; n = núcleo; CG = células da granulosa. Ampliação 400X, PAS- hematoxilina.....	43
9	Folículos pré-antrais bovinos mecanicamente isolados e avaliados por microscopia de luz. Controle (a = primordial viável) e folículos isolados após sete dias de cultivo in situ em α -MEM ⁺ com: 0 ng/mL de GH (b,c = primário viável e não viável); 10 ng/mL de GH (d,e = primordial viável, primário não viável); 25 ng/mL de GH (f,g = secundário viável e não viável) e 50 ng/mL de GH (h,i = primário viável e secundário não viável. Corados com azul de Tripán (mortos); e não corados (vivos)	44

CAPÍTULO 3

1	Protocolo experimental para o cultivo in vitro de folículos pré-antrais bovinos em meio contendo hormônio do crescimento (GH) e fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1). α -MEM ⁺ = meio essencial mínimo suplementado (JIMENEZ et al., 2013).....	59
2	Organograma do protocolo experimental do meio sequencial GH e, ou, IGF-1 no cultivo in situ de folículos pré-antrais bovinos. α -MEM ⁺ = meio essencial mínimo suplementado (JIMENEZ et al., 2013)	60
3	Cortes histológicos de folículos pré-antrais bovinos não cultivados (controle fresco) (A) e cultivados após um, sete e 14 dias, respectivamente na presença de α -MEM ⁺ (B); GH→IGF-1 (C); IGF-1→GH (D); e GH+IGF-1 (E). Folículos degenerados com retração oocitária (seta branca); retração das células da granulosa (seta preta pontilhada); células da granulosa desorganizadas (CGD); e núcleo picnótico (np). o = oócito; n = núcleo; CG = células da granulosa; FP = folículo primordial; FPa = folículo primário; e FS = folículo secundário. Ampliação 400X; PAS-hematoxilina	63
4	Folículos pré-antrais bovinos isolados mecanicamente, não cultivados (controle fresco) (A) e cultivados após um, sete e 14 dias, respectivamente com α -MEM ⁺ (B); GH→IGF-1(C); IGF-1→GH (D); e GH+IGF-1 (E). Coradas com azul de Tripan, (morto); e não corado (vivo)	64

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

1	Folículos morfológicamente normais (média $\pm$ erro-padrão da média) e folículos viáveis(%) cultivados em α -MEM ⁺ , TCM-199 ⁺ e meio McCoy's ⁺ durante um e sete dias.....	16
2	Folículos primordiais e em desenvolvimento (média $\pm$ erro-padrão da média cultivados em α -MEM ⁺ , TCM-199 ⁺ e meio McCoy's ⁺ durante um e sete dias.....	17
3	Média $\pm$ erro-padrão do diâmetro folicular/oocitário em micrômetros (μ m) de folículos pré-antrais bovinos cultivados no α -MEM ⁺ , TCM-199 ⁺ e meio McCoy's ⁺ durante um e sete dias	18

CAPÍTULO 2

1	Média $\pm$ erro-padrão da média do diâmetro folicular/oocitário em micrômetros (μ m) de folículos pré-antrais bovinos cultivados com diferentes concentrações de IGF-1	39
2	Média $\pm$ erro-padrão da média do diâmetro folicular/oocitário em micrômetros(μ m) de folículo pré-antrais bovinos cultivados em diferentes concentrações de GH	44

CAPÍTULO 3

1	Percentagens (média $\pm$ EP) de folículos pré-antrais morfológicamente normais e folículos viáveis (n = 50/%) em tecido não cultivado (controle fresco) ou cultivado por um, sete ou 14 dias em α -MEM ⁺ , na ausência ou presença de GH e, ou, IGF-1	62
2	Percentagens (média $\pm$ EP) de folículos pré-antrais primordiais e em desenvolvimento (primários + secundários) em tecidos não cultivado (controle fresco) e tecidos cultivados por um, sete ou 14 dias em α -MEM contendo ou não GH e, ou, IGF-1.....	66
3	Morfometria de folículos pré-antrais bovinos (média $\pm$ EP) em tecidos não cultivados e cultivados durante um, sete e 14 dias em α -MEM contendo ou não GH e, ou, IGF-1.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	-	Porcentagem
µg	-	Microgramas
µl	-	Microlitros
µm	-	Micrômetros
ADP	-	Adenosina difosfato
AMP	-	Adenosina monofosfato
ANOVA	-	Análise de variância
ARN	-	Ácido ribonucleico
RNA_m	-	Mensageiro do ácido ribonucleico
ATP	-	Adenosina trifosfato
BSA	-	Albumina sérica bovina
CAPES	-	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CG	-	Células da granulosa
CGD	-	Célula da granulosa desorganizada
CNPq	-	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO₂	-	Dióxido de carbono
D0	-	Dia 0
D1	-	Dia 1
D7	-	Dia 7
EGF	-	Fator de crescimento epidermal
FAPEMIG	-	Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais
FP	-	Folículo primordial
FPa	-	Folículos primários
FS	-	Folículo secundário
FSH	-	Hormônio folículo estimulante
g/L	-	Gramas por Litro
GDF-9	-	Fator de crescimento e diferenciação – 9
GH	-	Hormônio do crescimento
GHBP	-	Proteína de ligação do hormônio do crescimento
GHR	-	Receptor do hormônio do crescimento
HEPES	-	Hidroxietilpiperazina etanossulfônico
IGFBP	-	Proteína de ligação do fator de crescimento semelhante à insulina
IGF-1	-	Fator decrescimento semelhante à insulina 1
IGF-1IR	-	Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 2
IGF-1R	-	Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1
IGFs	-	Fatores de crescimento semelhantes à insulina
JAK-2	-	Janus kinase – 2
MAP	-	Proteína ativada por mitógeno
McCoy's	-	Meio McCoy's
McCoy's⁺	-	Meio McCoy's suplementado

α-MEM	-	Meio essencial mínimo
α-MEM⁺	-	Meio essencial mínimo suplementado
MG	-	Minas Gerais
mL	-	Mililitro
MOIFOPA	-	Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Pré-antrais
N	-	Núcleo
n =	-	Número
Ng	-	Nanograma
Np	-	Núcleo picnótico
O	-	Oócito
PI3-K	-	Fosfoinositol-3-quinase
SPRD	-	Sem padrão de raça definida
STAT	-	Transdutores de sinais e ativadores de transcrição
TCM-199	-	Meio de cultivo de tecido 199
TCM-199⁺	-	Meio de cultivo de tecido 199 suplementado
UFV	-	Universidade Federal de Viçosa
vs	-	Versus
χ^2	-	Qui-quadrado

RESUMO

JIMENEZ, Carolina Rodriguez, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2014. **Efeito dos meios básicos de cultivo, IGF-1 e GH, no desenvolvimento in vitro de folículos pré-antrais bovinos inclusos em tecido ovariano.** Orientador: Ciro Alexandre Alves Torres. Coorientadores: Valdevane Rocha Araújo e José Ricardo de Figueiredo.

Os objetivos deste estudo foram (1) determinar o melhor meio-base para o cultivo de folículos pré-antrais bovinos inclusos no tecido cortical ovariano (in situ), utilizando o meio essencial mínimo (α -MEM), meio de cultivo de tecido 199 (TCM-199) e meio McCoy's (McCoy's); (2) avaliar diferentes concentrações do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) e do hormônio do crescimento (GH) no desenvolvimento dos folículos pré-antrais bovinos cultivados in situ; e (3) avaliar um meio sequencial contendo GH e, ou, IGF-1 sobre o cultivo in situ de longa duração de folículos pré-antrais bovinos. Ovários de vacas sem padrão racial definido foram coletados em abatedouros locais e transportados ao laboratório em TCM-199 suplementado com HEPES, bicarbonato de sódio, ácido pirúvico, penicilina e estreptomicina. No laboratório o córtex ovariano foi fragmentado e destinado a cultivos de curta duração (sete dias) nas fases I, II e de longa duração (14 dias) na fase III. O cultivo foi realizado em incubadora a 37 °C e 5% de CO₂ em placa de 24 poços com troca total de meio a cada dois dias. Fragmentos ovarianos não cultivados (controle) e cultivados foram processados para avaliação histológica (morfológica e morfométrica), sendo avaliados o percentual de folículos morfolologicamente normais, primordiais e em desenvolvimento (primários e secundários) além do diâmetro folicular e oocitário. Além disto, a viabilidade foi avaliada pela coloração de azul de tripan, sendo os folículos classificados como corados e não corados, mortos e vivos, respectivamente. As variáveis morfológicas e morfométricas foram submetidas à ANOVA, seguidas de comparações entre médias pelo teste de Tukey e Dunnett e as variáveis de viabilidade foram submetidas ao teste de Qui-quadrado (χ^2). Os resultados da Fase I mostraram que o α -MEM suplementado (α -MEM⁺) preservou a morfologia folicular e se destacou na análise morfométrica e de viabilidade. Consolidando os resultados obtidos na fase I, na fase II utilizou-se o α -MEM⁺ com diferentes concentrações de IGF-1 recombinante humano (0, 30, 70, 100 ng/mL) ou GH recombinante humano (0, 10, 25, 50 ng/mL), compondo os experimentos 1 e 2, respectivamente. Os resultados mostraram que os

tratamentos IGF-1(30 ng/mL) e GH (50 ng/mL) foram as concentrações mais eficientes para manter a funcionalidade morfológica e morfométrica, assim como, a viabilidade de folículos pré-antrais bovinos cultivados in situ. Na fase III, os fragmentos ovarianos foram cultivados em α -MEM⁺ na ausência ou presença de GH (50 ng/mL) e, ou, IGF-1 (30 ng/mL), adicionados da seguinte forma: (α -MEM⁺) durante 14 dias; (GH→IGF-1) GH do dia 1^o ao 7^o e IGF-1 do dia 8^o ao 14^o; (IGF-1→GH) IGF-1 do dia 1^o ao 7^o, e GH do dia 8^o ao 14^o; e (GH+IGF-1) durante 14 dias. O tratamento (GH→IGF-1) manteve o percentual de folículos morfolologicamente normais durante todo o período de cultivo, e o percentual de folículos em desenvolvimento aumentou quando comparado com o controle a fresco após sete dias de cultivo, enquanto o diâmetro folicular aumentou em ambos, dia 7 e 14 de cultivo. Portanto, conclui-se que folículos pré-antrais bovinos cultivados in situ em meio sequencial, tratados com GH→IGF-1, melhoram o desenvolvimento e o diâmetro folicular até a primeira metade do cultivo e mantêm estes parâmetros com normalidade e viabilidade até o fim do cultivo in vitro.

ABSTRACT

JIMENEZ, Carolina Rodriguez, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2014.
Effects of basic culture medium, IGF-1 and GH in development in vitro of bovine preantral follicles enclosed in ovarian tissue. Adviser: Ciro Alexandre Alves Torres.
Co-advisers: Valdevane Rocha Araújo and José Ricardo de Figueiredo.

The objectives of this study were (I) to determine the best basic culture medium for bovine preantral follicles culture enclosed in ovarian cortical tissue (in situ), using the minimum essential medium (α -MEM), tissue medium culture 199 (TCM-199) and medium McCoy's (McCoy's); (II) to evaluate different concentrations of Insulin like growth factor 1 (IGF-1) and growth hormone (GH) in the development of bovine preantral follicles in situ cultured and (III) to evaluate a sequential medium containing GH and, or, IGF-1 on long-term in situ culture of bovine preantral follicles. Ovaries of cows without defined breed standard were collected from local slaughterhouse and transported to the laboratory in TCM-199 supplemented with HEPES, sodium bicarbonate, pyruvic acid, penicillin and streptomycin. In the laboratory the ovarian cortex was fragmented and was taken for short-term cultures (7 days) on phases I, II and long-term (14 days) on phase III. The culture was performed in an incubator at 37 °C and 5 % CO₂ in a 24 well plate with complete medium exchange every 2 days. Uncultured (control) and cultured ovarian fragments were processed for histological evaluation (morphological and morphometric) and evaluated the percentage of normal morphologically follicles, primordial and developing (primary and secondary) follicles, beyond the follicular and oocyte diameter. In addition, viability was assessed by trypan blue staining, the follicles classified as being stained and unstained, dead and living, respectively. The morphological and morphometric variables were analyzed by ANOVA followed by comparisons of means by Tukey and Dunnett's test and viability variables were subjected to chi-square (χ^2) test. The results of Phase I showed that α -MEM supplemented (α -MEM⁺) preserved follicular morphology and it highlighted in morphometric and viability analysis. Consolidating the results of phase I, on phase II we used the α -MEM⁺ with different concentrations of recombinant human IGF-1 (0, 30, 70, 100 ng/mL) or recombinant human GH (0, 10, 25, 50 ng/mL), composing the experiment 1 and 2, respectively. The results showed that IGF-1 (30 ng/ml) and GH (50 ng/mL) treatments were the most effective concentration to maintain morphological and morphometric functionality, as well as the viability of in situ cultured of bovine

preantral follicles. On phase III ovarian fragments were cultured in α -MEM⁺ in the absence or presence of GH (50 ng/mL) and, or, IGF-1 (30 ng/mL) added as follows: (α -MEM⁺) for 14 days, (GH→IGF-1) GH from 1st day to 7th day and IGF-1 from 8th day to 14th day, (GH→IGF-1) IGF-1 from 1st day to 7th day, and GH from 8th day to 14th day and (GH+IGF-1) for 14 days. The treatment (GH→IGF-1) maintained the percentage of normal morphology follicles during the whole culture period and the percentage of developing follicles increased compared to fresh control after 7 days of culture, while follicular diameter increased in both 7th and 14th days of culture. Therefore, it is concluded that in situ cultured bovine preantral follicles in sequential medium treated with GH→IGF-1 improved the development and follicular diameter until the first half of the culture and kept these parameters with normality and viability until the end of in vitro culture.

INTRODUÇÃO GERAL

O início da foliculogênese nas fêmeas mamíferas ocorre na fase fetal, quando as células germinativas primordiais migram do saco vitelino para a gônada em formação, originando as oogônias, que se diferenciam em oócitos primários quando iniciam o processo de divisão meiótica ainda na vida intrauterina, o qual é interrompido em prófase da meiose I (SOTO-SUAZO; ZORN, 2005). Neste momento, os oócitos primários são colonizados pelas células da pré-granulosa, formando os folículos primordiais. Somente após o recrutamento há continuidade do desenvolvimento do folículo e da retomada da meiose, no estágio final de desenvolvimento do folículo antral (EPPIG, 2001).

O ovário dos mamíferos é constituído por milhares de folículos primordiais em estado de quiescência folicular. Ao longo da vida reprodutiva da fêmea apenas um pequeno número de folículos primordiais é estimulado a crescer (0,1%) em um processo conhecido como ativação folicular em direção à ovulação. Contudo, a grande maioria (99,9%) morre por um processo conhecido como atresia folicular (SKINNER, 2005). Apesar da alta taxa de atresia, estes folículos podem ser uma fonte valiosa para os estudos sobre o desenvolvimento in vitro de oócitos e para uma eventual produção de embriões (O'BRIEN et al., 2003). Portanto, técnicas de reprodução assistida, como a Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Pré-Antrais (MOIFOPA), têm sido desenvolvidas e aperfeiçoadas a fim de maximizar o potencial reprodutivo de fêmeas superiores e, ou, ameaçadas de extinção. A MOIFOPA visa o resgate dos folículos ovarianos pré-antrais antes de se tornarem atrésicos e cultivá-los in vitro até sua completa maturação (FIGUEIREDO et al., 2008). Desta forma, maior número de folículos pré-antrais pode ser recuperado e ter seu crescimento completo in vitro, permitindo sua utilização nas demais biotécnicas reprodutivas, como a fecundação in vitro (FIV), clonagem e transgênese.

Apesar das informações obtidas durante as últimas décadas em várias espécies, o entendimento completo dos mecanismos controladores do desenvolvimento folicular permanece pouco esclarecido. E como principal avanço, apenas nas espécies como caprino (MAGALHÃES et al., 2011; SARAIVA et al., 2010); ovinos (ARUNAKUMARI et al., 2010); suínos (WU et al., 2001); e bubalinos (GUPTA et al., 2008), já se conseguiu produção de embriões a partir de folículos pré-antrais desenvolvidos in vitro, bem como nascimentos a partir de animais de laboratório

(EPPIG et al., 2001). Contudo, em bovinos, ainda são poucos os estudos sobre o desenvolvimento dos folículos pré-antrais, tendo sido obtido o desenvolvimento in vitro até o estágio de folículo antral (GUTIERREZ et al., 2000). As diferenças entre estes resultados podem ser devido a uma série de fatores que incluem as características da própria espécie, bem como as condições de cultivo utilizadas, os meios de cultivo e suas suplementações.

Tendo em vista a ampla diversidade metabólica das células, existem vários tipos de meios de cultivo para suprir as necessidades nutricionais. Neste contexto, vários meios têm sido testados para avaliar o desenvolvimento de folículos pré-antrais bovinos isolados, como Meio Waymouth (YANG; FORTUNE, 2006), Meio de cultivo de tecido (TCM-199; ITOH et al., 2002), Meio Essencial Mínimo (α -MEM; FIGUEIREDO et al., 1994) e Meio McCoy's (McLAUGHLIN et al., 2010a) e no cultivo de folículos pré-antrais bovinos in situ, α -MEM (BRAW-TAL; YOSSEFI, 1997) e McCoy's (McLAUGHLIN et al., 2010b). Estes meios contêm vários aminoácidos e vitaminas que são necessários para o crescimento celular, além de sais minerais que servem para manter o balanço osmótico e a atividade de algumas enzimas essenciais para a viabilidade da célula (MORAES, 2013). Além disto, os meios-base podem ser suplementados com outros compostos, como antioxidantes, aminoácidos, proteínas, micronutrientes, glicoproteínas, antibióticos e agentes de proteção de pH, os quais enriquecem o meio de cultivo com o objetivo de manter as características próprias do folículo pré-antral no seu ambiente in vivo.

A regulação do desenvolvimento folicular é complexa e envolve fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos, que são orquestrados de maneira estágio-específica, a fim de controlar vários processos, incluindo proliferação, diferenciação e atresia/apoptose das células foliculares (WEBB et al., 2003; FORTUNE et al., 2004). Portanto, o destino de um folículo depende do equilíbrio entre os fatores estimulatórios e inibitórios presentes no ovário. Os fatores estimulatórios são responsáveis pela viabilidade e pelo desenvolvimento folicular, enquanto os inibitórios são responsáveis pela atresia. Dentre os fatores envolvidos nessa regulação, pode-se destacar o hormônio do crescimento (GH) e o fator de crescimento semelhante à insulina1 (IGF-1), os quais constituem o grupo de fatores que diretamente influenciam no crescimento e são importantes reguladores das diversas etapas do desenvolvimento folicular.

O GH é um hormônio somatotrófico secretado pelo lobo anterior da hipófise na circulação. Este peptídeo se liga aos receptores nos tecidos-alvo com o objetivo de

estimular o crescimento (HERRINGTON, 2001). O receptor de GH (GHR) é uma citocina que apresenta um domínio extracelular, uma porção transmembrânica e um domínio citoplasmático (SJÖGREN et al., 1999). Em ovários bovinos, o RNAm do GHR já foi localizado no oócito de folículos primordiais e primários e começa a ser expresso em células da granulosa de folículos primários permanecendo durante o estágio secundário (KOLLE et al., 1998). O GH tem sido considerado importante para a diferenciação celular, maturação sexual além de participar na esteroidogênese gonadal, gametogênese e ovulação, aumentando a síntese proteica e o transporte de aminoácidos (SILVA et al., 2009). Experimentos in vivo têm revelado que o GH atua promovendo o desenvolvimento de folículos ovarianos bovinos (GONG et al., 1991), aumentando as concentrações periféricas de insulina e, ou, IGF-1 (GONG et al., 1997). Em outro estudo, a administração de GH recombinante bovino aumentou significativamente o número de folículos pré-antrais (primários e secundários) e antrais bovinos, enquanto os folículos pré-antrais (primordiais) diminuíram, mostrando ativação folicular (KAISER et al., 2006).

A adição de GH bovino (1, 10 e 100 ng/mL) ao meio de cultivo de folículos pré-antrais murinos aumentou o desenvolvimento folicular em comparação com aqueles cultivados em meio sem GH (ZHAO et al., 2000). Além disto, o GH foi capaz de acelerar a maturação nuclear (APA et al., 1994) e a expansão de células do cúmulos de oócitos bovinos (IZADYAR et al., 1997). Em caprinos, Martins et al. (2010) mostraram que a utilização IGF-1 ou GH sozinhos bem como sua interação promoveu a manutenção da viabilidade e a ativação de folículos pré-antrais cultivados in vitro. Em um estudo mais recente da mesma equipe, os autores demonstraram o efeito positivo do FSH e GH suplementados sequencialmente (adição de FSH na primeira metade seguido da adição de GH na segunda metade do cultivo). Estes hormônios mantiveram a viabilidade folicular, promoveram a ativação de folículos primordiais e posterior progressão para folículos secundários (MAGALHÃES-PADILHA et al., 2012).

O sistema IGF é composto de diferentes elementos, ou seja, IGF-1 e IGF-2, dois tipos de receptores (IGFR-1 e IGFR-2) e seis proteínas de ligação (IGFBP-1 a IGFBP-6). A importância dos IGFs para os estádios iniciais do desenvolvimento folicular foi demonstrada por experimentos em que a inativação do gene resultou em comprometimento severo da foliculogênese pré-antral e antral inicial em camundongos (MONGET; BONDY, 2000). Em bovinos, o IGF-1 possui receptores nas células da granulosa de folículos primários, secundários e antrais (MONGET; BONDY, 2000),

cumprindo funções como supressor de apoptose (MAKAREVICH; MARKKULA, 2002), indutor da mitose nas células da granulosa (ARMSTRONG et al., 1996), promotor da maturação de oócitos (LORENZO et al., 1994) e do desenvolvimento de embriões bovinos (KAYE et al., 1997). Estudos in vivo indicam que as concentrações de IGF-1 se elevam com o aumento do tamanho do folículo bovino (SPICER; ENRIGHT, 1991), produzindo efeitos diretos na função ovariana, os quais podem ser dependentes do tamanho do folículo (SPICER et al., 1995). Em bovinos e suínos, verificou-se que o IGF-1 além de estimular a proliferação mitótica das células da granulosa, aumenta a produção de esteroides, induzida pelo FSH (SPICER et al., 1991). Além disto, o IGF-1 quando adicionado durante o cultivo in vitro de folículos pré-antrais estimulou o crescimento folicular em humanos (LOUHIO et al., 2000) e em bovinos (GUTIERREZ et al., 2000).

Deste modo, estudos que avaliem os meios-base, fatores de crescimento e hormônios, individualmente e, ou, em associação são indispensáveis para o desenvolvimento folicular, visto que, suas ações são dependentes da espécie, do estágio folicular e da dose administrada. Considerados estes aspectos, a presente tese teve como objetivos (1) determinar a eficiência dos meios-base α -MEM, TCM-199 e McCoy's no cultivo in situ de folículos pré-antrais bovinos; (2) identificar a concentração adequada do IGF-1 e GH no desenvolvimento de folículos pré-antrais bovinos cultivados in situ; e (3) avaliar os efeitos de um meio sequencial contendo GH e, ou, IGF-1 no cultivo in vitro de longa duração de folículos ovarianos pré-antrais bovinos inclusos no tecido ovariano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APA, R.; LANZONE, A.; MICELI, F.; MASTRANDREA, M.; CARUSO, A.; MANCUSO, S.; CANIPARI, R. Growth hormone induces in vitro maturation of follicle- and cumulus-enclosed rat oocytes. *Mol. Cell Endocrinol.*, v. 106, p. 207-12, 1994.
- ARMSTRONG, D. T.; XIA, P.; GANNES, G.; TEKPEY, F. R.; KHAMSI, F. Differential effects of insulin-like growth factor-I and follicle-stimulating hormone on proliferation and differentiation of bovine cumulus cells and granulosa cells. *Biol. Reprod.*, v. 54, p. 331-338, 1996.
- ARUNAKUMARI, G.; SHANMUGASUNDARAM, N.; RAO, V. H. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. *Theriogenology*, v. 74, p. 884-894, 2010.
- BRAW-TAL, R.; YOSSEFI, S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *J. Reprod. Fertil.*, v. 109, p. 165-171, 1997.
- EPPIG J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, v. 122, p. 829-838, 2001.
- FIGUEIREDO, J. R.; HULSHOF, S. C. J.; van den HURK, R.; NUSGENS, B.; BEVERS, M. M.; ECTORS, F. J.; BECKERS, J. F. Preservation of oocyte and granulosa cell morphology in bovine preantral follicles cultured in vitro. *Theriogenology*, v. 41, p. 1333-1346, 1994.
- FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; SILVA, J. R. V. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. (Ed.). *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Roca, 2008. p. 303-327.
- FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; YANG, M. Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 82-83, p. 109-126, 2004.
- GONG, J. G.; BRAMLEY, T.; WEBB, R. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular population and peripheral hormones. *Biol. Reprod.*, v. 45, p. 941-949, 1991.
- GONG, J. G.; BAXTER, G.; BRAMLEY, T.; WEBB, R. Enhancement of ovarian follicle development in heifers by treatment with recombinant bovine somatotrophin: a dose-response study. *J. Reprod. Fertil.*, v. 110, p. 91-97, 1997.
- 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.
- GUTIERREZ, C. G.; RALPH, J. H.; TELFER, E. E.; WILMUT, I.; WEBB, R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. *Biol. Reprod.*, v. 62, p. 1322-1328, 2000.

- HERRINGTON, J.; CARTER-SU, C. Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. *Trends Endocr. Metab.*, v. 12, p. 252-257, 2001.
- 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. *Biol. Reprod.*, v. 67, p. 1099-1105, 2002.
- IZADYAR, F.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M. Stimulatory effect of growth hormone on in vitro maturation of bovine oocytes is exerted through the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate signaling pathway. *Biol. Reprod.*, v. 57, p. 1484-1489, 1997.
- KAISER, G. G.; KOLLE, S.; BOIE, G.; SINOWATZ, F.; PALMA, G. A.; ALBERIO, R. H. In vivo effect of growth hormone on the expression of connexin-43 in bovine ovarian follicles. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 73, p. 600-6, 2006.
- KAYE, P. L. Preimplantation growth factor physiology. *Rev. Reprod.*, v. 2, p. 121-127, 1997.
- KÖLLE, S.; SINOWATZ, F.; BOIE, G.; LINCOLN, D. Developmental changes in the expression of the growth hormone receptor messenger ribonucleic acid and protein in the bovine ovary. *Biol. Reprod.*, v. 59, p. 836-842, 1998.
- LORENZO, P. L.; ILLERA, M. J.; ILLERA, J. C.; ILLERA, M.; TUURI, T. Enhancement of cumulus expansion and nuclear maturation during bovine oocyte maturation in vitro by addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *J. Reprod. Fertil.*, v. 101, p. 697-701, 1994.
- LOUHIO, H.; HOVATTA, O.; SJOBERG, J. et al. The effects of insulin, and insulin-like growth factors I and II on human ovarian follicles in long term culture. *Mol. Hum. Reprod.*, v. 6, p. 694-698, 2000.
- MAGALHÃES-PADILHA, D. M.; ANDRADE, P. M.; SALES, E. T.; ARAUJO, V. R.; LIMA, I. M.; CASTRO, S. V.; FAUSTINO, L. R.; LOPES, C. A.; CAMPELLO, C. C.; BÃO, S. N.; GASTAL, M. O.; GASTAL, E. L.; FIGUEIREDO, J. R. Effect of sequential medium on in vitro culture of goat ovarian cortical tissue. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 132, p. 159-68, 2012.
- MAGALHÃES, D. M.; FERNANDES, D. D.; MORORÓ, M. B.; SILVA, C. M.; RODRIGUES, G. Q.; BRUNO, J. B.; MATOS, M. H.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Effect of the medium replacement interval on the viability, growth and in vitro maturation of isolated caprine and ovine pre-antral follicles. *Reprod. Domest. Anim.*, v. 46, p. 134-40, 2011.
- MAKAREVICH, A. V.; MARKKULA, M. Apoptosis and proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during in vitro maturation and culture. *Biol. Reprod.*, v. 66, p. 386-39, 2002.
- MARTINS, F. S.; CELESTINO, J. J.; SARAIVA, M. V.; CHAVES, R. N.; ROSSETTO, R.; SILVA, C. M. G.; LIMA-VERDE, I. B.; LOPES, C. A. P.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Interaction between growth differentiation factor 9, insulin-like growth factor I and growth hormone on the in vitro

- development and survival of goat preantral follicles. *Braz. J. Med. Biol.*,v. 43,p. 728-736, 2010.
- McLAUGHLIN, M.; TELFER, D. E. Oocyte development in bovine primordial follicles is promoted by activin and FSH within a two-step serum-free culture system. *Soc. Reprod.Fertil.*,v. 139, p. 971-978, 2010a.
- McLAUGHLIN, M.; BROMFIELD, J. J.; ALBERTINID, F. et al. Activin promotes follicular integrity and oogenesis in cultured pre-antral bovine follicles. *M. Hum. Reprod.*,v. 16,p. 644-653, 2010b.
- MONGET, P.; BONDY, C. Importance of the IGF system in early folliculogenesis.*Mol.Cell.Endocrinol.*,v. 163, p. 89-93, 2000.
- MORAES, M. Cultura de células animais.Disponível em:<<http://pt.scribd.com/doc/88969487/9-Cultura-de-celulas-animais>>. Acesso em: 16 dez. 2013.
- 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. *Biol. Reprod.*,v. 68, p. 1682-1686, 2003.
- SARAIVA, M. V. A.; ROSSETTO, R.; BRITO, I. R.; CELESTINO, J. J.; SILVA, C. M.; FAUSTINO, L. R.; ALMEIDA, A. P.; BRUNO, J. B.; MAGALHÃES, D. M.; MATOS, M. H.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Dynamic medium produces caprine embryo from preantral follicles grown in vitro. *Reprod.Sci.*,v. 17, p. 1135-1143, 2010.
- SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R.; van den HURK, R. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology*,v. 71, n. 8, p. 1193-208, 2009.
- SJÖGREN, K.; LIU, J. L.; BLAD, K.; SKRTIC, S.; VIDAL, O.; WALLENIS, V.; LEROITH, D.; TÖRNELL, J.; ISAKSSON, O. J. P.; JANSSON, J.; OHLSSON, C. Liver-derived insulin like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.*,v. 96, p. 7088-7092, 1999.
- SKINNER, M. K. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum. Reprod. Update*,v. 11,p. 461-471, 2005.
- SOTO-SUAZO, M.; ZORN, T. M. Primordial germ cells migration: morphological and molecular aspects. *Anim. Reprod.*,v. 2, p. 147-160, 2005.
- SPICER, L. J.; ECHTERNKAMP, S. E.The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with emphasis on domestic animals. *Domest.Anim. Endocrinol.*,v. 12,p. 223-245, 1995.
- SPICER, L. J.; ENRIGHT, W. J. Concentrations of insulin-like growth factor-I and steroids in follicular fluid of preovulatory bovine ovarian follicles: effect of daily injections of a growth hormone-releasing factor analogy and thyrotropin-releasing hormone. *J. Anim. Sci.*,v. 69, p. 1133-1144, 1991.

- WEBB, R.; NICHOLAS, B.; GONG, J. G.; CAMPBELL, B. K.; GUTIERREZ, C. G.; GARVERICK, H. A.; ARMSTRONG, D. G. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reproduction*, v. 61, p. 71-90, 2003.
- WU, J.; EMERY, B. R.; CARRELL, D. T. In vitro growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. *Biol. Reprod.*, v. 64, p. 375-381, 2001.
- YANG, M. Y.; FORTUNE, J. E. Testosterone stimulates the primary to secondary follicle transition in bovine follicles in vitro. *Biol. Reprod.*, v. 75, p. 924-932, 2006.
- ZHAO, J.; van TOL, H. T. A.; TAVERNE, M. A. M.; van der WEIJDEN, G. C.; BEVERS, M. M.; van den HURK, R. The effect of growth hormone on rat pre-antral follicles in vitro. Cambridge: Cambridge University Press, Vol. 8, 2000. p. 275-283.

CAPÍTULO 1

MORFOLOGIA, MORFOMETRIA E VIABILIDADE DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS BOVINOS AFETADAS PELOS MEIOS DE CULTIVO DE BASE

Morphology, morphometry and survival of bovine preantral follicles affected by base culture medium

Carolina Rodriguez Jimenez^{a*}, Jovana Luiza de Azevedo^a, Renata Gomes Silveira^a, Jurandy Penitente-Filho^a, Valdevane Rocha Araujo^b, Ciro Alexandre Alves Torres^a

^a Departamento de Zootecnia, Laboratório de Fisiologia e Reprodução Animal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

^b Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-Antrais, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

* Correspondência do autor: zoocaro@hotmail.com.

Resumo

Este trabalho teve o objetivo de determinar a eficiência do Meio Essencial Mínimo (α -MEM), Meio de Cultivo de Tecido 199 (TCM-199) e Meio McCoy's (McCoy's) no cultivo in vitro de folículos pré-antrais bovinos. Desta forma, folículos pré-antrais bovinos foram cultivados inclusos no tecido cortical ovariano (in situ) em α -MEM, TCM-199 e McCoy's suplementado (+) com glutamina, insulina, transferrina, selênio, ácido ascórbico, albumina sérica bovina, penicilina, estreptomicina e tampão HEPES. O córtex ovariano foi seccionado e destinado ao cultivo in vitro, em placa de 24 poços, estufa a 37 °C e 5% de CO₂. As variáveis morfológicas e morfométricas foram submetidos à ANOVA, seguidas de comparações entre as médias pelo teste de Tukey e Dunnett, e as variáveis de viabilidade pelo teste de Qui-quadrado (χ^2). Os resultados mostraram que após sete dias de cultivo o TCM-199⁺ foi o único tratamento que reduziu significativamente o percentual de folículos morfolologicamente normais quando comparado ao controle não cultivado. O percentual de folículos viáveis foi significativamente superior no α -MEM⁺ quando comparado ao TCM-199⁺ enquanto o McCoy's⁺ teve uma diminuição na viabilidade até o dia 7 de cultivo. As dimensões foliculares nos meios McCoy's⁺ e TCM-199⁺ foram significativamente menores após sete dias de cultivo quando comparados ao controle e ao α -MEM⁺. Assim, conclui-se que o α -MEM⁺ pode ser utilizado como meio eficaz para o cultivo in situ de folículos pré-antrais bovinos.

Palavras-chaves: oócito; foliculogênese; in situ; α -MEM; TCM-199; McCoy's.

Introdução

Os meios de cultura base contêm uma associação de substâncias que podem fornecer os nutrientes necessários para o desenvolvimento de células cultivadas *in vitro*. Tendo em vista a ampla diversidade do metabolismo celular, existem vários tipos de meios de cultura para satisfazer as múltiplas necessidades nutricionais das células; por exemplo, α -MEM, α -MEM glutamax, TCM-199, McCoy's, Waymouth's, Leibowitz e Menezo B2 (ARAUJO, 2013). Em geral, estes meios possuem diferentes concentrações de sais inorgânicos, aminoácidos, vitamina e nucleosídeos. Além disto, são adicionadas outras substâncias, como antioxidantes, proteínas, micronutrientes, glicoproteínas, antibióticos, agentes-tampão, hormônios e fatores de crescimento os quais enriquecem o meio de cultivo com o objetivo de manter a viabilidade das células em cultivo.

O α -MEM é um meio amplamente utilizado no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, utilizado em espécies: caprina (ARAÚJO et al., 2010; SARAIVA et al., 2011; MAGALHÃES-PADILHA et al., 2012); bovina (FIGUEIREDO et al., 1994; ROSSETTO et al., 2012, 2013; SUN; LI, 2013); canina (SERAFIM et al., 2013); e murina (JEE et al., 2012). Estudos confirmam que folículos pré-antrais bovinos cultivados em um sistema tridimensional com α -MEM suplementado (α -MEM⁺) é importante para o crescimento folicular e melhor desempenho dos fatores de crescimento e hormônios (FIGUEIREDO et al., 1994). Assim, Araújo (2013) analisou que o α -MEM⁺ pode ser usado para substituir o TCM-199 suplementado (TCM-199⁺) na cultura de folículos pré-antrais bovinos. Similarmente, Braw-Tal e Yossefi (1997) cultivaram folículos pré-antrais bovinos inclusos no tecido ovariano em α -MEM⁺ e concluíram que o crescimento folicular pode iniciar na ausência das gonadotrofinas. No entanto, Rossetto et al. (2013) cultivaram folículos secundários caprinos e bovinos em α -MEM⁺ e observaram que os oócitos de caprino foram capazes de ser maturados e fertilizados *in vitro*, ao contrário do que ocorre em bovinos, mostrando um comportamento diferente entre as espécies e as condições de cultivo.

Da mesma forma, estudos com o TCM-199 mostram que o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais isolados (40 a 80 μ m) aumentou o diâmetro folicular na presença de TCM-199⁺, FSH e, ou, EGF (SAHA, 2000). Igualmente, Itoh et al. (2002) concluíram que o cultivo *in vitro* com TCM-199⁺ desempenhou um papel importante no crescimento e desenvolvimento de folículos pré-antrais isolados (> 150 μ m). Rossetto et al. (2012) concluíram que o TCM-199⁺ promoveu o crescimento folicular e a formação

de antro em folículos secundários. Assim, Costa et al. (2001) observaram que a viabilidade não foi afetada no cultivo com TCM-199⁺ na presença ou ausência de hormônios. Da mesma forma, Hulshof et al. (1994) afirmaram que os folículos pré-antrais podem ser cultivados durante sete dias na ausência de soro e hormônios.

Outro meio que vem sendo utilizado nos estudos de folículos pré-antrais bovinos é o meio McCoy's. Thomas et al. (2001) cultivaram folículos pré-antrais isolados em meio McCoy's suplementado (McCoy's⁺) e observaram melhor qualidade e viabilidade folicular quando foi adicionado o ácido ascórbico. Os mesmos autores demonstraram que o Meio McCoy's⁺ ajudou na regulação dos estádios iniciais do oócito e no desenvolvimento folicular quando estava suplementado com IGF-1 (THOMAS et al., 2007). Mais recentemente, McLaughlin et al. (2010 a,b) promoveram o desenvolvimento de antro a partir de um cultivo em duas etapas (in situ/isolado), em folículos pré-antrais bovinos cultivados em meio McCoy's⁺ na presença de FSH e, ou, ativina.

Embora nos últimos anos as equipes de pesquisas tenham trabalhado com mais intensidade no cultivo de folículos pré-antrais isolados (>150 µm), é importante salientar que 90% dos folículos pré-antrais são primordiais. Portanto, o estudo de meios-base que propiciem a ativação e, ou, o desenvolvimento desses folículos, irá contribuir para a possibilidade do isolamento de um maior número de folículos secundários. Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo identificar o meio de cultivo base eficaz para o desenvolvimento de folículos pré-antrais bovinos inclusos no tecido cortical ovariano (in situ).

Material e métodos

Origem, coleta e transporte de ovários

O estudo foi realizado no Laboratório de Fisiologia e Reprodução Animal do Departamento de Zootecnia na Universidade Federal de Viçosa (UFV). Foram coletados em abatedouro, ovários (n = 24) de fêmeas bovinas, sem raça e idades definidas e em diferentes fases do ciclo estral, sendo utilizados seis pares para o estudo da morfologia e morfometria de folículos pré-antrais in situ, e seis pares para a análise da viabilidade de folículos pré-antrais isolados. Os ovários removidos foram lavados em álcool 70% e TCM-199 (CELESTINO et al., 2007), suplementado com 20 mM de HEPES, 2.200 mg/L de bicarbonato de sódio (SAHA et al., 2000), 25 µg/mL de ácido pirúvico, 75 µg/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina (McLAUGHLIN et al., 2010a) e denominado como TCM-199 de transporte. Posteriormente, os ovários foram colocados

em tubos Falcon contendo TCM-199 de transporte em garrafa térmica a 4 °C (BASSO; ESPER, 2002) e levados ao laboratório.

Meios de cultivo

Foram testados os seguintes meios-base: α -MEM (M8042), TCM-199 (M7653) e McCoy's (M8403), suplementados como citado por McLaughlin et al. (2010a) com 20 mM de HEPES; 3 mM de glutamina; 10 ng/mL de insulina; 2,5 μ g/mL de transferrina; 4 ng/mL de selênio; 50 μ g/mL de ácido ascórbico (exceto no α -MEM); 0,1% albumina sérica bovina (BSA); 0,1 mg/mL de penicilina e 0,1 mg/mL estreptomicina. Após suplementação, foram denominados α -MEM⁺, TCM-199⁺ e McCoy's⁺. Foram utilizadas placas de 24 poços em estufa a 37 °C, na presença de ar contendo 5% de CO₂ durante sete dias de cultivo. Todas as substâncias utilizadas no meio de cultivo foram provenientes da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). O organograma do protocolo experimental pode ser observado na Figura 1.

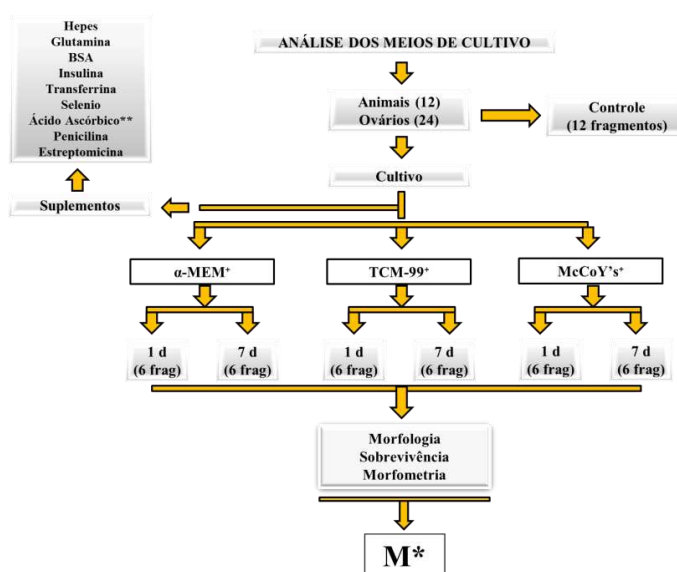


Figura 1 – Organograma do protocolo experimental. Frag =fragmentos; d =dia; M* =melhor meio-base determinado; e ** o α -MEM apresenta na sua composição original.

Processamento histológico

Os fragmentos ovarianos foram fixados em Carnoy por 4 horas em temperatura ambiente, desidratados com soluções alcoólicas crescentes (álcool 70; 80; 90 e absoluto I; II e III) durante uma hora cada. Posteriormente, os fragmentos foram diafanizados em xilol puro (I; II e III) e incluídos em parafina (I-II-III) durante 1 hora cada. Em seguida,

os fragmentos foram incluídos em parafina e cortados em seções de 5 µm de espessura e, corados pelo método de ácido periódico de Schiff (PAS)-hematoxilina (MATOS et al., 2007a). As lâminas foram examinadas em um microscópio óptico (400x; Olympus BX50, Japão). Um total de 30 folículos pré-antrais foram observados por repetição, para um total de 360 observações por tratamento (180 D1-180 D7).

Análise morfológica e morfométrica de folículos pré-antrais bovinos

Para a descrição histológica, os folículos pré-antrais foram classificados em primordiais e em desenvolvimento (primários e secundários), sendo que os folículos primordiais foram caracterizados pela presença de oócito esférico ou ovoide, completamente rodeado por uma camada simples de células da granulosa pavimentosas e, ou, com algumas tendendo à forma cuboidal. Nos folículos primários foi observada uma única camada de células da granulosa de forma cúbica em torno do oócito e em folículos secundários o oócito estava circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa de forma cúbica (BASSO; ESPER, 2002). Os folículos foram classificados morfológicamente em normais (contendo um oócito intacto e células da granulosa bem organizadas em camadas, sem núcleo picnóticos) e degenerados (oócito com núcleo picnótico, retração citoplasmática ou células da granulosa desorganizadas (SILVA et al., 2000).

Para a análise morfométrica foram capturados campos histológicos no microscópio óptico (400x; Olympus BX50, Japão), sendo que dez folículos normais foram observados por animal e 120 folículos por tratamento (60 D1 – 60 D7). Os diâmetros foram calculados pelo programa Image J/Fiji 1.46 (FERREIRA; RASBAND, 2012) e cada região vertical e horizontal do folículo e do oócito foi analisada.

Análise de viabilidade

Folículos pré-antrais foram isolados após o cultivo in vitro pelo método mecânico descrito por FIGUEIREDO et al. (1994). Brevemente, os fragmentos ovarianos foram finamente fragmentados e transferidos para tubos de 15 mL contendo 5 mL de TCM-199 com 20 mM de HEPES; 2.200 mg/L de bicarbonato de sódio (SAHA et al., 2000); 2 mM de piruvato de sódio; 75 µg/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina e 10% BSA (McLAUGHLIN et al., 2010a). Uma vez realizada a dissociação mecânica por repetidos movimentos de sucção e ejeção, utilizando-se pipetas Pasteur de 1.000 e 600 µm, o material obtido foi filtrado em malhas de nylon de 100 µm de diâmetro, resultando em uma suspensão de folículos pré-antrais com

diâmetro inferior a 100 µm. Posteriormente, analisou-se a viabilidade com Azul de Trypan. A cada 100 µL de meio de suspensão contendo folículos pré-antrais isolados, foram adicionados 5 µL do corante Azul de Trypan (0,4%; Sigma/Vetec, Brasil). Os folículos pré-antrais foram observados no microscópio invertido (Leica DFC295, Alemanha), com aumento de 100X e, classificados em viáveis ou não viáveis quando não corados ou corados em azul, respectivamente (VAN DENHURK et al., 1998).

Análise estatística

Os percentuais dos folículos pré-antrais normais, primordiais e em desenvolvimento (primários e secundários), bem como o diâmetro folicular e oocitário foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguidos de comparações entre as médias pelo teste de Dunnett para a comparação do controle versus os tratamentos, e teste de Tukey para a comparação entre tratamentos, software versão 9.1; SAS; 2004. A análise de viabilidade do folículo pré-antral isolado (vivo/morto) foi comparada em tabela de contingência e analisada pelo teste de Qui-quadrado (χ^2). Valores foram considerados significativos estatisticamente quando $P < 0,05$.

Resultados

Morfologia e viabilidade de folículos ovarianos pré-antrais bovinos cultivados *in situ* em α -MEM⁺, TCM-199⁺ e McCoy's⁺

Foram analisados 1.260 folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano. Folículos pré-antrais não cultivados (controle) e cultivados durante um ou sete dias com α -MEM⁺, TCM-199⁺ e meio McCoy's⁺ mostrados na Figura 2. A Tabela 1 demonstra que não foram observadas ($P > 0,05$) diferenças quando comparados o controle e os meios-base nos grupos normais no dia um (D1) de cultivo *in vitro*. No dia sete (D7) do cultivo, o TCM-199⁺ foi o único tratamento que reduziu significativamente o percentual de folículos morfologicamente normais quando comparado ao controle não cultivado ($P < 0,05$). Entre os tratamentos cultivados não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) nos folículos morfologicamente normais tanto no D1 e D7 como entre os dias de cultivo.

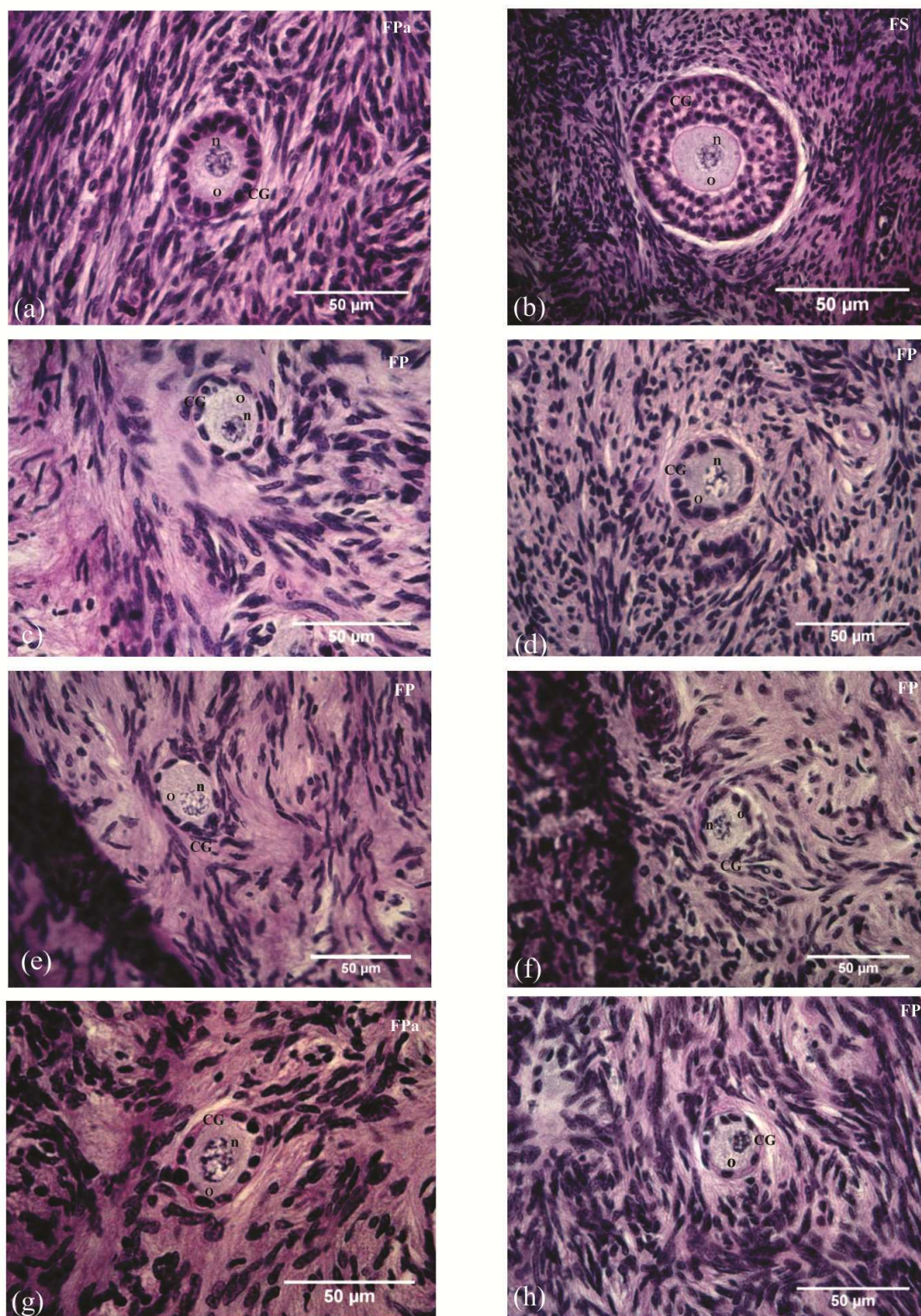


Figura 2 – Folículos pré-antrais bovinos não cultivados (controle) (a,b) e cultivados após um e sete dias na presença de α -MEM⁺ (c,d); TCM-199⁺ (e,f) e meio McCoy's⁺ (g,h), respectivamente. O = oócito; n= núcleo; CG= células da granulosa; FP =folículo primordial; FPa = folículo primário; e FS = folículo secundário. Ampliação 400X; PAS-hematoxilina.

Tabela 1 – Folículos morfologicamente normais (média $\pm$ erro-padrão da média) e folículos viáveis (%) cultivados em α -MEM⁺, TCM-199⁺ e meio McCoy's⁺ durante um e sete dias.

Tratamentos	Normais		Viabilidade	
	Dia 1	Dia 7	Dia 1	Dia 7
Controle	70,56 $\pm$ 6,6		44/50 (88%)	
α -MEM ⁺	65,6 $\pm$ 2,4 ^{aA}	47,7 $\pm$ 9,2 ^{aA}	41/50 (82) ^{abA}	41/50 (82) ^{aA}
TCM-199 ⁺	52,2 $\pm$ 6,5 ^{aA}	38,9 $\pm$ 4,9 ^{*aA}	36/50 (72) ^{bA}	26/50 (52) ^{*bA}
McCoy's ⁺	52,2 $\pm$ 4,8 ^{aA}	44,4 $\pm$ 8,4 ^{aA}	46/50 (92) ^{aA}	35/50 (70) ^{*abB}

* Diferença significativa para o tratamento-controle ($P < 0,05$); ^{a,b} Letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna são diferentes ($P < 0,05$); ^{A,B} Letras maiúsculas sobrescritas na linha indicam diferença significativa entre os dias de cultivo ($P < 0,05$); Cont = controle; α -MEM⁺ = meio essencial mínimo suplementado; TCM-199⁺ = meio de cultivo de tecido suplementado 199; e McCoy's⁺ = meio McCoy's suplementado.

Folículos pré-antrais foram isolados do estroma ovariano a fim de reafirmar os resultados da normalidade folicular, avaliando-se 350 folículos pré-antrais (50 por tratamento). Folículos viáveis e não viáveis podem ser observados na Figura 3. Os resultados demonstraram que embora os folículos cultivados no α -MEM⁺, TCM-199⁺ e McCoy's⁺ não tenham diferido do controle ($P > 0,05$) após um e sete dias de cultivo, o percentual de folículos viáveis foi significativamente superior no α -MEM quando comparado ao TCM-199⁺ (Tabela 1). Na análise individual de cada meio-base (D1-D7), o α -MEM⁺ e TCM-199⁺, mantiveram o mesmo número de folículos pré-antrais viáveis do D1 ao D7 de cultivo in vitro ($P > 0,05$); oposto ao meio McCoy's⁺ que, após sete dias, teve uma diminuição na viabilidade dos folículos pré-antrais isolados pós-cultivo in situ ($P < 0,05$).

A Tabela 2 demonstra que não foram observadas ($P > 0,05$) diferenças quando comparados o controle e os meios-base nos grupos primordiais e em desenvolvimento no dia um (D1) de cultivo in vitro. O percentual de folículos em desenvolvimento foi significativamente superior no α -MEM⁺ quando comparado ao TCM-199⁺ no D1 de cultivo. Após sete dias de cultivo todos os tratamentos reduziram o percentual de folículos primordiais quando comparados ao controle ($P < 0,05$), embora o percentual de folículos em desenvolvimento não tenha sido concomitante nos tratamentos cultivados. Quando comparados os tratamentos dentro dos diferentes dias de cultivo, houve uma redução significativa do percentual de folículos primordiais em todos os tratamentos do dia um para o dia sete. No entanto, os folículos em desenvolvimento mantiveram os mesmos percentuais no decorrer do cultivo in vitro ($P > 0,05$).

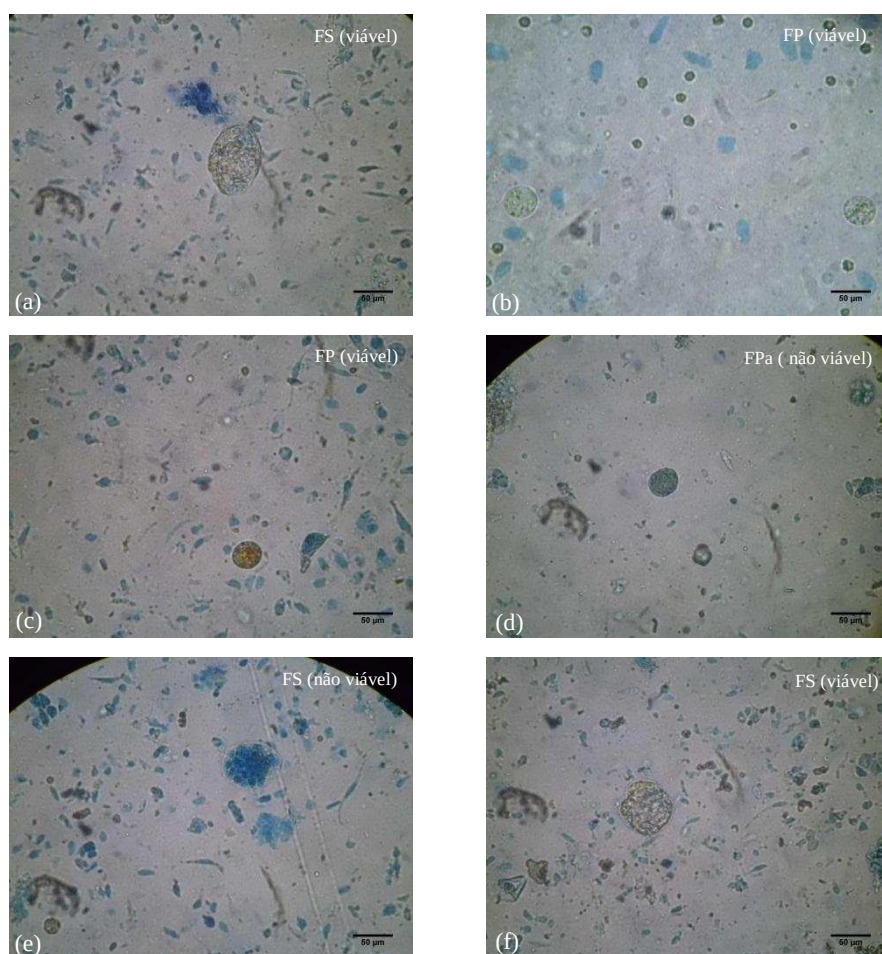


Figura 3–Folículos pré-antrais bovinos isolados mecanicamente antes do controle (a,b) e após um (c,d) ou sete (e,f) dias de cultivo em α -MEM⁺, corados com azul de tripan (mortos) não corados (vivos).

Tabela 2 – Folículos primordiais e em desenvolvimento (média $\pm$ erro-padrão da média cultivados em α -MEM⁺, TCM-199⁺ e meio McCoy's⁺ durante um e sete dias

Tratamentos	Primordiais		Em desenvolvimento	
	Dia 1	Dia 7	Dia 1	Dia 7
Controle		48,9 $\pm$ 8,2		21,7 $\pm$ 5,2
α -MEM ⁺	27,8 $\pm$ 6,1 ^{aA}	8,3 $\pm$ 1,4 ^{*aB}	37,8 $\pm$ 5,6 ^{aA}	39,4 $\pm$ 9,9 ^{aA}
TCM-199 ⁺	35,0 $\pm$ 5,5 ^{aA}	13,3 $\pm$ 4,5 ^{*aB}	17,2 $\pm$ 2,6 ^{bA}	25,6 $\pm$ 5,7 ^{aA}
McCoy's ⁺	30,6 $\pm$ 6,6 ^{aA}	18,3 $\pm$ 3,7 ^{*aB}	21,7 $\pm$ 5,1 ^{abA}	26,1 $\pm$ 6,5 ^{aA}

* Diferença significativa para o tratamento-controle ($P < 0,05$); ^{a,b} Letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna são diferentes ($P < 0,05$); ^{A,B} Letras maiúsculas sobrescritas na linha indicam diferença significativa entre os dias de cultivo ($P < 0,05$); Cont = controle; α -MEM⁺ = meio essencial mínimo suplementado; TCM-199⁺ = meio de cultivo de tecido suplementado 199; e McCoy's⁺ = meio McCoy's suplementado.

Morfometria de folículos ovarianos pré-antrais bovinos cultivados in situ em α -MEM⁺, TCM-199⁺ e McCoy's⁺

Para as análises morfométricas foram tomadas as dimensões de 210 (n) folículos e oócitos inclusos no tecido ovariano e realizadas 30 medições por tratamento. As médias de diâmetro folicular e oocitário no D1 e D7 de cultivo in vitro podem ser observadas na Tabela 3. No D1 do cultivo in vitro não foram encontradas diferenças ($P > 0,05$) entre as dimensões foliculares do controle e os meios-base testados (α -MEM⁺, TCM-199⁺ e McCoy's⁺). Entretanto, as dimensões oocitárias de todos os meios-base foram inferiores ao controle ($P < 0,05$). Quando comparados os meios-base, não foram observadas diferenças nas dimensões foliculares nem oocitárias após um dia de cultivo ($P > 0,05$). No entanto, no D7 de cultivo in vitro as dimensões dos folículos cultivados nos meios McCoy's⁺ e TCM-199⁺ foram significativamente menores quando comparados ao controle e ao α -MEM⁺. Não obstante, o diâmetro oocitário foi significativamente inferior em todos os tratamentos cultivados quando comparados ao controle não cultivado, embora não tenha diferido entre si.

Tabela 3 – Média $\pm$ erro-padrão do diâmetro folicular/oocitário em micrômetros (μ m) de folículos pré-antrais bovinos cultivados no α -MEM⁺, TCM-199⁺ e meio McCoy's⁺ durante um e sete dias

Tratamentos	Folículo		Oócito	
	Dia 1	Dia 1	Dia 1	Dia 7
Controle		52,31 $\pm$ 2,86		28,42 $\pm$ 1,22
α -MEM ⁺	45,05 $\pm$ 2,02 ^{aA}	49,79 $\pm$ 4,11 ^{aA}	22,77 $\pm$ 1,09 ^{*aA}	21,80 $\pm$ 1,01 ^{*aA}
TCM-199 ⁺	45,51 $\pm$ 2,25 ^{aA}	39,47 $\pm$ 1,74 ^{*bB}	21,86 $\pm$ 0,87 ^{*aA}	20,94 $\pm$ 0,79 ^{*aA}
McCoy's ⁺	48,34 $\pm$ 1,49 ^{aA}	38,54 $\pm$ 1,53 ^{*bB}	22,33 $\pm$ 0,53 ^{*aA}	20,32 $\pm$ 1,05 ^{*aA}

* Diferença significativa para o tratamento-controle ($P < 0,05$); ^{a,b} Letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna são diferentes ($P < 0,05$); ^{A,B} Letras maiúsculas sobrescritas na linha indicam diferença significativa entre os dias de cultivo ($P < 0,05$); Cont = controle; α -MEM⁺ = meio essencial mínimo suplementado; TCM-199⁺ = meio de cultivo de tecido 199 suplementado; e McCoy's⁺ = meio McCoy's suplementado.

O comportamento de cada meio-base entre os dias de cultivo (D1 ao D7) mostrou que o α -MEM⁺ manteve os diâmetros foliculares estáveis durante os sete dias de cultivo ($P > 0,05$). Entretanto, o TCM-199⁺ e o meio McCoy's⁺ mostraram diminuição do diâmetro folicular entre os dias de cultivo ($P < 0,05$). Mesmo assim, o diâmetro dos oócitos se manteve estável em todos os meios-base testados ($P > 0,05$).

Diferenças presentes nos α -MEM, TCM-199 e McCoy's

Os meios para cultivo de células animais contêm vários aminoácidos, vitaminas, sais minerais e nucleosídeos, que são necessários para o crescimento celular, a manutenção do balanço osmótico, a isotonicidade e a atividade de algumas enzimas essenciais para a viabilidade da célula (MORAES, 2013). Os meios testados no presente estudo, α -MEM, TCM-199 e McCoy's, possuem inúmeros componentes para suprir as necessidades celulares. O α -MEM e TCM-199 se destacam por possuírem uma variedade maior de sais minerais que o meio McCoy's; e o α -MEM incorpora concentrações mais elevadas de aminoácidos que o TCM-199 e meio McCoy's (Figura 4).

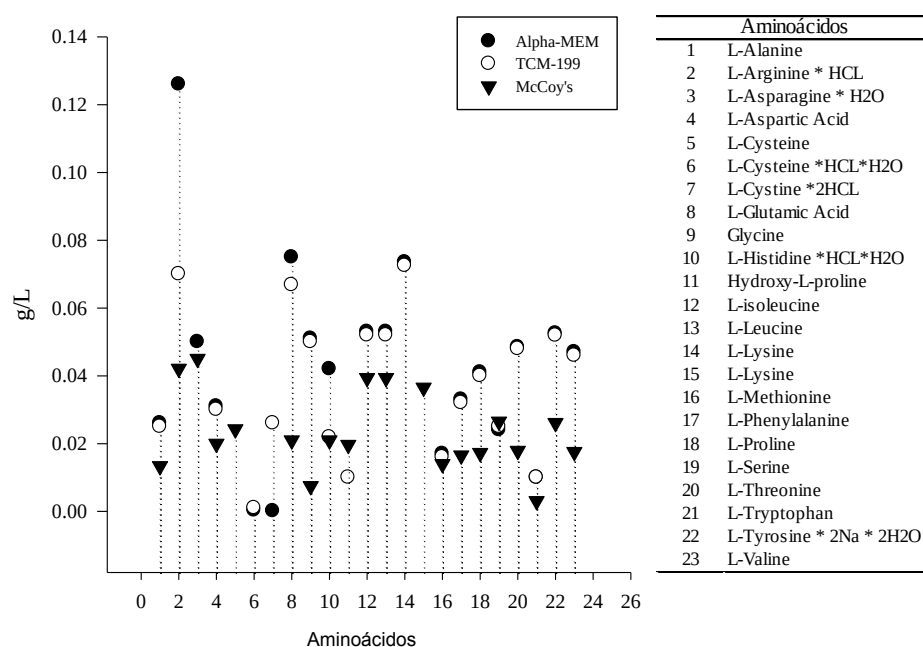


Figura 4 – Aminoácidos presentes no meio essencial mínimo (α -MEM-●), meio de cultivo de tecido (TCM-199-○) e meio McCoy's (McCoy's-▼)199.

O α -MEM possui uma quantidade maior de nucleosídeos, tipo desoxirribonucleósidos (deoxyadenosina 0,01 g/L; deoxycytidina 0,011 g/L e deoxyguanosina 0,01 g/L) e ribonucleosídeos (adenosina 0,01 g/L; guanosina 0,01 g/L e uridina 0,01 g/L). O nucleosídeo equivale a um nucleotídeo sem o grupamento fosfato. Os nucleotídeos são compostos que carregam muita energia e auxiliam os processos metabólicos, especialmente as biossínteses; em grande parte das células, atuam como sinais químicos, respondendo assim aos hormônios e aos outros estímulos, sendo

também, componentes estruturais de cofatores enzimáticos, intermediários metabólicos e ácidos nucleicos extracelulares (MELDAU, 2013).

O nucleosídeo adenosina, incorporado no α -MEM, desempenha papel importante nos processos bioquímicos, como transferência de energia, de trifosfato de adenosina (ATP) e de difosfato de adenosina (ADP), bem como, na transdução de sinal, como monofosfato de adenosina cíclico (cAMP; HASKÓ et al., 2008). Já o TCM-199 é suplementado com sulfato de adenina (0,01 g/L), adenosina monofosfato (0,0002385 g/L), adenosinatrifosfato (0,01 mg/L) e alguns núcleos-base adicionais. A vantagem do sulfato de adenina é a sua melhor solubilidade quando comparado à adenosina e sua capacidade para sintetizar adenosina (SUN et al., 2011).

O meio McCoy's, apresenta uma concentração três vezes mais elevada de glucose (3 g/L) que o α -MEM ou TCM-199 (1,0 g/L). Tem sido relatado que o aumento da concentração de glicose pode promover a regularização das proteínas responsáveis pelo transporte de açúcar no tecido ovariano bovino, resultando em uma privação de glicose intracelular e instabilidade energética (FLADEBY et al., 2003). O crescimento de folículos pré-antrais é marcado por divisão de células da granulosa, que depende da energia produzida pelo ciclo de Krebs e glicolítico, o que pode levar a um aumento da oxidação de glicose mitocondrial (ROY; TERADA, 1999). Sendo assim, Rossetto et al. (2013) sugerem que a concentração de glucose no meio de cultura pode afetar o desenvolvimento e o estresse oxidativo em folículos pré-antrais. Assim, em vez do α -MEM ter altas concentrações de glicose como o meio McCoy's, este meio tem ácido pirúvico (0,11 g/L), composto orgânico intermediário extremamente importante do metabolismo glicídico, ciclo de Krebs e na síntese de ácidos graxos, de esteróis e de aminoácidos (LEHNINGER et al., 2008).

O TCM-199 contém calciferol ou vitamina D (0,0001 g/L= 100.000 ng/L=100 ng/mL); assim como todas as vitaminas lipossolúveis, o calciferol é uma das mais tóxicas. Pode ser armazenada no corpo, sendo lentamente metabolizada. Não existe consenso sobre a concentração sérica ideal de vitamina D (SILVA, 2008). Premaor (2006) demonstrou que níveis de vitamina D abaixo de $3,2 \times 10^{-5}$ g/L (32 ng/mL) pode se caracterizar como uma deficiência. Da mesma forma, Castro et al. (2011) mostraram que doses elevadas (0,0002g ou 100 ng por semana ou meses) podem causar uma desestabilização do cálcio. Nos indivíduos saudáveis, os níveis de calcidiol (forma de armazenamento da vitamina D em humanos) estão normalmente entre 32 e 70

ng/mL (80-175 nmol/L), mas estes níveis podem ser 15 vezes maiores nos casos de toxicidade da vitamina D (CANTO et al., 2008).

O TCM-199 contém o bissulfeto de menadiona de sódio (0,000016 g/L) forma sintética da vitamina K3, produto de baixa estabilidade à luz, calor, umidade e pH. Menadiona é usada como fonte de vitamina K, não sendo utilizada diretamente como um suplemento nutricional, em virtude da elevada toxicidade e baixa estabilidade (REZENDE et al., 2012). O α -MEM e TCM-199 contêm na sua composição a maioria de vitaminas com concentrações iguais e, ou, aproximadas. O meio McCoy's não possui vitaminas adicionais, mas possui concentrações elevadas das mesmas, em comparação com os outros meios-base testados (Figura 5). Segundo Lima (2013), o armazenamento de altas concentrações de vitaminas, pode levar a sintomas tóxicos e grandes doses podem interferir no metabolismo de outras vitaminas.

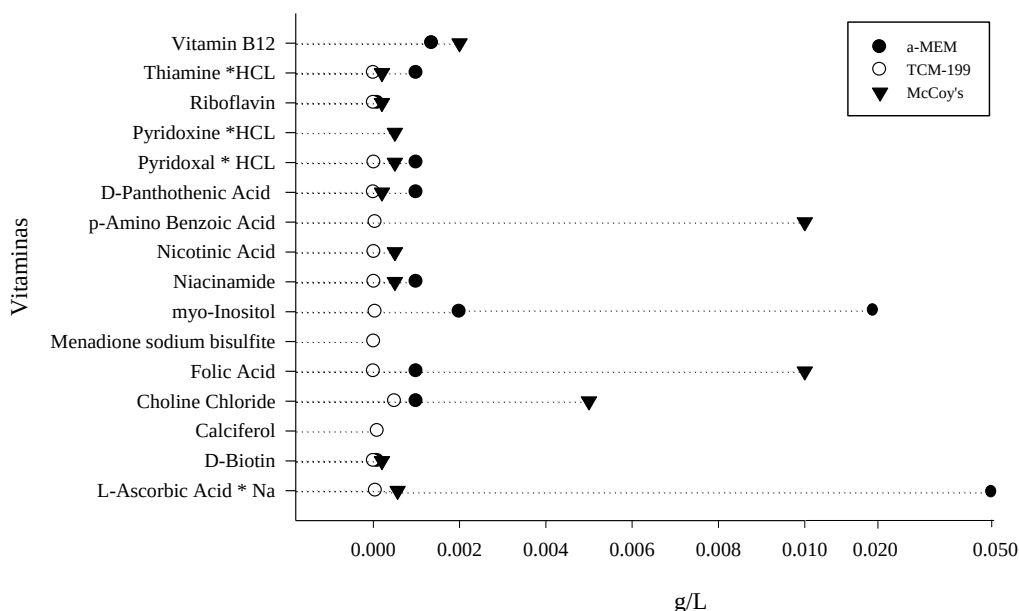


Figura 5 –Vitaminas presentes nomeio essencial mínimo (α -MEM-●), meio de cultivo de tecido (TCM-199-○) e meio McCoy's (McCoy's-▼) 199.

Discussão

No presente estudo foi avaliada a eficiência do α -MEM⁺, TCM-199⁺ e McCoy's⁺ no cultivo in vitro de folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano bovino. Analisando a normalidade e viabilidade folicular, bem como os folículos primordiais em desenvolvimento e o diâmetro folicular e oocitário. Além disto, confrontaram-se as diferenças apresentadas de sais minerais, aminoácidos, vitaminas e nucleosídeos de cada um dos meios do presente estudo. Contudo, os resultados

demonstraram que o α -MEM⁺ conservou o percentual de folículos morfolologicamente normais, manteve o percentual de folículos viáveis semelhante ao controle e superior ao tratamento TCM-199⁺ e melhorou o diâmetro folicular em comparação com os meios TCM-199⁺ e McCoy's⁺.

Na abordagem sobre os folículos morfolologicamente normais e viáveis, observou-se que o TCM-199⁺ foi o único tratamento que após sete dias de cultivo reduziu o percentual de folículos morfolologicamente normais quando comparado ao controle não cultivado. O α -MEM⁺ foi superior na viabilidade folicular quando comparado ao TCM-199⁺; e o meio McCoy's⁺ teve uma diminuição na viabilidade desde o 1º ao 7º dia de cultivo in situ. Assim, estudos confirmam que folículos pré-antrais bovinos cultivados em um sistema tridimensional com α -MEM⁺ é importante para o crescimento folicular e para o melhor desempenho dos fatores de crescimento e hormônios (FIGUEIREDO et al., 1994). Similarmente, Braw-tal e Yossefi (1997) cultivaram folículos pré-antrais in situ em α -MEM⁺ com ou sem FSH e concluíram que o crescimento folicular pode iniciar na ausência deste hormônio. Contudo, Araujo (2013) constatou que o α -MEM⁺ pode ser usado para substituir o TCM-199⁺ na cultura de folículos pré-antrais bovinos. Em contrapartida, Rossetto et al. (2012) testaram α -MEM⁺, TCM-199⁺ e McCoy's⁺ no cultivo in vitro de folículos pré-antrais secundários isolados e concluíram que o TCM-199⁺ manteve a morfologia e viabilidade folicular. Entretanto, no presente estudo o TCM-199⁺ foi menos eficiente nos folículos morfolologicamente normais e viáveis. Assim, pode-se compreender que os folículos pré-antrais respondem diferentemente dependendo das condições celulares e de cultivo oferecidas (isoladas ou in situ). Sendo importante definir individualmente os meios-base, hormônios, fatores de crescimento e outros suplementos para cada tipo de experimentação celular. Desta forma, será obtida uma base organizada de dados para o melhor desenvolvimento in vitro de folículos pré-antrais em cada espécie animal.

Quanto aos folículos primordiais e em desenvolvimento houve redução do percentual de folículos primordiais após sete dias de cultivo, embora sem ser concomitante com o aumento do percentual de folículos em desenvolvimento, os quais se mantiveram constantes durante os sete dias de cultivo. Desta forma, pode-se acreditar que o α -MEM⁺, TCM-199⁺ e McCoy's⁺ ativam os folículos primordiais e começam o desenvolvimento folicular. No entanto, estes meios sendo ricos em várias substâncias, não são suficientes para o total desenvolvimento pré-antral, sendo necessários a adição de hormônios, fatores de crescimento ou outros suplementos que interferem nas etapas

posteriores. Sun e Li (2013) conseguiram promover o crescimento de folículos primordiais, isolados em um cultivo in vitro com α -MEM⁺, FSH, LH e E2. Rossetto et al. (2012) concluíram que TCM-199⁺, FSH e ativina promoveram o crescimento folicular e a formação de antro em folículos secundários. Gutierrez et al. (2000) conseguiram obter folículos antrais a partir de folículos pré-antrais secundários, cultivados in vitro, em meio McCoy's⁺ na presença de FSH, EGF e IGF-1. Mais recentemente, McLaughlin et al. (2010a) promoveram o desenvolvimento de antro a partir do cultivo em duas etapas (in situ/isolado) em folículos pré-antrais bovinos cultivados em meio McCoy's⁺ acrescido de FSH e, ou, ativina. Portanto, o conhecimento da ação dos meios dentro do sistema de cultivo é de indispensável importância, visto que, existe grande variedade e os mesmos agem de forma diferente para espécie, célula e tipo de cultivo. Embora nos últimos anos as equipes de pesquisas tenham trabalhado com mais intensidade no cultivo de folículos pré-antrais isolados (>150 μ m), é importante salientar que 90% dos folículos pré-antrais são primordiais. Portanto, o estudo de meios-base que propiciem a ativação e, ou, o desenvolvimento desses folículos, irá contribuir para o isolamento de um maior número de folículos em desenvolvimento (primários e secundários).

Quanto às respostas morfométricas observou-se que no D7 de cultivo as dimensões dos folículos cultivados nos meios McCoy's⁺ e TCM-199⁺ foram menores quando comparados ao controle e ao α -MEM⁺. Deste modo, Braw-Tal et al. (1997) cultivaram folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano na presença de α -MEM⁺ acrescido ou não de FSH e observaram que o diâmetro folicular aumentou sem a presença de gonadotrofinas. Mais recentemente, Sun e Li (2013) isolaram folículos primordiais de aproximadamente 60 μ m e os cultivaram em α -MEM⁺ durante 13 dias e observaram aumento no diâmetro folicular (± 75 μ m). Rossetto et al. (2013) testaram em folículos secundários caprinos e bovinos o α -MEM⁺ e observaram que os oócitos de caprino foram capazes de ser maturados e fertilizados in vitro, ao contrário do que ocorre em bovinos. Entretanto, Araujo (2013) avaliou o TCM-199⁺ e o α -MEM⁺ na cultura de folículos pré-antrais isolados bovinos e demonstrou que os meios não diferiram nos parâmetros de viabilidade, diâmetro folicular e formação de antro. Vários estudos em folículos pré-antrais isolados e, ou, in situ têm sido realizados utilizando como meio-base o α -MEM; por exemplo, caprino (MATOS et al., 2007b; BRUNO et al., 2009; MAGALHAES et al., 2012); canino (SERAFIM et al., 2013); murino (JIN et al., 2010; JEE et al., 2012); primata (XU et al., 2011); e bovinos (FIGUEIREDO et al.,

1994; ROSSETTO et al., 2012, 2013; SUN; LI, 2013). Assim, no presente estudo pode-se afirmar que o α -MEM⁺ é o meio eficaz para melhorar o diâmetro folicular de folículos pré-antrais bovinos inclusos no tecido ovariano (in situ).

Afinal, a composição dos meios do presente estudo levou a definir que o α -MEM possui uma quantidade maior de nucleosídeos e aminoácidos. Também, o α -MEM e TCM-199 possuem concentrações de vitaminas iguais e, ou, aproximadas; no entanto, o TCM-199 não foi eficiente na viabilidade nem na morfometria folicular, possivelmente pela presença de calciferol e bissulfeto de menadiona de sódio ausente no α -MEM. Igualmente, o meio McCoy's não possui vitaminas adicionais, mas, possui concentrações mais elevadas que o α -MEM e TCM-199. Contudo, pode-se dizer que o menor diâmetro folicular observado, do D1 ao D7, e a baixa viabilidade observada, tanto no TCM-199 quanto no meio McCoy's, pode ser consequência de uma concentração elevada de vitaminas sobre os folículos pré-antrais. Assim, pode-se ligar a eficiência do α -MEM aos aminoácidos e nucleosídeos adicionais, bem como os sais minerais e as vitaminas presentes, que colaboraram na resposta positiva no cultivo in vitro de folículos pré-antrais.

Conclusão

Conclui-se que o α -MEM⁺ é um meio eficaz para a manutenção morfológica e morfométrica, e para a viabilidade dos folículos pré-antrais bovinos cultivados in situ.

Agradecimentos

ÀCAPES/CNPq – IEL Nacional – Brasil, pela bolsa de estudos; à FAPEMIG e ao CNPq, pelo recurso financeiro e à Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Referências

- ARAUJO, V. R. Estudo dos fatores que afetam a eficiência do cultivo in vitro de folículos pré-antrais caprinos e bovinos: efeito do regime de troca, meios de cultivo de base e suplementos. 2013. 290 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2013.
- ARAÚJO, V. R.; GOMES DA SILVA, C. M.; MAGALHAES, D. M.; DA SILVA, G. M.; BAO, S. N.; VIANA SILVA, J. R.; DE FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Effect of bone morphogenetic protein7 (BMP-7) in vitrosurvival of caprine preantral follicles. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 30, p. 305-310, 2010.

- BASSO, A. C.; ESPER, C. R. Isolamento e caracterização ultraestrutural de folículos pré-antrais de vacas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*,v. 39, p. 311-319, 2002.
- BRAW-TAL, R.; YOSSEFI, S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *J. Reprod. Fertil.*,v. 109, p. 165-171, 1997.
- BRUNO, J. B.; CELESTINO, J. J. H.; LIMA-VERDE, I. B.; LIMA, L. F.; MATOS, M. H. T.; ARAÚJO, V. R.; SARAIVA, M. V. A.; MARTINS, F. S.; NAME, K. P. O.; CAMPELLO, C. C.; BÃO, S. N.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor in goat ovaries and improvement of in vitro caprine preantral follicle survival and growth with VEGF. *Reprod. Fertil. Dev.*,v. 21, p. 679-687, 2009.
- CANTO, M.; LAUAND, T. C. G. Deficiência de vitamina D e fatores determinantes dos níveis plasmáticos de 25-hidroxivitamina D. *Brasília Méd.*,v. 45, n. 3, p. 208-217, 2008.
- CASTRO, L. C. G. O sistema endocrinológico vitamina D. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*,v. 55, p. 8, 2011.
- CELESTINO, J. J. H.; SANTOS, R. R.; MARTINS, F. S.; MATOS, M. H. T.; FIGUEIREDO, J. R.; COSTA, S. H. F.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R. Preservation of bovine preantral follicles in 0.9% saline solution or TCM-199. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*,v. 59, p. 591-599, 2007.
- COSTA, L. F. S.; GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; CARÁMBULA, S. F.; NEVES, J. P. MONTAGNER, M. M. In vitro development of bovine preantral follicles in monolayer of ovarian cells. *Ciênc. Rural*,v. 31, p. 323-327, 2001
- FERREIRA, T.; RASBAND, W. ImageJ. User Guide IJ 1.46r. Reviewed by Michael Schmid September/October 2012.
- 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.
- FLADEBY, C.; SKAR, R.; SERCK-HANSEN, G. Distinct regulation of glucose transport and GLUT1/GLUT3 transporters by glucose deprivation and IGF-1 in chromaffin cells. *Biochim. Biophys. Acta.*,v. 1593, p. 201-208, 2003.
- GUTIERREZ, C. G.; RALPH, J. H.; TELFER, E. E.; WILMUT, I.; WEBB, R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. *Biol. Reprod.*,v. 62, p. 1322-1328, 2000.
- HASKÓ, G.; LINDEN, J.; CRONSTEIN, B.; PACHER, P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.*,v. 7, n. 9, p. 759-770, 2008.

- HULSHOF, S. C. J.; FIGUEIREDO, J. R.; BECKERS, J. F.; BEVERS, M. M.; van den HURK, R. Isolation and characterization of preantral follicles from fetal bovine ovaries. *Veterinary Q.*, v. 16, p. 78-80, 1994.
- 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. *Biol.Reprod.*, v. 67, p. 1099-1105, 2002.
- JEE, B. C.; KIM, J. H.; PARK, da H.; YOUM, H.; SUH, C. S.; KIM, S. H. In vitro growth of mouse preantral follicles: effect of animal age and stem cell factor/insulin-like growth factor supplementation. *Clinical and Experimental Reproductive Medicine*, v. 39, p. 107-113. Erratum in *Clin.Exp.Reprod.Med.*, v. 39, p. 193, 2012.
- JIN, S. Y.; LEI, L.; SHIKANOV, A.; SHEA, L. D.; WOODRUFF, T. K. A novel two-step strategy for in vitro culture of early-stage ovarian follicles in the mouse. *Fertil.Steril.*, v. 93, p. 2633-2639, 2010.
- LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. *Principles of biochemistry*. 5.ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2008. 528 p.
- LIMA, A. História, ação, hipervitaminose e hipovitaminose de cada vitamina. Disponível em: <<http://www.passeidireto.com/arquivo/1922440/resumo-sobre-vitaminas>>. Acesso em: 16 dez. 2013.
- MAGALHÃES-PADILHA, D. M.; DUARTE, A. B. G.; ARAÚJO, V. R.; SARAIVA, M. V. A.; ALMEIDA, A. P.; RODRIGUES, G. Q.; MATOS, M. H. T.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R.; GASTAL, M. O.; GASTAL, E. L.; FIGUEIREDO, J. R. Steady-state level of insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor mRNA and the effect of IGF-I on the in vitro culture of caprine preantral follicles. *Theriogenology*, v. 77, p. 206-213, 2012.
- MATOS, M. H. T.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Técnicas para avaliação da qualidade de folículos ovarianos pré-antrais cultivados in vitro. *Rev. Bras. Reprod.Anim.*, Belo Horizonte, v. 31, p. 433-442, 2007a.
- MATOS, M. H.; van den HURK, R.; LIMA-VERDE, I. B.; LUQUE, M. C.; SANTOS, K. D.; MARTINS, F. S.; BÃO, S. N.; LUCCI, C. M.; FIGUEIREDO, J. R. Effects of fibroblast growth factor-2 on the in vitro culture of caprine preantral follicles. *Cells Tissues Organs*, v. 186, p. 112-120, 2007b.
- McLAUGHLIN, M.; BROMFIELD, J. J.; ALBERTINID, F.; TELFER, E. E. Activin promotes follicular integrity and oogenesis in cultured pre-antral bovine follicles. *M. Hum. Reprod.*, v. 16, p. 644-653, 2010a.
- McLAUGHLIN, M.; TELFER, D. E. Oocyte development in bovine primordial follicles is promoted by activin and FSH within a two-step serum-free culture system. *Soc. Reprod. Fertil.*, v. 139, p. 971-978, 2010b.

- MELDAU, D. C.; SOARES, J. L. Nucleotídeos. Biologia. Editora Scipione. Vol. único. Disponível em: <<http://www.infoescola.com/citologia/nucleotideos/>>. Acesso: 16 dez. 2013.
- MORAES, M. Cultura de células animais. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/88969487/9-Cultura-de-celulas-animais>>. Acesso em: 16 dez. 2013.
- PREMAOR, M. O.; FURLANETTO, T. W. Hipovitaminose D em adultos: entendendo melhor a apresentação de uma velha doença. Arq. Bras. Endocrinol. Metab., v. 50, p. 25-37, 2006.
- REZENDE, J. R. R.; ALVES, A. P.; OLIVEIRA, F. C.; MOTTA, M. S.; MARTINS, C. H.; NETO, C. P. W. Diagnóstico da deficiência de Vitamina K. Revista Científica do ITPAC, v. 5, n. 1, 2012.
- ROSSETTO, R.; SANTOS, R. R.; SILVA, G. M.; DUARTE, A. B. G.; SILVA, C. M. G.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Comparative study on the in vitro development of caprine and bovine preantral follicles. Small Ruminant Research, v. 113, n. 1, p. 167-170, 2013.
- ROSSETTO, R.; SARAIVA, M. V.; SANTOS, R. R.; SILVA, C. M.; FAUSTINO, L. R.; CHAVES, R. N.; BRITO, I. R.; RODRIGUES, G. Q.; LIMA, I. M.; DONATO, M. A.; PEIXOTO, C. A.; FIGUEIREDO, J. R. Effect of medium composition on the in vitro culture of bovine pre-antral follicles: morphology and viability do not guarantee functionality. Zygote, v. 21, p. 125-128, 2012.
- ROY, S. K.; TERADA, D. M. Activities of glucose metabolic enzymes in human preantral follicles: in vitro modulation by follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, epidermal growth factor, insulin-like growth factor I, and transforming growth factor beta1. Biol. Reprod., v. 60, p. 763-8, 1999.
- SAHA, S.; SAHA, S.; SHIMIZU, M.; GESHI, M.; IZAIKE, Y. In vitro culture of bovine pré-antral follicles. Anim. Reprod. Sci., v. 63, p. 27-39, 2000.
- SARAIVA, M. V. A.; CELESTINO, J. J. H.; ARAÚJO, V. R.; CHAVES, R. N.; ALMEIDA, A. P.; LIMA-VERDE, I. B.; DUARTE, A. B.; SILVA, G. M.; MARTINS, F. S.; BRUNO, J. B.; MATOS, M. H. T.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Expression of follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) in goat ovarian follicles and the impact of sequential culture medium on in vitro development of caprine preantral follicles. Zygote, v. 19, p. 205-214, 2011.
- SERAFIM, M. K.; SILVA, G. M.; DUARTE, A. B.; ARAÚJO, V. R.; SILVA, T. F.; LIMA, A. K.; CHAVES, R. N.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, L. D.; FIGUEIREDO, J. R. High insulin concentrations promote the in vitro growth and viability of canine preantral follicles. Reprod. Fertil. Dev., v. 25, n. 6, p. 927-34, 2013.
- SILVA, B. C.; CAMARGOS, B. M.; FUJII, G. B.; DIAS, E. P.; SOARES, M. M. S. Prevalência de deficiência e insuficiência de vitamina D e sua correlação com PTH, marcadores de remodelação óssea e densidade mineral óssea, em pacientes ambulatoriais. Arq. Bras. Endocrinol. Metab., v. 52, p. 482-488, 2008.

- SILVA, J. R. V.; FERREIRA, M. A. L.; COSTA, S. H. F.; SANTOS, R. R.; CARVALHO, F. C. A.; RODRIGUES, A. P. R.; LUCCIB, C. M.; BÁOB, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Degeneration rate of preantral follicles in the ovaries of goats. *Small Ruminant Research*, v. 43, p. 203-209, 2000.
- SUN, J.; LI, X. Growth and antrum formation of bovine primary follicles in long-term culture in vitro. *Reprod. Biol.*, v. 13, p. 221-228, 2013.
- SUN, L.; LU, J.; YU, X. J.; LI, D. L.; XU, X. L.; WANG, B.; REN, K. Y.; LIU, J. K.; ZANG, W. J. Adenine sulfate improves cardiac function and the cardiac cholinergic system after myocardial infarction in rats. *J. Pharmacol. Sci.*, v. 115, p. 205-13, 2011.
- THOMAS, F. H.; CAMPBELL, B. K.; ARMSTRONG, D. G.; TELFER, E. E. Effects of IGF-1 bioavailability on bovine preantral follicular development in vitro. *Reproduction*, v. 133, p. 1121-128, 2007.
- 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.
- van den HURK, R.; SPEK, E. R.; HAGE, W. J.; FAIR, T.; RALPH, J. H.; SCHOTANUS, K. Ultrastructure and viability of isolated bovine pré-antral follicles. *Human Reprod.*, v. 4, p. 833-841, 1998.
- XU, M.; KREEGER, P. K.; SHEA, L. D.; WOODRUFF, T. K. Tissue-engineered follicles produce live, fertile offspring. *Tissue Eng.*, v. 12, p. 2739-2746, 2006.

CAPÍTULO 2

OS EFEITOS DO IGF-1 E GH SOBRE O CULTIVO IN VITRO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS BOVINOS SÃO DOSE DEPENDENTE

Effects of IGF-1 and GH on in vitro culture of bovine preantral follicles are dose dependent

Carolina Rodriguez Jimenez^{a*}, Jovana Luiza de Azevedo^a, Renata Gomes Silveira^a, Jurandy Penitente-Filho^a, Valdevane Rocha Araujo^b, Erly Carrascal, Fabrício Albani Oliveira, Ciro Alexandre Alves Torres^a

^a Departamento de Zootecnia, Laboratório de Fisiologia e Reprodução Animal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

^b Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-Antrais, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

* Correspondência do autor: zoocaro@hotmail.com.

Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de diferentes concentrações do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) e do hormônio do crescimento (GH) no desenvolvimento dos folículos pré-antrais bovinos cultivados in situ sobre as taxas de folículos morfológicamente normais, viáveis, primordiais e em desenvolvimento, bem como diâmetro folicular e oocitário. Fragmentos ovarianos coletados de vacas sem padrão racial definido foram cultivados in vitro por um e sete dias, em placas de 24 poços, estufa à 37 °C e 5% de CO₂. Os fragmentos do córtex ovariano foram cultivados em 1 mL de α -MEM⁺, suplementados com diferentes concentrações de IGF-1 recombinante humano (Exp. 1 =0, 30, 70, 100 ng/mL) ou GH recombinante humano (Exp. 2 =0, 10, 25, 50 ng/mL). Os parâmetros morfológicos e morfométricos foram submetidos à ANOVA, seguidos de comparações entre as médias pelos testes de Tukey e Dunnett, os percentuais de folículos viáveis foram avaliados pelo teste de Qui-quadrado (χ^2). Os resultados mostraram que 30 ng/mL de IGF-1 ou 50 ng/mL de GH foram as concentrações mais eficazes, aumentando os folículos morfológicamente normais, em desenvolvimento e diâmetro folicular, bem como conservaram a viabilidade folicular do D1 ao D7 no cultivo in vitro dos folículos pré-antrais cultivados inclusos no tecido ovariano bovino.

Palavras-chave: oócito; células da granulosa; foliculogênese; in situ.

Introdução

A foliculogênese é um processo complexo que envolve a formação e o crescimento de folículos primordiais até o estágio de folículos pré-ovulatórios e pode ser dividido nas fases pré-antral e antral. Na fase pré-antral, ocorre a ativação dos folículos primordiais e posterior o crescimento para os estádios de folículos primários e secundários. Já a fase antral tem início com o aparecimento do antro nos folículos terciários, e termina com a formação do folículo pré-ovulatório ou De Graaf (SILVA et al., 2002). Apesar do desenvolvimento de folículos antrais em bovinos, informações concernentes à fase pré-antral ainda são escassas. Neste sentido, a compreensão dos mecanismos que regulam este processo é de muita importância para maximizar a eficiência reprodutiva dos animais.

Folículos podem ser cultivados in situ, ou seja, inclusos em fragmentos do córtex ovariano ou isolados. O cultivo in situ proporciona a manutenção da integridade tridimensional dos folículos e a sua interação com as células do estroma. Já o cultivo de folículos isolados permite o monitoramento individual dos folículos durante todo o período de cultivo (ABIR et al., 2001). Nas últimas duas décadas, vários sistemas de cultivo foram desenvolvidos e os resultados são dependentes do tipo de meio e sistema de cultivo utilizado, bem como da espécie animal (EPPIG; SCHOEDER, 1989; FORTUNE, 2003). Apesar de já ter sido relatada a obtenção de produtos viáveis a partir de folículos pré-antrais em animais de laboratório, em animais de produção este objetivo ainda não foi alcançado. O fator limitante para a produção in vitro de embriões a partir de folículos pré-antrais de animais domésticos é a ausência de um meio de cultivo ideal que assegure a manutenção da viabilidade, da ativação, do crescimento e da completa maturação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais. Desta forma, além dos meios de cultivo de base, também se faz necessário o estudo mais aprofundado de cada suplemento que possa agir positiva ou negativamente sobre os parâmetros citados anteriormente.

O IGF-1, por exemplo, possui receptores nas células da granulosa de folículos primários, secundários e antrais bovinos (MONGET et al., 2000), cumprindo funções

como supressor de apoptose (MAKAREVICH; MARKKULA, 2002), indutor da mitose das células da granulosa (ARMSTRONG; XIA, 1993), promotor da maturação oocitária (LORENZO et al., 1994) e do desenvolvimento de embriões bovinos (KAYE et al., 1997). Estudos in vivo têm indicado que as concentrações de IGF-1 se elevam com o aumento do tamanho dos folículos ovarianos (SPICER; ENRIGHT, 1991). Os efeitos estimulantes do IGF-1 na proliferação das células da granulosa e síntese de DNA in vitro foram demonstrados em suínos, ovinos e bovinos (SPICER et al., 1993). Entretanto, diferentes concentrações de IGF-1 têm sido avaliadas, mostrando resultados divergentes. Spicer et al. (1995) trabalharam com concentrações de 100 até 400 ng/mL de IGF-1 e mostraram efeitos sobre a proliferação de células da granulosa bovina, a produção de progesterona e estradiol no cultivo in vitro. Em outros estudos foram utilizadas concentrações de 100 e 200 ng/mL de IGF-1 no cultivo in vitro de embriões bovinos (SOUZA et al., 2009). Thomas et al. (2007), em um trabalho utilizando 50 ng/mL de IGF-1 em folículos pré-antrais bovinos, durante seis dias de cultivo, mostraram aumento do diâmetro folicular, bem como a produção de estradiol. Por outro lado, Fortune et al. (2004) relataram que concentrações de IGF-1 (1, 10 e 100 ng/mL) não estimularam os folículos primordiais e primários bovinos durante o cultivo in situ e aumentaram a atresia folicular.

Com relação ao GH, o RNA mensageiro (RNA_m) para o receptor de GH (GHR) já foi detectado em ovários bovinos e ovinos por hibridização in situ (ECKERY et al., 1997). Em ovários bovinos, o RNA_m do GHR já foi localizado no oócito de folículos primordiais e primários, e começa a ser expresso em células da granulosa de folículos primários, permanecendo durante o estágio secundário (KÖLLE et al., 1998). Experimentos in vivo têm relatado que o GH atua promovendo o desenvolvimento de folículos ovarianos bovinos (GONG et al., 1991), aumentando as concentrações periféricas de insulina e, ou, IGF-1 em novilhas (GONG et al., 1997). Shimizu et al. (2008) demonstraram que o aumento da expressão de GHR em células da granulosa pode ser o ponto para que o folículo antral entre no estágio pré-ovulatório, podendo, desta forma, auxiliar no processo de maturação folicular. Em bovinos, a utilização de 100 ng/mL de GH associados à insulina aumentou a síntese de progesterona e a proliferação das células da granulosa cultivadas por quatro dias (LANGHOUTET et al., 1991). Em ovinos, o FSH e o GH atuaram como reguladores da secreção de IGF-1 de forma dose-dependente, além de estimularem a produção de estrógeno (KHALID et al., 2000). Shimizu et al. (2008) observaram que folículos dominantes esteroides ativos e

pré-ovulatórios bovinos produzem mais GH que folículos esteroides inativos. Magalhães-Padilha (2012) obteve a ativação de folículos primordiais e sua posterior progressão para folículos secundários caprino, adicionando 10 ng/mL de GH como um de seus suplementos no cultivo in vitro. Similarmente, Zhao et al. (2000) demonstraram que o GH promoveu o desenvolvimento folicular e melhorou a morfologia no cultivo in vitro de folículos pré-antrais de ratos.

Desta forma, a análise da eficiência de fatores de crescimento e hormônios é indispensável para determinar as diferenças, vantagens ou desvantagens sobre o desenvolvimento dos folículos pré-antrais em cada espécie. Assim, o objetivo do presente estudo foi identificar a concentração adequada do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) e do hormônio do crescimento (GH) para o desenvolvimento dos folículos pré-antrais bovinos cultivados in situ.

Material e métodos

Fonte de ovários

Ovários (n = 24) de vacas sem idade e padrão racial definido (SPRD) foram coletados em abatedouro local. Imediatamente após a coleta, os ovários foram lavados em álcool 70%, seguidos por duas lavagens em TCM-199 (CELESTINO et al., 2007), suplementados com 20 mM de HEPES, 2.200 mg/L de bicarbonato de sódio (SAHA et al., 2000), 25 µg/mL de ácido pirúvico, 75 µg/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina (McLAUGHLIN et al., 2010), denominado como TCM-199 de transporte. Os ovários foram transportados ao laboratório em tubos Falcon, com TCM-199 de transporte, à temperatura de 4 °C (BASSO et al., 2002).

Protocolo experimental

No laboratório foram removidos todos os tecidos gordurosos e ligamentos dos ovários. O córtex do ovário foi dividido em fragmentos de aproximadamente 3 x 3 x 1 mm. Um fragmento foi imediatamente fixado para análise histológica (controle não cultivado). Os demais fragmentos do córtex ovariano foram individualmente cultivados in vitro em 1 mL de α -MEM, suplementados com 20 mM de HEPES, 3 mM de glutamina, 10 ng/mL de insulina, 2,5 µg/mL de transferina, 4 ng/mL de selênio, 0,1 % de albumina sérica bovina (BSA), 0,1 mg/mL de penicilina e 0,1 mg/mL estreptomicina, denominado α -MEM⁺ (JIMENEZ et al., 2013). Os fragmentos foram

cultivados em α -MEM⁺ sozinho ou adicionados de IGF-1 ou GH em diferentes concentrações. No experimento 1–IGF-1 humano recombinante (0, 30,70,100ng/mL), e no experimento 2– GH humano recombinante (0, 10,25,50 ng/mL) Life Technologies (Van Allen Way, Carlsbad, California, USA). Todos os produtos químicos utilizados no presente estudo foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo.), salvo indicação em contrário. Os tecidos foram cultivados durante um e sete dias, à 37 °C com 5% de CO₂ usando placa de cultivo de 24 poços. O meio de cultivo foi substituído totalmente por meio fresco a cada dois dias. Cada tratamento foi repetido seis vezes utilizando os ovários de seis animais diferentes. A Figura 1 mostra o organograma do protocolo experimental 1 e 2.

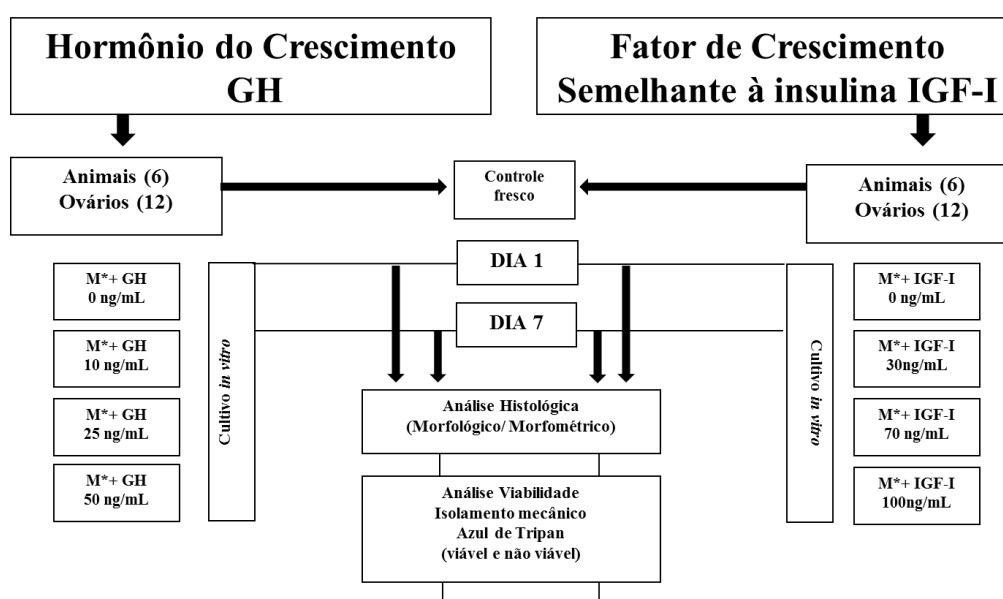


Figura 1 – Organograma do protocolo experimental do experimento 1(IGF-1) e 2(GH).M* =meio base-padrão (α -MEM⁺); D1 =dia 1; e D7 = dia 7.

Análise morfológica e avaliação in vitro do desenvolvimento folicular

Antes (controle fresco) e após um e sete dias de cultura, todos os fragmentos foram fixados em solução Carnoy durante 4 horas, à temperatura ambiente e, em seguida, desidratados em concentrações crescentes de álcool, diafanizados em xilol e incluídos em parafina (Vetec/Sigma, Brasil). Os fragmentos de ovário bovino foram cortados em secções de 5 μ m, sendo cada secção montada e corada pelo ácido periódico de Schiff (PAS)-hematoxilina. Uma vez montados, os cortes histológicos foram examinados em microscópio óptico (Olympus BX50, Japão) sob aumento de 400X. Os estádios dos folículos pré-antrais foram definidos em folículo primordial, caracterizados pela presença de oócito esférico ou ovoide, completamente rodeado por uma camada

simples de células da granulosa achatadas e, ou, pavimentosas, ou folículos em desenvolvimento, sendo estes primários com uma única camada de células da granulosa de morfologia cúbica em torno do oócito, e secundários, com oócito circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa de morfologia cúbica (BASSO; ESPER, 2002). Os folículos foram ainda classificados como normais quando os oócitos encontravam-se intactos circundados por células da granulosa, bem organizadas, em uma ou mais camadas, sem núcleo picnótico e folículos degenerados foram definidos quando apresentaram oócito com núcleo picnótico, retração citoplasmática e, ou, células da granulosa desorganizadas (SILVA et al., 2002). Foram avaliados 180 folículos pré-antrais por tratamento e 30 por repetição.

Os diâmetros de folículos e oócitos morfológicamente normais foram registrados a partir das extremidades externas da camada de células da granulosa e da membrana do oócito, respectivamente. Foram calculados pelo programa Image J/Fiji 1.46 (FERREIRA; RASBAND, 2012). Dois diâmetros perpendiculares foram registrados para cada um dos parâmetros (horizontal e vertical) e a média dos valores foi analisada. Em geral, 270 diâmetros foliculares e oocitários foram avaliados, 30 para cada tratamento e dia de cultivo (D1 e D7).

Avaliação da viabilidade do folículo pré-antral isolado pós-cultivo in situ

Para confirmar os resultados dos folículos morfológicamente normais, os fragmentos ovarianos foram isolados mecanicamente para a análise de viabilidade antes (controle) e após cultivo por um e sete dias. Para tanto, folículos pré-antrais foram isolados pelo processo mecânico descrito por Figueiredo et al. (1994). Resumidamente, amostras foram finamente fragmentadas e colocadas em 5 mL de TCM-199, suplementadas com 20 mM de HEPES; 2.200 mg/L de bicarbonato de sódio (SAHA et al., 2000); 2 mM de piruvato de sódio; 75 µg/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina e 10% BSA (McLAUGHLIN et al., 2010a). Com auxílio da pipeta Pasteur de 1.000 e 600 µm foram ressuspensas 80 vezes cada, a fim de separar os folículos pré-antrais do estroma. O material obtido foi passado duas vezes através de uma malha de nylon de 100 µm, resultando em uma suspensão contendo folículos menores de 100 µm de diâmetro. Posteriormente, a viabilidade dos folículos pré-antrais foi analisada com Azul de Trypan. A cada 100 µL de meio de suspensão contendo folículos pré-antrais isolados, foram adicionados 5 µL do corante Azul de Trypan (0,4%; Vetec/Sigma, Brasil). Os folículos isolados foram observados em microscópio

invertido (Leica DFC295, Alemanha), com aumento de 100X, e classificados em viáveis ou não viáveis, quando não corados ou corados em azul, respectivamente (van den HURK et al., 1998). Um total de 450 folículos pré-antrais isolados foram classificados (50 folículos por tratamento).

Análise estatística

As análises morfológicas de folículos pré-antrais normais, primordiais e em desenvolvimento (primários e secundários) e as análises morfométricas (diâmetro folicular e oocitário) foram submetidas à análise de variância (ANOVA), seguidas de comparações entre as médias, pelo teste de Tukey, para comparação entre tratamentos e pelo teste de Dunnett, para comparação entre o controle e os tratamentos (versão 9.1; SAS; 2004). A variável qualitativa de viabilidade do folículo pré-antral isolado foi comparada em tabela de contingência e analisada pelo teste de Qui-quadrado (χ^2). Valores foram considerados significativos quando ($P < 0,05$).

Resultados

Experimento 1– Efeito de diferentes concentrações do IGF-1 sobre o cultivo in vitro de folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano bovino

Um total de 1.620 folículos foi analisado histologicamente: 180 no controle não cultivado; 720 para dia 1 (D1); e 720 para dia 7 (D7). Em relação à morfologia folicular, o percentual de folículos morfolologicamente normais observado no tratamento IGF-1 30 ng/mL, foi similar ao controle fresco ($P > 0,05$) tanto no D1 como no D7 de cultivo in vitro. Os tratamentos IGF-1 0, 70 e 100 ng/mL apresentaram menor percentagem de folículos morfolologicamente normais diferindo ($P < 0,05$) do controle após um e sete dias de cultivo. Na comparação entre tratamentos, o IGF-1 30 ng/mL foi superior ($P < 0,05$) a todos os demais tratamentos no percentual de folículos morfolologicamente normais no D1, como no D7 de cultivo, exceto o tratamento IGF-1 100 ng/mL no D1 de cultivo ($P > 0,05$; Figuras 2b e 4).

A viabilidade dos folículos pré-antrais foi determinada depois de análise subjetiva por Azul de Trypan. Foram analisados 450 folículos pré-antrais isolados mecanicamente do estroma ovariano. O efeito da adição de IGF-1 sobre a viabilidade de folículos pré-antrais isolados após cultivo in situ está indicado na Figura 2b e 5. Após um dia de cultivo, tanto o controle fresco como os meios de cultivo contendo IGF-1, não mostraram diferenças ($P > 0,05$) na viabilidade folicular. Após sete dias de cultivo, a percentagem de folículos viáveis diminuiu quando comparado com o controle fresco

($P < 0,05$). No entanto, entre tratamentos cultivados, a percentagem de folículos viáveis não diferiu após um e sete dias de cultivo ($P > 0,05$). Todos os tratamentos cultivados diminuíram o percentual de folículos viáveis do D1 até o D7 de cultivo ($P < 0,05$), exceto o IGF-1 100 ng/mL ($P > 0,05$), que manteve o mesmo percentual de viabilidade.

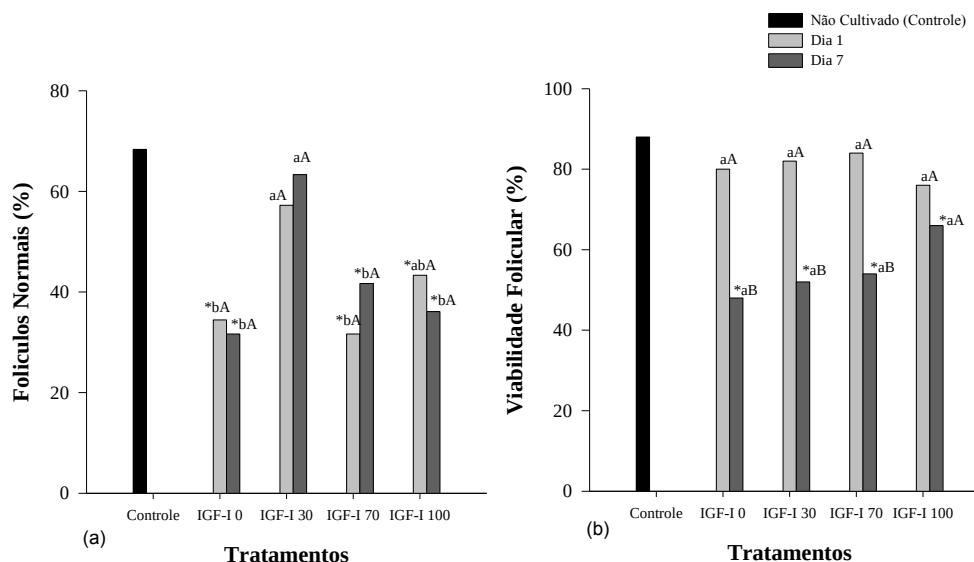


Figura 2—Percentagem de folículos pré-antrais bovinos normais (a) e viáveis (b) do controle e após um e sete dias de cultivo in vitro em α -MEM⁺ suplementado com IGF-1(0, 30, 70 e 100ng/mL). * Diferença com o tratamento-controle ($P < 0,05$); ^{a,b} Letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos ($P < 0,05$); ^{A,B} Letras maiúsculas indicam diferença entre os dias de cultivo ($P < 0,05$).

O percentual de folículos primordiais no D1 e D7 de cultivo foi inferior nos grupos cultivados (IGF-1 0, 30, 70 e 100ng/mL; $P < 0,05$), exceto o tratamento IGF-1 30 ng/mL que foi similar quando comparado com o controle fresco após um dia de cultivo ($P > 0,05$). Os tratamentos cultivados não apresentaram diferenças ($P > 0,05$) no percentual de folículos primordiais no D1 ou D7 de cultivo, como também na análise individual de cada tratamento (Figura 3a).

O tratamento IGF-1 30 ng/mL mostrou após sete dias de cultivo maiores percentagens de folículos em desenvolvimento (48,33%) que o controle fresco (22,22%) ($P < 0,05$; Figura 3b). Os tratamentos com IGF-I (0, 70 e 100 ng/mL) não apresentaram diferenças com o controle fresco após um e sete dias de cultivo ($P > 0,05$). O tratamento IGF-1 30 ng/mL teve aumento significativo no percentual de desenvolvimento folicular quando comparado aos demais tratamentos cultivados ($P < 0,05$), bem como entre os dias de cultivo (D1 e D7; $P < 0,05$).

Os diâmetros antes (controle fresco) e depois de um e sete dias de cultivo são mostrados na Tabela 1. O tratamento IGF-1 30 ng/mL apresentou diâmetro folicular inferior quando comparado com o controle fresco e demais tratamentos cultivados após um dia de cultivo; entretanto, após sete dias de cultivo foi superior ao controle e demais concentrações testadas de IGF-1 (0, 70 e 100 ng/mL; $P < 0,05$). Os tratamentos IGF-1

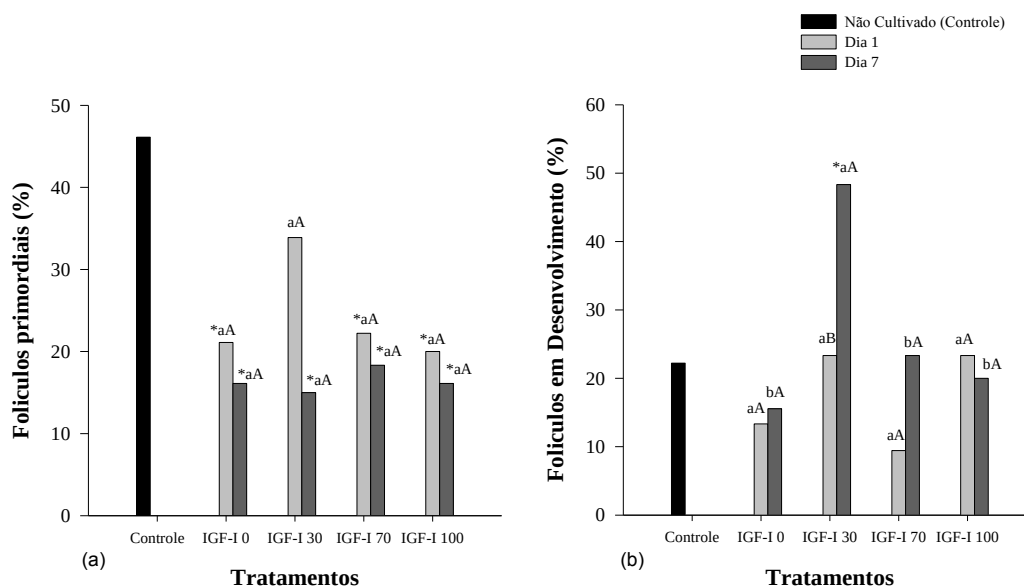


Figura 3 – Percentagem de folículos pré-antrais bovinos primordiais (a) e em desenvolvimento (b) do controle e após um e sete dias de cultivo in vitro em α -MEM⁺ suplementado com IGF-1 (0, 30, 70 e 100ng/mL). * Diferença com o tratamento-controle ($P < 0,05$); ^{a,b} Letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos ($P < 0,05$); ^{A,B} Letras maiúsculas indicam diferença entre os dias de cultivo ($P < 0,05$).

30 e 70 ng/mL aumentaram de modo significativo o diâmetro folicular no decorrer do cultivo (D1 até D7), com uma média no D1 de (34,14 e 38,08 μ m) e D7 (62,05 e 43,22 μ m), respectivamente ($P < 0,05$).

Em relação ao diâmetro oocitário todos os tratamentos cultivados diminuíram o diâmetro oocitário diferindo do controle fresco ($P < 0,05$) após um dia de cultivo e sem diferenças ($P > 0,05$) observadas entre os tratamentos cultivados. Apesar disto, após sete dias de cultivo, o tratamento IGF-130 ng/mL apresentou diâmetro oocitário significativamente maior que os tratamentos de IGF-1 (0, 70 e 100 ng/mL) e sem diferenças com o controle fresco ($P > 0,05$). O tratamento IGF-1 30 ng/mL apresentou diferenças ($P < 0,05$) no decorrer do cultivo, aumentando o diâmetro oocitário do D1 (20,39 μ m) até o D7 (25,33 μ m; Tabela 1).

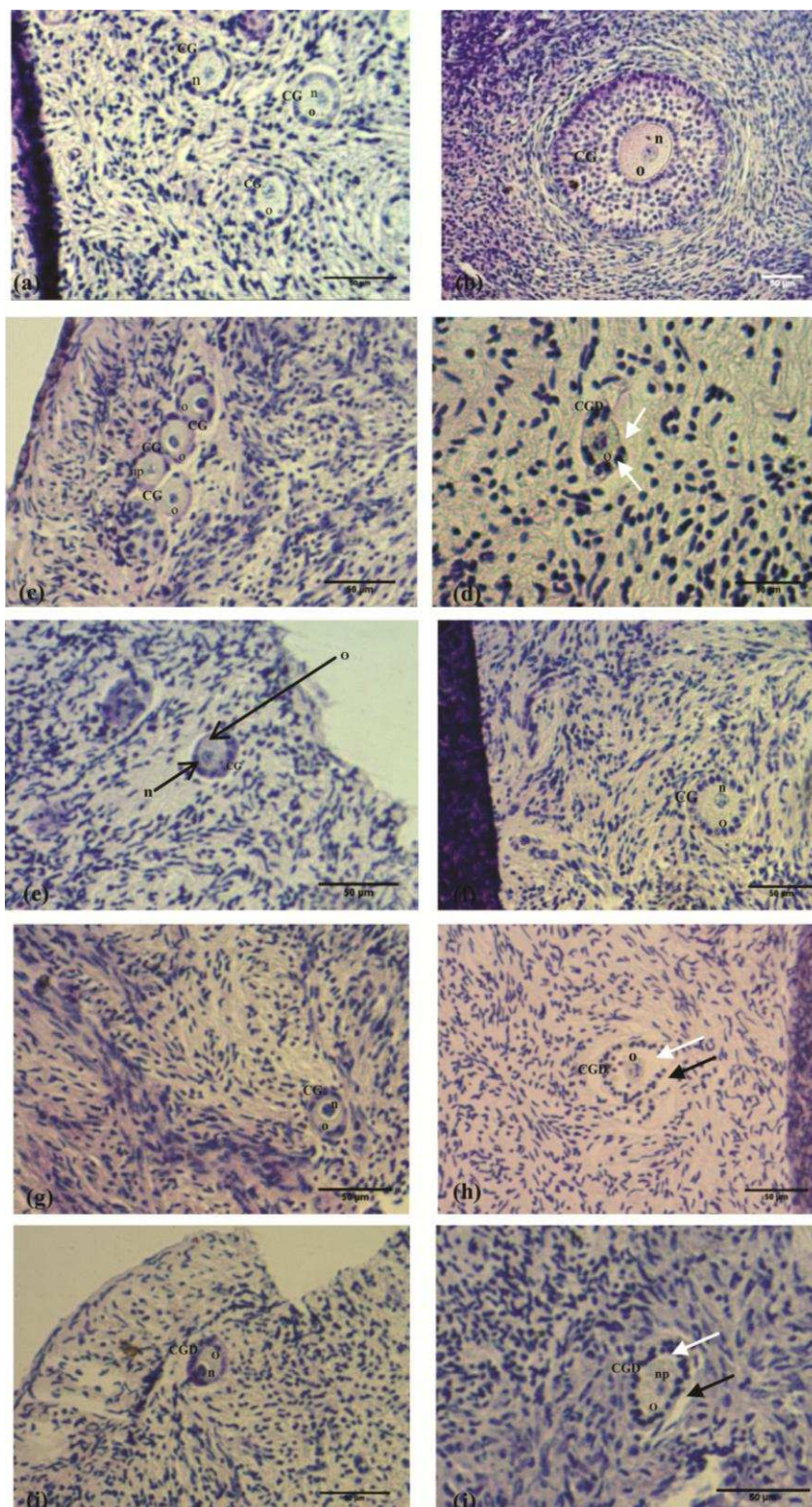


Figura 4–Folículos pré-antrais bovinos não cultivados (controle fresco, a,b = primordiais e secundário) e depois de um e sete dias de cultivo em α -MEM⁺ com: 0 ng/mL de IGF-1 (c,d = primordiais); 30 ng/mL de IGF-1 (e,f = primordial e primário); 70 ng/mL de IGF-1 (g,h = primordial e primário) e 100 ng/mL de IGF-1 (i,j = primordial e primário). Folículos degenerados com retração oocitária (seta branca), retração das células da granulosa (seta preta), células da granulosa desorganizadas (CGD) e núcleo picnótico (np). O= oócito; n = núcleo; CG= células da granulosa. Ampliação 400X; PAS-hematoxilina.

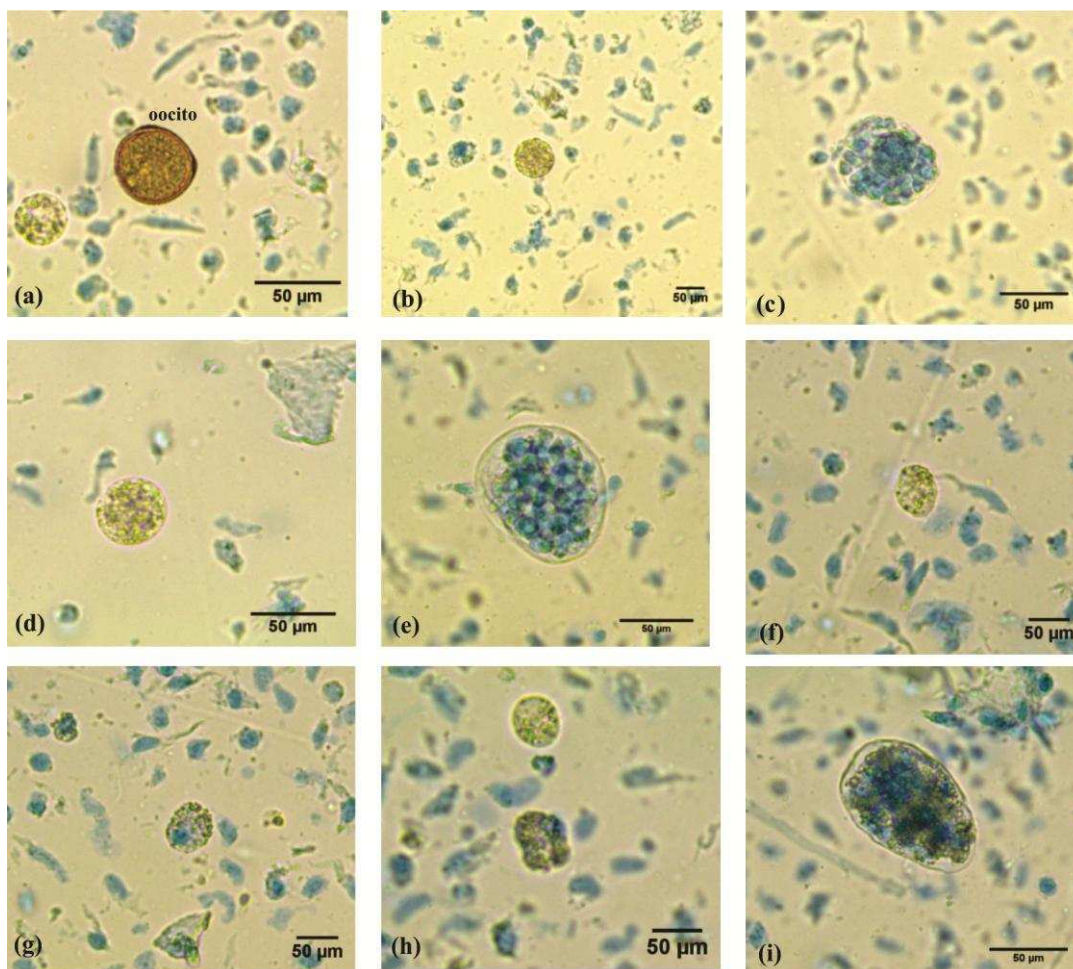


Figura 5 – Folículos pré-antrais bovinos mecanicamente isolados avaliados por microscopia de luz. Controle (a = primordial viável) e folículos isolados após sete dias de cultivo in situ em α -MEM⁺ com: 0 ng/mL de IGF-1(b,c = primordial viável, secundário não viável);30 ng/mL de IGF-1 (d,e = primordial viável, secundário não viável); 70ng/mL de IGF-1(f,g =primordial viável e não viável); e 100ng/mL de IGF-1 (h,i =primordial viável e secundário não viável. Corados com azul de Tripán (mortos) não corados (vivos).

Tabela 1 – Média $\pm$ erro-padrão da média do diâmetro folicular/oocitário em micrômetros (μ m) de folículos pré-antrais bovinos cultivados com diferentes concentrações de IGF-1

Controle	40,35 $\pm$ 1,87		26,63 $\pm$ 0,99	
	Folículo		Oócito	
Tratamentos	Dia 1	Dia 7	Dia 1	Dia 7
IGF0	36,19 $\pm$ 1,79 ^{abA}	36,76 $\pm$ 2,40 ^{bA}	20,13 $\pm$ 0,72 ^{*aA}	20,70 $\pm$ 1,16 ^{*bA}
IGF-1 30	34,14 $\pm$ 1,40 ^{*bB}	62,05 $\pm$ 7,92 ^{*aA}	20,39 $\pm$ 0,52 ^{*aB}	25,33 $\pm$ 1,32 ^{aA}
IGF-1 70	34,08 $\pm$ 1,95 ^{abB}	43,22 $\pm$ 4,15 ^{bA}	20,23 $\pm$ 0,97 ^{*aA}	20,16 $\pm$ 1,14 ^{*bA}
IGF-1 100	40,23 $\pm$ 2,58 ^{aA}	36,03 $\pm$ 3,64 ^{bA}	20,44 $\pm$ 0,72 ^{*aA}	20,18 $\pm$ 1,00 ^{*bA}

* Diferença significativa para o tratamento-controle ($P < 0,05$); ^{a,b} Letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna são diferentes ($P < 0,05$); ^{A,B} Letras maiúsculas sobrescritas na linha indicam diferença entre os dias de cultivo ($P < 0,05$); α -MEM =meio essencial mínimo; IGF-1 = fator do crescimento semelhante à insulina 1; e concentrações de IGF-1 em ng/mL.

Experimento 2 –Efeito de diferentes concentrações do GH sobre o cultivo in vitro de folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano bovino

Um total de 1.620 folículos pré-antrais foi analisado por histologia clássica. A Figura 6 mostra a percentagem de folículos normais e viáveis do controle fresco e após um e sete dias de cultivo em α -MEM⁺ com diferentes concentrações de GH. Após um dia de cultivo houve redução ($P < 0,05$) na percentagem de folículos normais nos tratamentos 0 ng/mL (48,89%) e 10 ng/mL de GH (50,56%), quando comparado ao controle fresco (75,56%), não acontecendo o mesmo para os tratamentos 25 ng/mL (57,78%) e 50 ng/mL (65,00%) de GH os quais foram equivalentes ao controle fresco ($P > 0,05$). Entretanto, após sete dias de cultivo o tratamento 50 ng/mL de GH (75,00%) mostrou eficiência equivalente nos folículos morfologicamente normais com o controle a fresco (75,56%; $P > 0,05$). Após um dia de cultivo não foram observadas diferenças ($P > 0,05$) no percentual de folículos morfologicamente normais e os tratamentos cultivados. Ao contrário do dia 7 de cultivo, o tratamento 50 ng/mL de GH apresentou ($P < 0,05$) maior percentagem de folículos morfologicamente normais do que as concentrações 0, 10 e 25 ng/mL de GH (Figura 8).

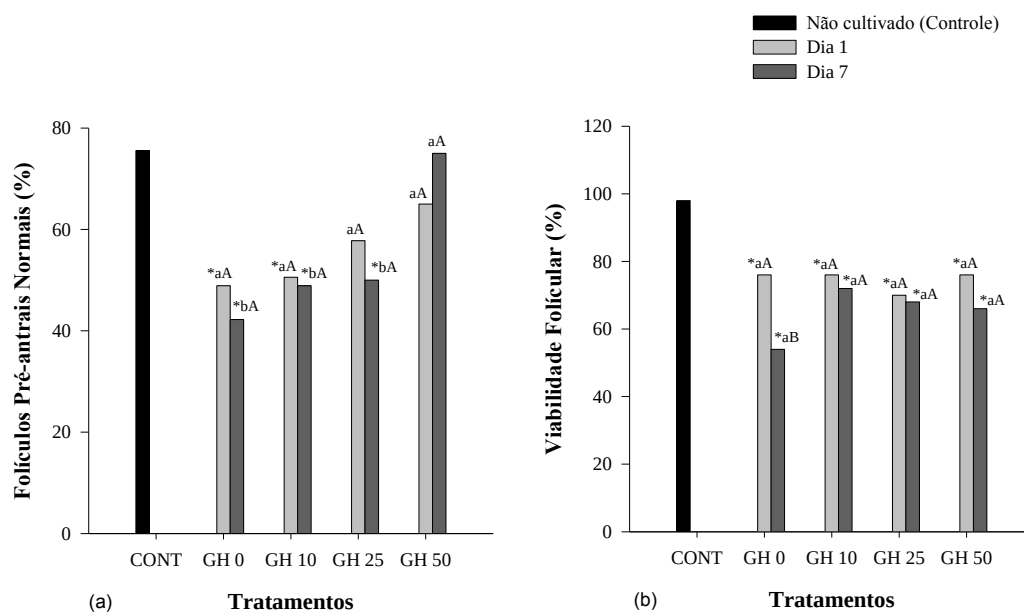


Figura 6 –Percentagem de folículos pré-antrais morfologicamente normais (a) e viáveis (b). Não cultivado (controle) e após um e sete dias de cultivo in vitro em α -MEM⁺ com GH (0, 10, 25 e 50 ng/mL). * Diferença significativa com o tratamento-controle ($P < 0,05$); ^{a,b} Letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos ($P < 0,05$); e ^{A,B} Letras maiúsculas indicam diferença entre os dias de cultivo ($P < 0,05$).

A fim de confirmar a efetividade dos folículos morfologicamente normais observados no presente estudo analisou-se a viabilidade de 450 folículos pré-antrais isolados bovinos. Com base em uma análise quantitativa, observou-se que os tratamentos cultivados diminuíram a viabilidade folicular após sete dias de cultivo, quando comparado com o tratamento não cultivado ($P < 0,05$). Verificou-se também que os folículos pré-antrais cultivados nas concentrações 10, 25 e 50 ng/mL de GH mantiveram a viabilidade desde o D1 até o D7 do cultivo in vitro, mostrando percentagens de 72,68 e 66%, respectivamente. A concentração 0 ng/mL de GH não manteve a viabilidade no decorrer do cultivo (54%) (Figuras 6 e 9).

Quanto aos folículos primordiais, os tratamentos 0, 10 e 25 ng/mL de GH diminuíram a percentagem de folículos primordiais após um dia de cultivo, enquanto somente 50 ng/mL de GH não diferiram do controle fresco neste estágio folicular ($P > 0,05$). Após sete dias de cultivo, os tratamentos com 0, 10 e 25 ng/mL de GH mantiveram percentagens equivalentes de folículos primordiais quando comparado ao D1 ($P > 0,05$; Figura 7a), não acontecendo o mesmo para o tratamento 50 ng/mL de GH, o qual decresceu a percentagem de folículos primordiais após sete dias de cultivo, observando-se (D1; 40,56% e D7; 22,22%; $P < 0,05$). Assim, notou-se redução de folículos primordiais na concentração 50 ng/mL de GH concomitante ao aumento significativo de folículos em desenvolvimento, diferindo tanto do controle fresco como das demais concentrações de GH testadas (Figura 7b).

Os resultados de diâmetro folicular e oocitário antes (controle fresco) e após um e sete dias de cultivo nas diferentes concentrações de GH são apresentados na Tabela 2. Verificou-se que após um dia de cultivo o diâmetro folicular foi inferior nos tratamentos GH 10 e 25 ng/mL ($P < 0,05$), quando comparado com o controle fresco, mas, entre os tratamentos cultivados não foram encontradas diferenças ($P > 0,05$) após um dia de cultivo. Entretanto, para o dia 7 de cultivo o tratamento GH 50 ng/mL mostrou-se com percentagens similares às do controle fresco ($P > 0,05$) e foi superior no diâmetro folicular em comparação aos tratamentos de GH (0, 10 e 25 ng/mL; $P < 0,05$).

Com relação ao diâmetro oocitário, todos os tratamentos cultivados tiveram um diâmetro inferior após um e sete dias de cultivo, em comparação com o controle fresco ($P < 0,05$); exceto o tratamento GH 50 ng/mL, que não apresentou diferenças com o controle fresco após sete dias de cultivo ($P > 0,05$). Da mesma forma, após sete dias de cultivo, o tratamento 50 ng/mL de GH mostrou maior diâmetro oocitário em comparação

com os demais tratamentos cultivados ($P < 0,05$) e mostrou-se mais eficiente no decorrer do cultivo ($P > 0,05$), ou seja, do D1 até o D7 de cultivo (Tabela 2).

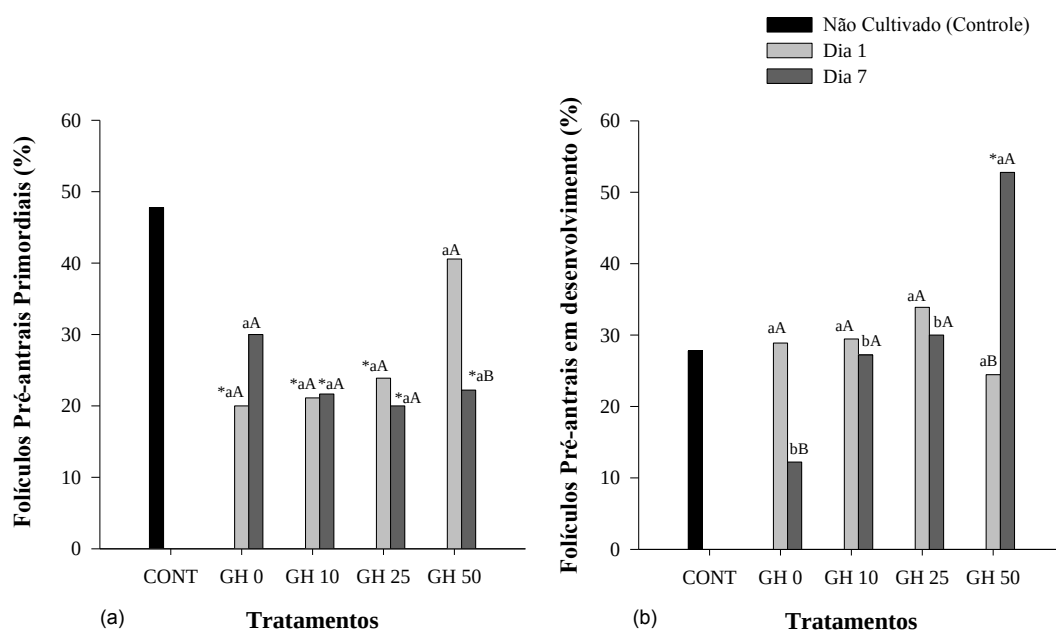


Figura 7 – Percentagem de folículos pré-antrais primordiais (a) e em desenvolvimento (b). Não cultivado (controle) e após um e sete dias de cultivo in vitro em α -MEM⁺ com GH (0, 10, 25 e 50 ng/mL). * Diferença significativa com o tratamento-controle ($P < 0,05$); ^{a,b} Letras minúsculas indicam diferença entre os tratamentos ($P < 0,05$); e ^{A,B} Letras maiúsculas indicam diferença entre os dias de cultivo ($P < 0,05$).

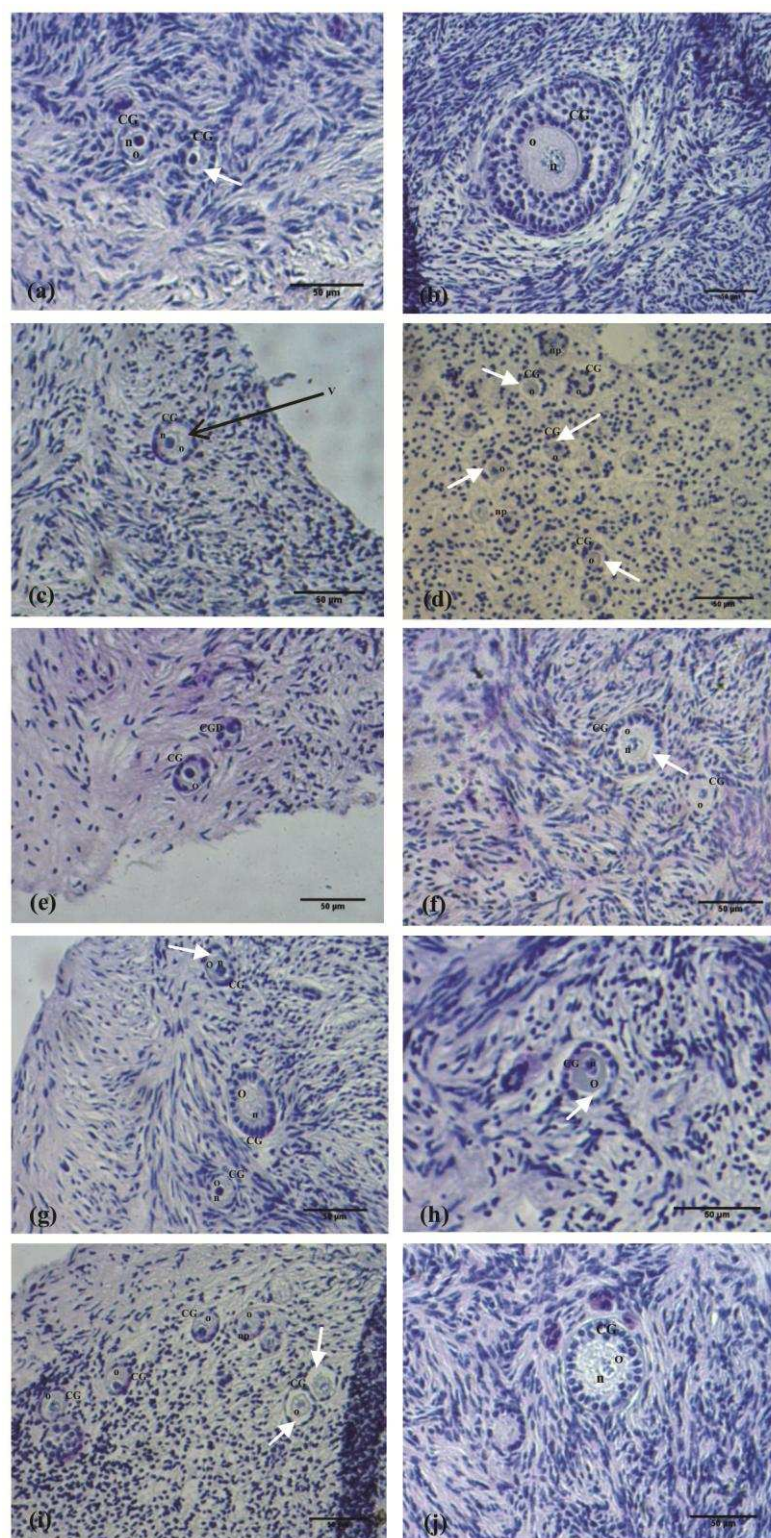


Figura 8 – Folículos pré-antrais bovinos não cultivados (controle, a,b; primário e secundário) e depois de um e sete dias de cultivo em α -MEM⁺ com 0 ng/mL de GH (c,d; primordiais); 10 ng/mL de GH (e, f; primordiais e primário); 25 ng/mL de GH (g,h; primordial e primários); e 50 ng/mL de GH (i,j; primordiais e secundário). Folículos degenerados com retração oocitária (seta branca), células da granulosa desorganizadas (CGD), vacúolos (v) e núcleo picnótico; o= oócito; n= núcleo; CG= células da granulosa. Ampliação 400X, PAS-hematoxilina.

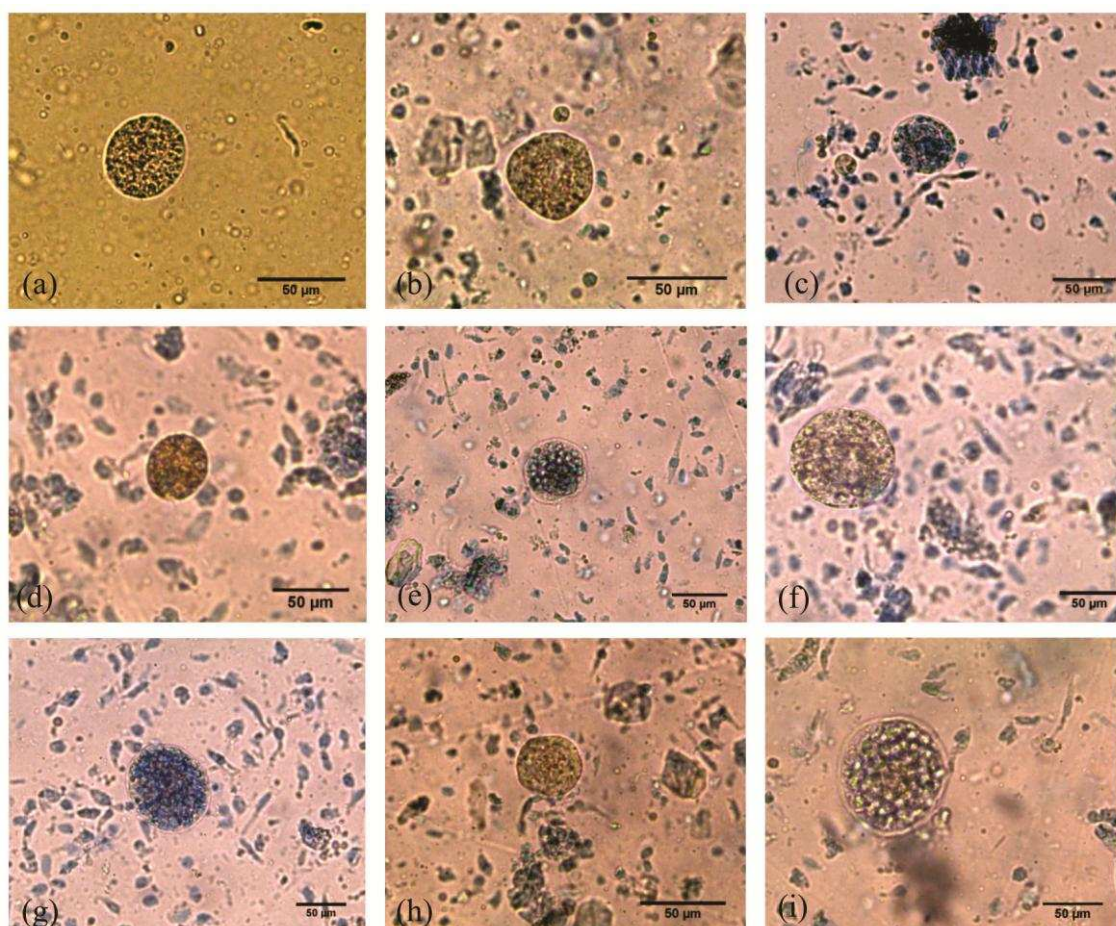


Figura 9 – Folículos pré-antrais bovinos mecanicamente isolados e avaliados por microscopia de luz. Controle (a = primordial viável) e folículos isolados após sete dias de cultivo in situ em α -MEM⁺ com: 0 ng/mL de GH (b,c = primário viável e não viável); 10 ng/mL de GH (d,e = primordial viável, primário não viável); 25 ng/mL de GH (f,g = secundário viável e não viável) e 50 ng/mL de GH (h,i = primário viável e secundário não viável). Corados com Azul de Tripán (mortos); e não corados (vivos).

Tabela 2 – Média $\pm$ erro-padrão da média do diâmetro folicular/oocitário em micrômetros (μ m) de folículos pré-antrais bovinos cultivados em diferentes concentrações de GH

Controle	50,04 $\pm$ 5,0		28,90 $\pm$ 1,71	
	Folículo		Oócito	
	Dia 1	Dia 7	Dia 1	Dia 7
GH 0	41,68 $\pm$ 2,52 ^{a A}	32,25 $\pm$ 2,0* ^{b B}	21,49 $\pm$ 0,89* ^{a A}	20,16 $\pm$ 0,90* ^{b A}
GH 10	36,70 $\pm$ 2,62* ^{a A}	31,14 $\pm$ 1,37* ^{b A}	20,21 $\pm$ 0,99* ^{a A}	20,23 $\pm$ 0,67* ^{b A}
GH 25	38,31 $\pm$ 2,00* ^{a A}	37,58 $\pm$ 2,45* ^{b A}	21,44 $\pm$ 0,77* ^{a A}	21,26 $\pm$ 1,12* ^{b A}
GH 50	39,14 $\pm$ 3,63 ^{a B}	60,33 $\pm$ 4,00 ^{a A}	23,16 $\pm$ 0,99* ^{a B}	26,22 $\pm$ 1,14 ^{a A}

* Diferença significativa para o tratamento-controle ($P < 0,05$); ^{a,b} Letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna são diferentes ($P < 0,05$); ^{A,B} Letras maiúsculas sobrescritas na linha indicam diferença entre os dias de cultivo ($P < 0,05$); α -MEM = meio essencial mínimo; GH = hormônio do crescimento; e concentrações em ng/mL.

Discussão

Fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1)

No presente estudo demonstrou-se que a concentração de IGF-1 30 ng/mL melhorou os percentuais de folículos morfolologicamente normais, manteve a viabilidade do D1 ao D7 de cultivo e aumentou os folículos em desenvolvimento, bem como seu diâmetro folicular e oocitário em folículos pré-antrais bovinos cultivados inclusos no tecido ovariano (in situ). Em folículos pré-antrais, o IGF-1 contribui na regulação do crescimento por meio de mecanismos endócrinos (SILVA et al., 2009). Apesar do IGF-1 não estar expresso em folículos pré-antrais bovinos, expressam receptores de IGF-1R e proteínas ligantes IGFBP-2 e 3 em células da granulosa e no oócito de folículos primários e secundários, mas não em folículos primordiais (ARMSTRONG et al., 2002; WEBB et al., 2003). O IGF-1 cumpre funções como supressor de apoptose (MAKAREVICH; MARKKULA, 2002); indutor da mitose nas células da granulosa (ARMSTRONG et al., 1996); promotor da maturação de oócitos (LORENZO et al., 1994); e do desenvolvimento de embriões bovinos (KAYE et al., 1997).

Este estudo observou uma menor percentagem de folículos morfolologicamente normais na presença de IGF-1 (0, 70 e 100 ng/mL), diferentemente do que ocorreu com o tratamento IGF-1 30 ng/mL. No entanto, a viabilidade foi mantida do D1 ao D7 em todas as concentrações, exceto 0 ng/mL. Estudos revelaram que o IGF-1 pode ter um efeito direto na função ovariana e estes efeitos podem ser dependentes do tamanho do folículo e da concentração empregada (SPICER et al., 1995). Rossetto et al. (2013) mostraram que a adição de 50 ng/mL IGF-1 para o meio de cultura de folículos pré-antrais bovinos não teve nenhum efeito sobre a morfologia folicular e a formação do antro. No entanto, no presente estudo demonstrou-se que o IGF-1 na concentração ideal pode ser um fator de crescimento utilizado no desenvolvimento in vitro de folículos pré-antrais. Gutierrez et al. (2000) afirmaram que a adição de fatores secretados pelos folículos pode ter uma influência positiva na cultura, promovendo a manutenção da sobrevivência folicular, tipo IGF-1. Em caprinos, Zhou e Zhang (2005) demonstraram que o IGF-1 na concentração de 50 ng/mL proporcionou o crescimento e a viabilidade de oócitos inclusos em folículos pré-antrais. Similarmente, Magalhães-Padilha et al. (2012) observaram que 50 ng/mL de IGF-1 foi capaz de manter a viabilidade folicular e aumentar a taxa de retomada da meiose de oócitos oriundos de folículos secundários caprinos crescidos in vitro; deste modo, em bovinos, altas concentrações de IGF-1

prejudicam a funcionalidade em folículos pré-antrais, ou seja, 30 ng/ml de IGF-1 é a concentração mais eficaz para melhorar as percentagens de folículos morfológicamente normais com folículos viáveis após sete dias de cultivo.

Resultados observados em folículos primordiais demonstraram diminuição deste estágio folicular em todos os tratamentos cultivados. Mas, somente o tratamento IGF-1 30 ng/mL aumentou o percentual de folículos em desenvolvimento após sete dias de cultivo. Embora, se saiba que o próprio IGF-I, bem como seu IGF-1R e IGFBP, não estão presentes nos folículos primordiais, pode-se atribuir o desenvolvimento folicular apresentado neste estudo ao meio de base utilizado (α -MEM⁺; JIMENEZ et al., 2013), que, possivelmente, colaborou na ativação de folículos primordiais e posterior desenvolvimento e ação do IGF-1 nas fases mais avançadas. Fortune et al. (2004) relataram que concentrações de IGF-1 (1, 10 e 100 ng/mL) não estimularam os folículos primordiais e primários de bovinos durante o cultivo in situ. No entanto, Gutierrez et al. (2000) e Itoh et al. (2002) confirmam que o IGF-1 estimula o crescimento folicular e oocitário, bem como a formação de antro durante cultivo in vitro em bovinos.

Apesar das concentrações do IGF-1R e IGFBP não serem quantificadas no presente estudo, os resultados estão diretamente relacionados com sua funcionalidade. Por não haver um armazenamento do IGF-1, um dos papéis mais importantes das IGFBPs seria o de manter uma reserva do peptídeo. Isso assegura a disponibilidade de um pool latente de IGF-1, não excedendo as exigências normais dos tecidos. Portanto, alterações nas concentrações de IGFBP são responsáveis pelo aumento e a diminuição da biodisponibilidade de IGF em folículos em crescimento saudáveis e naqueles submetidos à atresia (SILVA et al., 2009). Esta última função pode ser atribuída particularmente à IGFBP-3. Da mesma forma, a IGFBP-2 pode potencializar como também inibir a atividade do IGF-1, ou agir meramente como transportadora (CLARK, 1997). Assim, pode-se dizer que os IGF-1R e IGFBP na presença de altas concentrações de IGF-1, como foi observado no presente estudo (70 e 100 ng/mL de IGF-1), podem ter saturado o tecido ovariano, promovendo alterações no seu mecanismo funcional ou inibindo a atividade do IGF-1, afetando o desenvolvimento folicular pré-antral e causando apoptose celular. Segundo Rohan e Yu (2000), em células cancerosas, as IGFBPs regulam a ação dos IGFs, mas em muitas situações a ligação destas proteínas suprime a ação mitogênica dos IGFs e promove a apoptose. Deste modo, maiores concentrações de IGF-1 prejudicaram o desenvolvimento folicular em folículos pré-antrais bovinos cultivados in situ.

Sinergicamente, como a maioria das outras variáveis, o tratamento IGF-1 30 ng/mL foi o tratamento que melhorou o diâmetro folicular como oocitário, ao contrário dos tratamentos de IGF-1 (0, 70 e 100 ng/mL). Wandji et al. (1996), após o cultivo *in situ* de folículos pré-antrais na ausência de fatores de crescimento, observaram uma média de $\pm 55 \mu\text{m}$ no diâmetro folicular. Igualmente, Silveira et al. (2013) testaram diferentes meios-base sem fatores de crescimento e observaram diâmetros de aproximadamente $\pm 49,79 \mu\text{m}$ e $\pm 21,80 \mu\text{m}$ para folículo e oócito, respectivamente, em α -MEM suplementado. Assim, no presente estudo se pode afirmar que a adição de IGF-1 na concentração de 30 ng/mL, auxiliou no desenvolvimento folicular, com uma média de $\pm 62,05 \mu\text{m}$ e $\pm 25,33 \mu\text{m}$ no diâmetro folicular e oocitário, respectivamente. Além disto, estudos relataram que o IGF-I aumenta o diâmetro do folículo e oócito durante o cultivo *in vitro* na ausência de soro (ITOH et al., 2002), auxiliando no crescimento e na formação de antro em folículos pré-antrais secundários bovinos (GUTIERREZ et al., 2000). Adicionalmente, estudos de Thomas et al. (2007) observaram que em folículos pré-antrais secundários bovinos, cultivados em 50 ng/mL de IGF-1 durante seis dias de cultivo, promoveu o aumento do diâmetro folicular. Afinal, analisando os parâmetros de normalidade, viabilidade, desenvolvimento e diâmetro folicular do presente estudo, além dos resultados nas diferentes pesquisas com folículos pré-antrais, concorda-se que o desenvolvimento folicular é estritamente regulado pelo tipo de cultivo, estágio de desenvolvimento, período da cultura e da concentração de IGF-1 utilizada, definindo-se 30 ng/mL de IGF-1 como a concentração eficaz para o cultivo de folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano (*in situ*) bovino.

Hormônio do crescimento (GH)

Cultivaram-se folículos pré-antrais na presença de GH (0, 10, 25 e 50 ng/mL) e a maior concentração 50 ng/mL de GH foi o tratamento com maior normalidade, desenvolvimento e diâmetro folicular, além de manter a viabilidade folicular no decorrer dos sete dias de cultivo. Em ovários bovinos, o RNAm do GHR já foi localizado no oócito de folículos primordiais e primários e começa a ser expresso em células da granulosa de folículos primários, permanecendo até o estágio secundário (KOLLE et al., 1998). Entretanto, é importante ressaltar que o mecanismo pelo qual o GH estimula a foliculogênese parece ser espécie-específico e estágio dose-dependentes,

podendo agir de forma diferente para folículos antrais, oócitos, embriões ou células somáticas (HULL; HARVEY, 2001).

Neste estudo verificou-se maior percentagem de folículos morfolologicamente normais na concentração 50 ng/mL de GH. No entanto, todos os tratamentos na presença de GH, ou seja, 10, 25 e 50 ng/mL, mantiveram a viabilidade desde o D1 até o D7 do cultivo in vitro. Estudos in vitro têm mostrado que o GH tem um efeito inibidor direto sobre apoptose nas células da granulosa em ovários bovinos (SIROTKIN; MAKAREVICH, 1999). Zhao et al. (2000) demonstraram que a maior concentração de GH testada (100 ng/mL) provocou aumento anormal no número de células da teca e resultou em menor taxa de viabilidade de folículos cultivados. Provavelmente, a estimulação excessiva causou no meio um esgotamento relativo de nutrientes e oxigênio e reduziu a viabilidade. Contudo, 50 ng/mL de GH mostrou ser a concentração ideal para melhorar o percentual dos folículos morfolologicamente normais com folículos viáveis após sete dias de cultivo in situ. Resultados semelhantes foram obtidos por Araujo (2013), que observou que 50 ng/mL de GH foi um suplemento efetivo para o cultivo in vitro de folículos secundários bovinos em sistemas de cultivo 3D. Em caprinos, Martins et al. (2010) mostraram que a utilização 50 ng/mL de GH promoveu a manutenção da viabilidade e a ativação de folículos pré-antrais cultivados in vitro.

Em referência ao desenvolvimento folicular, o presente estudo demonstrou que após sete dias de cultivo in situ tratamento 50 ng/mL de GH foi superior ao controle e às demais concentrações testadas no percentual de folículos em desenvolvimento. Além disto, foi concomitante a diminuição dos folículos primordiais com o aumento de folículos em desenvolvimento. Estudos demonstraram efeito positivo em meio sequencial suplementado com GH; este hormônio ajudou a manter a viabilidade folicular, ativação de folículos primordiais e posterior progressão para folículos secundários (MAGALHÃES-PADILHA et al., 2012). Liu et al. (1998) demonstraram que as fases iniciais do desenvolvimento folicular em ratos são controladas pelo GH, o qual estimula a formação de folículo secundário in vitro. Em caprinos, Martins et al. (2008) avaliaram o GH e afirmaram que este hormônio é capaz de aumentar o crescimento e a progressão de folículos primordiais para folículos primários ao fim de sete dias de cultura in vitro.

O diâmetro folicular observado no presente estudo foi superior na concentração de 50 ng/mL de GH (60µm) após sete dias de cultivo, sendo superior em quase o dobro nos demais tratamentos (32, 31 e 37µm) para 0, 10 e 25 ng/mL de GH, respectivamente.

Em caprinos, Martins et al. (2008) testaram diferentes concentrações de GH e observaram que a adição de 10 ng/mL de GH durante sete dias de cultura in situ em folículos pré-antrais caprinos, aumentou o diâmetro folicular, bem como o crescimento de folículos pré-antrais. Magalhães Padilha et al. (2012) observaram maior diâmetro folicular e oocitário quando adicionado 10 ng/ml de GH no cultivo de folículos pré-antrais caprinos. Deste modo, pode-se sugerir que as concentrações devem ser definidas por espécie e sistema de cultivo. Contudo, não existe dúvida de que o GH é um hormônio eficaz nas etapas iniciais da foliculogênese; e de acordo com o presente estudo, a concentração observada poderá ser utilizada isoladamente ou em diferentes associações para melhor desempenho folicular; assim, ativando um grande número de folículos primordiais até os estádios mais avançados, que poderão ser isolados do estroma ovariano terminando seu crescimento individual. Assim, 50 ng/mL de GH é o nível ideal, para aumentar o diâmetro dos folículos pré-antrais bovinos cultivados in situ.

Conclusões

Conclui-se que 30 ng/mL de IGF-1 ou 50 ng/mL de GH são as concentrações mais eficazes para o desenvolvimento de folículos pré-antrais cultivados inclusos no tecido ovariano bovino. Deste modo, outros experimentos poderão ser realizados combinando GH e, ou, IGF-1, entre outros fatores que controlem a progressão ordenada do desenvolvimento folicular.

Agradecimentos

À CAPES/CNPq – IEL Nacional – Brasil pela bolsa de estudos; à FAPEMIG e ao CNPq, pelo recurso financeiro; e à Universidade Federal de Viçosa (UFV).

Referências

- ABIR, R.; FISCH, B.; NAHUM, R.; ORVIETO, R.; NITKE, S.; BEN RAFAEL, Z. Turner's syndrome and fertility: Current status and possible future projects. Hum.Reprod.,v. 7, p. 603-610, 2001.
- ARMSTRONG, D. G.; BAXTER, G.; HOGG, C. O.; WOAD, K. J. Insulin-like growth factor (IGF) system in the oocyte and somatic cells of bovine preantral follicles. Reproduction, v. 123, p. 789-797, 2002.

- ARMSTRONG, D. T.; XIA, P.; GANNES, G.; TEKPETEY, F. R.; KHAMSI, F. Differential effects of insulin-like growth factor-1 and follicle-stimulating hormone on proliferation and differentiation of bovine cumulus cells and granulosa cells. *Biol. Reprod.*,v. 54, p. 331-338, 1996.
- ARMSTRONG, D. T.;XIA, P.; GANNES, G. Differential mitogenic actions of IGF-1 and FSH on bovine cumulus cells and granuloma's cells. *Theriogenology*,v. 39, p. 181, 1993.
- BASSO, A. C.; ESPER, C. R. Isolamento e caracterização ultraestrutural de folículos pré-antrais de vacas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*,v. 39, p. 311-319, 2002.
- CELESTINO, J. J. H.; SANTOS, R. R.;MARTINS, F. S.; MATOS, M. H. T.; FIGUEIREDO, J. R.; COSTA, S. H. F.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R. Preservation of bovine preantral follicles in 0.9% saline solution or TCM-199. *Arq.Bras. Med. Vet. Zootec.*,v. 59, n.3, p.591-599, 2007.
- CLARK, R. The somatogenic hormones and insulin-like growth fator-1 stimulators of lymphopoiesis and immune function.*Endocrine Reviews*, v.18, p. 157-179, 1997.
- ECKERY, D. C.; MOELLER, C. L.; NETT, T. M.; SAWYER, H. R. Localization and quantification of binding sites for follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, growth hormone, and insulin-like growth factor I in sheep ovarian follicles. *Biol. Reprod.*,v. 57, p. 507-513, 1997.
- 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. *Biol. Reprod.*,v. 41, p. 268-276, 1989.
- FERREIRA, T.; RASBAND, W. Image. J. User Guide IJ 1. 46r. Reviewed by Michael Schmid September/October 2012.
- 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.
- FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim. Reprod.Sci.*,v. 78, p. 135-163, 2003.
- FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; YANG, M. Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim. Reprod.Sci.*,v. 82-83, p. 109-126, 2004.
- GONG, J. G.; BAXTER, G.; BRAMLEY,T.; WEBB, R. Enhancement of ovarian follicle development in heifers by treatment with recombinant bovine somatotrophin: a dose-response study. *J. Reprod. Fertil.*,v. 110, p. 91-97, 1997.

- GONG, J. G.; BRAMLEY, T.; WEBB, R. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular population and peripheral hormones. *Biol. Reprod.*, v. 45, p. 941-949, 1991.
- GUTIERREZ, C. G.; RALPH, J. H.; TELFER, E. E.; WILMUT, I.; WEBB, R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. *Biol. Reprod.*, v. 62, p. 1322-1328, 2000.
- HULL, K. L.; HARVEY, S. Growth hormone: roles in female reproduction. *Journal of Endocrinology*, v. 168, p. 1-23, 2001.
- 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. *Biol. Reprod.*, v. 67, p. 1099-1105, 2002.
- JIMENEZ, R. C.; AZEVEDO, J. L.; SILVEIRA, R. G.; TORRES, C. A. A.; PENITENTE-FILHO, J. M.; CARRASCAL, E. L.; SALINAS, J. A. P. Morphology of bovine preantral follicles cultivated in situ in basic culture media. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 20., 2013. Uberlândia, MG. Anais... Uberlândia, MG, 2013.
- KAYE, P. L. Preimplantation growth factor physiology. *Rev. Reprod.*, v. 2, p. 121-127, 1997.
- KHALID, M.; HARESIGN, W.; LUCK, M. R. Secretion of IGF-1 by ovine granulosa cells: effects of growth hormone and follicle stimulating hormone. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 58, p. 261-272, 2000.
- KÖLLE, S.; SINOWATZ, F.; BOIE, G.; LINCOLN, D. Developmental changes in the expression of the growth hormone receptor messenger ribonucleic acid and protein in the bovine ovary. *Biol. Reprod.*, v. 59, p. 836-842, 1998.
- LANGHOUT, D. J.; SPICER, L. J.; GEISERT, R. D. Development of a culture system for bovine granulosa cells: effects of growth hormone, estradiol, and gonadotropins on cell proliferation, steroidogenesis and protein synthesis. *J. Anim. Sci.*, v. 69, p. 3321-3334, 1991.
- LIU, X.; ANDOH, K.; YOKOTA, H.; KOBAYASHI, J.; ABE, Y.; YAMADA, K.; MIZUNUMA, H.; IBUKI, Y. Effects of growth hormone, activin, and follistatin on the development of preantral follicle from immature female mice. *Endocrinology*, v. 139, p. 2342-2347, 1998.
- LORENZO, P. L.; ILLERA, M. J.; ILLERA, J. C.; ILLERA, M.; TUURI, T. Enhancement of cumulus expansion and nuclear maturation during bovine oocyte maturation in vitro by addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *J. Reprod. Fertil.*, v. 101, p. 697-701, 1994.
- MAGALHÃES-PADILHA, D. M.; ANDRADE, P. M.; SALES, E. T.; ARAUJO, V. R.; LIMA, I. M.; CASTRO, S. V.; FAUSTINO, L. R.; LOPES, C. A.; CAMPELLO, C. C.; BÃO, S. N.; GASTAL, M. O.; GASTAL, E. L.; FIGUEIREDO, J. R. Effect of sequential medium on in vitro culture of goat ovarian cortical tissue. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 132, p. 159-68, 2012.

- MAKAREVICH, A. V.; MARKKULA, M. Apoptosis and proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during in vitro maturation and culture. *Biol. Reprod.*, v. 66, p. 386-39, 2002.
- MARTINS, F. S.; CELESTINO, J. J.; SARAIVA, M. V.; CHAVES, R. N.; ROSSETTO, R.; SILVA, C. M. G.; LIMA-VERDE, I. B.; LOPES, C. A. P.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Interaction between growth differentiation factor 9, insulin-like growth factor I and growth hormone on the in vitro development and survival of goat preantral follicles. *Braz. J. Med. Biol.*, v. 43, p. 728-736, 2010.
- MARTINS, F. S.; CELESTINO, J. J. H.; SARAIVA, M. V. A.; MATOS, M. H. T.; BRUNO, J. B.; ROCHA-JUNIOR, C. M. C.; LIMA-VERDE, I. B.; LUCCI, C. M.; BÃO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Growth and differentiation factor-9 stimulates activation of goat primordial follicles in vitro and their progression to secondary follicles. *Reprod. Fert. Dev.*, v. 20, p. 916-924, 2008.
- McLAUGHLIN, M.; BROMFIELD, J. J.; ALBERTINID, F.; TELFER E. E. Activin promotes follicular integrity and oogenesis in cultured pre-antral bovine follicles. *M. Hum. Reprod.*, v. 16, p. 644-653, 2010a.
- McLAUGHLIN, M.; TELFER, D. E. Oocyte development in bovine primordial follicles is promoted by activin and FSH within a two-step serum-free culture system. *Soc. Reprod. Fertil.*, v. 139, p. 971-978, 2010b.
- MONGET, P.; BONDY, C. Importance of the IGF system in early folliculogenesis. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v. 163, p. 89-93, 2000.
- MONGET, P. V.; FABRE, S.; MULSANT, P.; LECERF, F.; ELSER, J. M.; MAZERBOURG, S.; PISSELET, C.; MONNIAUX, D. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. *Dom. Anim. Endocrinol.*, v. 23, n. 1-2, p. 139-54, 2002.
- ROHAN, T.; YU, H. Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 92, n. 18, p. 1472-1489, 2000.
- ROSSETTO, R.; SANTOS, R. R.; SILVA, G. M.; DUARTE, A. B. G.; SILVA, C. M. G.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Comparative study on the in vitro development of caprine and bovine preantral follicles. *Small Ruminant Research*, v. 113, n. 1, p. 167-170, 2013.
- SAHA, S.; SHIMIZU, M.; GESHI, M.; IZAIKE, Y. In vitro culture of bovine preantral follicles. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 63, p. 27-39, 2000.
- SHIMIZU, T.; MURAYAMA, C.; SUDO, N.; KAWASHIMA, C.; TETSUKA, M.; MIYAMOTO, A. Involvement of insulin and growth hormone (GH) during follicular development in the bovine ovary. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 106, p. 143-152, 2008.

- SILVA, J. R. V.; FERREIRA, L. A. M.; COSTA S. H. F.; FIGUEIREDO, J. R. Características morfológicas e controle do crescimento folicular durante a folliculogênese em ruminantes domésticos. *Ciência Animal*, v. 12, n. 2, p. 105-117, 2002.
- SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R.; van den HURK, R. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. *Theriogenology*, v. 71, n. 8, p. 1193-208, 2009.
- SILVEIRA, R. G. JIMENEZ, C. R.; AZEVEDO, J. L. TORRES, C. A. A.; PENITENTE-FILHO, J. M.; CARRASCAL, E. L.; SALINAS, J. A. P. Morfometria de folículos ovarianos pré-antrais bovinos em diferentes meios de sustentação. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 20., 2013. Uberlândia, MG. Anais... Uberlândia, MG, 2013.
- SIROTKIN, A. V.; MAKAREVICH, A. V. GH regulates secretory activity and apoptosis in cultured bovine granulosa cells through the activation of the cAMP/protein kinase a system. *J. Endocrinol.*, v. 163, p. 317-327, 1999.
- SOUZA, T. Efeito do IGF na produção in vitro de embriões bovinos. Botucatu, SP: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Medicina, 2009.
- SPICER, L. J.; ENRIGHT, W. J. Concentrations of insulin-like growth factor-I and steroids in follicular fluid of preovulatory bovine ovarian follicles: effect of daily infections of a growth hormone-releasing factor analogy and thyrotropin-releasing hormone. *J. Anim. Sci.*, v. 69, p. 1133-1144, 1991.
- SPICER, L. J.; HANRAHAN, J. P.; ZAVY, M. T.; ENRIGHT, W. J. Relationship between ovulation rate and concentrations of insulin-like growth factor-I in various genotypes of sheep. *J. Reprod. Fertil.*, v. 97, p. 403-409, 1993.
- SPICER, L. J.; ECHTERNKAMP, S. E. The ovarian insulin and insulin-like growth factor system with emphasis on domestic animals. *Domest. Anim. Endocrinol.*, v. 12, p. 223-245, 1995.
- THOMAS, F. H.; CAMPBELL, B. K.; ARMSTRONG, D. G.; TELFER, E. E. Effects of IGF-1 bioavailability on bovine preantral follicular development in vitro. *Reproduction*, v. 133, p. 1121-1128, 2007.
- van den HURK, R.; SPEK, E. R.; HAGE, W. J.; FAIR, T.; RALPH, J. H.; SCHOTANUS, K. Ultrastructure and viability of isolated bovine pré-antral follicles. *Human Reprod.*, v. 4, p. 833-841, 1998.
- 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.
- WEBB, R.; NICHOLAS, B.; GONG, J. G.; CAMPBELL, B. K.; GUTIERREZ, C. G.; GARVERICK, H. A.; ARMSTRONG, D. G. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reproduction*, v. 61, p. 71-90, 2003.

- ZHAO, J.; van TOL, H. T. A.; TAVERNE, M. A. M.; van der WEIJDEN, G. C.; BEVERS, M. M.; van den HURK, R. The effect of growth hormone on rat pre-antral follicles in vitro. Cambridge: Cambridge University Press, v. 8, p. 275-283, 2000.
- ZHOU, H.; ZHANG, Y. Effect of growth factors on in vitro development of caprine preantral follicle oocytes. Animal Reproduction Science, v. 90, n. 3-4, p. 265-272, 2005.

CAPÍTULO 3

MEIO SEQUENCIAL COM GH E IGF-1 MELHORA O DESENVOLVIMENTO IN VITRO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS BOVINOS INCLUSOS NO TECIDO OVARIANO

Sequential medium with GH and IGF-1 improvements in vitro development of bovine pré-antral follicles included in ovarian tissue

Carolina Rodriguez Jimenez^{a*}, Jovana Luiza de Azevedo^a, Renata Gomes Silveira^a, Jurandy Penitente-Filho^a, Valdevane Rocha Araujo^b, Adriana Moreira Zolini, Ciro Alexandre Alves Torres^a

^aDepartamento de Zootecnia, Laboratório de Fisiologia e Reprodução Animal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.

^bLaboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-Antrais, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil.

* Correspondência do autor: zoocaro@hotmail.com

Resumo

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos de um meio sequencial contendo hormônio do crescimento (GH) e, ou, fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) no cultivo in vitro de longa duração de folículos ovarianos pré-antrais bovinos. Fragmentos ovarianos foram cultivados em α -MEM⁺ na ausência ou presença de GH (50 ng/mL) e, ou, IGF-1 (30 ng/mL) adicionados: primeira metade (dia 1 ao 7); segunda metade (dia 7 ao 14); ou em combinação de ambos durante os 14 dias de cultivo. Os tratamentos foram identificados como: α -MEM⁺; GH→IGF-1; IGF-1→GH; e GH+IGF-1. O cultivo foi realizado em placa de 24 poços, em estufa à 37 °C e 5% de CO₂. Os fragmentos ovarianos não cultivados (controle) e cultivados foram processados para análise histológica avaliando os parâmetros de normalidade, folículos primordiais, em desenvolvimento e diâmetro folicular, os quais foram submetidos à ANOVA, seguidos de comparações entre as médias pelos testes de Tukey e Dunnett. Para avaliação da viabilidade foi realizado o isolamento mecânico dos folículos pré-antrais do estroma ovariano, avaliando folículos viáveis e não viáveis. Os dados foram submetidos ao teste não paramétrico qui-quadrado (χ^2). Os resultados mostraram que o cultivo tratado com o meio sequencial GH na primeira metade (um a sete dias), seguidos de IGF-1 na segunda metade (sete a 14 dias) (GH→IGF-1) manteve a normalidade folicular e a viabilidade até o dia 14 de cultivo ($P>0,05$). Nos folículos primordiais, após 14 dias de cultura, foi observada redução na percentagem de folículos primordiais em todos os tratamentos cultivados. Entretanto, a sequência (GH→IGF-1) foi o único

tratamento que aumentou tanto no desenvolvimento folicular até o D7 quanto no diâmetro folicular até o D14, quando comparado com o controle fresco ($P < 0,05$). Os tratamentos IGF-1→GH e GH+IGF-1 não foram eficazes no desenvolvimento nem no diâmetro folicular após sete dias de cultivo ($P < 0,05$), e reduziram a percentagem de folículos viáveis no transcurso da segunda metade do cultivo. Conclui-se que folículos pré-antrais bovinos cultivados in situ em meio sequencial tratado com GH→IGF-1 melhoraram o desenvolvimento e diâmetro folicular até a primeira metade do cultivo e mantiveram estes parâmetros com normalidade e viabilidade até a segunda metade do cultivo in vitro.

Palavras-chave: foliculogênese; oócito; hormônios; fatores de crescimento; in situ.

Introdução

O ovário mamífero é constituído por milhares de folículos primordiais em estado de quiescência folicular, e ao longo da vida reprodutiva da fêmea um pequeno número de folículos primordiais são estimulados a crescer (0,1%) em um processo conhecido como ativação folicular em direção à ovulação, tornando-se a grande maioria (99,9%) atresico (SKINNER, 2005). Estes folículos podem ser uma fonte valiosa para os estudos sobre o desenvolvimento in vitro de oócitos e eventual produção de embriões (O'BRIEN et al., 2003). Apesar da enorme quantidade de informações produzidas durante a última década, em várias espécies, os entendimentos sobre os mecanismos controladores do desenvolvimento folicular bovino permanecem pouco esclarecidos.

A regulação do desenvolvimento folicular é complexa e envolve fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos, os quais são orquestrados de maneira estádio-específica a fim de controlar vários processos incluindo proliferação, diferenciação atresia/apoptose das células foliculares (WEBB et al., 2003; FORTUNE et al., 2004). Portanto, o destino de um folículo depende do equilíbrio entre os fatores estimulantes e inibitórios do ovário. Dentre os fatores envolvidos na regulação da foliculogênese pode-se destacar o hormônio do crescimento (GH) e o fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), os quais constituem o grupo de fatores que diretamente influenciam no crescimento e são importantes reguladores das diversas etapas do desenvolvimento folicular.

O GH é produzido pelos somatotrofos da hipófise anterior, o qual se liga aos receptores nos tecidos-alvo com o objetivo de estimular o crescimento

(HERRINGTON;CARTER-SU, 2001). O GH exerce suas ações por intermédio do seu receptor específico (GHR), membro da família de receptores de citocinas. Funcionalmente, o GH induz a diferenciação de células precursoras do IGF-1, que estimula a divisão celular. Além de estimular a síntese de proteínas, gluconeogênese e participar na ovulação, no transporte de aminoácidos através da membrana celular, bem como na formação de RNAm no interior das células (SILVA et al., 2009). Experimentos in vivo têm revelado que o GH atua promovendo o desenvolvimento de folículos ovarianos de bovinos (GONG et al., 1991), aumentando as concentrações periféricas de insulina e, ou, de IGF-1 em novilhas (GONG et al., 1997). Estudos in vitro e in vivo revelam a importância deste hormônio durante o desenvolvimento folicular (SIROTKIN; MAKAREVICH, 2002). Em ovários bovinos, o RNAm do GHR já foi localizado no oócito de folículos primordiais e primários e começa a ser expresso em células da granulosa de folículos primários permanecendo durante o estágio secundário (KOLLE et al., 1998).

Os fatores de crescimentos semelhantes à insulina (IGFs) são fatores de crescimento peptídicos que apresentam elevado grau de homologia estrutural com a pró-insulina e têm atividade sobre o metabolismo intermediário, a proliferação, o crescimento e a diferenciação celular (MARTINELLI et al., 2008), podendo serem produzidos na maioria dos órgãos e tecidos do organismo. O IGF-1 exerce suas ações mediante interação com os denominados receptores de IGF tipo1 (IGF-1R), e tipo 2 (IGF-2R) (JONES; CLEMMONS,1995). A maioria das ações conhecidas dos IGFs é mediada via IGF-1R, não sendo ainda claro o papel fisiológico do IGF-2R (MARTINELLI et al., 2008). No ovário, o IGF-1 possui sua origem nas células da granulosa e tem como principal função estimular o desenvolvimento folicular nas fases pré-antral e antral (ARMSTRONG; BENOIT, 1996). Também, é um supressor de apoptose (MAKAREVICH; MARKKULA, 2002); induz a mitose das células da granulosa (ARMSTRONG; XIA, 1993); promove a maturação de oócitos (LORENZO et al., 1994); e o desenvolvimento de embriões bovinos (KAYE et al., 1997).

Tendo em vista a grande importância do GH e IGF-1 na fisiologia ovariana, o presente estudo teve por objetivo analisar os efeitos de um meio sequencial contendo GH e, ou, IGF-1 no cultivo in vitro de longa duração de folículos ovarianos pré-antrais bovinos inclusos no tecido ovariano (in situ).

Material e métodos

Preparação de tecidos

Ovários (n = 24) de vacas mestiças em várias fases do ciclo estral foram coletados em abatedouro local. Após a coleta, os ovários foram lavados em álcool 70% e em TCM-199 (CELESTINO et al., 2007), suplementados com 20 mM de HEPES; 2.200 mg/L de bicarbonato de sódio (SAHA et al., 2000); 25 µg/mL de ácido pirúvico; 75 µg/mL de penicilina; e 50 µg/mL de estreptomicina (McLAUGHLIN et al., 2010a), denominado TCM-199 de transporte. Após as lavagens, os ovários foram transportados em TCM-199 de transporte à temperatura de 4 °C.

Cultivo in vitro de fragmentos ovarianos bovinos

No laboratório, sob condições estéreis, foram removidas finas tiras corticais com a utilização de lâmina de bisturi. Uma vez obtidos, os fragmentos foram cultivados individualmente em placa de 24 poços contendo α -MEM, suplementados com 20 mM de HEPES; 3 mM de glutamina; 10 ng/mL de insulina; 2,5 µg/mL de transferrina; 4 ng/mL de selênio; 0,1% de albumina sérica bovina (BSA); 0,1 mg/mL de penicilina; e 0,1 mg/mL estreptomicina, denominado α -MEM⁺ (JIMENEZ et al., 2013). Os tratamentos foram distribuídos da seguinte maneira: (1) α -MEM⁺ durante os 14 dias (α -MEM⁺), ou α -MEM⁺ suplementado com (2) GH durante sete dias, seguido de sete dias com IGF-1 (GH→IGF-1), (3) IGF-1 durante sete dias, seguido de sete dias com GH (IGF-1→GH) e GH mais IGF-1 durante 14 dias de cultivo (GH + IGF-1). As concentrações utilizadas neste experimento foram selecionadas com base nos melhores resultados obtidos anteriormente pelo grupo de pesquisa (Figura 1). Os fragmentos foram cultivados durante um, sete e 14 dias, à 37 °C, ar umidificado com 5% CO₂, e com substituição total do meio a cada dois dias. Todos os produtos químicos utilizados no presente estudo foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo), salvo GH e IGF-1 da Life Technologies Carlsbad, California, USA.

Avaliação histológica de folículos pré-antrais

Um total de seis fragmentos de tecido cortical fresco (controle) e 72 fragmentos de tecido cultivado por um, sete e 14 dias foram fixados durante 4 horas em solução Carnoy e processados para exame histológico (Figura 2). Foram desidratados em álcool em concentrações crescentes (70, 80, 85, 90 e absoluto %), diafanizados em xilol e

Tratamentos	Dias de Cultivo														
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Controle															
α -MEM ⁺	MEM*														
GH → IGF-1	GH 50 ng/mL							IGF-1 30 ng/mL							
IGF-1 → GH	IGF-1 30 ng/mL							GH 50 ng/mL							
GH + IGF-1	GH 50 ng/mL + IGF-1 30 ng/mL														

Figura 1 – Protocolo experimental para o cultivo in vitro de folículos pré-antrais bovinos em meio contendo hormônio do crescimento (GH) e fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1). α -MEM⁺ = meio essencial mínimo suplementado (JIMENEZ et al., 2013).

embebidas em parafina, à 60 °C. Após a realização dos blocos de parafina foram realizadas secções de 5 μ m de espessura, montadas em lâminas e coradas pelo método de ácido periódico de Shiff (PAS)-hematoxilina. Para avaliação, foi utilizado um microscópio óptico (Olympus BX50, Japão), em ampliação de 400X, em que foram avaliados os seguintes parâmetros:

- Classificação morfológica: folículo primordial = caracterizado pela presença de oócito esférico ou ovoide, completamente rodeado por uma camada simples de células da granulosa achatadas ou pavimentosas, sendo que algumas tenderam à forma cuboidal; e folículos em desenvolvimento: (primários = uma única camada de células da granulosa de forma cúbica em torno do oócito); e secundários = oócito circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa de forma cúbica (BASSO; ESPER, 2002);

- Qualificação morfológica: folículos normais = oócito intacto rodeado por células da granulosa bem organizada em uma ou mais camadas, sem núcleo picnótico; e folículos degenerados = oócito com núcleo picnótico, retração citoplasmática e, ou, células da granulosa desorganizada (SILVA et al., 2002); e

- Diâmetro folicular: o diâmetro folicular e oocitário foram registrados a partir das extremidades laterais externas da camada das células da granulosa e da membrana do oócito, respectivamente. Dois diâmetros perpendiculares foram registrados para cada um dos parâmetros folículo e oócito (horizontal e vertical). A média dos valores foi analisada e, só folículos normais foram avaliados. Programa Image J/Fiji 1.46 (FERREIRA; RASBAND, 2012).

Foram analisados um total de 2.340 folículos pré-antrais na classificação e qualificação morfológica; 180 no controle fresco e 720 por dia de cultivo. No diâmetro

folicular foram analisados 390 folículos pré-antrais normais; 30 no controle fresco e 120 por dia de cultivo.

Viabilidade de folículos pré-antrais bovinos isolados

Fragmentos ovarianos não cultivados e cultivados foram colocados em meio TCM-199, suplementado com 20 mM de HEPES; 2.200mg/L de bicarbonato de sódio (SAHA et al., 2000); 2 mM de piruvato de sódio; 75µg/mL de penicilina, 50 µg/mL de estreptomicina e 10% BSA (McLAUGHLIN et al., 2010b); cortados finamente e dissociados mecanicamente utilizando-se pipetas Pasteur de 1.000 e 600 µm de diâmetro; e ressuspensos 80 vezes para ajudar na separação dos folículos pré-antrais do estroma. Posteriormente, com auxílio de malhas de nylon de 100 µm, a suspensão foi filtrada duas vezes para obtenção de uma suspensão de folículos menores de 100 µm (FIGUEIREDO et al., 1994). A cada 100 µL de meio de suspensão contendo folículos pré-antrais isolados, foram adicionados 5 µL do corante Azul de Trypan (0,4%; Vetec/Sigma, Brasil). Foram observados no microscópio invertido (Leica DFC295, Wetzlar, Alemanha), com aumento de 100X, e então avaliados em viáveis ou não viáveis, quando não corados ou corados em azul, respectivamente (van den HURK et al., 1998). Um total de 650 folículos pré-antrais foram avaliados; 50 do controle fresco e 200 por dia de cultivo (Figura 2).

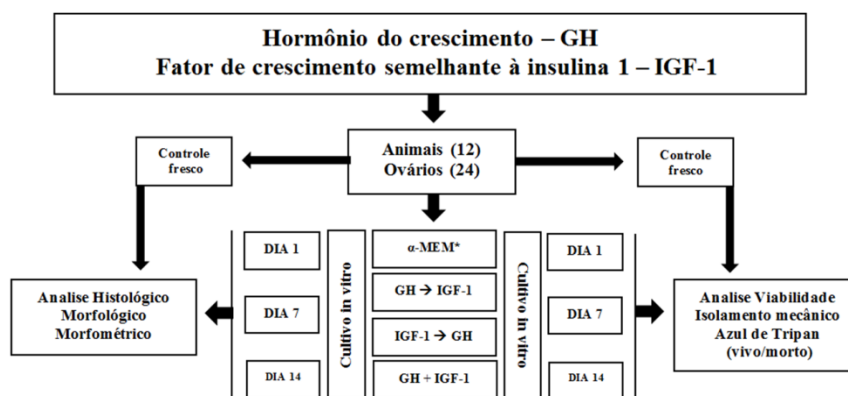


Figura 2 – Organograma do protocolo experimental do meio sequencial GH e, ou, IGF-1 no cultivo in situ de folículos pré-antrais bovinos. α -MEM⁺ = meio essencial mínimo suplementado (JIMENEZ et al., 2013).

Análise estatística

As análises morfológicas e morfométricas foram submetidas à análise de variância ANOVA, seguidas de comparações entre as médias pelo teste de Dunnett,

para análise-controle versus tratamentos e teste de Tukey, para análise entre os tratamentos cultivados (software, versão 9.1, SAS, 2004). A variável qualitativa de viabilidade dos folículos pré-antrais isolados, foi comparada em tabela de contingência e analisada pelo teste de Qui-quadrado (χ^2). Valores foram considerados significativos quando ($P < 0,05$).

Resultados

Um total de 2.340 folículos pré-antrais foram analisados por histologia clássica. A percentagem de folículos pré-antrais morfologicamente normais e de viabilidade folicular do controle fresco e após um, sete e 14 dias de cultivo é mostrado na Tabela 1. Após um e sete dias de cultivo manteve-se a percentagem de folículos normais no tratamento GH→IGF-1 (65,56 e 63,89%), respectivamente, sem diferir ($P > 0,05$) do controle fresco (74,44%). Porém, em comparação com os tratamentos, o GH→IGF-1 não apresentou diferença ($P > 0,05$) com o tratamento α -MEM⁺, mas diferiu ($P < 0,05$) dos demais tratamentos suplementados com GH e, ou, IGF-1 após um dia de cultivo. Após sete dias de cultivo, o tratamento GH→IGF-1 foi superior aos demais tratamentos de cultivo testados ($P < 0,05$). Após 14 dias de cultivo, todos os tratamentos reduziram significativamente ($P < 0,05$) a percentagem de folículos morfologicamente normais quando comparados com o controle fresco. Entretanto, no tratamento GH→IGF-1, dentro dos diferentes períodos de cultivo, foi observada a manutenção do percentual de folículos morfologicamente normais desde o dia um até o dia 14 (Figura 3).

Foram analisados 50 folículos não cultivados (controle fresco) e 600 folículos pré-antrais isolados cultivados in situ. A Figura 4 mostra folículos viáveis e, ou, não viáveis do controle fresco e após um, sete e 14 dias de cultura em α -MEM⁺ contendo ou não GH e, ou, IGF-1. Com base em uma análise quantitativa, verificou-se que os folículos pré-antrais cultivados na primeira metade do cultivo com GH (GH→IGF-1) ou combinados (GH + IGF-1) durante um dia, tiveram uma elevada percentagem de folículos viáveis, semelhante ao controle fresco (76, 74 e 90%, respectivamente; $P > 0,05$). Após sete e 14 dias de cultivo, todos os tratamentos cultivados tiveram um menor percentual de folículos viáveis quando comparados com o controle fresco ($P < 0,05$); embora, o tratamento GH→IGF-1 manteve os folículos pré-antrais viáveis durante todo o período de cultivo in vitro, sendo (76, 70 e 56%; $P > 0,05$) para um, sete e 14 dias de cultivo, respectivamente. O tratamento GH→IGF-1 diferiu ($P < 0,05$) de

Tabela 1 –Percentagens (média $\pm$ EP) de folículos pré-antrais morfologicamente normais e folículos viáveis (n = 50/%) em tecido não cultivado (controle fresco) ou cultivado por um, sete ou 14 dias em α -MEM⁺, na ausência ou presença de GH e, ou, IGF-1

Tratamentos	Folículos Normais				Folículos Viáveis			
	Dia 0	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 0	Dia 1	Dia 7	Dia 14
Controle (nc)	74,44 $\pm$ 3,62	-	-	-	45(90%)	-	-	-
α-MEM	-	52,78 $\pm$ 5,12* ^{abA}	34,44 $\pm$ 5,88* ^{bB}	36,11 $\pm$ 2,00* ^{bAB}	-	30 (60)* ^{aA}	20 (40) * ^{bA}	24 (48)* ^{aA}
GH$\rightarrow$IGF-1	-	65,56 $\pm$ 1,86 ^{aA}	63,89 $\pm$ 4,16 ^{aA}	58,89 $\pm$ 5,42* ^{aA}	-	38 (76) ^{aA}	35 (70) * ^{aA}	28 (56)* ^{aA}
IGF-1 $\rightarrow$GH	-	41,67 $\pm$ 8,02* ^{bcAB}	31,67 $\pm$ 2,24* ^{bB}	51,64 $\pm$ 2,55* ^{aA}	-	28 (56)* ^{aA}	22 (44) * ^{bA}	8 (16)* ^{bB}
GH + IGF-1	-	29,44 $\pm$ 10,00* ^{cA}	41,67 $\pm$ 4,61* ^{bA}	35,56 $\pm$ 4,44* ^{bA}	-	37 (74) ^{aA}	31 (62) * ^{abA}	12 (24)* ^{bB}

* Diferença significativa para o tratamento controle (P< 0,05); ^{a,b} Letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna são diferentes (P<0,05); e ^{A,B} Letras maiúsculas sobrescritas na linha indicam diferença significativa entre os dias de cultivo (P< 0,05), nc = não cultivado.

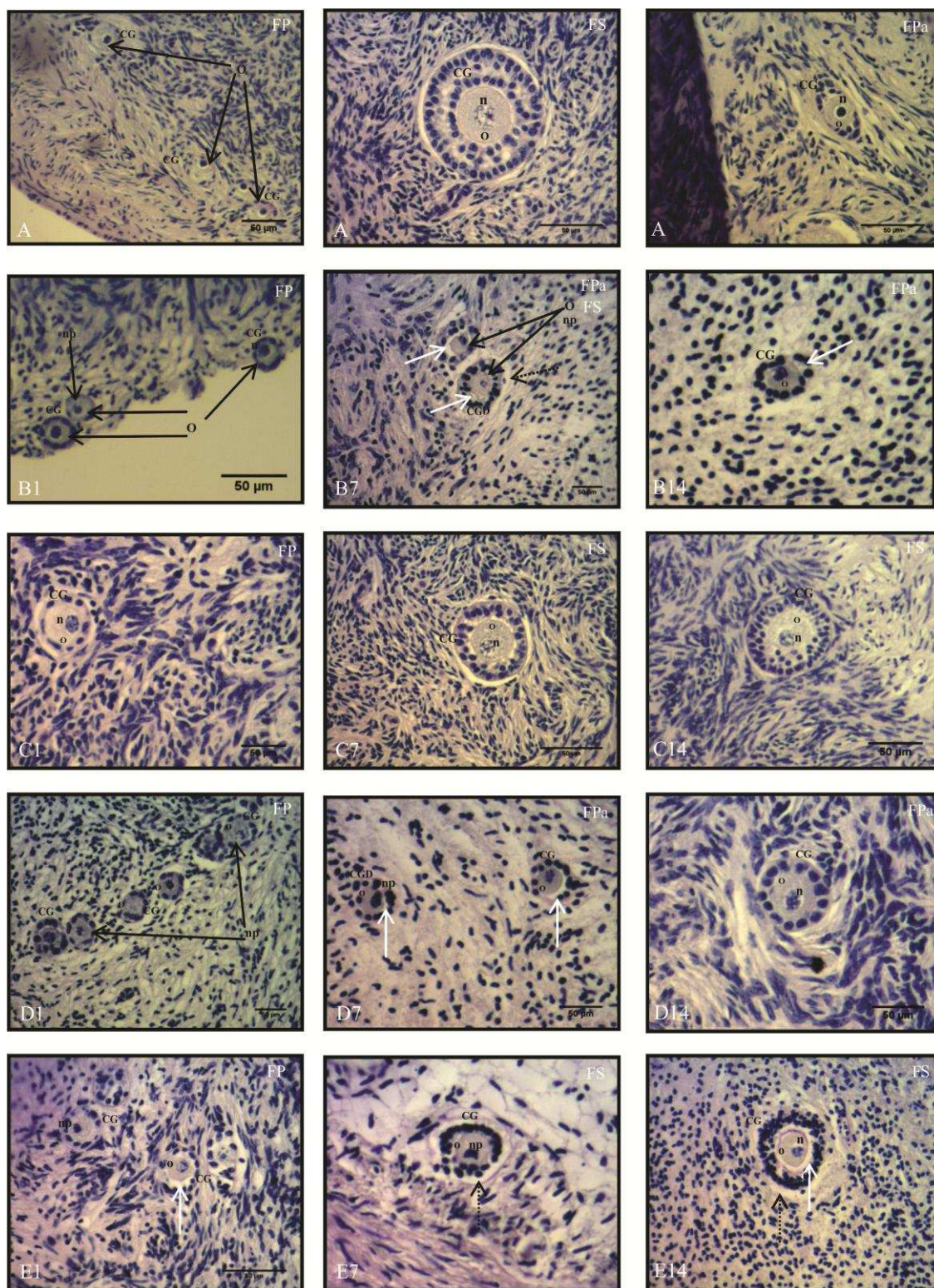


Figura 3 – Cortes histológicos de folículos pré-antrais bovinos não cultivados (controle fresco) (A) e cultivados após um, sete e 14 dias, respectivamente na presença de α -MEM⁺ (B); GH→IGF-1 (C); IGF-1→GH (D); e GH+IGF-1 (E). Folículos degenerados com retração oocitária (seta branca); retração das células da granulosa (seta preta pontilhada); células da granulosa desorganizadas (CGD); e núcleo picnótico (np). o= oócito; n= núcleo; CG= células da granulosa; FP =folículo primordial; FPa = folículo primário; e FS = folículo secundário. Ampliação 400X; PAS-hematoxilina.

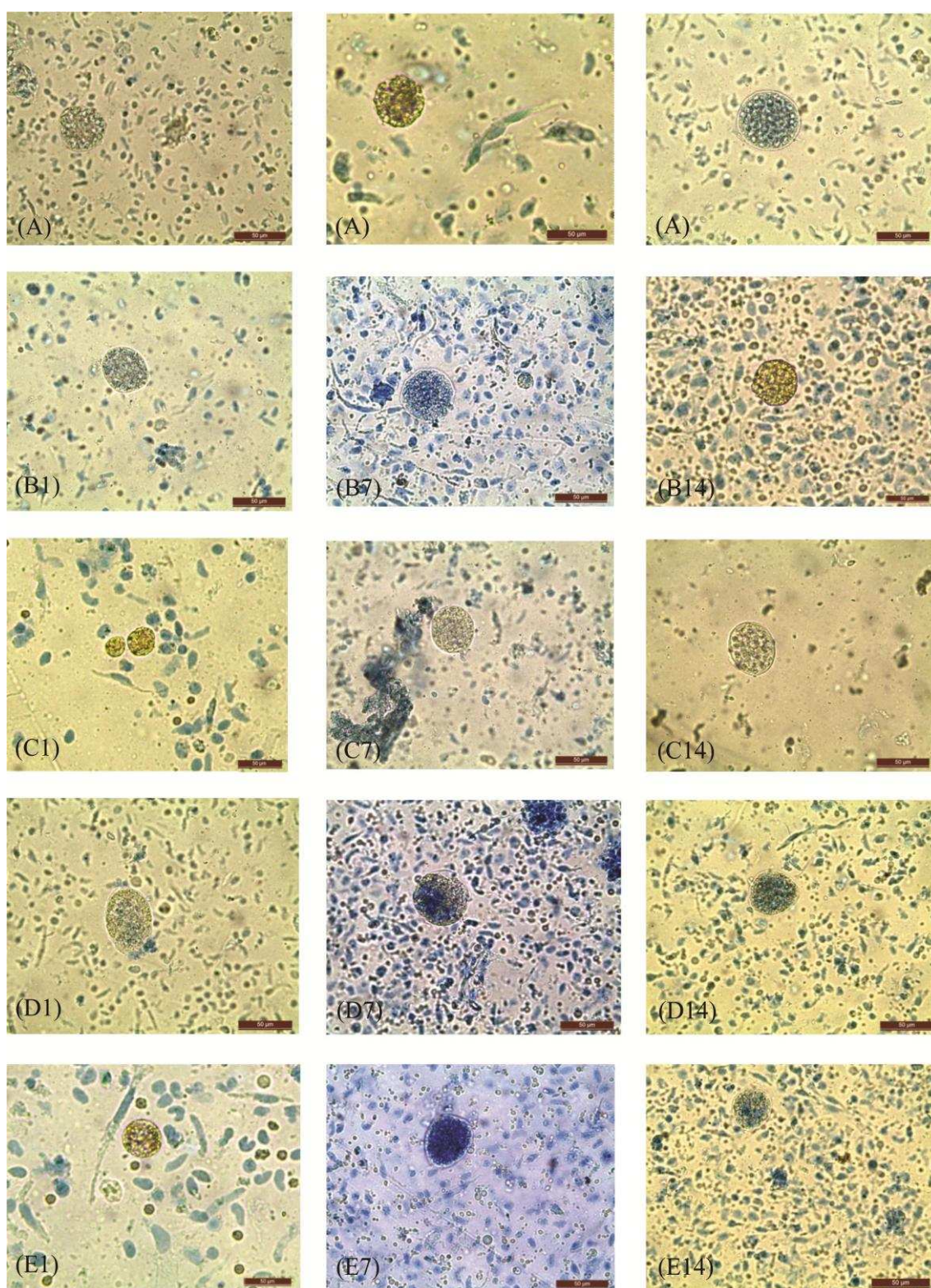


Figura 4 – Folículos pré-antrais bovinos isolados mecanicamente, não cultivados (controle fresco) (A) e cultivados após um, sete e 14 dias, respectivamente com α -MEM⁺ (B); GH→IGF-1(C); IGF-1→GH (D); e GH+IGF-1 (E). Coradas com azul de Tripán, (morto); e não corado (vivo).

todos os tratamentos cultivados no dia D7 e D14, exceto com o α -MEM⁺ após 14 dias de cultivo. Os tratamentos IGF-1→GH e GH + IGF-1 reduziram ($P < 0,05$) a percentagem de folículos viáveis no decorrer da segunda metade do cultivo (Tabela 1).

A Tabela 2 apresenta os folículos primordiais e em desenvolvimento do controle e dos fragmentos cultivados após um, sete e 14 dias. Houve redução na percentagem de folículos primordiais tratados inicialmente com IGF-1 e, seguidos de GH (IGF-1→GH) ou combinados (GH+IGF-1) após um dia de cultivo in vitro, diferindo do controle ($P < 0,05$). O contrário aconteceu nos tratamentos GH→IGF-1 e α -MEM⁺, os quais mantiveram as percentagens de folículos primordiais equivalentes ao controle não cultivado ($P > 0,05$). Depois de sete e 14 dias de cultivo, foi observada redução na percentagem de folículos primordiais em todos os tratamentos cultivados, diferindo do controle ($P < 0,05$).

Apesar da diminuição dos percentuais de folículos primordiais em todos os tratamentos cultivados, só o tratamento GH→IGF-1 apresentou maior percentagem (62,22%) de folículos em desenvolvimento após sete dias de cultivo, em comparação com o controle (26,67%) e demais tratamentos cultivados: α -MEM (32,38%); IGF-1→GH (29,44%); e GH + IGF-1 (40,00%) ($P < 0,05$). Após 14 dias de cultivo, todos os tratamentos não diferiram ($P > 0,05$) do controle e não foram observadas diferenças no desenvolvimento folicular entre os tratamentos cultivados. Entretanto, no decorrer do cultivo (D1, D7 e D14), o tratamento GH→IGF-1 aumentou as percentagens de folículos em desenvolvimento até o D7 e manteve estáveis as percentagens de folículos em desenvolvimento até o D14 (Tabela 2).

Um total de 390 folículos pré-antrais normais foram morfometricamente analisados: 30 no controle não cultivado e 360 cultivados por um, sete e 14 dias em α -MEM⁺ acrescidos ou não de GH e, ou, IGF-1. De acordo com a Tabela 3, após um dia de cultivo, houve diminuição no diâmetro folicular nos tratamentos α -MEM⁺ e GH+IGF-1, diferindo ($P < 0,05$) do controle. Entre os tratamentos cultivados não houve diferenças no diâmetro folicular após um dia de cultivo ($P > 0,05$). Após sete e 14 dias de cultivo, somente o tratamento GH→IGF-1 aumentou o diâmetro folicular (65,03 e 64,17 μ m), respectivamente, diferindo do controle a fresco (37,05 μ m; $P < 0,05$) e dos demais tratamentos cultivados do D7. Após 14 dias de cultivo, os tratamentos IGF-1→GH e GH+IGF-1 conseguiram aumentar ($P > 0,05$) o diâmetro folicular sem diferir do tratamento GH→IGF-1.

Tabela 2 – Percentagens (média $\pm$ EP) de folículos pré-antrais primordiais e em desenvolvimento (primários + secundários) em tecidos não cultivado (controle fresco) e tecidos cultivados por um, sete ou 14 dias em α -MEM contendo ou não GH e, ou, IGF-1

Tratamentos	Folículos Primordiais				Folículos em Desenvolvimento			
	Dia 0	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 0	Dia 1	Dia 7	Dia 14
Controle (nc)	47,78 $\pm$ 6,1	-	-	-	26,67 $\pm$ 5,1	-	-	-
α-MEM	-	28,33 $\pm$ 5,6 ^{abA}	1,67 $\pm$ 0,7* ^{abB}	7,78 $\pm$ 2,7* ^{abB}	-	24,44 $\pm$ 2,2 ^{aA}	32,38 $\pm$ 5,8 ^{bA}	28,33 $\pm$ 3,5 ^{aA}
GH$\rightarrow$IGF-1	-	40,56 $\pm$ 3,0 ^{aA}	1,67 $\pm$ 1,1* ^{aC}	14,44 $\pm$ 3,5* ^{aB}	-	25,00 $\pm$ 3,3 ^{aB}	62,22 $\pm$ 5,0* ^{aA}	44,44 $\pm$ 8,2 ^{aA}
IGF-1 $\rightarrow$GH	-	26,11 $\pm$ 8,5* ^{abA}	2,22 $\pm$ 1,1* ^{aB}	17,78 $\pm$ 4,7* ^{aAB}	-	15,56 $\pm$ 2,9 ^{aB}	29,44 $\pm$ 2,6 ^{bA}	33,89 $\pm$ 3,2 ^{aA}
GH + IGF-1	-	10,00 $\pm$ 3,8* ^{bA}	1,67 $\pm$ 1,1* ^{aAB}	0,56 $\pm$ 0,6* ^{bB}	-	19,44 $\pm$ 5,1 ^{aB}	40,00 $\pm$ 5,7 ^{bA}	35,00 $\pm$ 4,4 ^{aAB}

* Diferença significativa para o tratamento controle ($P < 0,05$); ^{a,b} Letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna são diferentes ($P < 0,05$); ^{A,B} Letras maiúsculas sobrescritas na linha indicam diferença significativa entre os dias de cultivo ($P < 0,05$); e nc = não cultivado.

Tabela 3 – Morfometria de folículos pré-antrais bovinos (média $\pm$ EP) em tecidos não cultivados e cultivados durante um, sete e 14 dias em α -MEM contendo ou não GH e, ou, IGF-1

Tratamentos	Diâmetro Folicular (μ m)			
	Dia 0	Dia 1	Dia 7	Dia 14
Controle	37,05 $\pm$ 1,44	-	-	-
α-MEM⁺	-	32,47 $\pm$ 0,90 ^{*aA}	33,70 $\pm$ 3,58 ^{aB}	34,89 $\pm$ 2,81 ^{bA}
GH$\rightarrow$IGF-1	-	35,02 $\pm$ 0,79 ^{aB}	65,03 $\pm$ 7,44 ^{*aA}	64,17 $\pm$ 9,36 ^{*aA}
IGF-1 $\rightarrow$GH	-	33,31 $\pm$ 1,21 ^{aA}	44,74 $\pm$ 5,34 ^{bA}	49,56 $\pm$ 7,03 ^{a bA}
GH + IGF-1	-	31,99 $\pm$ 1,05 ^{*aB}	40,64 $\pm$ 4,33 ^{bAB}	50,01 $\pm$ 5,24 ^{a bA}

Tratamentos	Diâmetro Oocitário (μ m)			
	Dia 0	Dia 1	Dia 7	Dia 14
Controle	24,62 $\pm$ 0,83	-	-	-
α-MEM⁺	-	20,78 $\pm$ 0,54 ^{*abA}	20,31 $\pm$ 1,04 ^{*bA}	20,02 $\pm$ 0,87 ^{*bA}
GH$\rightarrow$IGF-1	-	22,58 $\pm$ 0,53 ^{aB}	27,32 $\pm$ 1,34 ^{aA}	26,30 $\pm$ 1,44 ^{a AB}
IGF-1 $\rightarrow$GH	-	20,32 $\pm$ 0,86 ^{*abA}	21,96 $\pm$ 1,21 ^{bA}	23,99 $\pm$ 1,48 ^{a bA}
GH + IGF-1	-	20,03 $\pm$ 0,54 ^{*bB}	21,65 $\pm$ 1,36 ^{bAB}	24,79 $\pm$ 1,51 ^{a bA}

* Diferença significativa para o tratamento controle ($P < 0,05$); ^{a,b} Letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna são diferentes ($P < 0,05$); e ^{A,B} Letras maiúsculas sobrescritas na linha indicam diferença significativa entre os dias de cultivo ($P < 0,05$).

No diâmetro oocitário, após um dia de cultivo, o tratamento GH $\rightarrow$ IGF-1 foi o único tratamento em manter o diâmetro oocitário semelhante ao controle fresco ($P > 0,05$); embora este tratamento não tenha diferido do α -MEM⁺ e IGF-1 $\rightarrow$ GH, em comparação entre os tratamentos ($P > 0,05$). Após sete e 14 dias de cultivo, o tratamento α -MEM⁺ teve o menor diâmetro oocitário quando comparado com o controle fresco ($P < 0,05$). O tratamento GH $\rightarrow$ IGF-1 aumentou o diâmetro oocitário após sete dias de cultivo, diferindo ($P < 0,05$) dos demais tratamentos cultivados e manteve esta média até o D14 ($P > 0,05$). Deste modo, o tratamento GH $\rightarrow$ IGF-1 foi eficaz inicialmente com GH para aumentar o diâmetro folicular e na segunda sequência com IGF-1 para a manutenção do diâmetro folicular no cultivo in vitro (Figura 4).

Discussão

O presente estudo demonstrou pela primeira vez, com base em parâmetros morfológicos, morfométricos e de viabilidade, a ação de um meio sequencial com GH e, ou, IGF-1 na foliculogênese inicial em bovinos. Mostrando o efeito sobre os folículos pré-antrais em um cultivo sequencial de longa duração in situ. Segundo Zhao et al. (2000) e Shimizu et al. (2008), há um crescente número de indícios de que o GH e os

membros da família do fator de crescimento semelhante à insulina (IGFs) desempenham um papel importante no desenvolvimento pré-antral, pré-ovulatório e no processo de atresia folicular (ZHAO et al., 2000; HASTIE; HARESIGN, 2006). Nos estudos de expressão dos genes tem se demonstrado um papel importante do GH no crescimento e na diferenciação de folículos pré-antrais por sua ligação ao GHR (ZHOU et al., 1996). O GHR e seus RNAm foram localizados nos ovários de várias espécies, como ratos (RANKE et al., 1976; CARLSSON et al., 1993); humanos (SHARARA; NIEMAN, 1994); e ovinos (ECKERY et al., 1997). Em bovinos, os GHR estão localizados em folículos primordiais, primários e secundários, com níveis de expressão mais forte nos dois estádios iniciais (KOLLEET et al., 1998; IZADYAR et al., 1999). No sistema IGFs existe a expressão de RNAm de vários componentes como os IGF-1 e 2 e os receptores IGFR-1 e 2, bem como suas proteínas de ligação IGFBP-1 a 6 e foram demonstradas em espécies, como: caprinos (SILVA et al., 2008); roedores (OLIVER et al., 1989); suínos (ZHOU et al., 1996); ovinos (HASTIE et al., 2006); e primatas (ZHOU et al., 1993; VENDOLA et al., 1999). Em bovinos, Armstrong et al. (2002) mostraram que o IGF-1R e as proteínas de ligação IGFBP-2 e 3 foram expressas em células da granulosa e no oócito de folículos pré-antrais bovinos primários, secundários e antrais, mas, o IGF-1 e IGF-2 estavam ausentes (MONGET et al., 2000).

Os resultados do presente estudo mostraram a eficiência do GH nos folículos pré-antrais e confirmou a baixa eficiência do IGF-1 nos estádios iniciais do cultivo in vitro. Kolle et al. (1998) estudaram imunohistoquimicamente a expressão de RNAm do GHR e concluíram que o GHR é expresso três vezes mais forte em oócitos de folículos pré-antrais primordiais e primários do que em folículos secundários. Assim, observa-se que o tratamento GH→IGF-1 apresentou maior normalidade e desenvolvimento folicular do que os demais meios de cultivo testados. Pode-se afirmar que o GH cumpre papel importante na integridade dos folículos pré-antrais e que sua expressão é eficiente para o desenvolvimento folicular.

Por outro lado, o tratamento IGF-1→GH não foi eficiente quanto à sequência inversa na primeira metade do cultivo, mas, teve maior percentagem de folículos normais e em desenvolvimento na segunda metade do cultivo quando foi tratado com GH. Com estas considerações, pode-se confirmar que a presença de GH no meio de cultivo é essencial para a normalidade e o desenvolvimento inicial na foliculogênese. Os resultados de um estudo realizado por Hull e Harvey (2001) sugerem que o GH estimula o crescimento e previne a atresia de folículos antrais pequenos. Estudos in vitro têm

mostrado que o GH tem um efeito inibidor direto sobre a apoptose em bovinos (SIROTKIN; MAKAREVICH, 1999). Kobayashi et al. (2000) demonstraram um efeito estimulador de GH sobre a proliferação de células da granulosa de folículos pré-antrais de murinos. Liu et al. (1998) demonstraram que as fases iniciais do desenvolvimento folicular em ratos são controladas pelo GH, o qual estimula a formação do folículo secundário in vitro.

De acordo com a literatura citada, pode-se explicar do porquê da baixa eficiência do tratamento sequencial IGF-1→GH, com base na expressão gênica sobre os folículos pré-antrais, especialmente ausência dos IGF-1R e IGFBP nos folículos primordiais. Acredita-se que os folículos primordiais ativados que conseguiram se desenvolver possam ter sido por uma ação indireta do IGF-1 ou, provavelmente, em virtude do próprio meio-base utilizado (α -MEM⁺). Assim, o tratamento IGF-1→GH não teve uma percentagem significativa nos folículos em desenvolvimento na primeira metade do cultivo; ou seja, na presença de IGF-1; mas, na segunda metade na presença de GH o hormônio melhorou o desenvolvimento folicular mostrando-se equivalente ao tratamento GH→IGF-1 após 14 dias de cultivo.

Embora o GH e IGF-1 trabalhem positivamente em vários mecanismos, a combinação no meio de cultivo de folículos pré-antrais bovinos não mostraram resultados satisfatórios no presente estudo. Uma explicação pode ser que a produção local de IGF-1 pode mediar o efeito do GH sobre a diferenciação de células da granulosa. Entretanto, no ovário, existem evidências consideráveis de que o GH, sistêmico ou local, produz IGF-1, modulando a foliculogênese (SILVA et al., 2009). Assim sendo, a combinação de GH e IGF-1 no cultivo de folículos pré-antrais é desnecessária para o desenvolvimento folicular inicial. Possivelmente, o IGF-1 poderia ser eficiente com GH nos estádios pré-antrais finais. Porém, estudos realizados neste laboratório com IGF-1 mostrou que entre as concentrações (30, 70 e 100 ng/mL), a menor foi a mais eficaz para o desenvolvimento de folículos pré-antrais bovinos, sendo outra evidência de que o IGF-1 em altas concentrações promove a degeneração dos folículos pré-antrais. Assim, no tratamento GH+IGF-1 pode ter aumentado a disponibilidade de IGF-1 na presença de um potencializador, como é o GH e, portanto, prejudicou o desenvolvimento e a viabilidade folicular. Segundo Lucy et al. (2000), o GH provoca aumento na síntese e secreção de IGF-1, bem como na principal proteína transportadora de IGF (IGFBP-3). Estudos com IGF-1 em concentrações de 1, 10 e 100 ng/mL não estimularam o desenvolvimento dos folículos primordiais bovinos a se

desenvolverem aos estádios de folículo primário quando cultivados *in situ*, mas aumentou a atresia folicular (FORTUNE et al., 2004). Ainda, estudos de Armstrong et al. (2002) indicaram que o sistema IGF não está envolvido no início do crescimento do folículo primordial bovino, mas, está envolvido em eventos posteriores. Outro mecanismo que pode interferir são as proteínas de ligação do GH (GHBP) ou as do IGF-1 (IGFBP). AGHBP é idêntica ao domínio extracelular do GHR, o qual inibe a ligação de GH para os receptores, assim como a bioatividade *in vitro* por competir com o GH (LIM et al., 1990). No ovário de rato, o GHR é amplamente expresso, juntamente com a GHBP, regulando a biodisponibilidade e ação de GH (ZHAO et al., 2002). Igualmente, as IGFBP são inibitórias para as ações do IGF a nível das células-alvo (SPICER et al., 2002). Portanto, grandes alterações nas concentrações de proteínas de ligação podem ser responsáveis pelo aumento e a diminuição da biodisponibilidade de IGF-1 ou GH em folículos pré-antrais.

Por outro lado, autores afirmaram que o tecido ovariano cultivado *in vitro* pode chegar a um limite de crescimento (ROBERTIS et al., 2006); desta forma, os folículos pré-antrais que se desenvolveram até sete dias de cultivo não conseguiram promover seu crescimento para estádios pré-antrais mais avançados. Mesmo assim, é importante ressaltar que o tratamento sequencial (GH→IGF-1) manteve os folículos com a mesma percentagem de folículos normais, em desenvolvimento e viabilidade desde o D7 até o final do cultivo (Dia 14). Levando isto em consideração, é necessário mais pesquisas que demonstrem a existência deste tipo de restrição sobre o tecido ovariano. Deste modo, estudos garantem a eficiência do meio sequencial. Peng et al. (2010) demonstraram que, em ovinos os fatores de crescimento adicionados em diferentes dias de cultivo, ou seja, sequencialmente é crucial para um sistema de cultivo *in vitro* bem sucedido. Recentemente, Magalhães et al. (2012a) testaram um meio sequencial com FSH e, ou, GH e observaram que a sequência FSH/GH manteve a viabilidade folicular e promoveu a ativação de folículos primordiais e posterior progressão para folículos secundários caprinos. Estudo similar associou FSH e IGF-1 durante 16 dias e observaram alta percentagem de folículos normais e viáveis (MAGALHÃES et al., 2012b). Barros et al. (2013) adicionaram melatonina em momentos sequenciais e progressivos, e concluíram que esta poderia ser utilizada com sucesso para preservar a viabilidade folicular e promover o crescimento *in vitro* de oócitos caprinos.

Conclusão

Conclui-se que folículos pré-antrais bovinos cultivados in situ em meio sequencial tratado com GH→IGF-1 melhoraram o desenvolvimento e diâmetro folicular até a primeira metade do cultivo, e mantiveram estes parâmetros com normalidade e viabilidade até a segunda metade do cultivo in vitro.

Referências

- ARMSTRONG, D. G.; BAXTER, G.; HOGG, C. O.; WOAD, K. J. Insulin-like growth factor (IGF) system in the oocyte and somatic cells of bovine preantral follicles. *Reproduction*, v. 123, p. 789-797, 2002.
- ARMSTRONG, D. T.; XIA, P.; GANNES, G. Differential mitogenic actions of IGF-1 and FSH on bovine cumulus cells and granulosa's cells. *Theriogenology*, v. 39, p. 181, 1993.
- ARMSTRONG, D. T.; XIA, P.; GANNES, G.; TEKPETEY, F. R.; KHAMSI, F. Differential effects of insulin-like growth factor-1 and follicle-stimulating hormone on proliferation and differentiation of bovine cumulus cells and granulosa cells. *Biol. Reprod.*, v. 54, p. 331-338, 1996.
- BARROS, V. R.; CAVALCANTE, A. Y.; MACEDO, T. J. Immunolocalization of melatonin and follicle-stimulating hormone receptors in caprine ovaries and their effects during in vitro development of isolated pre-antral follicles. *Reprod. Domest. Anim.*, v. 48, n. 6, p. 1025-33, 2013.
- BASSO, A. C.; ESPER, C. R. Isolamento e caracterização ultraestrutural de folículos pré-antrais de vacas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v. 39, p. 311-319, 2002.
- CARLSSON, B.; NILSSON, A.; ISAKSSON, O. G. P.; BILLIG, H. Growth hormone-receptor messenger RNA in the rat ovary-regulation and localization. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v. 95, p. 59-66, 1993.
- CELESTINO, J. J. H.; SANTOS, R. R.; MARTINS, F. S.; MATOS, M. H. T.; FIGUEIREDO, J. R.; COSTA, S. H. F.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R. Preservation of bovine preantral follicles in 0.9% saline solution or TCM-199. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v. 59, n.3, p.591-599, 2007.
- ECKERY D. C.; MOELLER, C. L.; NETT, T. M.; SAWYER, H. R. Localization and quantification of binding sites for follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, growth hormone, and insulin-like growth factor I in sheep ovarian follicles. *Biol.Reprod.*, v. 57, p. 507-513, 1997.
- FERREIRA, T.; RASBAND, W. Image. J. User Guide IJ 1. 46r. Reviewed by Michael Schmid September/October 2012.

- 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.
- FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; YANG, M. Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 82-83, p. 109-126, 2004.
- FRANKS, S.; ROBINSON, S.; WILLIS, D. S. Nutrition, insulin and polycystic ovary syndrome. *Rev. Reprod.*, v. 1, p. 47-53, 1996.
- GONG, J. G.; BAXTER, G.; BRAMLEY, T.; WEBB, R. Enhancement of ovarian follicle development in heifers by treatment with recombinant bovine somatotrophin: a dose-response study. *J. Reprod. Fertil.*, v. 110, p. 91-97, 1997.
- GONG, J. G.; BRAMLEY, T.; WEBB, R. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular population and peripheral hormones. *Biol. Reprod.*, v. 45, p. 941-949, 1991.
- GREGORASZCZUK, E. L.; BYLICA, A.; GERTLER, A. Response of porcine theca and granulosa cells to GH during short-term in vitro culture. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 58, p. 113-25, 2000.
- HASTIE, P. M.; HARESIGN, W. Expression of mRNAs encoding insulin-like growth factor (IGF) ligands, IGF receptors and IGF binding proteins during follicular growth and atresia in the ovine ovary throughout the o estrous cycle. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 92, p. 284-99, 2006.
- HERRINGTON, J.; CARTER-SU, C. Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. *Trends Endocr. Metab.*, v. 12, p. 252-257, 2001.
- HULL, K. L.; HARVEY, S. Growth hormone: roles in female reproduction. *Journal of Endocrinology*, v. 168, p. 1-23, 2001.
- IZADYAR, F.; ZHAO, J.; van TOL, H. T.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M. Messenger RNA expression and protein localization of growth hormone in bovine ovarian tissue and in cumulus oocyte complexes (COCs) during in vitro maturation. *Mol. Reprod. Dev.*, v. 53, p. 398-407, 1999.
- JIMENEZ, R. C.; AZEVEDO, J. L.; SILVEIRA, R. G.; TORRES, C. A. A.; PENITENTE-FILHO, J. M.; CARRASCAL, E. L.; SALINAS, J. A. P. Morphology of bovine preantral follicles cultivated in situ in basic culture media. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 20., 2013. Uberlândia, MG. Anais... Uberlândia, MG, 2013.
- JONES, J. I.; CLEMMONS, D. R. Insulin-like growth factor and their binding proteins: Biological actions. *Endocrine Reviews*, v. 16, p. 3-34, 1995.
- KAYE, P. L. Preimplantation growth factor physiology. *Rev. Reprod.*, v. 2, p. 121-127, 1997.

- KOBAYASHI, J.; MIZUNUMAEMA, H.; KIKUCHI, N.; LIU, X.; ANDOH, K.; ABE, Y.; YOKOTA, H.; YAMADA, K.; IBUKI, Y.; HAGIWARA, H. Morphological assessment of the effect of growth hormone on preantral follicles from 11-day-old mice in an in vitro culture system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 268, n. 1, p. 36-41, 2000.
- KÖLLE, S.; SINOWATZ, F.; BOIE, G.; LINCOLN, D. Developmental changes in the expression of the growth hormone receptor messenger ribonucleic acid and protein in the bovine ovary. *Biol. Reprod.*, v. 59, p. 836-842, 1998.
- LANGHOUT, D. J.; SPICER, L. J.; GEISERT, R. D. Development of a culture system for bovine granulosa cells: effects of growth hormone, estradiol, and gonadotropins on cell proliferation, steroidogenesis and protein synthesis. *J. Anim. Sci.*, v. 69, p. 3321-334, 1991.
- LIM, L.; SPENCER, S. A.; MCKAY, I.; WATERS, M. J. Regulation of growth hormone (GH) bioactivity by recombinant human GH-binding protein. *Endocrinology*, v. 127, p. 1287-91, 1990.
- LIU, X.; ANDOH, K.; YOKOTA, H.; KOBAYASHI, J.; ABE, Y.; YAMADA, K.; MIZUNUMAEMA, H.; IBUKI, Y. Effects of growth hormone, activin, and follistatin on the development of preantral follicle from immature female mice. *Endocrinology*, v. 139, p. 2342-2347, 1998.
- LORENZO, P. L.; ILLERA, M. J.; ILLERA, J. C.; ILLERA, M.; TUURI, T. Enhancement of cumulus expansion and nuclear maturation during bovine oocyte maturation in vitro by addition of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *J. Reprod. Fertil.*, v. 101, p. 697-701, 1994.
- LUCY, M. C. Regulation of ovarian follicular growth by somatotropin and insulin-like growth factors in cattle. *J. Dairy Sci.*, v. 83, p. 1635-47, 2000.
- MAGALHÃES-PADILHA, D. M.; ANDRADE, P. M.; SALES, E. T.; ARAÚJO, V. R.; LIMA, I. M.; CASTRO, S. V.; FAUSTINO, L. R.; LOPES, C. A.; CAMPELLO, C. C.; BÃO, S. N.; GASTAL, M. O.; GASTAL, E. L.; FIGUEIREDO, J. R. Effect of sequential medium on in vitro culture of goat ovarian cortical tissue. *Anim. Reprod. Sci.*, v. 132, p. 159-68, 2012a.
- MAGALHÃES-PADILHA, D. M.; DUARTE, A. B. G.; ARAÚJO, V. R.; SARAIVA, M. V. A.; ALMEIDA, A. P.; RODRIGUES, G. Q.; MATOS, M. H. T.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R.; GASTAL, M. O.; GASTAL, E. L.; FIGUEIREDO, J. R. Steady-state level of insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor mRNA and the effect of IGF-I on the in vitro culture of caprine preantral follicles. *Theriogenology*, v. 77, p. 206-213, 2012b.
- MAKAREVICH, A. V.; MARKKULA, M. Apoptosis and proliferation potential of bovine embryos stimulated with insulin-like growth factor I during in vitro maturation and culture. *Biol. Reprod.*, v. 66, p. 386-39, 2002.

- MARTINELLI, C. E.; CUSTÓDIOI, R. J.; AGUIAR-OLIVEIRA, M. H. Fisiologia fazeo eixo GH-sistema IGF. Arq. Bras. Endocrinol. Metab., v. 52, p. 717-725, 2008.
- McLAUGHLIN, M.; BROMFIELD, J. J.; ALBERTINID. F.; TELFER E. E. Activin promotes follicular integrity and oogenesis in cultured pre-antral bovine follicles. M. Hum. Reprod., v. 16, p. 644-653, 2010a.
- McLAUGHLIN, M.; TELFER, D. E. Oocyte development in bovine primordial follicles is promoted by activin and FSH within a two-step serum-free culture system. Soc. Reprod. Fertil., v. 139, p. 971-978, 2010b.
- 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. Biol. Reprod., v. 68, p. 1682-1686, 2003.
- OLIVER, J. E.; AITMAN, T. J.; POWELL, J. F.; WILSON, C. A.; CLAYTON, R. N. Insulin-like growth factor I gene expression in the rat ovary is confined to the granulosa cells of developing follicles. Endocrinology, v. 124, p. 2671-9, 1989.
- PENG, X.; YANG, M.; WANG, L.; TONG, C.; GUO, Z. In vitro culture of sheep lamb ovarian cortical tissue in a sequential culture medium. J. Assist. Reprod. Genet., v. 27, p. 247-257, 2010.
- RANKE, M. B.; STANLEY, C. A.; RODBARD, D.; BAKER, L.; BONGIOVANNI, A.; PARKS, J. S. Sex differences in binding of human growth hormone to isolated rat hepatocytes. Proc. Nat. Acad. Sci., v. 73, p. 847-851, 1976.
- ROBERTIS, E. M. F.; HIB, J. Bases da biologia celular e molecular. Rio de Janeiro: Livraria Guanabara Koogan, 2006. p. 39-56.
- SAHA, S.; SAHA, S.; SHIMIZU, M.; GESHI, M.; IZAIKE, Y. In vitro culture of bovine pré-antral follicles. Anim. Reprod. Sci., v. 63, p. 27-39, 2000.
- SHARARA, F. I.; NIEMAN, L. K. Identification and cellular localization of growth hormone receptor gene expression in the human ovary. J. Clin. Endocrinol. Metab., v. 79, p. 670-672, 1994.
- SHIMIZU, T.; MURAYAMA, C.; SUDO, N.; KAWASHIMA, C.; TETSUKA, M.; MIYAMOTO, A. Involvement of insulin and growth hormone (GH) during follicular development in the bovine ovary. Anim. Reprod. Sci., v. 106, p. 143-152, 2008.
- SILVA, J. R. V.; BRITO, I. R.; LEITÃO, C. C. F.; SILVA, A. W. B.; PASSOS, M. J.; VASCONCELOS, G. L.; SARAIVA, M. V. A.; ALMEIDA, A. P.; FIGUEIREDO, J. R. Quantificação da proteína e do RNA mensageiro para o fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) em folículos ovarianos caprinos. In: REUNIÃO ANUAL DA SBTE, 22., 2008. Guarujá, SP. *Resumos...* Guarujá, SP: SBTE, 2008. p. 466.
- SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R.; van den HURK, R. Involvement of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF) system in ovarian folliculogenesis. Theriogenology, v. 71, n. 8, p. 1193-208, 2009.

- SILVA, J. R. V.; FERREIRA, L. A. M.; COSTA S. H. F.; FIGUEIREDO, J. R. Características morfológicas e controle do crescimento folicular durante a foliculogênese em ruminantes domésticos. *Ciência Animal*, v. 12, n. 2, p. 105-117, 2002.
- SIROTKIN, A. V.; MAKAREVICH, A. V. GH regulates secretory activity and apoptosis in cultured bovine granulosa cells through the activation of the cAMP/protein kinase A system. *J. Endocrinol.*, v. 163, p. 317-327, 1999.
- SKINNER, M. K. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Hum. Reprod. Update*, v. 11, p. 461-471, 2005.
- SPICER, L. J.; CHAMBERLAIN, C. S.; MACIEL, S. M. Influence of gonadotropins on insulin-like growth factor-I (IGF-1)-induced steroid production by bovine granulosa cells. *Domest. Anim. Endocrinol.*, v. 22, p. 237-54, 2002.
- van den HURK, R.; SPEK, E. R.; HAGE, W. J.; FAIR, T.; RALPH, J. H.; SCHOTANUS, K. Ultrastructure and viability of isolated bovine pré-antral follicles. *Human Reprod.*, v. 4, p. 833-841, 1998.
- VENDOLA, K.; ZHOU, J.; WANG, J.; FAMUYIWA, O. A.; BIEVRE, M.; BONDY, C. A. Androgens promote oocyte insulin-like growth factor I expression and initiation of follicle development in the primate ovary. *Biol. Reprod.*, v. 61, p. 353-7, 1999.
- WEBB, R.; NICHOLAS, B.; GONG, J. G.; CAMPBELL, B. K.; GUTIERREZ, C. G.; GARVERICK, H. A.; ARMSTRONG, D. G. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. *Reproduction*, v. 61, p. 71-90, 2003.
- ZHAO, J.; TAVERNE, M. A.; van den WEIJDEN, G. C.; BEVERS, M. M.; van den HURK, R. Immunohistochemical localisation of growth hormone (GH), GH receptor (GHR), insulin-like growth factor I (IGF-1) and type I IGF-1 receptor, and gene expression of GH and GHR in rat pre-antral follicles. *Zygote*, v. 10, p. 85-94, 2002.
- ZHAO, J.; van TOL, H. T. A.; TAVERNE, M. A. M.; van der WEIJDEN, G. C.; BEVERS, M. M.; van den HURK, R. The effect of growth hormone on rat pre-antral follicles in vitro. Cambridge: Cambridge University Press, Vol. 8, 2000. p. 275-283.
- ZHOU, J.; ADESANYA, O. O.; VATZIAS, G.; HAMMOND, J. M.; BONDY, C. A. Selective expression of insulin-like growth factor system components during porcine ovary follicular selection. *Endocrinology*, v. 137, p. 4893-4901, 1996.
- ZHOU, J.; BONDY, C. Anatomy of the human ovarian insulin-like growth factor system. *Biol. Reprod.*, v. 48, p. 467-82, 1993.

CONCLUSÃO GERAL

Com o presente estudo conclui-se que a determinação organizada e individual de cada um dos fatores que interferem no desenvolvimento folicular inicial é indispensável para o sucesso futuro do cultivo in vitro de folículos pré-antrais em diferentes espécies de alto nível zootécnico. Assim, este estudo contribuiu com três fatores-base para a continuidade das pesquisas em folículos pré-antrais bovinos. Pode-se concluir que o α -MEM⁺ é um meio eficaz para a sustentabilidade pré-antral de fragmentos cultivados in vitro. Além disto, o hormônio do crescimento (GH) e o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) melhoraram o desenvolvimento e o diâmetro folicular, mantendo as células normais e viáveis após sete dias de cultivo quando utilizadas as concentrações de 50 e 30 ng/mL, respectivamente. Finalmente, a realização de um meio sequencial de longa duração (14 dias) mostrou que o GH melhora o desenvolvimento e o diâmetro folicular e oocitário na primeira metade de cultivo in situ e estabilizou estes parâmetros com normalidade e viabilidade até a segunda metade na presença de IGF-1.