



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ROBERTA GARBELINI GOMES

**EFEITO DA ADIÇÃO DE ANTIOXIDANTES NO CULTIVO IN
VITRO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS EQUINOS INCLUSOS
EM FRAGMENTOS OVARIANOS**

Londrina
2015

ROBERTA GARBELINI GOMES

**EFEITO DA ADIÇÃO DE ANTIOXIDANTES NO CULTIVO IN
VITRO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS EQUINOS INCLUSOS
EM FRAGMENTOS OVARIANOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, Área de Concentração Sanidade Animal, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda

Londrina
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

G633e Gomes, Roberta Garbelini.

Efeito da adição de antioxidantes no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais equinos inclusos em fragmentos ovarianos / Roberta Garbelini Gomes. – Londrina, 2015.
157 f. : il.

Orientador: Marcelo Marcondes Seneda.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2015.
Inclui bibliografia.

1. Folículos ovarianos – Teses. 2. Antioxidantes – Teses. 3. Ovários – Teses. 4. Égua – Teses. I. Seneda, Marcelo Marcondes. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 636.082.4

ROBERTA GARBELINI GOMES

**EFEITO DA ADIÇÃO DE ANTIOXIDANTES NO CULTIVO IN VITRO DE
FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS EQUINOS INCLUSOS EM FRAGMENTOS
OVARIANOS**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, Área de Concentração Sanidade Animal, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita
Filho – UNESP

Profa. Dra. Livia Aires Lisboa
Centro Universitário Filadélfia – UNIFIL

Prof. Dr. Luciano Andrade Silva
Universidade de São Paulo – USP

Prof. Dr. Thales Ricardo Rigo Barreiros
Universidade Estadual do Norte do Paraná –
UNOPAR

Londrina, 12 de fevereiro de 2015

Dedico este trabalho em especial à Deus e minha família (pais, irmã, tias, cunhados, cunhada e sogros) que sempre me apoiaram e incentivaram nesta trajetória acadêmica.

Ao meu marido, amigo, companheiro e alma gêmea, Renato, pelo carinho, companheirismo, cumplicidade e paciência.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, Jesus e espíritos protetores. Agradeço por estarem ao meu lado auxiliando nos desafios encontrados e decisões tomadas, vitórias, derrotas, ensinamentos e amadurecimento.

Agradeço em especial ao amigo, irmão, conselheiro, e por fim orientador, pelo auxílio diário ao longo da execução desta tese, e também em outros momentos vividos no passado como na benção de matrimônio, orientação de mestrado e como docente durante a residência e a graduação. Como já escrito por alguém, existem pessoas que aparecem nas nossas vidas por acaso, mas não é por acaso que permanecem. Obrigada Professor pela paciência, pela amizade sincera, pelas palavras verdadeiras, sempre tentando me tornar uma pessoa melhor a cada dia. Conte sempre comigo!

Meu agradecimento profundo aos meus pais, Cida e Carlinhos, e minha irmã Gaby. Pessoas amáveis, simples, presente diariamente mesmo ao telefone e sempre apoiando cada passinho percorrido. Obrigada pelas broncas, pelos elogios, pelos ensinamentos e pelo apoio. Cheguei aqui e faço o que amo graças a vocês. Sintam-se amados e agradecidos por mim!

Ao meu companheiro, marido, esposo, parceiro de trabalho e também das dificuldades. Cada dia ao seu lado (não são muitos...) aprendo a ser uma pessoa melhor. Sinceramente, não sei o que seria de mim sem você! Obrigada por estar ao meu lado, por me suportar ao longo da redação desta tese e nos momentos de oscilações hormonais! Todos os dias, agradeço a Deus por ter te colocado na minha vida.

Agradeço pelo apoio proporcionado pelas minhas tias (Marlene e Vera), quer dizer mães, e aos meus novos familiares adquiridos oficialmente ao longo da realização desta tese: Rafael Losso (cunhado), Nelson Zanin (sogro), Ilana Gomes Zanin (sogra), Rafael e Aline Zanin (cunhados) e Nicole Zanin (sobrinha). Amo muito vocês!

Agradeço aos membros da banca de qualificação, Professoras Evelyn Rabelo Andrade, Maria Isabel Mello Martins e Kátia Cristina Silva Santos pelas contribuições proporcionadas. E também, aos membros da banca de defesa (Prof. Dra. Fernanda da Cruz Landim, Prof. Dr. Thales Ricardo Rigo Barreiros, Profa. Dra. Lívia Aires Lisboa e Prof. Dr. Luciano Andrade Silva) por participarem deste

momento ímpar na minha carreira acadêmica. Tenho certeza que contribuirão muito em melhorar esta tese.

Agradeço aos meus amigos antigos e mais novos do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (ReproA): Thales, Wanessa, Fabi, Livia, Kátia, Gustavo, Evelyn, Marilu, Luciana, Fábio, Letícia, Reginaldo, Rebeca, Nayara, Thiago, Anne, Fernanda, Paulinha, Jefferson, Alethéia, Eleni, Camila Rosa, Igor, Denis, Carlos, Polyana, Camila Bizarro, Camila Rosa, Kit, Suellen, Andressa, Fabiana, Isabela, João Vitor, Camila Bortoliero e Larissa). Também agradeço ao Rogério, Profa. Ana Paula Bracarense e os residentes do Laboratório de Anatomia Patológica. Todos contribuíram direta ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço em especial aos animais que foram infelizmente sacrificados e felizmente puderam contribuir na melhoria das pesquisas na espécie equina. Agradeço também ao Frigorífico Oregon por disponibilizar os materiais para estudo.

Aos amigos Erikão e Desirré, Wanessa e Cachorrão, Gustavo e Wanessa e, Pedro e Ingrid, casais companheiros de todos os momentos. Obrigada pela amizade sincera.

Ao Prof. Dr. Amauri A. Alfieri, ex-coordenador do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da UEL, pela oportunidade em realizar esta pós-graduação. A Capes, pela bolsa de estudos proporcionada ao longo da execução deste trabalho. A Helenice, secretária da pós, orientado com as burocracias e solucionando problemas diários. Aos ex-professores e por fim colegas de trabalho da Universidade Estadual de Londrina, apoiando na realização deste trabalho mesmo quando da presença de atribuições ligadas à docência.

Por fim, porém não menos importante agradeço aos meus animais: ao passarinho “Zé Rico”, fazendo com que o dia já comece melhor com suas canções, Montana e Frida, cachorrinhas companheiras por 12 anos (desde a graduação). Elas decoraram a apresentação da tese! E, aos meus equinos (Gray, Star, Ronaldinha, Hot e Faster) e dos clientes, tornando-me cada dia mais incitada e realizada.

"O cachorro é o único ser que ama você mais do que a si próprio." **Josh Billings**

"Ter fé é dar o primeiro passo mesmo quando você não consegue ver toda a escada". **Martin Luther King Jr.**

"Não existe o bom ou o mau; è o pensamento que os faz assim". **William Shakespeare**

"Deus nunca nos traz problemas intransponíveis. Em vez disso, Ele nos dá desafios, espera até que possamos superá-los e, em seguida, rejubila-se". **Michael Hingson**

GOMES, Roberta Garbelini. **Efeito da adição de antioxidantes no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais equinos inclusos em fragmentos ovarianos.** 2015. 157 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da adição dos antioxidantes ácido ascórbico ou ácido alfa lipoico no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais equinos inclusos em fragmentos ovarianos, por 2 ou 6 dias. Em cada um dos experimentos, foram coletados 5 ovários (n = 5) oriundos de 5 éguas em anestro estacional de abatedouro local. Os fragmentos ovarianos (experimento 1: ácido ascórbico) e os ovários (experimento 2: ácido alfa lipoico) foram transportados em PBS suplementado com estreptomicina (200 mg/mL) e penicilina (200 UI/mL) a 4° C por uma hora. Os fragmentos (n = 9) obtidos da porção mais interna do tecido ovariano de cada animal pesavam 125 a 135 mg, medindo 5 x 5 x 1 mm. Um dos fragmentos foi imediatamente fixado em Bouin (Controle; MEM-D0) e os outros fragmentos foram cultivados por 2 (D2) ou 6 dias (D6) em MEM suplementado (MEM⁺) ou MEM⁺ acrescido de 3 diferentes concentrações de ácido ascórbico (25, 50 ou 100 µg/mL) ou ácido alfa lipoico (50, 100 ou 250 µM). Ao término do cultivo *in vitro*, todos os fragmentos obtidos foram submetidos à avaliação histológica através de coloração de PAS. Os fragmentos obtidos no experimento 2 também foram submetidos à avaliação da atividade proliferativa das células da granulosa através de imunohistoquímica utilizando o marcador antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). Todos os folículos pré-antrais encontrados foram classificados de acordo com seu estágio de desenvolvimento em primordial ou em desenvolvimento (primário e secundário) e também quanto à sua morfologia, em normal ou degenerado. Para a imunohistoquímica, os folículos também foram classificados em PCNA-positivo (pelo menos uma célula da granulosa corada) e PCNA-negativo (nenhuma coloração). Os dados obtidos no experimento 1, foram analisados através do teste de Kruskal-Wallis e no experimento 2, através do teste Exato de Fisher, ambos com nível de significância de 5% (p < 0,05). No experimento 1, foram analisados 407 folículos e 43,5% apresentaram-se morfologicamente normais. Os tratamentos MEM⁺, 25, 50 e 100 µg/mL no dia 2 de cultivo *in vitro* apresentaram resultados similares quanto à porcentagem de folículos em desenvolvimento. Os tratamentos MEM⁺ adicionado de 50 ou 100 µg/mL de ácido ascórbico apresentaram maiores porcentagens de folículos em desenvolvimento que primordiais comparado aos demais grupos testados no dia 6 de cultivo *in vitro* (p < 0,05). No experimento 2, foram analisados 1095 folículos (767 folículos através de histologia e 328 através de imunohistoquímica). Dos 767 folículos analisados através de histologia, 56,3% apresentaram-se morfologicamente normais. O grupo MEM⁺ apresentou maior porcentagem de folículos em desenvolvimento (88,2%) que primordiais, diferindo dos demais grupos no dia 2 de cultivo *in vitro* (p < 0,05). O grupo MEM⁺ acrescido de 50 µM de ácido alfa lipoico, mostrou melhores resultados comparado aos demais tratamentos no dia 6 do cultivo *in vitro* (p < 0,05), com 100% dos folículos em desenvolvimento e PCNA-positivo. Pode-se concluir que o cultivo por 6 dias de

folículos pré-antrais equinos incluídos em fragmentos ovarianos oriundos de abatedouro em MEM⁺ acrescido de 50 ou 100 µg/mL de ácido ascórbico ou MEM⁺ acrescido de 50 µM de ácido alfa lipoico, permitiu o desenvolvimento folicular.

Palavras-chave: Folículos pré-antrais. Antioxidantes. Ovário. Cultivo *in vitro*. Égua.

GOMES, Roberta Garbelini. **Effect of antioxidants on *in vitro* culture of equine preantral follicles enclosed in ovarian fragments.** 2015. 157 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of the addition of the antioxidants ascorbic acid or alpha lipoic acid on *in vitro* culture of equine preantral follicles enclosed in ovarian fragments, for 2 or 6 days. In each experiment, 5 ovaries (n = 5) of 5 mares in seasonal anestrus were collected from a local slaughterhouse. The ovarian fragments (experiment 1: ascorbic acid) and ovaries (experiment 2: alpha lipoic acid) were transported in PBS supplemented with streptomycin (200 mg/mL) and penicillin (200 IU/mL) at 4 °C during one hour. The inner portion of ovarian tissue fragments' (n= 9) measurements indicate weights between the range of 125 to 135 mg in dimensions of 5 x 5 x 1 mm. One fragment was immediately fixed in Bouin (control; MEM-D0) and the other fragments were cultured for 2 (D2) or 6 days (D6) in MEM supplemented (MEM⁺) or MEM⁺ with the addition of 3 different ascorbic acid concentrations (25, 50, or 100 µg/mL) or alpha lipoic acid (50, 100, or 250 µM). At the end of the *in vitro* culture, all fragments were subjected to histological evaluation by PAS staining. The fragments obtained in experiment 2 were also evaluated for proliferative activity of granulosa cells by immunohistochemistry with the use of proliferation cell nuclear antigen (PCNA). All preantral follicles were categorized according the stage of development in primordial or development (primary and secondary), and also according the morphology, in normal or degenerated. By immunohistochemistry, the follicles were classified in PCNA-positive (at least one granulosa cell and/or oocyte staining) and PCNA-negative (no staining). The analysis of the data obtained in experiment 1 was made using the Kruskal-Wallis test, while experiment 2 was made using Fisher's exact test, both of them with a significance level of 5% (P < 0.05). In experiment 1, 407 follicles were analyzed and 43.5% were categorized as morphologically normal. The treatments MEM⁺, 25, 50 and 100 µg/mL on day 2 resulted in similar percentages of developing follicles. The MEM⁺ treatment containing 50 or 100 µg/mL ascorbic acid presented higher percentages of developing follicles than primordial in comparison to the other *in vitro* culture groups tested on day 6 (P < 0.05). In experiment 2, 1095 follicles were analyzed (767 follicles by histology and 328 by immunohistochemistry). In 767 follicles analyzed by histology, 56.3% were morphologically normal. The MEM⁺ group had a higher percentage of developing follicles (88.2%) than primordial, differing from the other *in vitro* culture groups on day 2 (P < 0.05). The MEM⁺ group plus 50 µM of alpha lipoic acid presented better results when compared to the other *in vitro* culture treatments on day 6 (P < 0.05), with 100% of the development follicles and PCNA-positive. In conclusion, follicular development was observed after *in vitro* culture of equine preantral follicles enclosed in ovarian fragments collected in abattoir during 6 days in MEM⁺ plus 50 or 100 µg/mL ascorbic acid or MEM⁺ plus 50 µM of alpha lipoic acid.

Key words: Preantral follicles. Antioxidants. Ovary. *In vitro* culture. Mares.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de Literatura

- Figura 1** – Diagrama comparando as relações entre as camadas cortical e medular de ovários equinos e de outras espécies mamíferas (GINTHER, 1979).....23
- Figura 2** – Características macroscópicas de ovários equinos. A: Ovário equino cíclico. B: Ovário equino em anestro estacional23
- Figura 3** – Imagens de folículos ovarianos de éguas obtidas através de histologia clássica, ilustrando a morfologia e o desenvolvimento dos folículos pré-antrais e antral. Coloração Ácido Periódico de Schiff (PAS; Adaptado de Gomes *et al.*, 2012). Aumento de 40 x. 1. Oócito primário; 2. Célula da Pré-granulosa; 3. Células da Granulosa e 4. Cavidade antral.....33
- Figura 4** – Quadro ilustrativo dos principais avanços no cultivo *in vitro* de FOPA nas diferentes espécies (Adaptado de Rossetto *et al.*, 2011).....42
- Figura 5** – Fragmentação de região parenquimatosa de ovário equino para cultivo *in vitro*.....44
- Artigo 1 – Acid ascorbic supplementation improves *in vitro* development of equine preantral follicles**
- Figure 1** – Sections of equine ovarian tissue after *in vitro* culture. A: Primordial follicle with normal morphology derived from the control group. B: Primordial follicle with normal morphology from the MEM⁺ 25 µg/mL ascorbic acid group after 6 days of *in vitro* culture. C: Secondary follicle with degenerated morphology derived from the 50 µg/mL ascorbic acid group after 6 days of *in vitro* culture. D: Secondary follicle with degenerated morphology from the 100 µg/mL ascorbic acid group after 6 days of *in vitro* culture. ON: oocyte nucleus; GC: granulosa cell. 40x magnification101

Artigo 2 – Effect of alpha lipoic acid on developmental competence of equine preantral follicles

- Figure 1** – Experimental protocol used for *in vitro* culture of equine preantral follicles in media containing alpha lipoic acid or in control medium121
- Figure 2** – Sections of equine ovarian tissue after *in vitro* culture. A: Morphologically normal primordial follicles in control group. B: Morphologically normal primary follicle after 6 days of *in vitro* culture in MEM⁺ 50 µM of alpha lipoic acid (ALA 50-D6); C: Morphologically degenerated secondary follicle after 6 days of *in vitro* culture in 250 µM of alpha lipoic acid (ALA 250-D6); A, B, C: Periodic acid Schiff (PAS) staining. D: Morphologically normal primary follicle with proliferating cell nuclear antigen (PCNA)positive (brown staining) granulosa cells and oocyte. O: oocyte nucleus; GC: granulosa cells. 40x magnification122
- Figure 3** – Percentage of morphologically normal primordial and developing follicles in all treatments after 2 and 6 days of *in vitro* culture of equine ovarian fragments ($P < 0.05$)123

LISTA DE TABELAS

Artigo 1 – Acid ascorbic supplementation improves *in vitro* development of equine preantral follicles

Table 1 – Number (%) of primordial and developing follicles observed in equine tissues cultured for 2 (D2) or 6 (D6) days in minimal essential medium (MEM⁺; control) or MEM⁺ supplemented with 25, 50 or 100 µg/mL ascorbic acid (AA)100

Artigo 2 – Effect of alpha lipoic acid on developmental competence of equine preantral follicles

Table 1 – Primordial and developing follicles retrieved for histology and proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-positive granulosa cells observed in equine ovarian tissue after 0, 2, and 6 days of culture in minimal essential medium (MEM⁺) supplemented with different concentrations of alpha lipoic acid (ALA).....120

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IA	inseminação artificial
TE	transferência de embriões
PIV	produção <i>in vitro</i> de embriões
ICSI	<i>intracytoplasmic sperm injection</i> -injeção intracitoplasmática de espermatozoides
GIFT	<i>gamete intrafallopian transfer</i> -transferência de gametas intrafalopiana
MOEPF / MOIFOPA	<i>manipulation of oocytes enclosed in preantral follicles</i> -manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais
FOPA	folículos ovarianos pré-antrais
CGP	células germinativas primordiais
LH	<i>luteinizing hormone</i> -hormônio luteinizante
EGF	<i>epidermal growth factor</i> -fator de crescimento epidermal
FGF	<i>fibroblast growth factor</i> -fator de crescimento de fibroblasto
TGF	<i>transforming growth factor</i> -fator transformador do crescimento
IGF	<i>insulin-like growth factor</i> -fator de crescimento semelhante à insulina
GDF-9	growth and differentiation factor -fator de crescimento e diferenciação
FSH	<i>follicle stimulant hormone</i> -hormônio folículo estimulante
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i> – antígeno nuclear de proliferação celular
BSA	<i>bovine serum albumin</i> -albumina sérica bovina
GH	<i>growth hormone</i> -hormônio do crescimento AMH - <i>anti-Müllerian hormone</i> hormônio anti-Mülleriano
KGF	<i>keratinocyte growth factor</i> -fator de crescimento de queratinócito BMP - <i>bone morphogenetic protein</i> -proteína morfogenética óssea
NGF	nerve growth factor – fator de crescimento neural
SIP	sphingosine-1-phosphate -esfingosina 1-fosfato
LIF	leukemia inhibitor factor -fator inibidor de leucemia
VEGF	vascular endothelial growth factor – fator de crescimento endotélio vascular
MEM	minimum essential media – meio essencial mínimo
M199	Meio 199
ROS	reactive oxygen species – espécies reativas de oxigênio

OS	oxidative stress -estresse oxidativo
AA	ascorbic acid -ácido ascórbico
ALA	alpha lipoic acid – ácido alfa lipoico
MEM+	supplemented minimum essential media – meio essencial mínimo suplementado
D0	day zero – dia zero
D2	day two – dia 2
D6	day six – dia 6
IVF-FIV	in vitro fertilization – fertilização in vitro
PBS	Phosphate buffered saline -tampão fosfato-salino
PAS	periodic acid Schiff -ácido periódico de Schiff
BPU	biopsy pick-up – biópsia
GC	granulosa cell -células da granulosa
ON	oocyte nucleus -núcleo do oócito
DAB	diaminobenzidine substrate -substrato de diaminobenzidina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	OVÁRIO EQUINO	21
2.2	OOGÊNESE	23
2.3	FOLICULOGÊNESE	25
2.4	NEO-FOLICULOGÊNESE	27
2.5	POPULAÇÃO FOLICULAR OVARIANA	29
2.6	FOLÍCULOS OVARIANOS	30
2.6.1	Folículos Pré-antrais	30
2.6.1.1	<i>Folículos primordiais</i>	31
2.6.1.2	<i>Folículos primários</i>	31
2.6.1.3	<i>Folículos Secundários</i>	32
2.6.2	Folículos Antrais	32
2.6.2.1	<i>Folículos terciários</i>	32
2.6.2.2	<i>Folículos maduros ou pré-ovulatórios</i>	33
2.7	ATRESIA FOLICULAR	34
2.8	MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR	36
2.9	MOIFOPA – Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais	37
2.9.1	Estado do Cultivo <i>in vitro</i> de Folículos Pré-Antrais	38
2.9.2	Isolamento Folicular ou Ovário <i>in situ</i>	42
2.9.3	Cultivo <i>in vitro</i> de Folículos Ovarianos Pré-Antrais	44
2.9.4	Importância da Composição do Meio Sobre o Desenvolvimento Folicular <i>in vitro</i>	47
2.9.5	Estresse Oxidativo	48
2.9.6	Utilização de Antioxidantes no Meio de Cultivo <i>in vitro</i>	50
2.9.6.1	Ácido Ascórbico	52
2.9.6.2	Ácido Alfa Lipoico	53
	REFERÊNCIAS	55

3	HIPÓTESE	80
4	OBJETIVOS	81
	4.1 OBJETIVO GERAL	81
	4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	81
5	ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO	82
	ARTIGO 1 – <i>Acid ascorbic supplementation improves in vitro development of equine preantral follicles</i>	82
	Abstract	83
	1 Introduction	85
	2 Materials and methods.....	87
	3 Results	89
	4 Discussion.....	90
	5 References.....	94
	ARTIGO 2 – <i>Effect of alpha lipoic acid on developmental competence of equine preantral follicles</i>	102
	Abstract	103
	1 Introduction	104
	2 Materials and methods.....	105
	3 Results	108
	4 Discussion.....	109
	References	113
6	DISCUSSÃO GERAL	124
7	CONCLUSÕES	127
8	ANEXOS	128
	ANEXO 1 – <i>Effect of Deslorelin and/or Human Chorionic Gonadotropin on Inducing Ovulation in Mares During the Transition Period Versus Ovulatory Season</i>	129

ANEXO 2 – Evaluation of reproductive cyclicity in female mules through morphology, ovarian structures and their use as embryo recipients	133
ANEXO 3 – Taxa de recuperação embrionária em éguas submetidas à caminhada com útero repleto de Ringer Lactato	151

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a população mundial de equinos é estimada em 58.315.816 de animais (FAO, 2013). O Brasil possui o terceiro maior rebanho de equídeos do mundo e o maior da América Latina, com uma população de equídeos de 7.986.023 de animais, sendo 5.541.702 equinos, 1.130.795 asininos e 1.313.526 muares (IBGE, 2012).

O agronegócio equestre movimenta 7,3 bilhões de reais apenas na produção de animais. Além disso, a indústria equestre envolve mais de 30 segmentos entre insumos, criação e destinação final, responsável pela geração de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos. O Brasil expandiu em 524% a exportação de equinos vivos no período de 1997 a 2009 (MAPA, 2009).

com isso, visando o aumento da produtividade e incremento genético da população de equídeos, algumas biotécnicas da reprodução já tem sido empregadas com êxito como a Inseminação Artificial (IA), a Transferência de Embriões (TE), a Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI) e a clonagem. Também destacam-se as biotécnicas como a Produção *In vitro* de Embriões (PIV), a Transferência de Gametas Intrafalopiana (GIFT), e mais atualmente na espécie equina, a Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais (MOIFOPA), as quais ainda estão sendo fruto de pesquisas (FIGUEIREDO *et al.*, 2007).

A MOIFOPA consiste no isolamento ou resgate de folículos pré-antrais a partir de ovários, seguido da conservação (resfriamento ou congelamento) e cultivo folicular, tendo como finalidade promover o crescimento, a maturação e a fecundação *in vitro* dos oócitos previamente inclusos nestes folículos ovarianos pré-

antrais (FOPA, FIGUEIREDO *et al.*, 2007). Os FOPA representam 90% da população folicular ovariana (SAUMANDE, 1991) e são responsáveis pela contínua renovação de folículos antrais no ovário (HASHIMOTO *et al.*, 2007). No entanto, 99,9% sofrem atresia (EGGAN *et al.*, 2006). A MOIFOPA objetiva minimizar esta grande perda de estoque folicular, otimizando o seu aproveitamento, resgatando inúmeros folículos e oócitos para a realização de outras biotécnicas e melhor compreensão dos aspectos envolvidos na foliculogênese.

A MOIFOPA tem sido estudada desde a década de 80, apresentando resultados satisfatórios em algumas espécies. Como exemplo, em suínos (HIRAO *et al.*, 1994; WU *et al.*, 2001), bubalinos (GUPTA *et al.*, 2008), ovinos (ARUNAKUMARI *et al.*, 2010) e caprinos (HUANMIN; YONG, 2000; MAGALHÃES *et al.*, 2010; SARAIVA *et al.*, 2010) já foi demonstrado que os oócitos de folículos pré-antrais podem crescer, adquirir competência meiótica, serem fertilizados *in vitro* e chegar até o estágio de blastocisto. Em humanos (ROY; TREACY, 1993) e bovinos (McCAFFERY *et al.*, 2000; ROSSETTO *et al.*, 2013), folículos pré-antrais foram isolados e desenvolvidos *in vitro* até o estágio antral. Em animais de laboratório, os resultados foram ainda mais promissores. Em ratos relatou-se a produção *in vitro* de embriões (DANIEL *et al.*, 1989). Eppig e Schroeder (1989) obtiveram o nascimento de camundongos a partir de FOPA que cresceram, foram maturados e fecundados *in vitro*. Carroll *et al.* (1990) conseguiram produtos viáveis oriundos de FOPA de camundongos, os quais haviam sido submetidos à procedimentos de congelação e descongelação. Adicionalmente, nos últimos anos tem-se testado meios ideais para a vitrificação do tecido ovariano e posterior cultivo *in vitro* de FOPA inclusos de caprinos (FAUSTINO *et al.*, 2014) e bovinos (CASTRO *et al.*, 2014) com resultados satisfatórios.

A adição de antioxidantes ao meio de cultivo *in vitro* dos folículos ovarianos pré-antrais como o ácido ascórbico e o ácido alfa lipoico, tem sido relatada em espécies como bovinos (THOMAS *et al.*, 2001; ANDRADE *et al.*, 2012), ratos (TALEBI *et al.*, 2012) e caprinos (ROSSETTO *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2011a), visando equilibrar a formação das espécies reativas de oxigênio formadas em maiores quantidades no cultivo *in vitro* comparado ao ambiente *in vivo*. Estas substâncias proporcionam benefícios aos folículos nos estágios iniciais de desenvolvimento, protegendo-os contra os danos causados pelos radicais livres.

Na espécie equina, pesquisas a respeito do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais inclusos em fragmentos ovarianos ainda são escassas. Este fato pode ser explicado devido principalmente à dificuldade em se obter ovários associada à baixa densidade populacional de folículos no estroma ovariano desta espécie (GOMES *et al.*, 2012).

Considerando os aspectos supracitados, o objetivo do presente trabalho é avaliar o efeito da adição de antioxidantes sobre a viabilidade e o desenvolvimento de folículos pré-antrais no cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos da espécie equina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 OVÁRIO EQUINO

O ovário equino difere de outras espécies de mamíferos domésticos por desenvolver características peculiares durante a fase fetal, como por exemplo, possuir abundante estroma fibroso, conter frequentemente tecido adrenocortical ectópico e fossa ovárica (NAVES *et al.*, 2008). Além disso, na espécie equina, o conceito de zona parenquimatosa formando um córtex e zona vascular formando a medula como em outras espécies mamíferas, não é aplicado (KLAUS-DIETER *et al.*, 2001). A região parenquimatosa (mais interna), borda mais ventral e côncava, que se localiza próxima à fossa ovulatória, contém folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento, bem como corpos lúteos, *albicans* e hemorrágicos. A região vascular, mais dorsal e convexa, localizada na porção mais externa do ovário, é constituída por tecido conjuntivo, algumas células musculares lisas, nervos, artérias e veias, responsáveis pela nutrição e sustentação do ovário, conhecida como hilo ovariano (HAFEZ, 1996; BLANCHARD *et al.*, 2003; EVANS *et al.*, 2007; Figura 1). Pequenos vasos sanguíneos estendem-se a partir da região vascular para dentro da região parenquimatosa do ovário. A fossa ovulatória se localiza na borda ventral do tecido ovariano (região côncava; CORMACK, 1991; EVANS *et al.*, 2007).

A diferenciação da gônada na espécie equina ocorre por volta de 39 a 45 dias de gestação. Estas se originam de espessamentos conhecidos como cristas gonadais formadas no terço médio dos ductos mesonéfricos. As células germinativas primordiais presentes no embrião migram do endoderma do saco vitelínico para as cristas gonadais e em seguida inicia-se a diferenciação gonadal, e

estas células passam a ser denominadas ovogônias (fêmeas) ou espermatogônias (machos). As gônadas fetais equinas de 7 a 8 meses de idade gestacional são maiores que os ovários de éguas adultas (NAVES *et al.*, 2008).

Em equinos, os ovários estão suspensos na região sublombar da cavidade abdominal pelo ligamento mesovárico e apresentam pouca mobilidade, medindo aproximadamente 5 a 8 cm de comprimento, 3 a 4 cm de largura e seu peso varia entre 30 a 120 gramas dependendo do estágio do ciclo estral (Figura 2, BLANCHARD *et al.*, 2003; EVANS *et al.*, 2007). Ovários de éguas que se encontram na estação anovulatória medem aproximadamente 2,4 x 1,6 x 1,6 cm, pesando em torno de 17,5 gramas e possuem folículos menores que 5 mm e a maioria sofrerá o processo de atresia (GINTHER, 1979).

O ovário desempenha funções endócrina (produção e liberação de hormônios esteroides e diversos peptídeos), e exócrina ou gametogênica (produção e liberação de oócitos; HAFEZ, 1996; EVANS *et al.*, 2007), a qual é exercida pela interação de dois fenômenos, a oogênese e a foliculogênese (SAUMANDE, 1991; EVANS *et al.*, 2007).

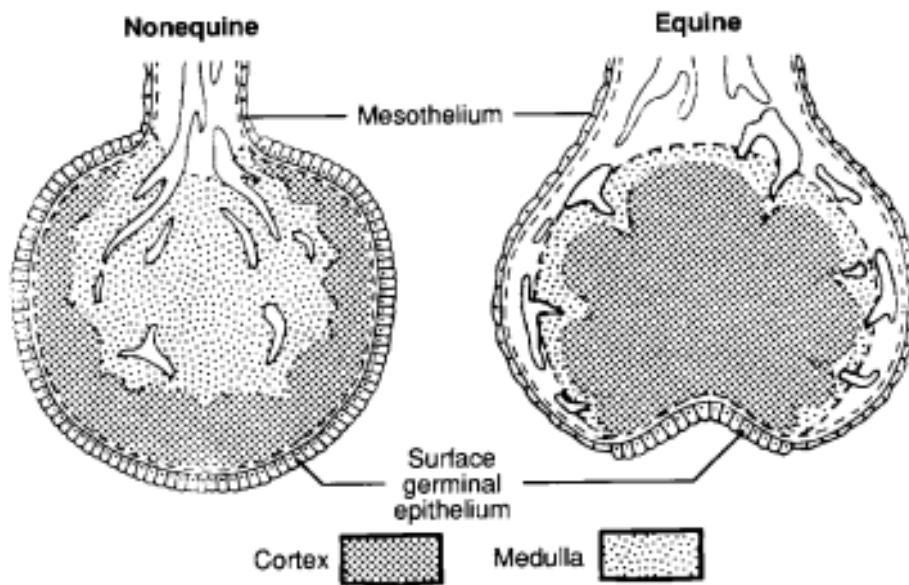


Figura 1. Diagrama comparando as relações entre as camadas cortical e medular de ovários equinos e de outras espécies mamíferas (GINTHER, 1979).

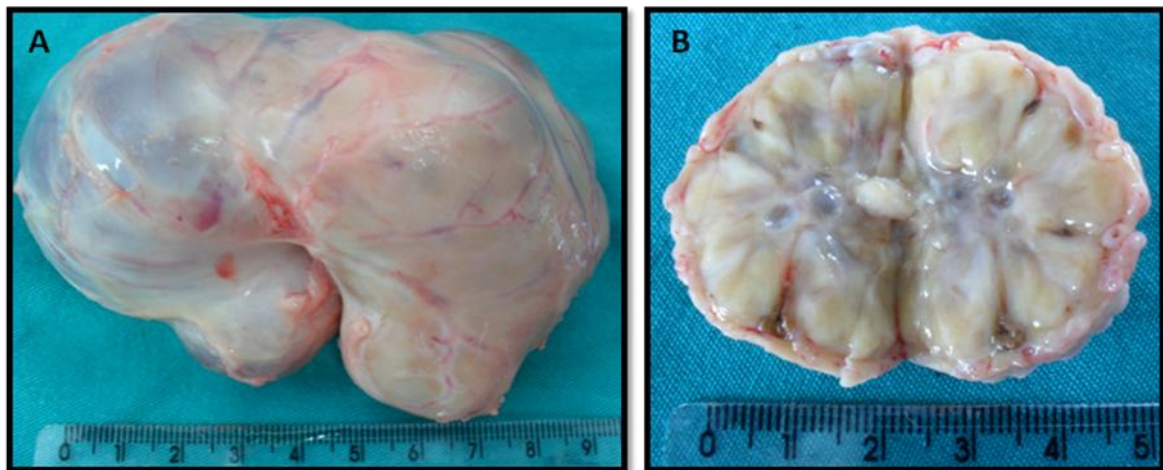


Figura 2. Características macroscópicas de ovários equinos. A: Ovário equino cíclico. B: Ovário equino em anestro estacional.

2.2 OOGÊNESE

A oogênese em mamíferos pode ser definida como uma sequência

de eventos no período embrionário, em que as células germinativas primordiais (CGP) de origem extragonadal, desenvolvem-se e diferenciam-se até a formação do oócito haploide fecundado (RÜSSE, 1983). A oogênese inicia-se na vida fetal, mas somente alguns oócitos conseguem completar este processo meses ou anos mais tarde no animal adulto, após a fecundação (WASSARMAN, 1988; EVANS *et al.*, 2007).

Após o oócito ser fecundado pelo espermatozoide é formado o zigoto que irá evoluir até blastocisto, o qual apresenta duas estruturas: o trofoblasto e o embrioblasto. O embrioblasto originará três folhetos: o ectoderma, o mesoderma e o endoderma. Estes formarão várias estruturas, como por exemplo, o saco vitelínico (HIRSHFIELD, 1991). As CGP se originam no epiplasto e migram para o hipoblasto por fatores quimiotáticos. Após diversos eventos, estas células migram para o mesênquima da crista genital colonizando a gônada indiferenciada. Por fim, perdem a capacidade de migração e começam a se multiplicar ativamente por mitose e diferenciam-se em oogônias (ERICKSON, 1966; WASSARMAN, 1994).

Após várias mitoses, as oogônias entrarão na primeira divisão meiótica (estádio de prófase I) e serão denominadas de oócitos primários ou imaturos. O núcleo oocitário, que está na meiose I, irá passar por quase todos os estádios da prófase I (leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno), no entanto, o processo meiótico é interrompido no estágio de diplóteno e o núcleo do oócito irá permanecer neste estágio até que o animal entre na puberdade. Durante este período, o oócito passará por uma fase de crescimento, caracterizada por um aumento na síntese de RNA, acúmulo de lipídeos e absorção ativa e/ou passiva de diferentes nutrientes (FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

Quando o animal atinge a puberdade e ocorrem liberações de

hormônio luteinizante (LH), algumas horas antes da ovulação, a meiose é reiniciada, passando pelas fases de metáfase I, anáfase I e telófase I, e então o primeiro corpúsculo polar é expulso. Assim, neste momento, o oócito é denominado de secundário, pois seu núcleo se encontra na segunda divisão meiótica. Esta, por sua vez, tem uma rápida e às vezes inexistente prófase II, que avançará até metáfase II, quando então ocorre a segunda parada da meiose. O oócito só finalizará a meiose se for fecundado pelo espermatozoide. Havendo a fecundação, o núcleo do oócito irá passar pelos estádios de anáfase II e telófase II, expulsará o segundo corpúsculo polar e formará o oócito haploide fecundado, assim finalizando a oogênese (BETTERIDGE *et al.*, 1989).

2.3 FOLICULOGÊNESE

A foliculogênese, evento iniciado na vida pré-natal na maioria das espécies, caracteriza-se pela formação, crescimento e maturação folicular. Este evento origina-se com a formação do folículo primordial e culmina com o desenvolvimento do folículo pré-ovulatório (SAUMANDE, 1981; MOORE; PERSAUD, 1994). Sendo assim, a foliculogênese começa depois do início e termina antes do fim da oogênese (FIGUEIREDO *et al.*, 2008)

A foliculogênese pode ser dividida em duas fases: 1) Fase pré-antral, que é subdividida em ativação dos folículos primordiais e crescimento dos folículos primários e secundários; 2) Fase antral, subdividida em crescimento inicial e terminal dos folículos terciários (FIGUEIREDO *et al.*, 1995).

Os folículos ovarianos são unidades morfológicas funcionais onde células somáticas e germinativas estão interligadas, porém, interdependentes,

desempenhando um papel fundamental no desenvolvimento de um folículo maduro e na ovulação de um oócito completamente competente para ser submetido à fertilização (CANIPARI, 2000).

Ainda na vida fetal, uma camada de células da pré-granulosa (células somáticas planas ou achatadas) envolvem o oócito primário ou imaturo do feto (núcleo em prófase I), dando origem ao folículo primordial, o primeiro e mais primitivo dos estádios foliculares. Depois da formação destes folículos, as células da pré-granulosa cessam sua multiplicação e o folículo primordial entra no período de dormência ou quiescência (FIGUEIREDO *et al.*, 2008). A retomada da proliferação celular só acontece quando o folículo primordial começa a crescer, meses ou anos após a sua formação (HIRSHFIELD, 1991), atravessando sucessivamente os estádios de folículos primários, secundários e terciário até chegar ao folículo pré-ovulatório (FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

A maior parte dos oócitos presentes no ovário estão inclusos em folículos primordiais, porém, a população destes folículos diminui progressivamente durante a vida reprodutiva da fêmea (GOSDEN *et al.*, 1983; EGGAN *et al.*, 2006; KERR *et al.*, 2012). Na população folicular ovariana há uma grande reserva de folículos primordiais quiescentes e uma pequena quantidade de folículos em crescimento (CAHILL; MAULÉON, 1981).

O mecanismo que promove o crescimento dos folículos pré-antrais ainda está sendo elucidado. Para que ocorra a foliculogênese e oogênese e, os FOPA se desenvolvam, é necessária a interação entre a sinalização de fatores parácrinos secretados pelo oócito e células somáticas do óvário (HUTT *et al.*, 2006). O desenvolvimento dos folículos pré-antrais, possivelmente, recebe grande influência de fatores intraovarianos como a ativina (THOMAS, ARMSTRONG;

TELFER, 2003), fator de crescimento epidermal (EGF), fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento de transformação (TGF α e β), fator de crescimento insulínico (IGF-1 e 2, ZHAO *et al.*, 2001; FIGUEIREDO *et al.*, 2008; DUARTE *et al.*, 2013), Kit ligand, também conhecido como “*stem cell factor*” ou “*steel factor*” (FAUSTINO *et al.*, 2013), e fator de diferenciação de crescimento-9 (GDF-9, MAYERHOFER *et al.*, 1997).

2.4 NEO-FOLICULOGÊNESE

No século passado, Zuckerman (1951), consagrou que o número de oócitos é permanentemente definido nos ovários desde a vida fetal e que este possui um estoque de gametas. Porém, recentemente, este dogma da ausência de renovação folicular ovariana na vida pós-natal, vem sendo amplamente discutido, desde a publicação de Johnson *et al.* (2004), descrevendo a presença de marcadores específicos de meiose nos ovários de camundongas adultas.

Este mesmo grupo de pesquisadores promoveram a esterelização química de camundongas detectando a ausência de população folicular ovariana. Em seguida, as mesmas foram submetidas à transfusão de medula óssea e sangue periférico. Uma semana depois, foram encontrados folículos viáveis nos ovários destes animais (JOHNSON *et al.*, 2005).

Eggan *et al.* (2006) investigaram a renovação folicular ovariana em camundongos parabióticos, ou seja, com corrente sanguínea compartilhada. Uma camundonga transgênica para uma proteína fluorescente compartilhou sangue periférico com outra não transgênica. Os oócitos fluorescentes não foram evidenciados nos ovários da fêmea não transgênica, contradizendo a teoria da neo-

foliculogênese.

Corroborando com a teoria da renovação folicular, Dyce *et al.* (2006) isolaram estruturas como folículos derivados de células tronco da pele de fetos suínos, e estas foram capazes de produzir hormônios esteróides, responder às gonadotrofinas e produzir estruturas semelhantes à embriões através de partenogênese. Porém, Liu *et al.* (2007) não encontraram evidências de meiose através de genes específicos em ovários de mulheres. Adicionalmente, Kerr *et al.* (2012) monitoraram a população de folículos primordiais ao longo da vida pós-natal e evidenciaram depleção da reserva folicular ovariana, afirmando ausência de renovação folicular.

Ainda em 2012, Zhang *et al.* desenvolveram uma linhagem de células germinativas femininas e não encontraram estas células mitoticamente ativas nos ovários na vida pós-natal. White *et al.* (2012), relataram que ovários provenientes de mulheres na puberdade possuem células germinativas mitoticamente ativas que podem gerar oócitos tanto *in vitro* como *in vivo*.

Recentemente, foi descrita a produção de células somáticas que expressavam marcadores específicos de células da granulosa. Estas células, foram injetadas em ovários de camundongas neonatais, se incorporaram na camada de células da granulosa de folículos imaturos, sintetizaram esteroides e responderam ao hormônio folículo estimulante (FSH, WOODS *et al.*, 2013). Em seguida, Woods e Tilly (2013) descreveram um protocolo para isolamento de células tronco germinativas femininas de tecido ovariano de camundongas adultas e mulheres, seguido de cultivo e caracterização destas células, enfatizando que a oogênese e a foliculogênese não são processos limitados à vida perinatal nos mamíferos, e que estes protocolos abrem caminhos para novas pesquisas para a utilidade clínica e

biológica destas células.

2.5 POPULAÇÃO FOLICULAR OVARIANA

A população de folículos presentes no ovário é influenciada por diversos fatores como: genética (ERICKSON, 1966), raça (CAHILL; MAULÉON, 1981), idade (ERICKSON, 1966; RÜSSE, 1983; SILVA-SANTOS *et al.*, 2011), níveis hormonais (PETERS, 1976), estado reprodutivo (ERICKSON; REYNOLDS; MURPHEREE, 1976), variações individuais (SILVA-SANTOS *et al.*, 2011) e nutricional do animal (SZLACHTA; TISCHNER, 2008; SCARAMUZZI *et al.*, 2011).

A estimativa da população de folículos pré-antrais em ovários de fêmeas bovinas de diferentes idades e raças variou de 143.929 a 285.155 folículos para fetos, 76.851 a 109.673 folículos para novilhas, e 39.438 a 89.577 folículos para vacas, *Bos indicus* e *Bos taurus* respectivamente (SILVA-SANTOS *et al.*, 2011). Sendo que, a população de folículos primordiais de vacas de até 24 meses de idade foi estimada em 130.000 folículos (ERICKSON, 1966). Em cabras, a população folicular ovariana foi descrita em 37.646 folículos (LUCCI *et al.*, 1999), sendo 26.613 primordiais (LUCCI *et al.*, 1999); nas ovelhas, 160.000 folículos (DRIANCOURT, 1991), sendo 77.000 folículos primordiais (LAND, 1970), na mulher, 2.000.000 de folículos (ERICKSON, 1986) e, na cadela, variou de 6.164 a 59.283 folículos nas fêmeas adultas, dependendo do tamanho do animal (LUNARDON *et al.*, 2014).

Já na espécie equina, estima-se que sua população folicular seja ao redor de 36.000 folículos por ovário (SZLACHTA; TISCHNER, 2002; EVANS *et al.*, 2007). Com relação à quantidade de folículos primordiais, Driancourt *et al.* (1982) estimaram que ovários de pôneis e éguas de sela de 2 a 4 anos de idade

apresentam em média 35.590 folículos primordiais.

2.6 FOLÍCULOS OVARIANOS

Os folículos são diferenciados entre si pela forma e número de camadas de células que circundam o oócito (FIGUEIREDO *et al.*, 2002). De acordo com Hulshof *et al.* (1994), os folículos pré-antrais são classificados em primordiais, primários, secundários e, os antrais, em terciários e pré-ovulatórios, estabelecendo ainda que os folículos primordiais e primários não poderiam ser diferenciados pelo seu diâmetro e sim por diferenças morfológicas.

Além disso, os folículos também podem ser classificados de acordo com a sua viabilidade, como folículos viáveis (lâmina basal intacta, oócitos com não mais que três vacúolos citoplasmáticos, vesícula germinativa e nucléolos intactos), folículos em atresia inicial (estágio I: oócito com mais de três vacúolos citoplasmáticos e início de descondensação da cromatina), folículos em atresia moderada (estágio II: oócito com nucléolo e citoplasma em fragmentação e alta condensação de cromatina) ou folículos com atresia acentuada (estágio III: oócito completamente fragmentado ou ausente, WANDJI *et al.*, 1996a).

2.6.1 Folículos Pré-antrais

Os folículos pré-antrais representam cerca de 90% da população folicular do ovário mamífero (ERICKSON, 1986) e constituem o estoque de gametas femininos durante sua vida reprodutiva (LIU *et al.*, 2001).

O crescimento folicular inicia-se com a ativação de folículos primordiais, sendo caracterizado por três eventos principais: mudanças na forma das células da granulosa de pavimentosa para cuboide, proliferação destas células e aumento de tamanho do oócito (HIRSHFIELD, 1991; FORTUNE, 2003).

2.6.1.1 Folículos primordiais

Os folículos primordiais, também conhecidos como folículos de reserva ou quiescentes, compreendem cerca de 90% a 95% de toda a população folicular presente no ovário. Estes são constituídos por um oócito central circundado por uma camada de células da pré-granulosa (células somáticas planas ou achatadas) de forma pavimentosa (ERICKSON, 1986; HIRSHFIELD, 1991). Os folículos que apresentam algumas células da granulosa com formato pavimentoso e outras com formato cuboide são denominados folículos de transição (VAN DEN HURK; BEVERS; BECKERS, 1997).

2.6.1.2 Folículos primários

Quando o folículo primordial é ativado, o mesmo evolui para folículo primário. Esta classe folicular é constituída por um oócito central circundado por uma única camada de células da granulosa, mais volumosas, em maior quantidade (VAN DER HURK *et al.*, 1997) e de formato cuboide (HULSHOF *et al.*, 1994). Seu oócito aumenta de volume, ao mesmo tempo em que surge ao seu redor a zona pelúcida (GEORGE *et al.*, 1998), que se mantém por todo o desenvolvimento do folículo (FIGUEIREDO *et al.*, 2002).

2.6.1.3 Folículos secundários

Os folículos secundários são caracterizados por um oócito central circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa de formato cuboide. Os folículos secundários mais avançados apresentam as fibras do tecido conjuntivo organizadas paralelamente à membrana basal para formar a camada de células tecais. Neste estágio, a zona pelúcida se torna evidente. (VAN DEN HURK *et al.*, 1997). Neste estágio de desenvolvimento folicular, o núcleo do oócito passa de uma posição central no oolema dos folículos primordiais para uma região excêntrica, situando-se entre a zona pelúcida e o centro do oócito (HYTTEL *et al.*, 1997).

2.6.2 Folículos Antrais

Esta categoria de folículos compreende os folículos terciários e os folículos maduros ou também conhecidos como pré-ovulatórios. O folículo antral é caracterizado por apresentar uma área preenchida por fluido folicular, conhecida como antro folicular e intensa proliferação das células da granulosa (FIGUEIREDO *et al.*, 2002).

2.6.2.1 Folículos terciários

Os folículos terciários são constituídos de um oócito circundado pela zona pelúcida, várias camadas de células da granulosa, uma pequena cavidade antral, formada pelo acúmulo de líquido durante a evolução do folículo secundário,

uma membrana basal e duas camadas de células tecais, conhecidas como teca interna e teca externa (GORDON, 1994).

2.6.2.2 Folículos maduros ou pré-ovulatórios

Esta classe folicular representa o estágio terminal do desenvolvimento folicular (HULSHOF *et al.*, 1994), podendo medir 35 a 50 mm de diâmetro na espécie equina (EVANS *et al.*, 2007). Apresenta o oócito aderido à parede do folículo pelas células foliculares e uma grande cavidade preenchida pelo líquido folicular. Os folículos pré-ovulatórios apresentam também um conjunto de células envolvendo o oócito denominada *corona radiata* (BANKS, 1992; GEORGE *et al.*, 1998) e também, o complexo *cumulus oophorus* (FIGUEIREDO *et al.*, 2008). A morfologia e desenvolvimento dos folículos ovarianos na espécie equina está ilustrada na Figura 3.

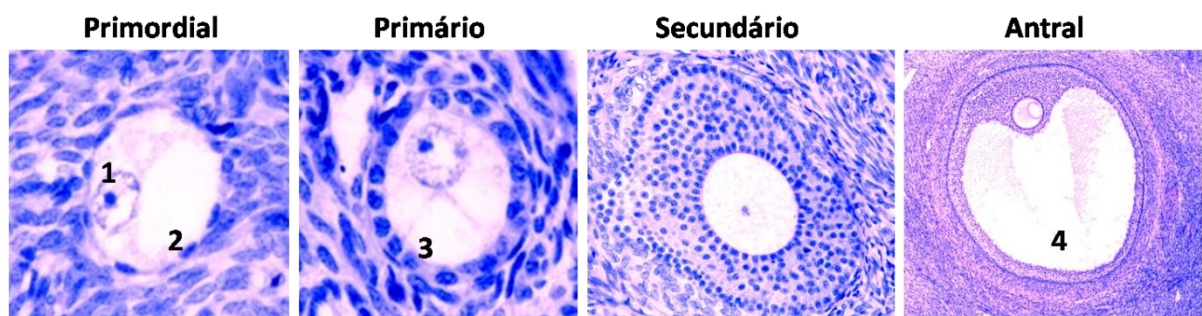


Figura 3. Imagens de folículos ovarianos de éguas obtidas através de histologia clássica, ilustrando a morfologia e o desenvolvimento dos folículos pré-antrais e antral. Coloração Ácido Periódico de Schiff (PAS; Adaptado de Gomes *et al.*, 2012). 1. Oócito primário; 2. Célula da Pré-granulosa; 3. Células da Granulosa e 4. Cavidade antral.

2.7 ATRESIA FOLICULAR

Mesmo os folículos pré-antrais representando 90% da população folicular ovariana, 99,9% deles não chegam até a ovulação, sofrendo um processo degenerativo ou apoptótico conhecido como atresia, tornando o ovário um órgão de baixíssima produtividade (IRELAND, 1987). A atresia é um processo fisiológico, de duração desconhecida, e indica ser um dos elementos que controla o número de folículos selecionados até chegar à ovulação. Este processo refere-se aos folículos antrais que sofrem mudanças degenerativas antes mesmo de se romperem na ovulação (KRYSKO *et al.*, 2008). A duração precisa, bem como o estágio no qual os folículos ovarianos são mais susceptíveis a sofrer atresia, é desconhecida (HENDERSON *et al.*, 1987).

Ainda na década de 80, foi postulado que a atresia ocorre por um processo de morte celular programada conhecido por apoptose (TSAFIRI; BRAW, 1984; TILLY, 1996; REYNAUD; DRIANCOURT, 2000; MARKSTROM *et al.*, 2002). A apoptose é a morte celular programada, a qual ocorre em todas os organismos multicelulares e em tecidos que estão sofrendo alterações de desenvolvimento ou respondendo a algum estímulo fisiológico. A alteração típica observada é a condensação da cromatina, resultando na formação de zonas densas de heterocromatina sobre a membrana nuclear. Independentemente da condensação da cromatina, endonucleases dependentes de cálcio e magnésio são ativadas, resultando na clivagem do DNA entre as unidades nucleossomais, a cada 180-200 pares de bases (HUGHES; GOROSPE, 1991; TILLY, 1996). O citoplasma de células apoptóticas é caracterizado pela agregação e desorientação das organelas citoplasmáticas. Concomitantemente, a membrana plasmática mostra sinais de

retração e a célula rompe-se em diversos fragmentos conhecidos por corpos apoptóticos, que são posteriormente fagocitados (KAIPIA; HSUEH, 1997). Este processo usualmente inicia-se antes que a membrana plasmática perca completamente sua integridade. Desta forma, não ocorre extravasamento dos componentes citoplasmáticos e não é observada reação inflamatória (HSUEH *et al.*, 1994).

Durante a atresia, muitas características morfológicas da apoptose têm sido demonstradas em oócitos e células da granulosa de folículos atrésicos. O processo de atresia usualmente difere entre folículos pré-antrais (primordiais, primários e secundários) e antrais. Em folículos pré-antrais, as primeiras alterações indicativas de atresia ocorrem no oócito, como por exemplo, retração da cromatina nuclear e fragmentação oocitária, o que desencadeia o processo de eliminação irreversível dos folículos ovarianos neste estágio de desenvolvimento (MORITA; TILLY, 1999) e, nestes folículos, alterações nas células da granulosa são raramente observadas (JORIO *et al.*, 1991).

É importante ressaltar que após a formação da cavidade antral, ocorre uma alteração na sensibilidade do oócito e das células da granulosa. A partir deste estágio, o oócito torna-se altamente resistente e as primeiras alterações indicativas de atresia são observadas nas células da granulosa. Os primeiros sinais morfológicos de atresia nestas são presença de núcleos picnóticos, condensação da cromatina e retração nuclear, observados nas células próximas à cavidade antral. Posteriormente, fragmentos de núcleos picnóticos ou corpos apoptóticos são observados na cavidade antral (HUGHES; GOROSPE, 1991; TILLY, 1996). Com a progressão da atresia, observa-se redução no número de camadas das células da granulosa e invasão do folículo por fibroblastos e macrófagos. Após estas drásticas

mudanças na camada granulosa, o oócito, frequentemente, sofre pseudomaturação, fragmenta-se e, finalmente, é eliminado durante os estágios finais de atresia (BYSKOV, 1974).

Sendo assim, a atresia, mesmo sendo um fenômeno fisiológico, reduz de maneira significativa o número de oócitos potencialmente ovuláveis, tendo como consequência, a diminuição da produção de oócitos viáveis durante a vida reprodutiva do animal (FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

2.8 MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

Para constatar experimentalmente as alterações morfológicas, viabilidade ou atresia dos folículos submetidos ao cultivo *in vitro*, têm-se utilizado técnicas como a histologia clássica, imunohistoquímica, microscopia eletrônica, entre outras. Oktay *et al.* (1995) demonstraram que os marcadores de proliferação celular são reguladores essenciais do ciclo celular, e apresentam sensibilidade em identificar a atividade da célula, assim como, o início do crescimento folicular ovariano. Neste contexto, por meio de marcadores específicos para proliferação celular, é possível a avaliação morfológica e proliferativa de folículos ovarianos e, isto poderá contribuir com a melhor compreensão dos aspectos envolvidos na foliculogênese.

Um exemplo de marcador é o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), uma proteína presente apenas em células que estão em multiplicação, e indica o início do crescimento folicular (WANDJI *et al.*, 1996a). O PCNA é uma proteína não-histônica de 36-kDA, encontrada em todas as espécies eucarióticas. Este marcador apresenta importante papel no metabolismo do ácido

nucleico, atuando nos processos de replicação e reparação do DNA, além de estar associado à remodelação da cromatina e controle do ciclo celular (STRZALKA; ZIEMIENOWICZ, 2011). O PCNA apresenta uma meia vida longa (cerca de 20 horas), podendo imunoexpressar em células que possivelmente já tenham deixado o ciclo de divisão celular (LIU; KLEIN-SZANTO, 2000; MYOUNG et al., 2006).

Sendo assim, através da técnica de imunohistoquímica, o PCNA vem sendo amplamente utilizado, durante o cultivo *in vitro*, no intuito de detectar a atividade proliferativa das células da granulosa de folículos pré-antrais de bovinos (ANDRADE *et al.*, 2012), babuínos (FORTUNE *et al.*, 1998) e caprinos (SILVA *et al.*, 2004b).

2.9 MOIFOPA - Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais

A MOIFOPA é uma biotécnica da reprodução que consiste no isolamento ou resgate de folículos pré-antrais a partir de ovários, seguido da conservação visando a estocagem por um curto (resfriamento) ou longo (congelamento) período e no cultivo folicular, a qual objetiva promover o crescimento, maturação e fecundação *in vitro* dos oócitos previamente inclusos em FOPA (FIGUEIREDO *et al.*, 2007).

A biotécnica de MOIFOPA tem sua importância tanto para a pesquisa fundamental ou básica, como na pesquisa aplicada. Na pesquisa fundamental, a MOIFOPA poderá contribuir esclarecendo os mecanismos ainda desconhecidos implicados nos estágios iniciais da foliculogênese. No tocante à reprodução animal aplicada, futuramente, o isolamento de FOPA de um ovário e,

posterior cultivo *in vitro* de seus oócitos até o estágio de maturação, poderá contribuir com a multiplicação de animais de alto valor zootécnico ou em vias de extinção, animais jovens, animais sacrificados, animais que não respondem à tratamentos convencionais de superovulação, animais com patologias graves no oviduto e/ou útero e animais mortos (desde que a colheita dos ovários seja realizada antes que a sua degeneração ocorra). Além disso, a MOIFOPA poderá fornecer um grande número de oócitos de um mesmo animal, que poderão ser maturados *in vitro* e utilizados na padronização de técnicas como de FIV e clonagem (FIGUEIREDO *et al.*, 2007; FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

Outra importância desta biotécnica é a criopreservação de FOPA isolados ou *in situ* (no interior de tecido ovariano), a qual trará benefícios como a formação de bancos de germoplasma animal que teria como objetivo a conservação de oócitos de animais de alto valor zootécnico e/ou em perigo de extinção (FIGUEIREDO *et al.*, 2007; FAUSTINO *et al.*, 2014).

2.9.1 Estado do Cultivo *in vitro* de Folículos Pré-antrais

Notável progresso tem sido observado no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais em diferentes espécies animais (Figura 4). Em felinos (JEWGENOW; STOLTE, 1996) e em marsupiais (BUTCHER; ULLMAN, 1996) já foi observado o crescimento de folículos ovarianos pré-antrais isolados após o cultivo *in vitro*, porém, sem a formação de antro. Jewgenow *et al.* (1998) descreveram o desenvolvimento de FOPA oriundos de ovários de gatas, leoa e tigresa. Butcher e Ullman (1996) relataram o efeito positivo do FSH no crescimento *in vitro* de FOPA em gambás sul-americanos. Em cadelas, o cultivo *in vitro* de FOPA promoveu o desenvolvimento

dos folículos até o estágio antral (SERAFIM *et al.*, 2010). Em bovinos (GUTIERREZ *et al.*, 2000; McCAFFERY *et al.*, 2000; ROSSETTO *et al.*, 2013) folículos pré-antrais isolados desenvolveram-se *in vitro* até o estágio antral, assim como em humanos (ROY; TREACY, 1993). Em suínos, folículos secundários desenvolvidos *in vitro* chegaram até a ovulação e tiveram seus oócitos fecundados *in vitro* (HIRAO *et al.*, 1994) chegando até o estágio de blastocisto (WU *et al.*, 2001). Em bubalinos (GUPTA *et al.*, 2008) e em ovelhas (ARUNAKUMARI *et al.*, 2010) se obteve também a produção de embriões a partir da MOIFOPA.

DANIEL *et al.* (1989) relataram a produção *in vitro* de embriões de ratos a partir da fecundação de oócitos oriundos de FOPA. Em camundongos, o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais foi descrito por vários autores (QVIST *et al.*, 1990; CARROLL; WHITTINGHAM; WOOD, 1991; NAYÜDU; OSBORN, 1992; EPPIG, 1997). Carroll *et al.* (1990) também promoveram o nascimento de camundongos após congelação e descongelação, crescimento, maturação e fecundação *in vitro* de oócitos oriundos de folículos pré-antrais. Entretanto, os melhores resultados foram observados por Eppig e O'brien (1996) com o nascimento de camundongos a partir de folículos pré-antrais desenvolvidos, maturados e fecundados *in vitro*.

Em caprinos, Huanmin e Yong (2000) relataram o desenvolvimento de FOPA até o estágio antral, e Saraiva *et al.* (2010) promoveu o desenvolvimento dos FOPA com produção de embriões. Recentemente, Brito *et al.* (2014) e Silva *et al.* (2014) descreveram resultados promissores com o cultivo tridimensional com baixas concentrações de hidrogel de alginato de FOPA caprinos isolados. Estes resultados demonstraram a possibilidade deste tipo de sistema de cultivo mimetizar

as condições *in vivo*, promovendo a obtenção de oócitos competentes para posterior produção de embriões.

Recentemente, tem-se testado meios ideais para a vitrificação de tecido ovariano e posterior cultivo *in vitro* de FOPA inclusos. Em caprinos, Faustino *et al.* (2014) vitrificaram fragmentos de tecido ovariano e em seguida, promoveram o cultivo dos FOPA e, observaram que não houve aumento do dano ao DNA destes folículos inclusos, podendo esta ser uma metodologia de conservação do tecido ovariano aplicável. Em bovinos, Castro *et al.* (2014) testaram os meios McCoy e M199 e evidenciaram que M199 é recomendado para o cultivo *in vitro* a fresco e o segundo para o cultivo após vitrificação do fragmento ovariano.

Apesar do grande avanço no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, com as espécies supracitadas, os resultados mais satisfatórios têm sido observado em animais de laboratório. Na espécie equina, até o presente momento, há poucos relatos da realização de MOIFOPA. Isto se deve pela disponibilidade de ovários ser um fator limitante. Os centros de pesquisas raramente dispõem de ovários oriundos de abatedouros de equinos devido à escassez dos mesmos no Brasil e na maioria dos países. Outra restrição importante refere-se à baixa densidade populacional e da escassez de informações sobre a distribuição espacial dos folículos no parênquima ovariano desta espécie (GOMES *et al.*, 2012).

Gomes *et al.* (2012) reportaram que FOPA equinos inclusos em fragmentos ovarianos podem ser conservados *in situ* com sucesso em PBS a 4° C por até 4 horas para posterior cultivo *in vitro*. Com relação ao cultivo *in vitro* propriamente dito, na espécie equina existem apenas três relatos. Szlachta e Tischner (2000) publicaram um resumo com cultivo *in vitro* de FOPA equinos isolados enzimaticamente obtendo-se aumento da taxa de crescimento após um dia

de cultivo quando se adicionou FSH, seguido de aumento da taxa de atresia até quatro dias de cultivo. Novamente, Szlachta e Tischner (2004), testaram a eficácia dos meios Menezo B2 e Wymouth MB752/1 com ou sem a suplementação com FSH em FOPA isolados através das enzimas colagenase e DNase de ovários oriundos de abatedouro. Estes pesquisadores descreveram que o meio de cultivo Menezo B2 foi superior e a suplementação com FSH não aumentou as taxas de desenvolvimento e sobrevivência dos folículos após o cultivo *in vitro* de quatro dias.

Recentemente, Haag *et al.* (2013) descreveram a terceira publicação a respeito do cultivo *in vitro* de FOPA em equinos. Através da obtenção de fragmentos ovarianos equinos via biopsia *in vivo*, estes pesquisadores compararam os meios α -MEM e TCM-199 no cultivo *in vitro* de FOPA por um ou sete dias por meio de análise histológica. Os resultados encontrados foram que FOPA equinos podem ser cultivados *in vitro* em α -MEM por sete dias promovendo desenvolvimento dos folículos e crescimento de oócitos e folículos, com 27% destes permanecendo morfolologicamente normais.

Devido a esta escassez literária a respeito do cultivo *in vitro* de FOPA inclusos em fragmentos ovarianos equinos, ainda faz-se necessária a realização de pesquisas adicionais, no intuito de explorar e compreender com mais detalhes dos mecanismos e eventos envolvidos na regulação dos estágios iniciais da foliculogênese nesta espécie.

ESPÉCIE	CRESCIMENTO	ANTRO	MATURAÇÃO	EMBRIÃO	NASCIMENTO
GATA					
CADELA					
VACA					
MULHER					
OVELHA					
CABRA					
PORCA					
BÚFALA					
CAMUNDONGA					
ÉGUA					

Figura 4. Quadro ilustrativo dos principais avanços no cultivo *in vitro* de FOPA nas diferentes espécies (Adaptado de Rossetto *et al.*, 2011).

2.9.2 Isolamento Folicular ou Ovário *in situ*

Os FOPA podem ser cultivados em ovários inteiros (EPPIG; O'BRIEN, 1996), inclusos em tecido ovariano (fragmentos; SILVA *et al.*, 2004a) ou isolados, como é o caso dos folículos primários e secundários (FIGUEIREDO *et al.*, 1994).

Os ovários dos roedores, por serem pequenos, podem ser cultivados como órgão inteiro, aspecto favorável à compreensão da foliculogênese inicial destes pequenos mamíferos (FIGUEIREDO *et al.*, 2008). Eppig e O'Brien (1996) obtiveram sucesso com a ativação de folículos primordiais utilizando ovários inteiros no cultivo *in vitro*. Entretanto, este modelo experimental não é utilizado em ovários de animais domésticos de médio a grande porte, devido à grande dimensão destes. Sendo assim, em caprinos (SILVA *et al.*, 2004b), seres humanos (HOVATTA *et al.*, 1997), bovinos (WANDJI *et al.*, 1996b) e babuínos (FORTUNE *et al.*, 1998) tem-se

optado pelo cultivo de pequenos fragmentos do córtex ovariano (Figura 5), que são abundantes em folículos primordiais e a maioria deles (até 80%) sofrem ativação e crescem até o estágio de folículo primário. O cultivo de pequenos fragmentos de córtex ovariano tem como vantagem permitir a manutenção do contato celular e facilitar a perfusão do meio para o tecido ovariano (TELFER, 1998). Ainda neste contexto, Haag *et al.* (2013) descreveram o primeiro cultivo *in vitro* de FOPA inclusos em fragmentos ovarianos equinos oriundos de biopsia ovariana *in vivo*, utilizando fragmentos de 25 a 45 mg.

Para o cultivo de folículos pré-antrais previamente isolados, podem ser utilizados métodos mecânicos associados ou não aos químicos ou enzimáticos. Nos procedimentos mecânicos, os equipamentos mais utilizados são o *tissue chopper*, mixer, tesouras cirúrgicas, pequenos fórceps e agulhas dissecantes. Já nos procedimentos enzimáticos, as enzimas proteolíticas mais utilizadas são: a colagenase, Dnase, tripsina e pronase, sendo a primeira a mais empregada (SZLACHTA; TISCHNER, 2000; FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

Os métodos enzimáticos de isolamento de FOPA foram relatados em camundongos (CARROLL; WHITTINGHAM; WOOD, 1991), em ratos (DANIEL *et al.*, 1989), em suínos (HIRAO *et al.*, 1994), fetos bovinos (CARAMBULA *et al.*, 1999) e humanos (ROY; TREACY, 1993).

Já os procedimentos mecânicos, são mais usados para o isolamento de FOPA de ovários de bovinos (FIGUEIREDO; HULSHOF; ECTORS, 1992; HULSHOF *et al.*, 1994), porém poucos trabalhos têm sido descritos em caprinos (RODRIGUES; AMORIM; FIGUEIREDO, 1996; RODRIGUES *et al.*, 1998) e ovinos (AMORIM *et al.*, 1996). Na espécie equina, Szlachta e Tischner (2000; 2004) reportaram o primeiro cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais realizado através do

isolamento enzimático com colagenase e DNase.



Figura 5. Fragmentação de região parenquimatosa de ovário equino para cultivo *in vitro*.

2.9.3 Cultivo *In vitro* de Folículos Ovarianos Pré-Antrais

O modelo de cultivo ideal deve promover três condições básicas e sequenciais: manter a viabilidade dos folículos, preservar sua morfologia pré-existente *in vivo* e, por último, propiciar o crescimento e a maturação folicular. No entanto, principalmente em animais domésticos, os sistemas de cultivo existentes ainda atendem parcialmente os pré-requisitos supracitados (FIGUEREDO *et al.*, 2008). O desenvolvimento dos sistemas de cultivo *in vitro* é possível desde que seja mantida a regulação entre os fatores inibitórios e estimulatórios presentes no ovário (NÓBREGA *et al.*, 2014).

As substâncias que compõem os meios utilizados no cultivo de FOPA devem ser previamente testadas para exercerem benefícios ao mesmo. Alguns compostos formam a base da maioria dos meios disponíveis, sendo alguns deles: solução salina, antibióticos, tampões, como o bicarbonato e diversos

substratos nutricionais (lipídeos, proteínas, monossacarídeos, aminoácidos, vitaminas, ácidos nucleicos, entre outras). Também podem ser adicionados à esses meios fontes proteicas como: soro de vaca em estro, soro fetal bovino, soro de macho castrado, albumina sérica bovina (BSA), soro de cabra em estro (BRUNO *et al.*, 2006), alguns hormônios como o FSH (DUARTE *et al.*, 2013; NÓBREGA Jr. *et al.*, 2014), o LH, hormônio do crescimento (GH; MARTINS *et al.*, 2014), hormônio antimüleriano (AMH; DURLINGER *et al.*, 2002; ROCHA *et al.*, 2013a), andrógenos e estradiol-17 β ; além de peptídeos como o peptídeo intestinal vasoativo (BRUNO *et al.*, 2010) e antioxidantes como o alfa tocoferol (LIMA-VERDE *et al.*, 2009), o ácido ascórbico (ANDRADE *et al.*, 2012) e o ácido alfa lipoico (TALEBI *et al.*, 2012), em variadas concentrações (SILVA *et al.*, 2011a,b).

Alguns fatores estimulatórios que também têm sido utilizados nos meios de cultivo em variadas concentrações para a ativação dos foliculos primordiais são: “kit ligand” (PARROTT; SKINNER, 1999; FAUSTINO *et al.*, 2013), GDF-9, FGF-2 (NILSSON *et al.*, 2001), fator de crescimento de queratinócito (KGF; NILSSON; SKINNER, 2003), proteína morfogenética óssea-4 (BMP-4; TANWAR *et al.* 2008), fator de crescimento neural (NGF; DISSEN *et al.*, 2001), esfingosina 1-phosphato (SIP; NÓBREGA Jr *et al.*, 2014), fator inibitório da leucemia (LIF; NÓBREGA Jr *et al.*, 2012), fator de transformação do crescimento (TGF; RODRIGUES *et al.*, 2014), fator de crescimento insulínico (IGF-I e II; ZHAO *et al.*, 2001; DUARTE *et al.*, 2013), melatonina (ROCHA *et al.*, 2013b) e fator de crescimento endotélio vascular (VEGF; ARAÚJO *et al.*, 2013).

Contudo, independente do meio, para que o cultivo seja bem sucedido, a osmolaridade e o pH devem estar entre 280 e 310 mOsm/L e 7,2 e 7,4, respectivamente. Ainda assim, a duração do cultivo depende do objetivo

experimental, e pode variar de um a 36 dias dependendo da espécie (THOMAS *et al.*, 2001; FIGUEREDO *et al.*, 2008; PESSOA *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2014).

Outro fator que afeta a capacidade do folículo em responder aos diversos estímulos, é o substrato com que o folículo mantém contato. Dependendo de como se dá o contato do folículo com o substrato, pode-se classificar os sistemas de cultivo em bi ou tridimensionais. No sistema bidimensional, o folículo se localiza em cima do substrato, que pode ser o plástico da placa de cultivo, envolto ou não por ágar, por compostos da matriz extracelular purificados (colágeno do tipo I, fibronectina, laminina e matrigel), ou ainda por monocamada de células somáticas (células da granulosa, fibroblastos e outros componentes do tecido ovariano; FIGUEIREDO *et al.*, 2008). Já no sistema tridimensional, o folículo se localiza no interior do substrato, ou seja, está completamente envolto por ele, portanto, o crescimento do oócito e a proliferação das células da granulosa ocorre de forma radial, iniciando no centro do folículo. Os substratos mais usados nesse sistema são o colágeno do tipo I, o ágar (FIGUEIREDO *et al.*, 2008) e, recentemente, o polissacarídeo biocompatível conhecido como hidrogel de alginato (BRITO *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2014).

Silva *et al.* (2014) testaram a influência dos sistemas de cultivo *in vitro* bi e tridimensional com alginato, no desenvolvimento de FOPA caprinos e, afirmaram que os dois sistemas foram eficientes em promover oócitos competentes após maturação *in vitro* e, posteriormente, produção de embriões viáveis através de fertilização *in vitro*.

2.9.4 Importância da Composição do Meio sobre o Desenvolvimento Folicular *in vitro*

A composição do meio é o principal fator para o sucesso durante o cultivo de FOPA *in vitro* (ANDRADE *et al.*, 2012; ROSSETTO *et al.*, 2013). Na maioria das espécies, o cultivo de FOPA tem sido realizado em meios já previamente definidos após testes experimentais, adicionando substâncias em diversas concentrações no intuito de encontrar o meio mais promissor que promova o desenvolvimento e mantenha a viabilidade folicular. Podemos citar como exemplos: meio essencial mínimo (MEM; MARTINS *et al.*, 2010), meio Waymouth (BOLAMBA *et al.*, 2002), Meio 199 (M199; CASTRO *et al.*, 2014) ou meio McCOY (DULEBA *et al.*, 2001; CASTRO *et al.*, 2014) suplementados com outras substâncias enriquecedoras. O experimento de Castro *et al.* (2014) destaca-se neste quesito, pois detectou que fragmentos de tecido ovariano bovino podem ser cultivados a fresco no meio M199, porém se forem vitrificados e posteriormente cultivados, estes devem ser cultivados no meio McCoy para manter sua viabilidade.

O MEM tem sido utilizado no cultivo de várias espécies como bovinos (ANDRADE *et al.*, 2012), caprinos (SILVA *et al.*, 2004a,b), murinos (ZHAO *et al.*, 2001) e até mesmo em equinos (HAAG *et al.*, 2013). No intuito de prevenir a atresia destes folículos, tem-se adicionado a estes meios substâncias como fontes de proteínas (albumina, soro fetal bovino), antibióticos, antimicóticos, transferrina (quelante de íons), selênio (quelante de radicais livres), glutamina, piruvato (fonte de energia), hormônios (insulina, FSH, GH, hormônio estimulante da tireoide, tiroxina, estradiol e testosterona) e, ocasionalmente, um ou mais fatores de crescimento como IGF-I, EGF, ativina-A, GDF-9, FGF-2, LIF, TGF, NGF, SIP (FIGUEREDO *et al.*,

1999; DISSEN *et al.*, 2001; ZHAO *et al.*, 2001; THOMAS; ARMSTRONG; TELFER, 2003; NÓBREGA Jr *et al.*, 2012; ARAÚJO *et al.*, 2013; DUARTE *et al.*, 2013; MARTINS *et al.*, 2014; NÓBREGA Jr *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2014).

2.9.5 Estresse Oxidativo

Os radicais livres podem ser formados a partir do oxigênio sendo conhecido como espécies reativas de oxigênio (ROS), de nitrogênio, de enxofre e até mesmo de carbono, sendo a primeira de maior relevância. As ROS são espécies químicas que apresentam no mínimo um elétron não compartilhado na camada de valência. Estas se formam durante o processo normal ou excessivo da redução de oxigênio no interior da mitocôndria (DORMANDY, 1980). Os organismos aeróbios, quando da utilização de oxigênio para sua sobrevivência, produzem metabólitos como o superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxila, os quais podem modificar o funcionamento da célula, comprometendo alguns mecanismos intracelulares acarretando em sua morte (SILVA *et al.*, 2011b).

O estresse oxidativo tem sido definido como uma excessiva produção de ROS ou o desequilíbrio entre a produção de ROS e os sistemas de defesa antioxidantes (AGARWAL *et al.*, 2003). Esta definição implica no fato de que a célula deve ter um sistema no qual exista um equilíbrio entre a produção e a eliminação de ROS durante o metabolismo aeróbio normal. Níveis críticos de ROS são necessários para as vias bioquímicas que envolvem as funções fisiológicas (JORDÃO *et al.*, 1998). Normalmente, a geração de ROS que ocorre durante as variadas reações metabólicas das células é equilibrada pelos sistemas de defesa antioxidantes, os quais neutralizam intermediários reativos (AGARWAL *et al.*, 2005).

O oócito, por exemplo, possui o fluido folicular e a tuba uterina como sistemas de defesa contra o estresse oxidativo que ocorre normalmente *in vivo* (FISCHER; BAVISTER, 1993).

Sendo assim, o estresse oxidativo acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares, tendo como consequência a perda da seletividade iônica, liberação do conteúdo de organelas e formação de produtos citotóxicos, acarretando em lesões que podem variar desde uma apoptose até mesmo a carcinogênese, culminando com a morte da célula (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999; SILVA *et al.*, 2011b).

No entanto, as ROS também possuem efeitos positivos e muitas vezes são necessárias, funcionando como marcadores da remodelação dos tecidos, da esteroidogênese, da função das células germinativas e também da sinalização hormonal, participando de eventos como maturação oocitária e ovulação (ATTARAN *et al.*, 2000).

O desenvolvimento e a maturação folicular são afetados por diversos fatores e, recentemente, o estresse oxidativo tem se destacado como o maior deles (AGARWAL *et al.*, 2004). Quando oócitos e embriões são cultivados *in vitro*, estes são expostos ao estresse oxidativo, já que o cultivo envolve exposição à luz, elevadas concentrações de oxigênio e concentrações variáveis de substratos metabólicos (GUERIN *et al.*, 2001). As ROS são uma das possíveis causas de apoptose *in vitro* (BYRNE *et al.*, 1999; MATWEE *et al.*, 2000; VAN SOOM *et al.*, 2002; GUPTA *et al.*, 2010).

Sendo assim, tem sido descrito que o estresse oxidativo pode afetar o desenvolvimento de oócitos competentes durante a maturação *in vitro* e, o excesso de produção de ROS pelas células da granulosa causa efeitos deletérios sobre a

fertilização de oócitos e desenvolvimento embrionário (BEDAIWY *et al.*, 2004). Com isso, devido à ausência de sofisticados mecanismos de defesa e a excessiva produção de estresse oxidativo durante o cultivo *in vitro* de gametas ou embriões, a adição de antioxidantes ao meio passa ser crucial (BEDAIWY *et al.*, 2004).

Nas condições *in vivo*, antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos fornecem proteção adequada para as mudanças patológicas induzidas pelo estresse oxidativo e mantém os níveis ótimos de ROS. Como antioxidantes enzimáticos ou naturais destacam-se o superóxido dismutase, a glutatona e a catalase. Já como antioxidantes não enzimáticos pode-se citar o ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol (vitamina E), a coenzima Q e o ácido alfa lipoico (SILVA *et al.*, 2011b).

2.9.6 Utilização de Antioxidantes no Meio de Cultivo *in vitro*

A ativação e o crescimento dos folículos primordiais no ovário *in vivo* dependem dos nutrientes provenientes do sangue oriundo da medula óssea, assim como hormônios e fatores de crescimento (McNATTY *et al.*, 2000). O cultivo *in vitro* de folículos parece induzir a ativação destes folículos primordiais, provavelmente devido ao meio de cultivo ser rico em nutrientes, oxigênio, insulina, entre outras substâncias, as quais imitam o córtex ovariano. Mudanças no ambiente podem estimular o desenvolvimento do folículo tanto direta como indiretamente, via liberação de fatores de estimulação ou diminuição de fatores de inibição pelo estroma, células da granulosa, células pré-tecal dentro do tecido cortical ovariano (ANDRADE *et al.*, 2012). Como já descrito anteriormente, o cultivo *in vitro* resulta em maiores concentrações de oxigênio que o ambiente *in vivo*, resultando em um aumento dos níveis de ROS (LUVONI *et al.*, 1996). Apesar de a concentração de

oxigênio normalmente usada nas estufas de cultivo *in vitro* ser de 20% (mesma presente no ar atmosférico), esta é consideravelmente superior à encontrada na tuba uterina e no útero da maioria dos mamíferos (FISCHER; BAVISTER, 1993). Adicionalmente, estes embriões e oócitos acabam sendo privados do seu sistema de defesa existente no fluido folicular e tuba uterina (LAPOINTE *et al.*, 1998).

Os radicais livres gerados no interior dos folículos, quando em equilíbrio, são importantes nos processo de ovulação e retomada da primeira meiose (KODAMAN; BEHRMAN, 2001), porém, a produção cíclica dessas moléculas reativas pode, com o passar do tempo, contribuir para uma insuficiência ovariana prematura autoimune (BEHRMAN *et al.*, 2001). Sabe-se também que o cultivo *in vitro* de FOPA isolados ou não, acarreta em maior produção de estresse oxidativo comparado o ambiente *in vivo* e que este é o responsável pela maior taxa de atresia folicular (SILVA *et al.*, 2011a,b).

Tanto o ácido ascórbico (AA) como o ácido alfa lipoico (ALA) são substâncias que promovem a diminuição dos níveis de ROS presentes nas células tanto *in vivo* como *in vitro*. As atividades antioxidantes do AA e do ALA variam de acordo com as concentrações utilizadas. Por exemplo, em altas concentrações, ambos os antioxidantes produzem efeitos tóxicos nos cultivos *in vitro* de FOPA (ANDRADE *et al.*, 2002; TALEBI *et al.*, 2012). Apesar de o AA induzir a morte celular por apoptose em altas concentrações, possivelmente sua ação pró-oxidante (SAKAGAMI *et al.*, 2000) em baixas concentrações previne tanto a apoptose espontânea quanto a induzida por estresse (WANG *et al.*, 2002). Portanto, a terapia antioxidante pode ter efeitos negativos e indesejáveis se a dose limiar segura for ultrapassada (SILVA *et al.*, 2011a,b).

2.9.6.1 Ácido Ascórbico

O AA, vitamina C ou ascorbato é uma vitamina hidrossolúvel antioxidante, a qual reduz o α -tocoferol, os peróxidos e as ROS em superóxido. Este antioxidante é uma substância de proteção que pode ser adicionada ao meio de cultivo contribuindo nos estágios iniciais do crescimento folicular. Em concentrações fisiológicas, o AA atua removendo os radicais livres, protegendo as células contra danos causados pelas ROS (CARR; FREI, 1999), tornando o ascorbato um radical livre estável (LUTSENKO *et al.*, 2002).

O AA se acumula nas células da granulosa, teca interna, células luteais e oócitos (THOMAS *et al.*, 2001). Além disso, durante o processo de crescimento folicular, ovulação, formação de corpo lúteo, a membrana basal e a matriz extracelular se encontram em constante remodelação, requerendo uma grande quantidade de colágeno e, esta vitamina desempenha um papel importante na síntese do mesmo (LI; SCHELLHORN, 2007). Este antioxidante também atua como cofator na síntese de amidação peptídica e, ainda facilita o desenvolvimento folicular (THOMAS *et al.*, 2001). Em síntese, as ações deste antioxidante são proteger as células da peroxidação lipídica (KIMURA *et al.*, 1992; BARJA *et al.*, 1994) e prevenir as mutações no DNA induzidas pela oxidação (SWEETMAN *et al.*, 1997; LUTSENKO *et al.*, 2002).

Porém, esta substância em altas concentrações pode inibir processos fisiológicos no ovário, resultando em degeneração folicular (MURRAY *et al.*, 2001), devido ao dano oxidativo ao DNA, especialmente na presença dos íons Cu^{2+} e Fe^{2+} , os quais reagem com o peróxido de hidrogênio levando a formação de radicais reativos de hidroxil que causará dano à célula (LI; SCHELLHORN, 2007).

Já foi descrito que o AA contribuiu na redução da apoptose de FOPA de bovinos (THOMAS *et al.*, 2001) e ratos (MURRAY, *et al.*, 2001) e teve a capacidade de manter a sobrevivência e promover o crescimento e ativação *in vitro* de folículos primordiais caprinos (ROSSETTO *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2011a).

Andrade *et al.* (2012) obtiveram efeito positivo com a adição de 50 µg/mL de AA ao meio de cultivo *in vitro* de 8 dias de FOPA bovinos, estimulando ativação e subsequente crescimento, mantendo sua viabilidade. Murray *et al.* (2001) também observaram que nesta mesma concentração, o AA proporcionou a sobrevivência das células da granulosa e o aumento da remodelação da membrana basal no cultivo *in vitro* por 6 dias de folículos secundários de ratos.

2.9.6.2 Ácido Alfa Lipoico

O ácido alfa lipoico (ácido 1,2-ditiolano-3-pentanoico) é um cofator essencial em complexos multienzimáticos que catalisam a descarboxilação dos α-cetoácidos, como o piruvato (α-acetil coenzima-A - CoA) e o α-cetoglutarato (α-succinil CoA) no ciclo de Krebs (SILVA *et al.*, 2011b). Este antioxidante é uma importante coenzima do complexo multienzimático mitocondrial e é bem conhecido pela sua ação em vários processos biológicos, agindo diretamente na limpeza das ROS e quelação de metais e, indiretamente, reciclando outros antioxidantes intracelulares como a vitamina C, vitamina E e a glutathiona (PACKER *et al.*, 1995).

Talebi *et al.* (2012) observaram que a adição de 100 µM de ALA ao meio MEM suplementado no cultivo *in vitro* de FOPA de camundongos, foi capaz de promover melhores taxas de desenvolvimento de folículos, oócitos e embriões, devido à diminuição das ROS e aumento da capacidade total antioxidante.

A exposição a altas concentrações de ALA também acarreta em uma maior degeneração dos FOPA de camundongos cultivados *in vitro* (TALEBI *et al.*, 2012), por interromper os ciclos celulares culminando em morte celular através de fragmentação do DNA internucleossomal e clivagem da caspase. Adicionalmente, o longo tempo de exposição dos FOPA ao ALA resultou em aumento da peroxidação lipídica, dano mitocondrial e inibição da síntese de glicogênio (YAMASAKI *et al.*, 2009).

Cabe ressaltar ainda que, na espécie equina, há uma escassez de informações a respeito do meio ideal de cultivo *in vitro* de FOPA inclusos em fragmentos ovarianos. Com isso, é de suma importância a realização de mais pesquisas, incluindo a adição de antioxidantes no meio de cultivo *in vitro* de FOPA, no intuito de elucidar o melhor meio e os suplementos que possam promover desenvolvimento e manter a viabilidade dos FOPA para posterior utilização em técnicas da reprodução.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A.; ALLAMANENI, S.S. Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. **Reprod Biomed Online**. v.9, n.3, p.338–47, 2004.
- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R. Oxidative stress and its implications in female infertility - a clinicians perspective. **Reprod Biomed Online**. v.11, n.5, p.641–50, 2005.
- AGARWAL, A.; SALEH, R.A.; BEDAIWY, M.A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertil Steril**. v.79, n.4, p.829–43, 2003.
- AMORIM, C. A.; RODRIGUES, A. P. R.; LUCCI, C. M.; FIGUEIREDO, J. R. Desenvolvimento e otimização de um método mecânico para o isolamento de folículos ovarianos pré-antrais ovinos: resultados preliminares. *In*: ENCONTRO DE PESQUISADORES DA UECE, 2., 1996, Fortaleza, CE. **Anais...** Fortaleza. p.471, 1996.
- ANDRADE, E. R.; AMORIM, C. A.; MATOS, M. H. T.; RODRIGUES, A. P. R.; SILVA, J. R. V.; DODE, M. A. N.; FIGUEIREDO, J. R. Evaluation of saline and coconut water solutions in the preservation of sheep preantral follicles *in situ*. **Small Ruminant Research**. v.43, n.3, p.235-43, 2002.
- ANDRADE, E.R.; VAN DEN HURK, R.; LISBOA, L.A.; HERTEL, M.F.; MELO-STERZA, F.A.; MORENO, K.; BRACARENSE, A.F.R.L.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A.A. Effects of ascorbic acid on *in vitro* culture of bovine preantral Follicles. **Zygote**. v.20, p.379-88, 2012.
- ARAÚJO, V.R.; DUARTE, A.B.G.; BRUNO, J.B.; PINHO LOPES, C.A.; FIGUEIREDO, J.R. Importance of vascular endothelial growth factor (VEGF) in

ovarian physiology of mammals. **Zygote**. v.21, p.295-304, 2013.

ARUNAKUMARI, G.; SHANMUGASUNDARAM, N.; RAO, V. H. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. **Theriogenology**. v.74, p.884-94, 2010.

ATTARAN, M.; PASQUALOTTO, E.; FALCONE, T.; GOLDBERG, J.; MILLER, K.; AGARWAL, A. The effect of follicular fluid reactive oxygen species on outcome of *in vitro* fertilization. **Int J Fertil** v.45, p.314-20, 2000.

BANKS, W. J. **Histologia Veterinária Aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, p.565-72, 1992.

BARJA, G.; LOPEZ-TORRES, M.; PEREZ-CAMPO, R.; ROJAS, C.; CADENAS, S.; PRAT, J.; PAMPLONA, R. Dietary vitamin C decreases endogenous protein oxidative damage, malondialdehyde, and lipid peroxidation and maintains fatty acid unsaturation in the guinea pig liver. **Free Radic. Biol. Med.** v.17, p.105–15, 1994.

BEDAIWY, M.A.; FALCONE, T.; MOHAMED, M.S.; ALEEM, A.A.; SHARMA, R.K.; WORLEY, S.E.; *et al.* Differential growth of human embryos *in vitro*: role of reactive oxygen species. **Fertil Steril**. v.82, n.3, p.593–600, 2004.

BEHRMAN, H.R.; KODAMAN, P.H.; PRESTON, S.L.; GAO, S. Oxidative stress and the ovary. **J Soc Gynecol Investig**. v.8, p.40-2, 2001.

BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C. C.; BRINSKO, S. P.; RIGBY, S. L. **Manual of Equine Reproduction**. 2003.

BOLAMBA, D.; FLOYD, A.A.; MCGLONE, J.J.; LEE, V.H. Epidermal growth factor enhances expression of connexin 43 protein in cultured porcine preantral follicles. **Biol. Reprod.** v.67, p.154–60, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Espécies Equídeos**. Brasília, 2009. Disponível em:

<<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/equideos>>. Acesso em: 10 de Janeiro de 2015.

BRITO, I.R.; SILVA, C.M.G.; DUARTE, A.B.G.; LIMA, I.M.T.; RODRIGUES, G.Q.; ROSSETTO, R.; SALES, A.D.; LOBO, C.H.; BERNUCI, M.P.; ROSA-E-SILVA, A.C.J.S.; CAMPELLO, C.C.; XU, M.; FIGUEIREDO, J.R. Alginate hydrogel matrix stiffness influences the *in vitro* development of caprine preantral follicles. **Molecular Reproduction & Development**. v.81, p.636–45, 2014.

BRUNO, J.B.; MARTINS, F.S.; LIMA-VERDE, I.B.; MATOS, M.H.T.; WANDERLEY, L.S.; CORREIA, J.C.; SILVA, J.R.V.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Influência de diferentes origens e concentrações de soro sobre folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro*. **Acta Sci Vet**. v.34, suppl.1, p.352, 2006.

BUETTNER, G.R. The pecking order of free-radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate. **Arch Biochem Biophys**. v.300, p.535-43, 1993.

BUTCHER, L.; ULLMAN, S. Culture of preantral ovarian follicles in the grey, short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. **Reproduction, Fertility and Development**. v.8, n.4, p.535-39, 1996.

BYRNE, A.T.; SOUTHGATE, J.; BRISON, D.R.; LEESE, H.J. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. **Journal Reprod Fertil**. v.117, p.97–105, 1999.

BYSKOV, A.G.S. Cell kinetics studies of follicular atresia in the mouse ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.37, p.277-85, 1974.

CAHILL, L.P.; MAULÉON, P. A. Study of the population of primordial and small follicles in the sheep. **Journal of Reproduction Fertility**. v.61, n.1, p.201-06, 1981.

- CANIPARI, R. Oocyte-granulosa cells interactions. **Human reproduction Update**. v.6, n.3, p.279-89, 2000.
- CARAMBULA, S. F.; GONÇALVES, P. B. D.; COSTA, L. F. S. et al. Effect of fetal age and method of recovery on isolation of preantral follicles from bovine ovaries. **Theriogenology**. v.52, p.563-71, 1999.
- CARR, A.; FREI, B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? **FASEB J**. v.13, p.1007-24, 1999.
- CARROLL, J.; WHITTINGHAM, D. C.; WOOD, M. J. Effects of gonadotrophin environment on growth and development of isolated mouse primary ovarian follicles. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.93, n.1, p.71-9, 1991.
- CARROLL, J.; WHITTINGHAM, D. G.; WOOD, M. J.; TELFER, E.; GOSDEN, R. G. Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.90, n.1, p.321-27, 1990.
- CASTRO, S.V.; RODRIGUES, A.P.R.; CARVALHO, A.A.; SILVA, C.M.G.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R. Fresh and vitrified bovine preantral follicles have different nutritional requirements during *in vitro* culture. **Cell and Tissue Banking**. v.online, p.1-11, 2014.
- CORMACK, D.H. O sistema reprodutor feminino. *In*: CORMACK, D.H. **Ham Histologia**, 9. ed, Guanabara Koogan, Brasil, p.485-508, 1991.
- DANIEL, S. A. J.; ARMSTRONG, D. T.; GORELANGTON, R. E. Growth and development of rat oocytes *in vitro*. **Gamete Research**. v.24, n.1, p.109-21, 1989.
- DISSEN, G.A.; ROMERO, C.; HIRSHFIELD, N.A.; OJEDA, S.R. Nerve growth factor is required for early follicular development in the mammalian ovary. **Endocrinology**. v.142, p.2078-86, 2001.

DORMANDY, D.L. Free radical reaction in biological systems. **Ann R Coll Surg Engl.** v.62, p.188-94, 1980.

DRIANCOURT, M. A. Follicular dynamics in sheep and cattle. **Theriogenology.** v.35, n.1, p.55-63, 1991.

DRIANCOURT, M.A.; PARIS, A.; ROUX, C.; MARIANA, J.C.; PALMER, E. Ovarian follicular populations in pony and saddle-type mares. **Reprod Nutr Dev.** v.22, p.035–47, 1982.

DUARTE, A.B.G.; ARAÚJO, V.R.; CHAVES, R.N.; DA SILVA, G.M.; LUZ, V.B.; HAAG, K.T.; MAGALHÃES-PADILHA, D.M.; ALMEIDA, A.P. ; LÔBO, C.H.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R. Insulin-like growth factor II (IGF-II) and follicle stimulating hormone (FSH) combinations can improve the *in vitro* development of grown oocytes enclosed in caprine preantral follicles. **Growth Hormone & IGF Research.** v.23, p.37-44, 2013.

DULEBA, A.J.; PEHLIVAN, T.; CARBONE, R.; SPACZYNSKI, R.Z. Activin stimulates proliferation of rat ovarian thecal-interstitial cells. **Biol Reprod.** v.65, p.704–709, 2001.

DURLINGER, A. L.; GRUIJTERS, M. J.; KRAMER, P.; KARELS, B.; INGRAHAM, H. A.; NACHTIGAL, M. W.; UILENBROEK, J. T.; GROOTEGOED, J. A.; THEMME, A. P. Antimüllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. **Endocrinology.** v.143, n.3, p.1076-84, 2002.

DYCE, P.W.; LIHUA, W.; LI, J. *In vitro* germline potential of stem cells derived from fetal porcine skin. **Nat Cell Biol.** v.8, p.384-90, 2006.

EGGAN, K.; JURGA, S.; GOSDEN, R.; MIN, I.M.; WAGERS, A.J. Ovulated oocytes in adult mice derive from non-circulating germ cells. **Nature.** v.441, p.1109-14, 2006.

EPPIG, J. J. Mouse oocyte development *in vitro* with various culture systems. **Dev. Biol.** v.60, p.371-78, 1997.

EPPIG, J.J.; HOSOE, M.; O'BRIEN, M.J.; PENDOLA, F.M.; REQUENA, A.; WATANABE, S. Conditions that affect acquisition of developmental competence by mouse oocytes *in vitro*: FSH, insulin, glucose and ascorbic acid. **Mol Cell Endocrinol.** v.163, p.109-16, 2000.

EPPIG, J.J.; O'BRIEN, M.J. Development *in vitro* of mouse oocytes from primordial follicles. **Biology of Reproduction.** v.54, n.1, p.197-207, 1996.

EPPIG, J.J.; SCHOEDER, A. C. Capacity of mouse oocyte from preantral follicles undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization *in vitro*. **Biology of Reproduction.** v.41, p.268-76, 1989.

ERICKSON, B. H. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. **Journal of Reproduction and Fertility.** v.10, p.97-105, 1966.

ERICKSON, G. F. Analysis of follicle development and ovum maturation. *In*: SEMINARS IN REPRODUCTIVE ENDOCRINOLOGY, 1986, San Diego. **Proceedings...** San Diego, p.233-54, 1986.

ERICKSON, B. H.; REYNOLDS, R. A.; MURPHEREE, R. L. Ovarian characteristics and reproductive performance of the aged cow. **Biology of Reproduction.** v.14, p.555-60, 1976.

EVANS, T. J.; CONSTANTINESCU, G. M.; GANJAN, V. K. Clinical reproductive anatomy and physiology of the mare. *In*: YOUNGQUIST, R. S.; THRELFALL, W. R. **Current Therapy in Large Animal Theriogenology 2.** p.47-67, 2007.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT.

Disponível em:

<http://faostat.fao.org/site/573/DesktopDefault.aspx?PageID=573#ancor>> Acesso em:

29 de janeiro de 2015.

FAUSTINO, L.R.; CARVALHO, A.A.; SILVA, C.M.G.; ROSSETTO, R.; LOPES, C.A.P.; VAN TILBURG, M.F.; CARNEIRO, P.B.M.; BÁO, S.N.; MOURA, A.A.A.; BORDIGNON, V.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A.P.R. Assessment of DNA damage in goat preantral follicles after vitrification of the ovarian cortex.

Reproduction, Fertility and Development. v.on line, p.on line, 2014.

FAUSTINO, L.R.; LIMA, I.M.T.; CARVALHO, A.A.; SILVA, C.M.G.; CASTRO, S.V.; LOBO, C.H.; LUCCI, C.M.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Interaction between keratinocyte growth factor-1 and kit ligand on the goat preantral follicles cultured *in vitro*. **Small Ruminant Research.** v.114, p.112-9, 2013.

FIGUEIREDO J.R.; SILVA J.R.V.; RODRIGUES, A.P.R. Estado atual da biotécnica de manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais (MOIFOPA). **Ciência Animal**, v.9, p.11-25,1999.

FIGUEIREDO, J. R.; CELESTINO, J. J. H.; RODRIGUES, A. P. R.; SILVA, J. R. V. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção *in vitro* de embriões em larga escala. **Revista Brasileira de Reprodução Animal.** v.31, n.2, p.143-52, 2007.

FIGUEIREDO, J. R.; HULSHOF, S. C. J.; THIRY, M.; VAN DER HURK, R.; BEVERS, M. M.; NUSGENS, B.; BECKERS, J. F. Extracellular matrix proteins and basement membrane: identification in bovine ovaries and significance for the attachment of cultured preantral follicles. **Theriogenology.** v.43, n.5, p.845-58, 1995.

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.1333-46, 1994.

- FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; SILVA, J. R. V. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais – MOIFOPA. *In*: GONÇALVES, P. B.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, p. 227-327, 2008.
- FIGUEIREDO, J.R.; HULSHOF, S.C.J.; ECTORS, F.J. Mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. *In*: REUNION AETE, 8., Lyon. **Anais...** Lyon, p.152, 1992.
- FISCHER, B.; BAVISTER, B.D. Oxygen tension in the oviduct and uterus of hesus monkeys, hamsters and rabbits. **J Reprod Fertil**. v.99, p.673-79, 1993.
- FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**. v.78, n.3, p.135-63, 2003.
- FORTUNE, J. E.; KITO, S.; WANDJI, S. A. SRSEN, V. Activation of bovine and baboon primordial follicles *in vitro*. **Theriogenology**. v.49, n.2, p.441-9, 1998.
- GEORGE, L.L.; ALVES, C.E.R.; CASTRO, R.R.L. **Histologia Comparada**. 2. ed., São Paulo, Rocca, p.237-40, 1998.
- GINTHER, O. J. Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspects. Equiservices. 1979.
- GOMES, R.G.; ANDRADE, E.R.; LISBOA, L.A.; CIQUINI, C.; BARREIROS, T.R.R.; FONSECA, N.A.N.; SENEDA, M.M. Effect of holding medium, temperature and time on structural integrity of equine ovarian follicles during the non-breeding season. **Theriogenology**. v.78, p.731-6, 2012.
- GORDON, I. Recovery the primary oocyte. *In*: _____. **Laboratory production of cattle embryos**. Cambridge: CAB International: Raven Press, p.71-82, 1994.

GOSDEN, R. G.; LAING, S. C.; FELICIO, L. S.; NELSON, J. F.; FINCH, C. E.

Imminent oocyte exhaustion and reduced follicular recruitment mark the transition to acyclicity in aging C57BL/6 mice. **Biology of Reproduction**. v.28, n.2, p.225-60, 1983.

GOUGEON, A.; ECOHARD, R.; THALABARD, J. C. Age-related changes of the population of human ovarian follicles: increased in disappearance rate of now-growing and early-growing follicles in aging women. **Biology of Reproduction**. v.50, n.3, p.653-63, 1994.

GUÈRIN, P.E.L.; MOUATASSIM, S.; MENEZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Hum Reprod Update**. v.7, p.175-89, 2001.

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

GUPTA, S.; SEKHON, L.; KIM, Y.; AGARWAL, A. The role of oxidative stress and antioxidants in assisted reproduction. **Women's Health Rev**. v.6, p.227–38, 2010.

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. **Biology of Reproduction**. v.62, n.5, p.1322-8, 2000.

HAAG, K.T; MAGALHÃES-PADILHA, D.M.; FONSECA, G.R.; WISCHRAL, A.; GASTAL, M.O.; KING, S.S.; JONES, K.L.; FIGUEIREDO, J.R.; GASTAL, E.L. *In vitro* culture of equine preantral follicles obtained via the Biopsy Pick-Up method. **Theriogenology**. v.79, n.6, p.911-7, 2013.

HAFEZ, E.S.E. Anatomy of female reproduction. *In*: HAFEZ, E.S.E. **Reproduction in farm animals**, 6. ed. USA: Williams & Wilkins. p.20-58, 1996.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine.**

3.ed. Clarendon, UK: Oxford University Press. 936p, 1999.

HASHIMOTO, S.; OHSUMI, K.; TSUJI, Y.; HARAUMA, N.; MIYATA, Y.; FUKUDA, A.;

HOSOI, Y.; IRITANI, A.; MORIMOTO, Y. Growing porcine oocyte-granulosa cell

complexes acquired meiotic competence during *in vitro* culture. **Journal of**

Reproduction and Development. v.53, n.2, p.379-84, 2007.

HENDERSON, K.M.; McNATTY, K.P.; SMITH, P.; GIBB, M.; O'KEEFFE, L.E.; LUN,

S.; HEALTH, D.A.; PRISK, M.D. Influence of follicular health on the steroidogenic and

morphological characteristics of bovine granulosa cells *in vitro*. **Journal of**

Reproduction and Fertility. v.79, n.1, p.185-93, 1987.

HIRAO, Y.; NAGAI, T.; KUBO, M.; MIYANO, T.; MIYAKE, M.; KATO, S. *In vitro*

growth and maturation of pig oocytes. **Journal Reproduction & Fertility.** v.100, n.2,

p.333-9, 1994.

HIRSHFIELD, A. N. Development of follicles in the mammalian ovarian.

International Review of Cytology. v.124, p.43-101, 1991.

HOVATTA, O.; SILYE, R.; ABIR, R.; KRAUSZ, T.; WINSTON, R. M. Extracellular

matrix improves survival of both stored and fresh human primordial and primary

ovarian follicles in long-term culture. **Human Reproduction.** v.12, n.5, p.1032-6,

1997.

HSUEH A.J., BILLIG H., TSAFRIRI A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled

apoptotic process. **Endocr. Rev.** v.15, p.707-24, 1994.

HUANMIN, Z.; YONG, Z. *In vitro* development of caprine ovarian preantral follicles.

Theriogenology. v.54, p.641-50, 2000.

- HUGHES, M.H.; GOROSPE, W.C. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. **Endocrinology**. v.129, p.2415-22, 1991.
- HULSHOF, S. C.; FIGUEIREDO, J. R.; BECKERS, J. F.; BEVERS, M. M.; VAN DER HURK, R. Isolation and characterization of preantral follicles from fetal bovine ovaries. **The Veterinary Quarterly**. v.16, n.2, p.78-80, 1994.
- HULSHOF, S.C.J.; FIGUEIREDO, J.R.; BECKERS, J.F.; BEVERS, M.M.; VAN DER DONK, J.A.; VAN DER HURK, R. Effects of fetal bovine serum, FSH and 17 β -estradiol on the culture of bovine preantral follicles. **Theriogenology**. v.44, n.2, p.217-26, 1995.
- HUTT, K.; McLAUGHLIN, E.A.; HOLLAND, M.K. KL and KIT have diverse role during mammalian oogenesis. **Mol Hum Reprod**. v.12, p.61-9, 2006.
- HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLENSSEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**. v.47, p.23-32, 1997.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Anuário Estatístico do Brasil**, Rio de Janeiro, 2012. Disponível em:
<<http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/20/aeb.2012.pdf>> Acesso em:
07 de janeiro de 2015.
- IRELAND, J. J. Control of follicular growth and development. **Journal Reprod. Fertil.** v.34, p.39-54, 1987.
- JEWGENOW, K.; PENFOLD, L.M.; MEYER, H.H.D.; WILDT, D.E. Viability of small preantral ovarian follicles from domestic cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.112, n.1, p.39-47, 1998.

- JEWGENOW, K.; STOLTE, M. Isolation of preantral follicles from nondomestic cats- viability and ultrastructural investigations. **Animal Reproduction Science**. v.44, p.183-93, 1996.
- JOHNSON, J.; SKAZNIK-WIKIEL, M.; LEE, H.J.; NIIKURA, Y.; TILLY, J.C.; TILLY, J.L. Setting the record straight on data supporting postnatal oogenesis in female mammals. **Cell Cycle**. v.4, p.1471-7, 2005.
- JOHNSON, J.; BAGLEY, J.; SKAZNIK-WIKIEL, M.; LEE, H.J.; ADAMS, G.B.; JOHNSON, J.; CANNING, J.; KANEKO, T.; PRU, J.K.; TILLY, J.L. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. **Nature**. v.428, p.145-150, 2004.
- JORDÃO, J.R.; CHIARELLO, A.A.; BERNARDES, P.G.; VANNUCCHI, M.S.M. Peroxidação lipídicas e etanol: papel da glutatona reduzida e da vitamina E. **Medicina Ribeirão Preto**, v.31, p.434-49, 1998.
- JORIO, A.; MARIANA, J.C.; LAHLOU-KASSI, A. Development of the population of ovarian follicles during the prepubertal period in D'man and Timahdite sheep. **Animal Reproduction Science**. v.26, p.239-50, 1991.
- KAIPIA, A.; HSUEH, A.J. Regulation of ovarian follicle atresia. **Ann. Rev. Physiol**. v.59, p.349-63, 1997.
- KERR, J.B.; BROGAN, L.; MYERS, M.; HUTT, K.J.; MLADENOVSKA, T.; RICARDO, S.; HAMZA, K.; SCOTT, C.L.; STRASSER, A.; FINDLAY, J.K. The primordial follicle reserve is not renewed after chemical or γ -irradiation mediated depletion. **Reproduction**. v.143, p.469-76, 2012.
- KIMURA, H.; YAMADA, Y.; MORITA, Y.; IKEDA, H.; MATSUO, T. Dietary ascorbic acid depresses plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation in genetically scorbutic rats. **Journal Nutr**. v.122, p.1904-9, 1992.

KLAUS-DIETER BUDRAS, W.O.; SACK, S.R. **Anatomy of the Horse**. 3a. edição, p.76, 2001.

KODAMAN, P.H.; BEHRMAN, H.R. Endocrine-regulated and protein kinase C-dependent generation of superoxide by rat preovulatory follicles. **Endocrinology**. v.142, p.687-93, 2001.

KRYSKO, D.V.; DIEZ-FRAILE, A.; CRIEL, G.; SVISTUNOV, A.A.; VANDENABEELE, P.; D'HERDE, K. Life and death of female gametes during oogenesis and folliculogenesis. **Apoptosis**. v.13; p.1065-87, 2008.

LAND, R.B. Number of oocytes present at birth in the ovaries of pure and Finnish Landrace cross blackface and Welsh sheep. **Journal Reprod Fertil**. v.21, p.517-21, 1970.

LAPOINTE, S.; SULLIVAN, R.; SIRARD, M.A. Binding of a bovine oviductal fluid catalase to mammalian spermatozoa. **Biology of Reproduction**. v.58, p.747-53, 1998.

LI, Y.; SCHELLHORN, H.E. New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. **The Journal of Nutrition**. v.137, p.2171-84, 2007.

LIMA-VERDE, L.B.; MATOS, M.H.T.; BRUNO, J.B.; MARTINS, F.S.; SANTOS, R.R.; BÁO, S.N.; LUQUE, M.C.A.; VIEIRA, G.A.B.; SILVEIRA, E.R.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F. Effects of α -tocopherol and ternatin antioxidants on morphology and activation of goat preantral follicles *in vitro* cultured. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.61, n.1, p.57-65, 2009.

LIU, J.; VAN DER ELST, J.; VAN DEN BROECK, R.; DHONT, M. Live offspring by *in vitro* oocytes from cryopreserved primordial mouse follicles after sequential *in vivo* transplantation and *in vitro* maturation. **Biol. Reprod**. v.64, p.171-8, 2001.

- LIU, S.C.; KLEIN-SZANTO, A.J.P. Markers of proliferation in normal and leukoplakic oral epithelia. **Oral Oncology**. v.36, p.145-51, 2000.
- LIU, Y.; WU, C.; LYU, Q.; YANG, D.; ALBERTINI, D.F.; KEEFE, D.L.; LIU, L. Germline stem cells and neo-oogenesis in the adult human ovary. **Dev Biol**. v.306, p.112-20, 2007.
- LUCCI, C.M.; AMORIM, C.A.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R.; BÁO, S.N.; SILVA, J.R.V.; GONÇALVES, P.B.D. Study of preantral follicles population *in situ* and after mechanical isolation from caprine ovaries at different reproductive stages. **Animal Reproduction Science**. v.56, p.223-36, 1999.
- LUNARDON, N.T.; SILVA-SANTOS, K.C.; JUSTINO, R.C.; DESSUNTI, G.T.; SENEDA, M.M.; MARTINS, M.I.M. Population estimate of the preantral follicles and frequency of multiocyte follicles in prepubertal and adult bitches. **Theriogenology**. on line, 2014.
- LUTSENKO, E.A.; CARCAMO, J.M.; GOLDE, D.W. Vitamin C prevents DNA mutation induced by oxidative stress. **J. Biol. Chem**. v.277, p.16895–9, 2002.
- LUVONI, G.C.; KESKINTEPE, L.; BRACKETT, B.G. Improvement in bovine embryo production *in vitro* by glutathione-containing culture media. **Mol. Reprod. Dev**. v.43, p.437–43, 1996.
- MAGALHÃES, D.M.; DUARTE, A.B.; ARAÚJO, V.R.; BRITO, I.R.; SOARES, T.G.; LIMA, I.M.; LOPES, C.A.; CAMPELLO, C.C.; RODRIGUES, A.P.; FIGUEIREDO, J.R. *In vitro* production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. **Theriogenology**. v.75, n.1, p.182-8, 2010.
- MARKSTROM, E.; SVENSSON, E.; SHAO, R.; SVANBERG, B.; BILLIG, H. Survival factors regulating ovarian apoptosis-dependence on follicle differentiation. **Reproduction**. v.123, p.23-30, 2002.

- MARTINS, F.S.; CELESTINO, J.J.H.; SARAIVA, M.V.A.; 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. Res.** v.43, p.728–36, 2010.
- MARTINS, F.S.; SARAIVA, M.V.A.; MAGALHÃES-PADILHA, D.M.; ALMEIDA, A.P.; CELESTINO, J.J.H.; PADILHA, R.T.; CUNHA, R.M.S.; SILVA, J.R.V.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO J.R. Presence of growth hormone receptor (GH-R) mRNA and protein in goat ovarian follicles and improvement of *in vitro* preantral follicle survival and development with GH. **Theriogenology.** v.82, p.27-35, 2014.
- MATWEE, C.; BETTS, D.H.; KING, W.A. Apoptosis in the early bovine embryo. **Zygote.** v.8, p.57-68, 2000.
- MAYERHOFER, A.; DISSEN, G.A.; COSTA, M.E.; OJEDA, S.R. A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulation hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. **Endocrinology.** v.138, n.8, p.3320-9, 1997.
- McCAFFERY, F.H.; LEASK, R.; RILEY, S.C.; TELFER, E.E. Culture of bovine preantral follicles in a serum-free system: Markers for assessment of growth and development. **Biology of Reproduction.** v.63, n.1, p.267-73, 2000.
- McNATTY, K.P.; FIDLER, A.E.; JUENGEL, J.L.; QUIRKE, L.D.; SMITH, P.R.; HEATH, D.A.; LUNDY, T.; O'CONNELL, A.; TISDALL, D.J. Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. **Mol. Cell. Endocrinol.** v.163, p.11–20, 2000.

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

MORITA Y., TILLY J.L. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass.

Developmental Biology, v.213, p.1-17, 1999.

MURRAY, A.A.; MOLINEK, M.D.; BAKER, S.J.; KOJIMA, F.N.; SMITH, M.F.;

HILLIER, S.G.; SPEARS, N. Role of ascorbic acid in promoting follicle integrity and survival in intact mouse ovarian follicles *in vitro*. **Reproduction**. v.121, p.89–96, 2001.

MYOUNG, H.; KIM, M.J.; LEE, J.H.; OK, Y.J.; PAENG, J.Y.; YUN, P.Y. Correlation of proliferative markers (Ki-67 and PCNA) with survival and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma: a clinical and histopathological analysis of 113 patients. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. v.35, p.1005-10, 2006.

NAVES, C.S.; VIEIRA, R.C.; DINIZ, E.G.; JACOMINI, J.O.; BELLETI, M.E.;

OLIVEIRA, R.C. Desenvolvimento morfológico dos ovários em fetos equinos sem raça definida. **Ciência Rural**. v.38, n.2, p.416-22, 2008.

NAYÜDU, P.L.; OSBORN, S.M. Factors influencing the rate of preantral and antral growth of mouse ovarian follicles *in vitro*. **Journal Reprod. Fertil.** v.99, p.577-84, 1992.

NILSSON, E., PARROT, J.A., SKINNER, M.K. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**. v.175, p.123-30, 2001.

- NILSSON, E.; SKINNER, M.K. Bone morphogenetic protein-4 acts as a KGF and primordial follicle development ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. **Biol Reprod.** v.69, p.1265-72, 2003.
- NÓBREGA JR, J.E.; GONÇALVES, P.B.D.; CHAVES, R.N.; MAGALHÃES, D.M.; ROSSETTO, R.; LIMA-VERDE, I.B.; PEREIRA, G.R.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R.; OLIVEIRA, J.F.C. Leukemia inhibitory factor stimulates the transition of primordial to primary follicle and supports the goat primordial follicle viability *in vitro*. **Zygote.** v.20, p.73-8, 2012.
- NÓBREGA JR, J.E.; GONÇALVES, P.B.D.; PEREIRA, G.R.; FIGUEIREDO, J.R. Participação da esfingosina 1-fosfato e do fator inibidor de leucemia no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais de cabras. **Revista Brasileira de Reprodução Animal.** v.38; n.2; p.75-9, 2014.
- OKTAY, K.; SCHENKEN, R.S.; NELSON, J.F. Proliferation cell nuclear antigen marks the initiation of follicular growth in the rat. **Biology of Reproduction.** v.53, p.295-301, 1995.
- PACKER, L.; WITT, E.H.; TRITSCHLER, H.J. Alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. **Free Radic Biol Med.** v.19, n.2, p.227-50, 1995.
- PARROTT, J.A.; SKINNER, M.K. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. **Endocrinology.** v.140, p.4262-671, 1999.
- PESSOA, A.F.C.; ROCHA, R.M.P.; SILVA, G.M.; BRITO, I.R.; CHAVES, R.N.; PADILHA, D.M.M.; CAMPELLO, C.C.; RODRIGUES, A.P.R.; PINHEIRO, D.C.S.N.; FIGUEIREDO, J.R. Effect of morphological integrity, period, and type of culture system on the *in vitro* development of isolated caprine preantral follicles. **Theriogenology.** v.82, p.312-17, 2014.

PETERS, H. Development and maturation of the ovary. **Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique**, Paris, v.16, p.271-278, 1976.

QVIST, R.; BLACKWELL, L.F.; BOURNE, H. et al. Development of mouse ovarian follicles from primary to preovulatory stages *in vitro*. **Journal Reprod. Fertil.** v.89, p.169-80,1990.

RANKIN, T.; SOYAL, S.; DEAN, J. The mouse zona pellucida: folliculogenesis, fertility and pre-implantation development. **Molecular and Cellular Endocrinology.** v.163, n.1, p.21-5, 2000.

REYNAUD, K.; DRIANCOURT, M.A. Oocyte attrition. **Mol. Cel. Endoc.** v.163, p.101-8, 2000.

ROCHA, R.M.P.; ALVES, A.M.C.V.; LIMA, L.F.; ARAÚJO, V.R.; BERNUCI, M.P.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Regulação da função ovariana: caracterização estrutural e papel do hormônio anti-mülleriano (AMH). **Acta Scientiae Veterinariae.** v.41, p.1-12, 2013a.

ROCHA, R.M.P.; LIMA, L.F.; ALVES, A.M.C.V.; CELESTINO, J.J.H.; MATOS, M.H.T.; LIMA-VERDE, I.B.; BERNUCI, M.P.; LOPES, C.A.P.; BÃO, S.N.; CAMPELLO, C.C.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Interaction between melatonin and follicle-stimulating hormone promotes *in vitro* development of caprine preantral follicles. **Domestic Animal Endocrinology.** v.44, p.1-9, 2013b.

RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; LUCCI, C.M.; FIGUEIREDO, J.R.; GONÇALVES, P.B.D.; BEM, A.R. Folículos pré-antrais caprinos isolados mecanicamente em diferentes estágios reprodutivos e parâmetros morfométricos ovarianos. **Ciência Rural.** v.28, n.3, p.471-6, 1998.

RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; FIGUEIREDO, J.R. Comparação entre o número de folículos pré-antrais isolados nos ovários direito e esquerdo das cabras

- nativas da Região Nordeste: Resultados preliminares. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 24., 1996, Goiânia. **Anais...** Goiânia, 1996.
- RODRIGUES, G.Q.; LIMA, I.M.T.; CHAVES, R.N.; ROSSETTO, R.; COSTA, S.L.; CASTRO, S.V.; BARROS, V.R.P.; MATOS, M.H.T.; LOPES, C.A.P.; BÁO, S.N.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R. Transforming growth factor- β (TGF- β) maintains follicular ultrastructure and stimulates preantral follicle growth in caprine ovarian tissue cultured *in vitro*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.66, p.411-6, 2014.
- ROSE, R.C.; BODE, A.M. Biology of free radical scavengers: an evaluation of ascorbate. **Faseb J.** v.7, p.1135–42, 1993.
- ROSSETTO, R.; Lima, I.M.T.; SARAIVA, M.V.A.; LIMA-VERDE, I.B.; SALES, E.T.; FIGUEIREDO, J.R. Avanços no isolamento e sistemas de cultivo de folículos pré-antrais. **Acta Veterinaria Brasilica (UFERSA)**. v.5, p.15-23, 2011.
- ROSSETTO, R.; LIMA-VERDE, I.B.; MATOS, M.H.T.; SARAIVA, M.V.A.; MARTINS, F.S.; FAUSTINO, L.R.; ARAÚJO, V.R.; SILVA, C.M.G.; BÁO, S.N.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R.; BLUME, H. Interaction between ascorbic acid and follicle-stimulating hormone maintains follicular viability after long-term *in vitro* culture of caprine preantral follicles. **Domest. Anim. Endocrinol.** v.37, p.112–23, 2009.
- 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, p.167-70, 2013.
- ROSSETTO, R.; SARAIVA, M.V.A.; SANTOS, R.R.; SILVA, C.M.G.; FAUSTINO, L.R.; CHAVES, R.N.; BRITO, I.R.; RODRIGUES, G.Q.; LIMA, I.M.T.; DONATO,

M.A.M.; 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.01, p.1-4, 2012.

ROY, S.K.; TREACY, B.J. Isolation and long-term culture of human preantral follicles. **Fertility and Sterility**. v.59, n.4, p.783-90, 1993.

RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca Anatomica**, Basel, v.24, p.77-92, 1983.

SAKAGAMI, H.; SATOH, K.; HAKEDA, Y.; KUMEGAWA, M. Apoptosis inducing activity of Vitamin C and Vitamin K. **Cell Mol Biol**. v.46, p.129-43, 2000.

SARAIVA, M.V.A.; ROSSETTO, R.; BRITO, J.R. et al. Dynamic médium containing FSH, LH and EGF produces caprine embryo from preantral follicles grown *in vitro*. **Acta Scientiae Veterinarie**. v.38(supl. 2), p.712, 2010.

SAUMANDE, J. La Folliculogénèse Chez les Ruminants. **Recueil de Médecine Vétérinaire**. v.167, p.205-18, 1991.

SAUMANDE, J. Ovogénèse et folliculogénèse. **Recueil de Médecine Vétérinaire**. v.157, p.29-38, 1981.

SCARAMUZZI, R.J.; BAIRD, D.T.; CAMPBELL, B.K.; DRIANCOURT, M.A.; DUPONT, J.; FORTUNE, J.E.; GILCHRIST, R.B.; MARTIN, G.B.; MCNATTY, K.P.; MCNEILLY, A.S.; MONGET, P.; MONNIAUX, D.; VIÑOLES, C.; WEBB, R. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. **Reprod Fertil Dev**. v.23, p.444-67, 2011.

SERAFIM, M.K.B.; ARAÚJO, V.R.; SILVA, G.M.; DUARTE, A.B.G.; ALMEIDA, A.P.; CHAVES, R.N.; CAMPELLO, C.C.; LOPES, C.A.P.; FIGUEIREDO, J.R.; SILVA, L.D.M. Canine preantral follicles cultured with various concentrations of follicle-stimulating hormone (FSH). **Theriogenology**. v. 74, p. 749-55, 2010.

SILVA, G.M.; ARAÚJO, V.R.; DUARTE, A.B.G.; CHAVES, R.N.; SILVA, C.M.G.; LOBO, C.H.; ALMEIDA, A.P.; MATOS, M.H.T.; TAVARES, L.M.T.; CAMPELO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R. Ascorbic acid improves the survival and *in vitro* growth of isolated caprine preantral follicles. **Animal Reproduction**. v.8, p.14-24, 2011a.

SILVA, G.M.; ARAÚJO, V.R.; DUARTE, A.B.G.; LOPES, C.A.P.; FIGUEIREDO, J.R. Papel dos antioxidantes no cultivo *in vitro* de células ovarianas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.35, n.3, p.315-26, 2011b.

SILVA, G.M.; ROSSETTO, R.; CHAVES, R.N.; DUARTE, A.B.G.; ARAÚJO, V.R.; FELTRIN, C.; BERNUCI, M.P.; ANSELMO-FRANCI, J.; XU, M.; WOODRUFF, T.K.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R. *In vitro* development of secondary follicles from pre-pubertal and adult goats cultured in two-dimensional or three-dimensional systems. **Zygote**. p.1-10, 2014.

SILVA, J.R.; VAN DEN HURK, R.; COSTA, S.H.; ANDRADE, E.R.; NUNES, A.P.; FERREIRA, F.V.; LÔBO, R.N.; FIGUEIREDO, J.R. Survival and growth of goat primordial follicles after *in vitro* culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. **Animal Reproduction Science**. v.81, n.3, p.273-86, 2004a.

SILVA, J.R.; VAN DEN HURK, R.; MATOS, M.H.; SANTOS, R.R.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; FIGUEIREDO, J.R. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during *in vitro* culture of caprine ovarian cortical tissue. **Theriogenology**. v.61, p.1691-704, 2004b.

SILVA-SANTOS, K.C., SANTOS, G.M.G., SILOTO, L.S., HERTEL, M.F., ANDRADE, E.R., RUBIN, M.I.B., STURION, L., STERZA, F.A.M., SENEDA, M.M. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* females. **Theriogenology**. v.76, p.1051-7, 2011.

STRZALKA, W.; ZIEMIENOWICZ, A. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key

factor in DNA replication and cell cycle regulation. **Annals of Botany**. v.107, p.1127-40, 2011.

SWEETMAN, S.F., STRAIN, J.J.; MCKELVEY-MARTIN, V.J. Effect of antioxidant vitamin supplementation on DNA damage and repair in human lymphoblastoid cells. **Nutr. Cancer**. v.27, p.122–30, 1997.

SZLACHTA, M.; TISCHNER, M. Isolation and *in-vitro* culture of preantral follicles in mares. **Medycyna Weterynaryjna**. v.60, p.1177–80, 2004.

SZLACHTA, M.; TISCHNER, M. Isolation and short-term culture of preantral follicles from mare ovaries. **Proceedings from the 14th International Congress on Animal Reproduction**, Stockholm, Sweden. v.2, p.224, 2000.

SZLACHTA, M.; TISCHNER, M. Distribution, morphology and ultrastructure of preantral follicles in the ovary of the mare. **Havemeyer Foundation Monograph Series**, n.5, p.33-5, 2002.(Abstract)

TALEBI, A.; ZAVAREH, S.; KASHANI, M.H.; LASHGARBLUKI, T.; KARIMI, I. The effect of alpha lipoic acid on the developmental competence of mouse isolated preantral follicles. **Journal Assist Reprod Genet.** v.29, p.175–83, 2012.

TANWAR, P.S.; O'SHEA, T.; MCFARLANE, J.R. *In vivo* evidence of role of bone morphogenetic protein-4 in the mouse ovary. **Animal Reproduction Science**. v.106, p.232-40, 2008.

TELFER, E.E. *In vitro* models for oocyte development. **Theriogenology**. v.49, p.451-60, 1998.

THOMAS, F.H.; ARMSTRONG, D.G.; TELFER, E.E. Activin promotes oocyte development in ovine preantral follicles *in vitro*. **Reproductive Biology and Endocrinology**. v.1, p.76, 2003.

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.487–95, 2001.

TILLY J.L. Apoptosis and ovarian function. **Reviews of Reproduction**. v.1, p.162-72, 1996.

TILLY, J.L.; TILLY, K.I. Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. **Endocrinology**. v.136, p.242-52, 1995.

TSAFIRI, A.; BRAW, R.H. Experimental approaches to atresia in mammals. **Oxf. Rev. Reprod. Biol**. v.6, p.226-65, 1984.

VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M.M.; BECKERS, J.F. *In vivo* and *in vitro* development of preantral follicles. **Theriogenology**. v.47, n.1, p.73-82, 1997.

VAN SOOM, A.; YUAN, Y.Q.; PEELMAN, L.J.; MATOS, D.G.; DEWULF, J.; LAESENS, H. Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tensions with or without cysteine addition. **Theriogenology**. v.57, p.1453–65, 2002.

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, n.4, p.817-32, 1996a.

WANDJI, S.A.; SRSEN, V.; VOSS, A.K.; EPPING, J.J.; FORTUNE, J.E. Initiation *in vitro* of growth of bovine primordial follicles. **Biology of Reproduction**. v.55, n.5, p.942-8, 1996b.

WANG, X.; FALCONE, T.; ATTARAN, M.; GOLDBERG, J.M.; AGARWAL, A.; SHARMA, R.K. Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. **Fertil Steril**.

v.78, p.1272-7, 2002.

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

WASSARMAN, P.M. The mammalian ovum. *In*: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. (Ed.). **The physiology of Reproduction**. New York: Raven Press, p.571-628, 1994.

WHITE, Y.A.R.; WOODS, D.C.; TAKAI, Y.; ISHIHARA, O.; SEKI, H.; TILLY, J.L.

Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. **Nature Medicine**. v.18, p.413–21, 2012.

WOODS, D.C.; TILLY, J.L. Isolation, characterization and propagation of mitotically active germ cells from adult mouse and human ovaries. **Nature America**. v.8, n.5, p.966-88, 2013.

WOODS, D.C.; WHITE, Y.A.R.; NIIKURA, Y.; KIATPONGSAN, S.; LEE, H.; TILLY, J.L. Embryonic stem cell–derived granulosa cells participate in ovarian follicle formation *in vitro* and *in vivo*. **Reprod Sci**. v.20, p.524-35, 2013.

WU, J.; CARREL, D.T.; WILCOX, A.L. Development of *in vitro*-matured oocytes from porcine preantral follicles following intracytoplasmic sperm injection. **Biol Reprod**. v.65, p.1579–85, 2001.

YAMASAKI M, K.A.; NISHIMOTO, K.; MADHYASTHA, H.; SAKAKIBARA Y. *et al*. Dihydro-alpha-lipoic acid has more potent cytotoxicity than alpha-lipoic acid. **In vitro Cell Dev Biol Animal**. v.45, p.275-80, 2009.

ZHANG. H.; ZHENG, W.; SHEN, Y.; ADHIKARI, D.; UENO, H.; LIU, K. Experimental evidence showing that no mitotically active female germline progenitors exist in postnatal mouse ovaries. **Proc Natl Acad Sci USA**. v.109, p.12580-5, 2012.

ZHAO, J.; TAVENE, M.A.M.; VAN DER WEIJDEN, G.C.; BEVERS, M.M.; VAN DEN HURK, R. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulates the development of cultured rat pre-antral follicles. **Mol. Reprod. Dev.** v.58, p.287-96, 2001.

ZUCKERMAN, S. The number of oocytes in the mature ovary. **Recent Progress in Hormone Research.** v.6, p.63-108, 1951.

3 HIPÓTESE

A adição dos antioxidantes ácido ascórbico e ácido alfa lipoico ao Meio Essencial Mínimo suplementado no cultivo *in vitro* por 2 ou 6 dias de folículos pré-antrais equinos inclusos em fragmentos ovarianos promove o desenvolvimento folicular.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da adição dos antioxidantes ácido ascórbico ou ácido alfa lipoico em diferentes concentrações sobre o desenvolvimento e a atividade proliferativa de folículos pré-antrais equinos inclusos em fragmentos ovarianos cultivados *in vitro*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar, por histologia clássica, o efeito do antioxidante ácido ascórbico adicionado em diferentes concentrações (25, 50 e 100 µg/ml) ao Meio Essencial Mínimo suplementado (MEM⁺) cultivados *in vitro* por 2 ou 6 dias, sobre o desenvolvimento de folículos pré-antrais inclusos em fragmentos ovarianos equinos;
- Avaliar, por histologia clássica, o efeito do antioxidante ácido alfa lipoico adicionado em diferentes concentrações (50, 100 e 250 µM) ao Meio Essencial Mínimo suplementado (MEM⁺) cultivados *in vitro* por 2 ou 6 dias, sobre o desenvolvimento de folículos pré-antrais inclusos em fragmentos ovarianos equinos;
- Avaliar a atividade proliferativa, por meio da técnica de imunohistoquímica (PCNA), dos folículos pré-antrais inclusos em fragmentos ovarianos equinos cultivados sob diferentes concentrações do ácido alfa lipoico suplementado ao meio MEM⁺ por 2 e 6 dias de cultivo *in vitro*.

5 ARTIGOS PARA PUBLICAÇÃO

ARTIGO 1

**Acid ascorbic supplementation improves *in vitro* development of equine
preantral follicles**

(Artigo submetido à Revista Theriogenology, em fase de correção)

Acid ascorbic supplementation improves *in vitro* development of equine preantral follicles

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effects of different concentrations of ascorbic acid (25, 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in supplemented minimum essential medium (MEM^+) on the development of equine preantral follicles that were cultured *in vitro* for 2 or 6 days. The ovaries ($n = 5$) contralateral of the *Corpus luteum*, from five mares were collected from a local abattoir. Nine ovarian tissue fragments of approximately $5 \times 5 \times 1$ mm were obtained from each animal. One fragment was immediately fixed and subjected to histological analysis (control group; D0), and the other eight were placed in PBS supplemented with penicillin (200 IU/mL) and streptomycin (200 mg/mL) at 4°C for 1 h (during transport to the laboratory). The fragments were cultured *in situ* for 2 days (D2) or 6 days (D6) in MEM^+ or MEM^+ plus 3 different concentrations of ascorbic acid, establishing the following nine groups: control; MEM^+ (D2); MEM^+ (D6); MEM^+ 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ascorbic acid (D2); MEM^+ 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ascorbic acid (D6); MEM^+ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ascorbic acid (D2); MEM^+ 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ascorbic acid (D6); MEM^+ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ascorbic acid (D2) and MEM^+ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ascorbic acid (D6). The preantral follicles were classified according to their stage (primordial or development) and their morphology (normal or abnormal). Slides ($n = 951$) including 4450 histological sections were evaluated. Follicles were observed in only 4.85% (216/4450) of the histological sections. Of the 407 follicles evaluated, 120 were in the primordial stage, and 287 were in different developmental stages; additionally, 43.5% were morphologically normal. The group MEM^+ , 25, 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of ascorbic acid had similar results on development follicles comparing with primordial follicles other 2 day of *in vitro* culture of equine preantral follicles. All treatments showed different statistical from control group ($P < 0.05$). However, after six

days of culture, the MEM⁺ 50 or 100 µg/mL ascorbic acid groups differed in terms of follicular development compared with the other groups at same day of culture ($P < 0.05$). Based on the occurrence of follicular development, it can be concluded for a positive effect on equine ovarian fragments maintained in culture *in vitro* for 6 days in MEM⁺ supplemented with 50 or 100 µg/mL ascorbic acid.

Key words: ascorbic acid, equine, *in vitro* culture, preantral follicles

1. Introduction

Interest in the production of animals with high genetic potential has led to the development of new biotechnologies in the field of animal reproduction. Using assisted reproductive biotechnologies such as *in vitro* fertilization (IVF), thousands of embryos can be obtained and transferred to recipients [1].

Preantral follicles represent 90% of the follicular population in the ovary [2] and are responsible for the continuous renewal of antral follicles [3]. However, approximately 99.9% of the primordial follicles present in the ovaries do not undergo ovulation but rather undergo a degenerative or apoptotic process known as atresia, causing a major decrease in the productivity of the ovary [4,5]. It would be highly beneficial from a practical standpoint if the follicles that are destined to degenerate could somehow become capable of maturation and ovulation.

The goal of *in vitro* cultivation of preantral follicles is to provide a favorable environment for the development of these follicles under *in vitro* conditions. The major objectives of this technique are to promote ovulation and the production of embryos *in vitro* by reducing the follicular demise that generally occurs *in vivo* [6].

Live offspring have been produced by *in vitro* cultivation of preantral follicles only in murine species [7,8,9]; however, promising results have been obtained in several other species. Viable embryos have been produced from cultured preantral follicles of rats [10], pigs [11], buffalo [12], sheep [13] and goats [14]. However, studies on the culture of equine preantral follicles are scarce, mainly due to the difficulty in obtaining ovarian tissue from this species. Considering that equine abattoirs are rare in most countries, the most common sources of equine preantral follicles are ovaries obtained through ovariectomy, biopsies or

immediately after death. Furthermore, equine follicles appear to be more susceptible to degradation than those of other domestic species [15].

Consequently, no reports have indicated that viable oocytes can be obtained after the *in vitro* ovulation of equine follicles. To improve the current equine preantral follicular culture system, the conditions must be adjusted, and the peculiarities of this species must be taken into account. Compared to the *in vivo* environment, the *in vitro* culture of preantral ovarian follicles leads to increased production of reactive oxygen species (ROS) due to oxidative stress and this ends up being responsible for most follicular atresia rate [16].

Ascorbic acid, a substance that protects against the damage caused by ROS and a potent free-radical scavenger, forming ascorbate as a stable free radical, and has been shown to improve viability and to promote the activation of primordial follicles as well as the follicular growth of bovine, caprine and mouse preantral follicles cultured *in vitro* [6,16,17,18,19,20]. This substance is distributed in animal tissues and is found in the adrenal, gonads and pituitary [21]. Specifically, in the mammalian ovary, this antioxidant is found in granulosa cells, luteal cells, oocytes, and inner theca [18]. Furthermore, the ascorbic acid plays an important role in collagen synthesis during follicular growth, ovulation and corpus luteum formation, at which point the extracellular matrix and basement membrane are constantly remodeling [18, 22]. In summary, the actions of this ascorbic acid are preventing DNA mutations induced by oxidation [23] and protection against lipid peroxidation [24].

Therefore, the purpose of this study was to test different concentrations of ascorbic acid in *in vitro* cultures of preantral follicles derived from fragments of equine ovaries. Our hypothesis was that the supplementation of preantral follicles with antioxidants such as ascorbic acid provide more suitable conditions for the *in vitro* culture of follicles, thereby allowing them to stimulate their development.

2. Materials and Methods

2.1 Collection of ovaries

The ovaries (n = 5), contralateral of the *Corpus Luteum*, from five mares of unknown breed, age and body condition score were collected in may at an abattoir Apucarana, Brazil-PR (-23° 33' 03"S, -51° 27' 39"W) located approximately 40 km from the laboratory of animal reproduction. At the abattoir, the ovaries were washed with 70% alcohol followed by a wash with PBS. Each ovary was carefully dissected with a scalpel, and all the adipose and connective tissues were removed. The ovaries were cut sagittally, and the ovaries containing *Corpus Luteum* or antral follicles were discarded. The parenchymal portion (internal) of the five ovaries that were selected was divided into fragments of approximately 5 x 5 x 1 mm (i.e., approximately 125 to 135 mg). One fragment of each ovary was randomly selected and was immediately fixed using Bouin's fixative for histological analysis (control group; D0). Following the protocol of Gomes et al. [15], all other fragments were immediately placed in PBS supplemented with penicillin (200 IU/mL) and streptomycin (200 mg/mL); the fragments were then maintained at 4 °C for 1 h (during transport to the laboratory).

2.2 Experimental protocol

In the laboratory, successive ovarian fragments from each animal were cultured in 24-well culture dishes containing the base medium (1 mL/well; control) or the base medium supplemented with ascorbic acid (1 mL/well). The base medium was minimum essential medium (MEM; pH 7.2-7.4) supplemented with penicillin (200 IU/mL), streptomycin (200 mg/mL), bovine serum albumin (1.25 mg/mL), hypoxanthine (2 mM), glutamine (2 mM),

pyruvate (0.23 mM), insulin (6.25 µg/mL), transferrin (6.25 µg/mL) and selenium (6.25 µg/mL); this medium will be referred to as MEM⁺.

MEM⁺ was supplemented with 25, 50 or 100 µg/mL ascorbic acid. *In vitro* culture was performed at 39 °C in an atmosphere of 5% CO₂ for a period of 2 or 6 days. Each treatment was repeated five times using the eight ovarian fragments from each mare.

The culture medium (MEM; product number M 7278), ascorbic acid and other chemicals used in this study were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) [6,25,26]

At the end of the culture period, the ovarian fragments were evaluated using histological techniques. All samples were fixed in Bouin's fixative for 24 h, dehydrated in ethanol, diaphanized in xylene, embedded in paraffin, cut serially at intervals of 5 µm and mounted on slides with albumin. The staining was performed with periodic acid-Schiff (PAS).

The follicles were classified according to the following developmental stages: (1) primordial follicles (the oocyte is surrounded by one layer of flattened granulosa cells); (2) developing follicles composed of primary follicles (the oocyte is surrounded by a single layer of cuboidal granulosa cells) and secondary follicles (the oocyte is surrounded by more than one complete layer of cuboidal granulosa cells). To evaluate the activation and the growth of primordial follicles in the different developmental stages, the numbers of primordial and growing follicles were determined in the control group and in each *in vitro*-cultured treatment group [27].

The follicles were also classified as normal or degenerated (abnormal) according to the morphology of the oocyte and the granulosa cells to determine the rate of follicular atresia in the control group and in each *in vitro*-cultured treatment group. Follicles were classified as morphologically normal when they contained an intact oocyte and granulosa cells organized in discrete layers without pyknotic nuclei. Degenerated follicles were defined as follicles

containing an oocyte with a pyknotic nucleus and/or an oocyte surrounded by disorganized granulosa cells that had detached from the basement membrane with retracted cytoplasm (Fig. 1) [27].

2.3 Statistical analysis

The percentages of primordial follicles, developing follicles and morphologically normal preantral follicles in the five replicates of the control group and at 2 and 6 days of culture in the various treatment groups were subjected to a nonparametric analysis of variance (Kruskal-Wallis test). The level of significance was set at 5% ($P < 0.05$) and all analyses were performed with the SigmaStat Statistical Software: version 2.0 (St. Joseph, California, USA).

3. Results

In this investigation, we evaluated 951 slides, which included 4450 histological sections from 45 ovarian fragments that were obtained from five mares totaling 407 follicles to analyses (120 primordial and 287 development follicles). Follicles were found in only 4.8% (216/4450) of the histological sections obtained, and they were in different stages of development.

Of the total follicles ($n = 407$) analysed in the experiment, 43.5% were morphologically normal. The treatments MEM⁺, 25, 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$ of ascorbic acid had results similar of the developing follicles than primordial follicles in the 2 day of *in vitro* culture of equine preantral follicles, however, statistical difference of the control group ($P < 0.05$). Additionally, the treatment MEM⁺ showed higher percentage of normal development follicles than other groups of the 2 day of *in vitro* culture. The control group had higher

percentage of primordial follicles than development follicles, and 100% of these follicles were morphologically normal (Table 1).

With respect to treatments of the day 6 of *in vitro* culture, the groups 50 and 100 µg/mL ascorbic acid showed similar results with higher percentage of development follicles than primordial follicles, however, statistically different of the treatments MEM⁺ and 25 µg/mL ascorbic acid in the same day of culture ($P < 0.05$). Moreover, the group 50 µg/mL ascorbic acid supplemented to MEM⁺ had more percentage (53.8%) of normal developing follicles than other groups of 6 day of *in vitro* culture (Table 1).

4. Discussion

In this study, we demonstrated the improvement on follicular development in ovarian fragments after *in vitro* culture with addition of 50 or 100 µg/mL ascorbic acid to the MEM⁺. To the best of our knowledge, this is the first report describing the effect of ascorbic acid on *in vitro* culture of follicles obtained from mares after death.

The information concerning equine ovarian follicles is very limited compared with that concerning ovarian follicles in other species. The first challenge is find follicles at the ovarian fragments. Follicles were found in only 4.85% of the fragments derived from the parenchymal (inner) portion of the ovary. This low density of preantral follicles in equine ovarian tissue was also described by Szlachta and Tischner [28], and Gomes et al. [15]. Also, Driancourt et al. [29] reported that 2- to 4-year-old saddle ponies and mares had only the average of 35,590 primordial follicles in the ovary. In contrast, heifers present on average 130,000 primordial follicles [30], sheep 77,000 [31], and goats have approximately 26,613 primordial follicles per ovary [32]. This aspect turns more critical when considering the size of equine ovary. Comparing all these species, it is easy to recognize the largest dimensions of

the equine ovary. The combination of largest ovary and lowest follicular density makes the follicle localization very difficult in the histological sections obtained of fragments of the inner portion of the ovarian tissue.

Another difficulty for performing experiments with ovarian tissue from equine species is due mainly to the shortage of horse slaughterhouses. For example, the last horse slaughterhouse in the United States was closed in 2007. An alternative to this resource was proposed by Haag et al. [5], whom obtained ovarian fragments from *in vivo* ovarian biopsies. This material exhibited preantral follicular development and follicular and oocyte growth for 7 days *in vitro*. Using the biopsy pick-up (BPU) method, ovarian tissue can be repeatedly harvested from live donor mares to obtain viable preantral follicles. However, only 25-45 mg of tissue can be obtained per BPU session, which is quite limited compared with the mass of an entire ovary. We could obtain ovaries near to the laboratory, performing an easy handling in the whole gonad, a more desirable condition to choose the ovarian fragments.

The *in vitro* culture of equine follicles was firstly reported by Szlachta and Tischner [33,34]. After enzymatic isolation of follicles, they added FSH to the culture medium. After an improvement on follicular growth rate during the first day of culture, they related an increased rate of atresia during the fourth day of culture [33]. Also, the effects of Menezo B2 and Waymouth's MB 752/1 media and FSH supplementation were tested, being Menezo B2 superior after four days of culture FSH neither increase survival rates nor growth of follicles [34].

Additionally, Haag et al. [5] compared MEM and TCM-199 media and found that the former plus 50 µg/mL ascorbic acid wich promoted a better follicular development and oocyte growth. However, only 27% of the follicles were morphologically normal. In the present study, we obtained a global average of 43.5% of follicles morphologically normal. A possible explanation for our higher rate of follicle morphology normal may be the

methodology used in this study. We have worked with ovarian fragments obtained from slaughterhouse, and not from biopsy of the live animals. Perhaps the effect of ascorbic acid may be more important on the ovarian tissue after the metabolic stress caused by the death. Another explanation might be simply due to the larger size of the fragment used in this study. Since there is lack of knowledge about follicular distribution at the equine ovary, we report that many sections of ovarian tissue did not present follicles at all. This situation may have a strong influence on follicular counting and, consequently, evaluation of the follicles.

It has been reported that ascorbic acid exerts beneficial effects on bovine [6,18], murine [19] and caprine (goat) follicles [16,17] cultured *in vitro*. Ascorbic acid accumulates in oocytes, granulosa cells, luteal cells, and the inner theca [18] and forms ascorbate as a stable free radical, significantly reducing the damage caused by ROS [23]. Moreover, ascorbic acid positively influences the process of steroidogenesis [18].

Andrade et al. [6] demonstrated positive effects of ascorbic acid on the survival, activation and growth of bovine early-stage follicles that were cultured *in vitro*. At a concentration of 50 µg/mL, the ascorbic acid stimulated the activation of primordial follicles cultured *in vitro* for 8 days and the subsequent growth of the activated follicles as in the present experiment. In the cited study, ascorbic acid also preserved follicular viability and stimulated granulosa cell proliferation, as demonstrated through immunohistochemical staining of proliferating cell nuclear antigen (PCNA).

Thomas et al. [18] also reported that the presence of 50 µg/mL ascorbic acid was effective in maintaining the integrity and the survival of ovarian follicles isolated from cattle and cultured for 12 days *in vitro*. These positive effects of ascorbic acid were most likely due to the higher concentration of oxygen in *in vitro* culture compared with the *in vivo* environment, which increases the level of ROS [35]. At physiological concentrations, antioxidants protect cells from the damage caused by ROS [36]. In the present study,

however, when the treated groups were compared, follicular development and growth were increased when 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ascorbic acid was present in supplemented MEM⁺. These results suggest that for equine species, higher concentrations ($> 25 \mu\text{g}/\text{mL}$) of ascorbic acid may have positive effects on ovarian tissue fragments that are cultured *in vitro* for 6 days.

Additionally, depending on the time of *in vitro* culture of ovarian fragments, the addition of the antioxidant ascorbic acid may be useful or not. As described in our results, the two days *in vitro* culture in all treatments analyzed showed similar results on the percentage of follicular development. However, after six days *in vitro* culture, the addition of 50 or 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ascorbic acid added positive effects at the developing of the follicles. It is expected a greater amount of ROS after six days, when comparing with two days of culture. Taking all together, we suggest that addition of ascorbic acid and, perhaps other antioxidants, may vary according to the period of *in vitro* follicular culture.

In conclusion, *in vitro* culture of abattoir-derived equine ovarian fragments can be successfully conducted for 6 days in MEM⁺ supplemented with 50 or 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ascorbic acid based on the occurrence of follicular development. In the present study, an *in vitro* culture system for equine ovarian tissue was established using ovaries collected from a slaughterhouse. This technology might be used in the future to produce equine embryos and to establish gamete or embryo banks to store genetic materials and to facilitate genetic improvement.

5. References

- [1] Guilbault LA, Dufourt JJ, Thatcher WW, Drost M, Haibel GK. Ovarian Follicular Development During Early Pregnancy in Cattle. *J. Reprod. Fert* 1986;73:127-35.
- [2] Saumande J. La Folliculogenèse Chez les Ruminats. *Rec. Méd. Vet* 1991;167:205-18.
- [3] Telfer E. The Development of Methods for Isolation and Porcine Ovaries. *Theriogenology* 1996;45:101-10.
- [4] Ireland JJ. Control of Follicular Growth and Development. *J. Reprod. Fert* 1987;34:39-54.
- [5] Haag KT, Magalhães-Padilha DM, Fonseca GR, Wischral A, Gastal MO, King SS, Jones KL, Figueiredo JR, Gastal EL. *In vitro* culture of equine preantral follicles obtained via the Biopsy Pick-Up method. *Theriogenology* 2013; :1-7.
- [6] Andrade ER, Van den Hurk R, Lisboa LA, Hertel MF, Melo-Sterza FA, Moreno K, Bracarense AFRL, Landim-Alvarenga FC, Seneda MM, Alfieri AA. Effects of ascorbic acid on *in vitro* culture of bovine preantral Follicles. *Zygote* 2012;20:379-88.
- [7] Eppig JJ, O'Brien MJ. Development *in vitro* of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol Reprod* 1996;54:197–207.

- [8] O'Brien MJ, Pendola JK, Eppig JJ. A revised protocol for *in vitro* development of mouse oocyte from primordial follicles dramatically improves their development competence. *Biol Reprod* 2003;68:1682–6.
- [9] Wang X, Catt S, Pangestu M, Temple-Smith P. Successful *in vitro* culture of pre-antral follicles derived from vitrified murine ovarian tissue: oocyte maturation, fertilization, and live births. *Reproduction* 2011;141:183–91.
- [10] Daniel SAJ, Armstrong DT, Gorelangton RE. Growth and development of rat oocytes *in vitro*. *Gam Res* 1989;24:109–21.
- [11] Wu J, Carrel DT, Wilcox AL. Development of *in vitro*-matured oocytes from porcine preantral follicles following intracytoplasmic sperm injection. *Biol Reprod* 2001;65:1579–85.
- [12] Gupta PSP, Ramesh HS, Manjunatha BM. Production of buffalo embryos using oocytes from *in vitro* grown preantral follicles. *Zygote* 2008;16:57–63.
- [13] Arunakumari G, Shanmugasundaram N, Rao VH. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. *Theriogenology* 2010;74:884–94.
- [14] Magalhães DM, Duarte ABG, Araújo VR, Brito IR, Soares TG, Lima IM, et al. *In vitro* production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. *Theriogenology* 2011;75:182–8.

- [15] Gomes RG, Andrade ER, Lisboa LA, Ciquini A, Barreiros TRR, Fonseca NAN, Seneda MM. Effect of holding medium, temperature and time on structural integrity of equine ovarian follicles during the non-breeding season. *Theriogenology* 2012;78:731–6.
- [16] Silva GM, Araújo VR, Duarte ABG, Chaves RN, Silva CMG, Lobo CH, Almeida AP, Matos MHT, Tavares LMT, Campelo CC, Figueiredo JR. Ascorbic acid improves the survival and *in vitro* growth of isolated caprine preantral follicles. *Animal Reproduc* 2011;8:14-24.
- [17] Rossetto R, Lima-Verde IB, Matos MHT, Saraiva MVA, Martins FS, Faustino LR, Araújo VR, Silva CMG, Bão SN, Campello CC, Figueiredo JR, Blume H. Interaction between ascorbic acid and follicle-stimulating hormone maintains follicular viability after long-term *in vitro* culture of caprine preantral follicles. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2009;37:112–23.
- [18] Thomas FH, Leask R, Srsen V, Riley SC, Spears N, Telfer EE. Effect of ascorbic acid on health and morphology of bovine preantral follicles during long-term culture. *Reproduction* 2001;122:487–95.
- [19] Murray AA, Molinek MD, Baker SJ, Kojima FN, Smith MF, Hillier SG, Spears N. Role of ascorbic acid in promoting follicle integrity and survival in intact mouse ovarian follicles *in vitro*. *Reproduction* 2001;121:89–96.
- [20] Melo MAP, Oskam IC, Celestino JJH, Carvalho AA, Castro SV, Figueiredo JR, Rodrigues APR, Santos RR. Adding ascorbic acid to vitrification and IVC medium influences preantral follicle morphology, but not viability. *Reprod. Dom. Anim.* 2011;46:742–745.

- [21] Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. Alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med.* 1995;19(2):227–50.
- [22] Li Y, Schellhorn HE. New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. *J. Nutr.* 2007;137:2171–84.
- [23] Lutsenko EA, Carcamo JM, Golde DW. Vitamin C prevents DNA mutation induced by oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 2002;277:16895–9.
- [24] Barja G, Lopez-Torres M, Perez-Campo R, Rojas C, Cadenas S, Prat J, Pamplona R. Dietary vitamin C decreases endogenous protein oxidative damage, malondialdehyde, and lipid peroxidation and maintains fatty acid unsaturation in the guinea pig liver. *Free Radic. Biol. Med.* 1994;17:105–15.
- [25] Zhao J, Tavene MAM, Van Der Weijden GC, Bevers MM, Van Den Hurk R. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulates the development of cultured rat pre-antral follicles. *Mol. Reprod. Dev.* 2001;58:287-96.
- [26] Silva JR, Van Den Hurk R, Costa SH, Andrade ER, Nunes AP, Ferreira FV, Lôbo RN, Figueiredo JR. Survival and growth of goat primordial follicles after *in vitro* culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. *Animal Reproduction Science* 2004;81:273-86.
- [27] Szlachta M, Tischner M. Distribution, morphology and ultrastructure of preantral follicles in the ovary of the mare. *Havemeyer Foundation Monograph Series* 2008; 5:33-5.

- [28] Driancourt MA, Paris A, Roux C, Mariana JC, Palmer E. Ovarian follicular populations in pony and saddle-type mares. *Reprod Nutr Dev* 1982;22:1035–47.
- [29] Erickson BH. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *J Anim Sci* 1966;25:800–5.
- [30] Land RB. Number of oocytes present at birth in the ovaries of pure and Finnish Landrace cross blackface and Welsh sheep. *J Reprod Fertil* 1970;21:517–21.
- [31] Lucci CM, Amorim CA, Rodrigues APR, Figueiredo JR, Bão SN, Silva JRV, et al. Study of preantral follicle population in situ and after mechanical isolation from caprine ovaries at different reproductive stages. *Anim Reprod Sci* 1999;56:223–36.
- [32] Szlachta M, Tischner M. Isolation and short-term culture of preantral follicles from mare ovaries. *Proceedings from the 14th International Congress on Animal Reproduction*, Stockholm, Sweden 2000;2:224.
- [33] Szlachta M, Tischner M. Isolation and in-vitro culture of preantral follicles in mares. *Medycyna Weterynaryjna* 2004;60:1177–80.
- [34] Luvoni GC, Keskinetepe L, Brackett BG. Improvement in bovine embryo production *in vitro* by glutathione-containing culture media. *Mol. Reprod. Dev.* 1996;43: 437–43.

- [35] Carr A, Frei B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions?
FASEB J. 1999;13:1007–24.

Table 1: Number (%) of primordial and developing follicles observed in equine tissues cultured for 2 (D2) or 6 (D6) days in minimal essential medium (MEM⁺; control) or MEM⁺ supplemented with 25, 50 or 100 µg/mL ascorbic acid (AA).

Groups	Total of Follicles n	Primordial Follicles n (%)	Normal	Developing	Normal
			Primordial follicles n (%)	follicles n (%)	Developing follicles n (%)
Control (D0)	64	57 (89)a	57 (100)	7 (11)a	7 (100)
MEM (D2)	76	11 (14.5)b	10 (91)	65 (85.5)b	54 (83.1)
AA 25 (D2)	65	15 (23)b	12 (80)	50 (77)bc	15 (30)
AA 50 (D2)	54	8 (14.8)b	1 (12.5)	46 (85.2)b	0 (0)
AA 100 (D2)	14	1 (7)b	0 (0)	13 (93)b	3 (23.1)
MEM (D6)	40	12 (30)b	1 (8.3)	28 (70)c	3 (10.7)
AA 25 (D6)	19	5 (26.3)b	1 (20)	14 (73.7)c	1 (7.1)
AA 50 (D6)	14	1 (7)b	1 (100)	13 (93)b	7 (53.8)
AA 100 (D6)	61	10 (16.4)b	0 (0)	51 (83.6)b	4 (7.8)
Total	407	120 (29.5)	83 (69.2)	287 (70.5)	94 (32.7)

Values in columns that are followed by different lowercase letters are significantly different ($P < 0.05$).

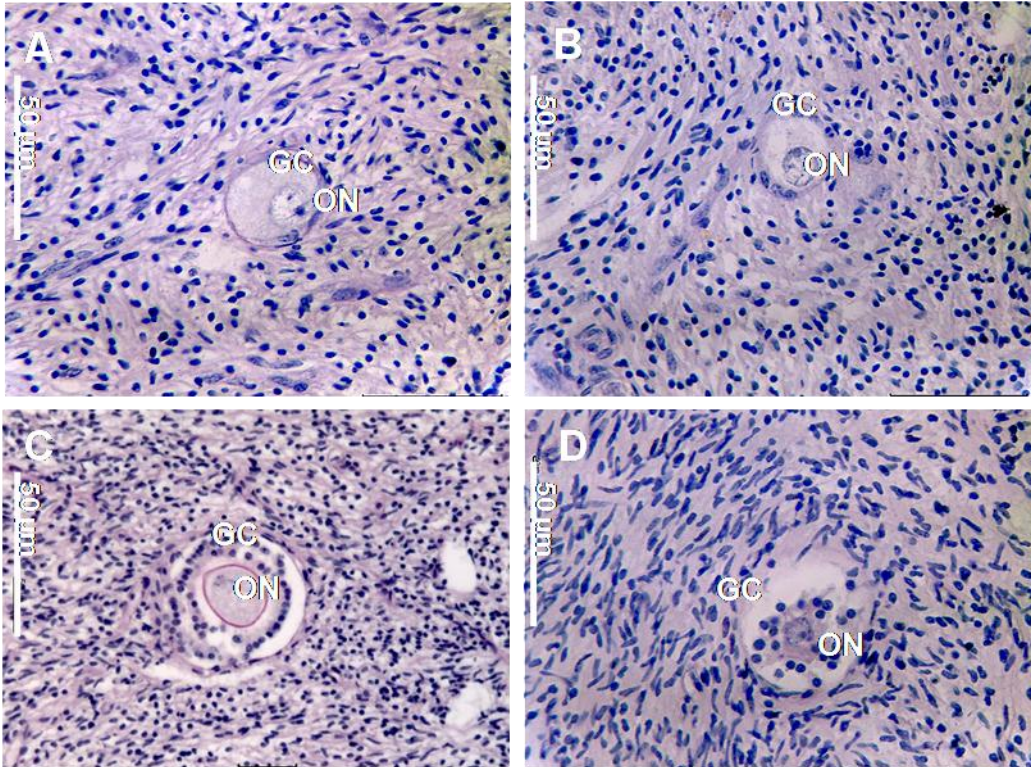


Figure 1: Sections of equine ovarian tissue after *in vitro* culture. A: Primordial follicle with normal morphology derived from the control group. B: Primordial follicle with normal morphology from the MEM⁺ 25 µg/mL ascorbic acid group after 6 days of *in vitro* culture. C: Secondary follicle with degenerated morphology derived from the 50 µg/mL ascorbic acid group after 6 days of *in vitro* culture. D: Secondary follicle with degenerated morphology from the 100 µg/mL ascorbic acid group after 6 days of *in vitro* culture. ON: oocyte nucleus; GC: granulosa cell. 40x magnification.

ARTIGO 2

**Effect of alpha lipoic acid on developmental competence of equine preantral
follicles**

Effect of alpha lipoic acid on developmental competence of equine preantral follicles

Abstract

The effect of different concentrations of alpha lipoic acid (ALA) in supplemented Minimum Essential Medium (MEM⁺) on the development and viability of equine preantral follicles cultured *in vitro* for 2 or 6 days was tested. Ovaries (n = 5) of five seasonal anestrus mares were harvested in a local slaughterhouse. At the laboratory, nine ovarian fragments (5 x 5 x 1 mm) from each animal were used. One fragment was immediately fixed in Bouin and subjected to histological and immunohistochemistry (PCNA) analysis (control group; D0 = day 0), and the other eight fragments were cultured *in situ* for 2 days (D2) or 6 days (D6) in MEM⁺ or MEM⁺ plus ALA (50, 100, or 250 µM) establishing the following groups: MEM-D0 (culture control), MEM-D2; MEM-D6; ALA 50-D2; ALA 50-D6; ALA 100-D2; ALA 100-D6; ALA 250-D2 and ALA 250-D6. After culture, fragments were analyzed histologically and immunohistochemistry using proliferation cell nuclear antigen (PCNA). Preantral follicles were classified according to stage of development (primordial or development) and morphology (normal or abnormal), and to the immunohistochemistry for the presence or absence of positive immunostaining. Slides (n = 795) including 5,205 histological sections were evaluated and were found 767 follicles. The rate of follicle development after culture was 71.4% and of total follicles, 56.3% were normal morphology. Immunohistochemistry data were analyzed in all treatments, and 203/328 follicles (46 primordial, and 157 in development) were PCNA-positive. After six days of culture, follicles maintained in MEM⁺ supplemented with 50 µM of ALA presented better results (P < 0.05) on viability and development, as well as proliferative activity of granulosa cells.

Keywords: antioxidant, mare, *in vitro* culture, immunohistochemistry, PCNA, preantral follicles

1. Introduction

The culture of preantral follicles aims to investigate the physiology of follicular growth and also to promote the production of a consistent population of competent oocytes for *in vitro* fertilization (Talebi *et al.* 2012). Considering mammals in general, preantral follicles represent 90% of the follicle population present in the ovarian tissue (Saumande 1991) and these follicles represent the reserve of antral follicles (Guilbault *et al.* 1986). However, the most follicles present in the ovary do not develop until ovulation and often undergo a process of follicular degeneration known as atresia. Thus, the ovary is underutilized due to the low quantify of oocytes from few antral follicles that are recruited (Ireland 1987, Haag *et al.* 2013).

One alternative to improve the use of oocytes from ovarian reserve is the *in vitro* culture of preantral follicles. This biotechnology has been described in many species, as mice (Wang *et al.* 2011), rats (Daniel *et al.* 1989), pigs (Wu *et al.* 2001), buffaloes (Gupta *et al.* 2008), sheep (Arunakumari *et al.* 2010), and goats (Magalhães *et al.* 2011). Reports in horses are scarce due to difficulties for obtaining ovaries, considering the very low number of equine slaughterhouses worldwide. Another challenge is represented by the low density population of preantral follicles in the mare ovary (Driancourt *et al.*, 1982; Gomes *et al.* 2012).

Besides these aspects, there are also other items to be considered at the *in vitro* culture of equine follicles. For example, the damage on ovarian tissue caused by oxidative stress, which can be defined as an excessive production of reactive oxygen species (ROS) or an imbalance between ROS production and the antioxidant defense system (Agarwal *et al.* 2003). Follicular and oocyte development and maturation *in vitro* are both affected by oxidative stress (OS, Del Corso *et al.* 1994, Agarwal & Allamaneni 2004, Pasqualotto *et al.*

2004). Also, the excessive ROS production by granulosa cells may cause deleterious effects on oocyte fertilization and embryo development (Bedaiwy *et al.* 2004).

Because of that, many antioxidant components have been tested on cell and tissue culture. In this context, alpha lipoic acid (ALA), (R)-5-(1,2-dithiolan-3-yl) pentanoic acid, is an important enzyme of the mitochondrial complex and is well known for its antioxidant function in various biological processes. ALA acts directly on the elimination of ROS by chelating metals and recycling other intracellular antioxidants (Packer *et al.* 1995, Packer *et al.* 1997).

The role of ALA has not been studied on development of equine follicles. Therefore, this study aims to investigate the effects of ALA on development, morphology and cellular proliferation of equine preantral follicles.

2. Materials and methods

2.1. Collection of ovaries

Ovaries (n = 5) from five mares of unknown breed, age and body condition score were harvested in June at a slaughterhouse Apucarana, Brazil-PR (-23° 33' 03"S, -51° 27' 39"W). Immediately after collection, ovaries were washed with PBS and transported to the laboratory in PBS supplemented with penicillin (200 IU/mL) and streptomycin (200 mg/mL) at 4 °C for 1 h, according to Gomes *et al.* (2012). At the laboratory ovaries were carefully dissected with a scalpel and scissors to remove all fat and connective tissue around ovarian tissue. Ovaries were then sectioned in a sagittal plane, and those with visible *Corpora Lutea* or large antral follicles were discarded. The parenchymal (inner) portion of the five selected ovaries was divided into fragments of approximately 5 x 5 x 1 mm, (i.e., approximately 125 to 135 mg).

One fragment of each ovary was immediately fixed in Bouin (Day 0 = D0, non cultured control group).

2.2. Experimental protocol and groups

Ovarian fragments were placed in 24-well plates containing 1 mL of the base medium, base medium supplemented with different concentrations of alpha lipoic acid. The base medium consisted of Minimum Essential Medium (MEM; pH 7.2-7.4) with penicillin (200 IU/mL), streptomycin (200 mg/mL), bovine serum albumin (1.25 mg/mL), insulin (6.25 µg/mL), transferrin (6.25 µg/mL), selenium (6.25 µg/mL), 0.23 mM pyruvate, 2 mM glutamine, and 2 mM hypoxanthine and referred from now on as MEM⁺. MEM⁺ was supplemented with 50 (ALA 50-D2 and D6), 100 (ALA 100-D2 and D6), or 250 (ALA 250-D2 and D6) µM of alpha lipoic acid (Fig. 1). The culture media MEM, alpha lipoic acid, and other chemicals used in this study were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

The *in vitro* culture was performed at 39 °C in an atmosphere of 5% CO₂ in air for a period of 2 or 6 days. We performed 5 replicates of the experimental design. After culture, samples were fixed in Bouin for 24 h, dehydrated in ethanol, diaphanized in xylene, embedded in paraffin, cut serially at intervals of 5 µm and mounted on slides. The staining was performed with periodic acid-Schiff (PAS).

Follicles were classified according to the developmental stage as i) primordial follicles (one layer of flattened granulosa cells around the oocyte); ii) developing follicles composed of primary follicles (a single layer of cuboidal granulosa cells around the oocyte), and secondary follicles (oocyte surrounded by more than one complete layer of cuboidal granulosa cells; Hulshof *et al.*, 1994).

To evaluate the activation and growth of primordial follicles we consider the proportion of primordial and growing follicles at days zero, two and six. Follicles were also morphologically classified as normal or degenerated. Normal follicles had an intact oocyte and granulosa cells organized in tight layers without pyknotic nuclei. Degenerated follicles were defined as those with oocytes with pyknotic nuclei, and/or surrounded by disorganized granulosa cells detached from the basement membrane and with retracted cytoplasm (Andrade *et al.*, 2012).

2.3. Assessment of granulosa cell proliferation by PCNA and morphological analysis

Fragments of all treatments were subjected to immunohistochemistry to evaluate cell proliferative activity, with cell proliferation nuclear antigen (PCNA). Positive and negative controls were used according to the manufacturer's instructions. Histological sections of 4 μm were deparaffinized using xylene, rehydrated using 70% ethanol, and subjected to antigen retrieval using PCNA in citric buffer (pH 6.0) after incubation in a microwave at 100 °C oven for 12 min. Next, these sections were incubated in 3% hydrogen peroxide for 20 min to block endogenous peroxidase activity. Immunostaining was performed by incubation in a 1:100 dilution of the primary antibodies for 18 h. The antibody used was anti-PCNA (Clone PC10 monoclonal antibody, 1:100 dilution, Zymed ®, Carlsbad, CA). After that, the secondary antibody (SuperPicTure Polymer Detection Kit, Invitrogen ®, São Paulo, BR) was conjugated for 20 min and then the reaction was incubated with diaminobenzidine substrate (DAB Plus liquid, Zymed ®, Carlsbad, CA) for one minute. After that, sections were counterstained with Harris hematoxylin and dehydrated. Finally, the slides were mounted. Follicles were analyzed qualitatively for the presence or absence of positive immunostaining. Follicles with at least

one granulosa cell marked were considered positive and the no staining was considered negative.

2.4. Statistical analyses

A Fisher exact test was used to compare percentages of primordial and development follicles and follicles with PCNA-positive granulosa cells. All analyses were performed with the SigmaStat Statistical Software: version 2.0 (St. Joseph, California, USA) and values were considered statistically significant when $P < 0.05$.

3. Results

We evaluated 767 follicles (320 primordial and 447 developing) identified on 795 slides containing 5,205 sections. The immunohistochemistry was performed on 328 follicles, being 203 PCNA-positive and 125 PCNA-negative granulosa cells. Regarding follicular development, positive immunostaining was seen in 22.6% primordial and 77.4% in growing follicles.

At day 2 of culture the treatment MEM had a significantly higher percentage of developing follicles (88.2%; $P < 0.05$) than the treatments 50, 100, and 250 μM in the same day of culture. Additionally, treatments MEM-D2 and ALA 100-D2 showed higher percentage of development follicles PCNA-positive granulosa cells. The non cultured control (D0) had a higher proportion of primordial (84.4%) follicles with all the follicles immunostaining PCNA-positive, unlike the aforementioned groups.

After six days of culture, ALA 50-D6 showed higher percentage of follicles in development that all other treatments at the same day of culture ($P < 0.05$) with all follicles in

development and also PCNA-positive. The group ALA 250-D6 was the second best on the proportion of primordial and developing. However, at this treatment, just one follicle was PCNA-positive of 24 follicles evaluated. Comparing MEM-D6 and ALA 100-D6 there was no difference (Table 1; Fig. 2).

At evaluation, 56.3% of all follicles were morphologically normal at the end the culture period. There were a higher percentage of morphologically normal primordial follicles (90.3%) than follicles in development (32%; $P < 0.05$). In the non cultured control group (D0), it may be noted that 100% of the follicles were morphologically normal. Follicles in MEM-D2 and ALA 50-D6 showed a higher percentage of morphologically normal developing follicles (75% and 100% respectively) than morphologically normal primordial follicles compared to other groups ($P < 0.05$). Additionally, there was no normal follicles at ALA 250-D6 (Fig. 3).

4. Discussion

Here we demonstrated for the first time the improvement of *in vitro* culture of equine follicles with addition of the antioxidant alpha lipoic acid at a concentration of 50 μM , which provided a greater proportion of viable follicles with proliferative activity of granulosa cells.

Despite consistent progress of the manipulation of oocytes enclosed in preantral follicles in several mammalian species, as mice (Gao *et al.*2007), humans (Telfer *et al.*2008), cattle (Shimizu *et al.*2008), sheep (Andrade *et al.* 2005), and goats (Matos *et al.*2011), there is a lack of information in horses. In this way, we highlight the contribution of our work on this field of knowledge with strong limitations. That has been worldwide caused due to shortage of slaughterhouse ovaries on this species. In this context, the development of an efficient system for *in vitro* culture of equine follicles represents a key tool for a better understanding

on ovarian follicular physiology in mares. The recent contribution of Haag *et al.*(2013) described a valuable strategy for harvesting follicles from live animals, the *in vivo* ovarian biopsy specimens. Here we describe a successful strategy to promote follicular culture from ovary of dead mares. We believe that both strategies may be considered for an optimal use of gametes from high values donors. The biopsy of ovary being considered for live animals and the last chance to harvest oocytes may be considered after death. Considering the lack of information on follicular physiology in mares, our model (unknown mares from slaughterhouses) is very useful to provide consistently samples for multiple uses. Compared to obtaining biopsy fragments, the use of the *post-mortem* ovaries allows full use of the gonad with access to a greater number of follicles to culture.

After follicle collection, the next step is an efficient system for *in vitro* culture. In this way, ovarian follicles can develop in media previously tested in different species, such as Minimum Essential Medium (MEM; Martins *et al.*2010; Haag *et al.*2013), Waymouth medium (Bolamba *et al.*2002), TCM-199 (Haag *et al.*2013), or McCoy's medium (Duleba *et al.*2001). MEM medium was used for 7 days of *in vitro* culture of equine preantral follicles by Haag *et al.*(2013) and showed greater follicular development than TCM-199. Notably, these authors added the antioxidant ascorbic acid at a concentration of 50 µg/mL to the base medium. This compound has already been used in preantral follicle culture of other species, such as cattle (Thomas *et al.*2001; Andrade *et al.*2012), goats (Rossetto *et al.* 2009; Silva *et al.* 2011) and rats (Murray *et al.* 2001). Recently, our research group performed culture of equine ovarian fragments obtained from slaughterhouse ovaries and tested various concentrations of ascorbic acid in supplemented MEM (unpublished data). We noted that the addition of concentrations 50 or 100 µg/mL of ascorbic acid in the MEM medium culture was effective to promote development of follicles.

Taking our previous results with ascorbic acid and the data at this article, we consider the positive effects of antioxidant on *in vitro* culture of equine follicles. At physiological concentrations, antioxidants protect cells from damage caused by reactive oxygen species (ROS; Carr & Frei 1999). During *in vitro* culture, higher concentrations of oxygen are produced than in the *in vivo* environment, increasing levels of ROS (Luvoni *et al.* 1996). Some studies show that ROS are generated not only by cellular metabolism but also by external factors, such as oxygen concentration, light and *in vitro* manipulation, influencing the overall metabolism of the cells (Goto *et al.* 1992; Combelles *et al.* 2009). It has also been *in vivo* demonstrated that production of ROS is a usual route in the respiratory chain of mitochondria, which is balanced by antioxidants in cells (Agarwal *et al.* 2005; Agarwal *et al.* 2006). It has also been reported that lower concentrations of ROS may have positive effects on maturation, competence, and development of oocytes (Halliwell & Gutteridge 1988; Blondin *et al.* 1997). Thus, the addition of antioxidants to culture medium provided an improvement on the *in vitro* culture conditions (Goto *et al.* 1992; Nasr-Esfahani & Johnson 1992).

Despite the mentioned benefits of ALA, it is important to mention there is an appropriated concentration for that. Follicles submitted to 250 μ M ALA presented 100% of degeneration. Talebi *et al.* (2012) described that high concentrations (500 μ M) of ALA resulted in decreased rates of maturation and development of mice preantral follicles. In addition, other studies reported that high doses (500 μ M) of ALA can induce apoptosis of cell lines (Marsh *et al.* 2005, Wenzel *et al.* 2005, Simbula *et al.* 2007, Yamasaki *et al.* 2009). Long time (for example: 6 days) exposure to ALA may also result on inhibition of glycogen synthesis, increase of lipid peroxidation, mitochondrial damage, and arrest cell cycle in some cells (Moini *et al.* 2002; Cakatay 2006).

Considering the challenge to identify the localization of preantral follicles in mare ovary, we consider that our number of identified follicles was appropriated for our goals, e.g.,

histological analysis (767 follicles) and analysis of the proliferative activity of granulosa cells (328 follicles). Szlachta & Tischner (2002) and Gomes *et al.*(2012) also reported difficulties in obtaining follicles for experiments due to the low follicular density in the equine ovarian tissue. This species has on average 35,590 primordial follicles in ovarian tissue (Driancourt *et al.*1982). Other species, with smaller ovaries, have much more primordial follicles. For example, sheep contain on average 77,000 (Land 1970), cows 130,000 (Erickson 1966), and goats 26,613 (Lucci *et al.*1999). Thus, compared to these species, equines have larger ovary but lower amount of preantral follicles in the parenchyma.

Regarding follicular viability, Haag *et al.*(2013) found that 27% equine preantral follicles were morphologically normal after 7 day of culture. In the present experiment, 56.3% of follicles were morphologically normal by histological evaluation. Thus, besides the low density of follicle population in equine ovaries, we also consider that the *in vitro* culture needs a lot of improvement on efficiency in order to provide a better utilization of female gametes in this species.

We firstly detect proliferative activity of granulosa cells through the PCNA in culture of equine preantral follicles. The highest proportion of PCNA-positive developing follicles was found in MEM⁺, ALA 50, and ALA 100 on day 2. Considering the six days treatments, the best concentration was 50 μ M, demonstrating a possible stronger antioxidant effect of ALA through ovarian tissue when it was submitted to the longer period of *in vitro* culture. This positive aspect was also confirmed by the 100% PCNA-positive immunostaining of follicles at D6.

In conclusion, the addition of 50 μ M of alpha lipoic acid in the MEM⁺ provided the best result on follicular development and proliferative activity of granulosa cells in the six days *in vitro* culture of equine ovarian fragments obtained from slaughterhouse. As a general

conclusion, we highlight the importance of using ovaries from slaughterhouse as an important source of studies on equine follicular physiology.

Declaration of interest

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the manuscript.

References

- Agarwal A, Allamaneni SS. Role of free radicals in female reproductive diseases and assisted reproduction. *Reprod Biomed Online* (2004)9:338–47.
- Agarwal A, Gupta S, Sharma R. Oxidative stress and its implications in female infertility - a clinician's perspective. *Reprod Biomed Online* (2005)11:641–50.
- Agarwal A, Gupta S, Sikka S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol.* (2006)18:325–32.
- Agarwal A, Saleh RA, Bedaiwy MA. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertil Steril.* (2003)79:829–43.
- Andrade ER, Van den Hurk R, Lisboa LA, Hertel MF, Melo-Sterza FA, Moreno K, Bracarense AFRL, Landim-Alvarenga FC, Seneda MM, Alfieri AA. Effects of ascorbic acid on *in vitro* culture of bovine preantral follicles. *Zygote.* (2012)20:1-10.
- Andrade ER, Seneda MM, Alfieri AA, de Oliveira JA, Bracarense APFRL, Figueiredo JR, Toniolli R 2005 Interactions of indole acetic acid with EGF and FSH in the culture of ovine preantral follicles. *Theriogenology.* (2005)64:1104–13.

- Arunakumari G, Shanmugasundaram N, Rao VH. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. *Theriogenology*. (2010)74:884–94.
- Bedaiwy MA, Falcone T, Mohamed MS, Aleem AA, Sharma RK, Worley SE, et al. Differential growth of human embryos *in vitro*: role of reactive oxygen species. *FertilSteril*. (2004)82:593–600.
- Blondin P, Coenen K, Sirard MA. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. *J Androl*. (1997)18:454–60.
- Bolamba D, Floyd AA, McGlone JJ, & Lee VH. Epidermal growth factor enhances expression of connexin 43 protein in cultured porcine preantral follicles. *Biol. Reprod*. (2002)67:154–60.
- Cakatay U. Pro-oxidant actions of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Med hypotheses*. (2006)66:110-7.
- Carr A, & Frei B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *Faseb J*. (1999)13:1007–24.
- Combelles CM, Gupta S, Agarwal A. Could oxidative stress influence the *in vitro* maturation of oocytes? *Reprod Biomed Online*. (2009)18:864–80.
- Daniel SAJ, Armstrong DT, Gorelangton RE. Growth and development of rat oocytes *in vitro*. *Gam Res*. (1989)24:109–21.
- Del Corso A, Cappiello M, Mura U. Thiol dependent oxidation of enzymes: the last chance against oxidative stress. *Int J Biochem*. (1994)26:745–50.
- Downey KM, Tan CK, & So AG. DNA polymerase delta: a second eucaryotic DNA replicase. *Bioessays*. (1990)12:231–36.
- Driancourt MA, Paris A, Roux C, Mariana JC, Palmer E. Ovarian follicular populations in pony and saddle-type mares. *Reprod Nutr Dev*. (1982)22:1035–47.

- Duleba AJ, Pehlivan T, Carbone R, Spaczynski RZ. Activin stimulates proliferation of rat ovarian thecal-interstitial cells. *Biol Reprod.* (2001)65:704–09.
- Eppig JJ, O'Brien MJ. Development *in vitro* of mouse oocytes from primordial follicles. *Biol Reprod.* (1996)54:197–207.
- Erickson BH. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. *Journal of Reproduction and Fertility.* (1966)10:97-105.
- Gao MZ, Wang Y, WU X. *In vitro* maturation of immature oocytes from preantral follicles in prepuberal mice. *J. Reprod. Contracept.* (2007)18:25–32.
- Gomes RG, Andrade ER, Lisboa LA, Ciquini A, Barreiros TRR, Fonseca NAN, Seneda MM. Effect of holding medium, temperature and time on structural integrity of equine ovarian follicles during the non-breeding season. *Theriogenology.* (2012)78:731–36.
- Goto Y, Noda Y, Narimoto K, Umaoka Y, Mori T. Oxidative stress on mouse embryo development *in vitro*. *Free Radic Biol Med.* (1992)13:47–53.
- Gougeon A, & Busso D. Morphologic and functional determinants of primordial and primary follicles in the monkey ovary. *Mol. Cell. Endocrinol.* (2000)163:33–41.
- Guilbault LA, Dufourt JJ, Thatcher WW, Drost M, Haibel GK. Ovarian follicular development during early pregnancy in cattle. *J. Reprod. Fert.* (1986)73:127-35.
- Gupta PSP, Ramesh HS, Manjunatha BM. Production of buffalo embryos using oocytes from *in vitro* grown preantral follicles. *Zygote.* (2008)16:57–63.
- Haag KT, Magalhães-Padilha DM, Fonseca GR, Wischral A, Gastal MO, King SS, Jones KL, Figueiredo JR, Gastal EL. *In vitro* culture of equine preantral follicles obtained via the biopsy pick-up method. *Theriogenology.* (2013)79:911-7.
- Halliwell B, Gutteridge JM. Free radicals and antioxidant protection: mechanisms and significance in toxicology and disease. *Hum Toxicol.* (1988)7:7–13.
- Ireland JJ. Control of Follicular Growth and Development. *J. Reprod. Fert.* (1987)34:39-54.

- Hulshof SC, Figueiredo JR, Beckers JF, Bevers MM, Van Der Hurk R. Isolation and characterization of preantral follicles from fetal bovine ovaries. *The Veterinary Quarterly*. (1994)16:78-80.
- Land RB. Number of oocytes present at birth in the ovaries of pure and Finnish Landrace cross blackface and Welsh sheep. *J Reprod Fertil*. (1970)21:517–21.
- Lintern-Moore S, & Moore GPM. The initiation of follicle and oocyte growth in the mouse ovary. *Biol. Reprod*. (1979)20:773–78.
- Lucci CM, Amorim CA, Rodrigues APR, Figueiredo JR, Bão SN, Silva JRV, et al. Study of preantral follicle population *in situ* and after mechanical isolation from caprine ovaries at different reproductive stages. *Anim Reprod Sci*. (1999)56:223–36.
- Luvoni GC, Keskinetepe L, Brackett BG. Improvement in bovine embryo production *in vitro* by glutathione-containing culture media. *Mol. Reprod. Dev*. (1996)43:437–43.
- Magalhães DM, Duarte ABG, Araújo VR, Brito IR, Soares TG, Lima IM, et al. *In vitro* production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. *Theriogenology*. (2011)75:182–8.
- Marsh SA, Pat BK, Gobe GC, Coombes JS. Evidence for a nonantioxidant, dose-dependent role of alpha-lipoic acid in caspase-3 and ERK2 activation in endothelial cells. *Apoptosis*. (2005)10:657–65.
- Martins FS, Celestino JJH, Saraiva, MVA, Chaves RN, Rossetto R, Silva CMG, Lima-Verde IB, Lopes CAP, Campello CC, Figueiredo JR. 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. Res*. (2010)43, 728–736.
- Matos MHT, Bruno JB, Rocha RMP, Lima-Verde IB, Santos KDB, Saraiva MVA, Silva JRV, Martins FS, Chaves RN, Bão SN, Figueiredo JR. *In vitro* development of primordial follicles after long-term culture of goat ovarian tissue. *Res. Vet. Sci*. (2011)90:404–11.

- Meredith S, Dudenhoeffer G, Jackson K. Classification of small type B/C follicles as primordial follicles in mature rats. *J. Reprod. Fertil.* (2000)119:43–8.
- Moini H, Packer L, Saris NE. Antioxidant and prooxidant activities of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Toxicol Appl Pharmacol.* (2002)182:84-90.
- Murray AA, Molinek MD, Baker SJ, Kojima FN, Smith MF, Hillier SG, Spears N. Role of ascorbic acid in promoting follicle integrity and survival in intact mouse ovarian follicles *in vitro*. *Reproduction.* (2001)121:89–96.
- Nasr-Esfahani MH, Johnson MH. How does transferrin overcome the *in vitro* block to development of the mouse preimplantation embryo? *J ReprodFertil.* (1992)96:41.
- O'Brien MJ, Pendola JK, Eppig JJ. A revised protocol for *in vitro* development of mouse oocyte from primordial follicles dramatically improves their development competence. *Biol Reprod.* (2003)68:1682–6.
- Packer L, Tritschler HJ, Wessel K. Neuroprotection by the metabolic antioxidant alpha-lipoic acid. *Free Radic Biol Med.* (1997)22:359–78.
- Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. Alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med.* (1995)19:227–50.
- Pasqualotto EB, Agarwal A, Sharma RK, Izzo VM, Pinotti JA, Joshi NJ, et al. Effect of oxidative stress in follicular fluid on the outcome of assisted reproductive procedures. *FertilSteril.* (2004)81:973–6.
- Rossetto R, Lima-verde IB, Matos MHT, Saraiva MVA, Martins FS, Faustino LR, Araújo VR, Silva CMG, Bão SN, Campello CC, Figueiredo JR, Blume H. Interaction between ascorbic acid and follicle-stimulating hormone maintains follicular viability after long-term *in vitro* culture of caprine preantral follicles. *Domest. Anim. Endocrinol.* (2009)37:112–23.
- Saumande J. La folliculogénèse chez les ruminants. *Rec. Méd. Vet.* (1991)167:205-18.

- 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.* (2008)106:143–52.
- Silva GM, Araújo VR, Duarte ABG, Chaves RN, Silva CMG, Lobo CH, Almeida AP, Matos MHT, Tavares LMT, Campelo CC, Figueiredo JR. Ascorbic acid improves the survival and *in vitro* growth of isolated caprine preantral follicles. *Animal Reproduc.* (2011)8:14-24.
- Simbula G, Columbano A, Ledda-Columbano GM, Sanna L, Deidda M, Diana A, et al. Increased ROS generation and p53 activation in alpha-lipoic acid induced apoptosis of eptoma cells. *Apoptosis.* (2007)12:113–23.
- Szlachta M, Tischner M. Distribution, morphology and ultrastructure of preantral follicles in the ovary of the mare. *Havemeyer Foundation Monograph Series.* (2002) 5:33-5. (Abstract)
- Szlachta M, Tischner M. Isolation and *in vitro* culture of preantral follicles in mares. *Medycyna Weterynaryjna.* (2004)60:1177–80.
- Szlachta M, Tischner M. Isolation and short-term culture of preantral follicles from mare ovaries. *Proceedings from the 14th International Congress on Animal Reproduction.* Stockholm, Sweden. (2000)2:224.
- Talebi A, Zavareh S, Kashani MH, Lashgarbluki T, Karimi I. The effect of alpha lipoic acid on the developmental competence of mouse isolated preantral follicles. *Journal Assist Reprod Genet.* (2012)29:175–83.
- Telfer EE, McLaughlin M, Ding C, Thong KJ. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. *Hum. Reprod.* (2008)23:1151–8.
- Thomas FH, Leask R, Srsen V, Riley SC, Spears N, Telfer EE. Effect of ascorbic acid on health and morphology of bovine preantral follicles during long-term culture. *Reproduction .* (2001)122:487–95.

Wandji SA, Eppig JJ, Fortune JE. FSH and growth factors affect the growth and endocrine function *in vitro* of granulosa cells of bovine preantral follicles. *Theriogenology*.

(2006)45:817–32.

Wang X, Catt S, Pangestu M, Temple-Smith P. Successful *in vitro* culture of pre-antral follicles derived from vitrified murine ovarian tissue: oocyte maturation, fertilization, and live births. *Reproduction*. (2011)141:183–91.

Wenzel U, Nickel A, Daniel H. Alpha-lipoic acid induces apoptosis in human colon cancer cells by increasing mitochondrial respiration with a concomitant O₂-generation. *Apoptosis*.

(2005)10:359–68.

Wu J, Carrel DT, Wilcox AL. Development of *in vitro*-matured oocytes from porcine preantral follicles following intracytoplasmic sperm injection. *Biol Reprod*. (2001)65:1579–85.

Yamasaki M, Kawabe A, Nishimoto K, Madhyastha H, Sakakibara Y, Suiko M, et al. Dihydro-alpha-lipoic acid has more potent cytotoxicity than alpha-lipoic acid. *In vitro Cell Dev Biol-Animal*. (2009)45:275–80.

Table 1. Primordial and developing follicles retrieved for histology and proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-positive granulosa cells observed in equine ovarian tissue after 0, 2, and 6 days of culture in minimal essential medium (MEM⁺) supplemented with different concentrations of alpha lipoic acid (ALA).

Groups	N	Follicles Histology		N	Follicles PCNA-positive granulosa cells	
		Primordial % (n)	Developing % (n)		Primordial % (n)	Developing % (n)
Control (MEM-D0)	180	84.4 (152) ^a	15.6 (28) ^a	15	66.7 (10) ^a	33.3 (5) ^a
MEM-D2	68	11.8 (8) ^{bd}	88.2 (60) ^b	83	23.4 (18) ^b	76.6 (59) ^b
ALA 50-D2	88	40.9 (36) ^c	59.1 (52) ^c	12	36.4 (4) ^{ab}	63.6 (7) ^{ab}
ALA 100-D2	92	44.6 (41) ^c	55.4 (51) ^c	77	23.5 (12) ^b	76.5 (39) ^b
ALA 250-D2	77	42.9 (33) ^c	57.1 (44) ^c	14	0 (0) [#]	0 (0) [#]
MEM-D6	22	36.4 (8) ^{cd}	63.6 (14) ^{ce}	19	7.1 (1) ^{bc}	92.9 (13) ^c
ALA 50-D6	22	0 (0) [#]	100 (22) ^d	9	0 (0) [#]	100 (6) ^c
ALA 100-D6	161	21.1 (34) ^d	78.9 (127) ^{be}	75	3.6 (1) ^c	96.4 (27) ^c
ALA 250-D6	57	14 (8) ^{bd}	86 (49) ^b	24	0 (0) [#]	100 (1) [#]
Total	587	28.6 (168)	71.4 (419)	328	46 (22.6)	157 (77.4)

a-d Within a column, groups without a common superscript differed (P < 0.05).

Data not analyzed. D0 = day 0; D2 = day 2; D6 = day 6.

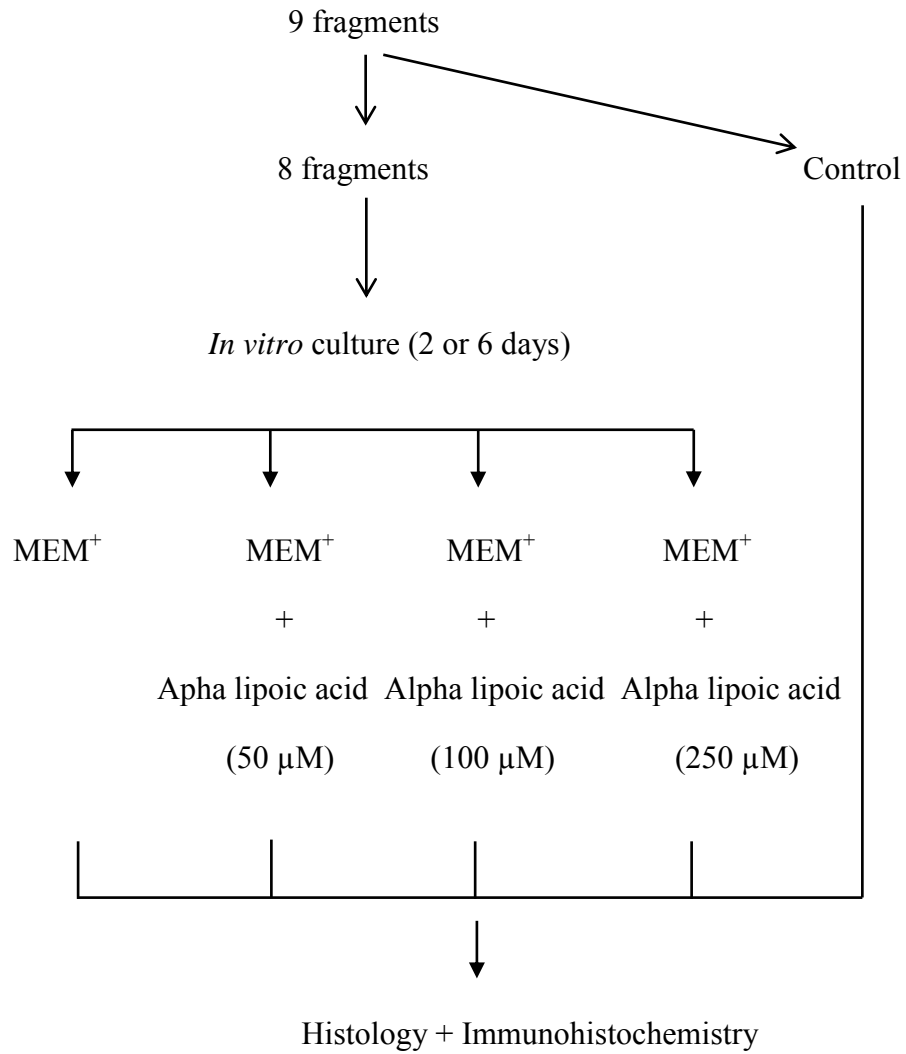


Fig 1. Experimental protocol used for *in vitro* culture of equine preantral follicles in media containing alpha lipoic acid or in control medium.

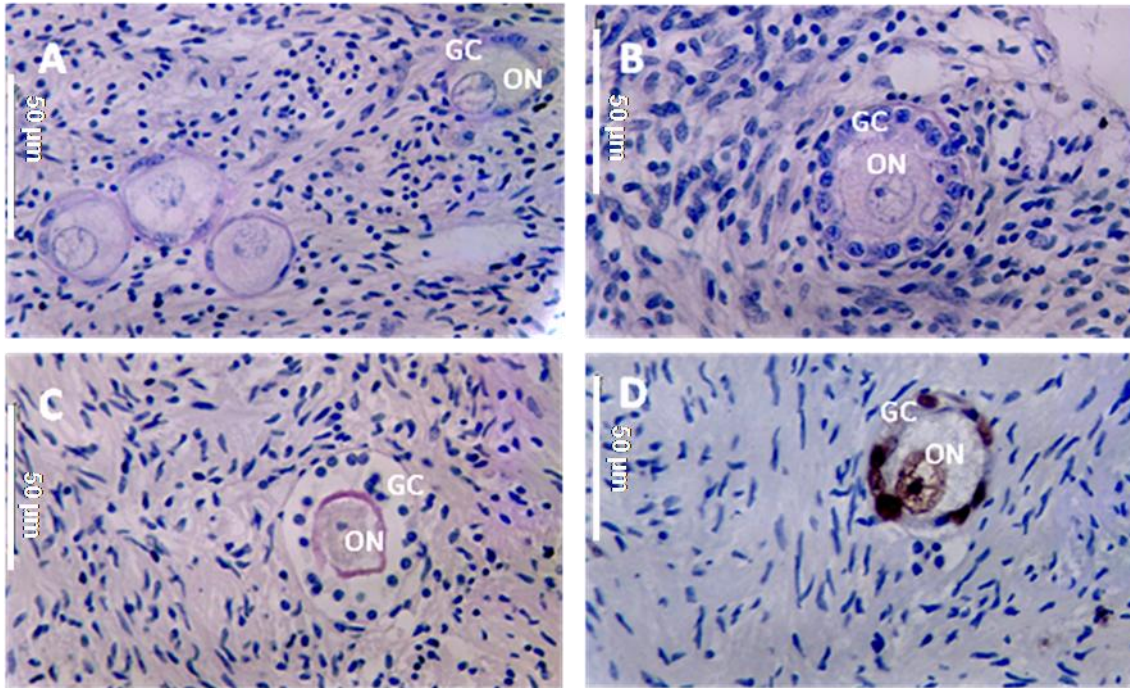


Fig 2. Sections of equine ovarian tissue after *in vitro* culture. A: Morphologically normal primordial follicles in control group. B: Morphologically normal primary follicle after 6 days of *in vitro* culture in MEM⁺ 50 μ M of alpha lipoic acid (ALA 50-D6); C: Morphologically degenerated secondary follicle after 6 days of *in vitro* culture in 250 μ M of alpha lipoic acid (ALA 250-D6); A, B, C: Periodic acid Schiff (PAS) staining. D: Morphologically normal primary follicle with proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-positive (brown staining) granulosa cells and oocyte. O: oocyte nucleus; GC: granulosa cells. 40x magnification.

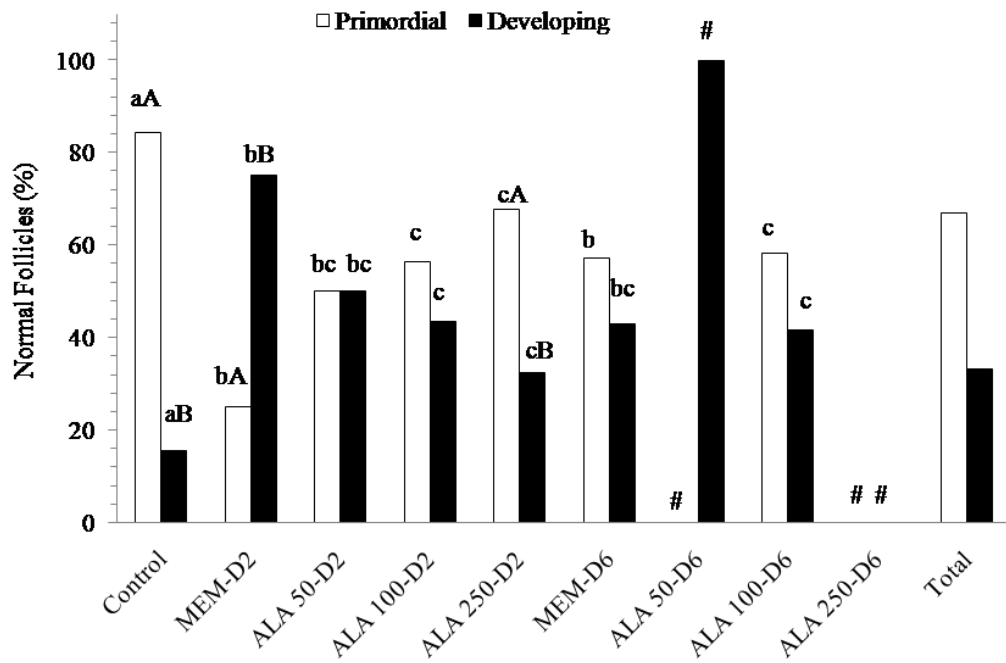


Fig 3. Percentage of morphologically normal primordial and developing follicles in all treatments after 2 and 6 days of *in vitro* culture of equine ovarian fragments ($P < 0.05$).

A,B Within a treatment, values without a common superscript differed ($P < 0.05$)

a-c Within a follicle class, values without a common superscript differed ($P < 0.05$)

Data not analyzed

6 DISCUSSÃO GERAL

Para o incremento da população de equídeos associada à rápida progressão genética, a implantação de biotécnicas da reprodução tem sido crucial. Neste contexto, além das biotécnicas mais aplicáveis como IA, TE, ICSI e clonagem, a MOIFOPA também poderá, se tornar aplicável na espécie supracitada, principalmente diante de avanços que ocorreram, destacando-se em especial a obtenção de embriões a partir do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais em outros mamíferos de produção. Esta biotécnica possibilita o maior aproveitamento de oócitos inclusos em folículos pré-antrais através do cultivo *in vitro*, acarretando em maior compreensão dos eventos implicados na foliculogênese, produção de bancos de germoplasma, assim como, a produção de embriões em larga escala.

Considerando que na espécie equina há uma escassez de trabalhos a respeito da anatomia ovariana, população folicular, oogênese e foliculogênese, cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, e, que a mesma não apresenta resultados ainda satisfatórios com relação à superovulação, fatos estes explicados principalmente devido à escassez de ovário e indisponibilidade de um grande número de oócitos para a realização de pesquisas, o objetivo do presente trabalho foi promover, o primeiro cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais equinos inclusos em fragmentos ovarianos oriundos de abatedouro, em meios contendo diferentes concentrações de antioxidantes.

A elucidação de um meio de cultivo *in vitro* eficiente em promover o desenvolvimento e manter a viabilidade dos 90% de folículos pré-antrais que se encontram quiescentes no parênquima ovariano, tem sido o primeiro passo para a realização da MOIFOPA de forma eficiente em diversas espécies. A adição de

antioxidantes varredores de radicais livres em baixas concentrações, como o ácido ascórbico ou o ácido alfa lipoico, foram eficientes em promover o desenvolvimento de FOPA após o cultivo *in vitro* em outros mamíferos.

O primeiro artigo objetivou a realização do primeiro cultivo *in vitro* de FOPA equinos inclusos em fragmentos com a adição de três concentrações diferentes do antioxidante ácido ascórbico (25, 50 e 100 µg/mL) ao meio MEM suplementado. Inicialmente, neste experimento, notou-se que é possível a realização de MOIFOPA através de fragmentos ovarianos equinos oriundos de abatedouro, porém, a baixa densidade populacional de folículos, a diversidade anatômica da zona parenquimatosa e o exacerbado tamanho dos folículos antrais, podem ser entraves na realização desta biotécnica. Também foi possível notar que, os FOPA equinos podem ser mais sensíveis aos meios e períodos de cultivo *in vitro*, corroborando com outros experimentos na mesma espécie. Adicionalmente, o cultivo *in vitro* de FOPA equinos inclusos em fragmentos ovarianos podem ser cultivados por 6 dias em MEM⁺ acrescido de 50 ou 100 µg/mL de ácido ascórbico promovendo desenvolvimento folicular nas condições propostas.

O segundo artigo objetivou a realização de um sistema de cultivo *in vitro* mais eficiente testando o antioxidante ácido alfa lipoico em três concentrações diferentes (50, 100 ou 250 µM), acrescido ao meio MEM suplementado. Cabe ressaltar que, em ambos os experimentos, a adição de altas concentrações de antioxidantes ao meio de cultivo *in vitro* ocasionou maior degenração folicular, corroborando com outros experimentos com cultivo em mamíferos testando antioxidantes. No presente artigo, também foi possível afirmar que a técnica de imunohistoquímica por meio da utilização do marcador antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) pode ser utilizada para a elucidação da atividade

proliferativa das células da granulosa de folículos pré-antrais equinos com êxito. Por fim, a adição de 50 μ M de ácido alfa lipoico ao meio MEM suplementado no cultivo *in vitro* por 6 dias de FOPA inclusos em fragmentos ovarianos equinos foi eficiente em promover o desenvolvimento e viabilidade folicular associada à presença de atividade proliferativa das células da granulosa.

Concluindo, a adição do ácido ascórbico ou ácido alfa lipoico ao meio MEM suplementado no cultivo *in vitro* de FOPA equinos inclusos em fragmentos ovarianos por 6 dias é de suma importância, pois suas propriedades antioxidantes contribuem com o desenvolvimento e mantêm a viabilidade folicular.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos permitem concluir que:

- Folículos pré-antrais inclusos em fragmentos ovarianos equinos oriundos de abatedouro podem ser cultivados *in vitro* em MEM suplementado acrescido de 50 ou 100 µg/mL de ácido ascórbico por 6 dias, promovendo desenvolvimento folicular;
- A adição de 50 µM do antioxidante ácido alfa lipoico ao meio MEM suplementado foi capaz de estimular o desenvolvimento dos folículos pré-antrais inclusos em fragmentos ovarianos equinos oriundos de abatedouro no cultivo *in vitro* por 6 dias.
- Através da técnica de imunohistoquímica utilizando o marcador antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), detectou-se a atividade proliferativa das células da granulosa nos dia 2 e 6 de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais equinos inclusos em fragmentos ovarianos.

8 ANEXOS

Durante a realização desta tese, também foram gerados outros trabalhos paralelos, expostos nos anexos abaixo.

ANEXO 1

**Effect of Deslorelin and/or Human Chorionic Gonadotropin
on Inducing Ovulation in Mares During the Transition
Period Versus Ovulatory Season**

(Publicado: Journal of Equine Veterinary Science)



Short Communication

Effect of Deslorelin and/or Human Chorionic Gonadotropin on Inducing Ovulation in Mares During the Transition Period Versus Ovulatory Season



Roberta Garbelini Gomes MD^a, Reginaldo Luís Oliveira MD^a,
 Carlos Guilherme de Castro Schutzer MD^b, Thales Ricardo Rigo Barreiros PhD^c,
 Marcelo Marcondes Seneda PhD^{a,*}

^a Laboratório de Reprodução Animal, DCV-CCA-Uel, Londrina, Paraná, Brazil

^b Centro Avançado de Reprodução equina Embrio equi, São Simão, São Paulo, Brazil

^c Laboratório de Reprodução Animal, Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP), Campus Luiz Meneghel, Bandeirantes, Paraná, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 January 2014

Received in revised form 21 May 2014

Accepted 13 June 2014

Available online 21 June 2014

Keywords:

Inducing agent

Ovulation

Ovulatory season

Transition period

Mare

ABSTRACT

The objective of this study was to compare the rate of ovulation when deslorelin and/or human chorionic gonadotropin (hCG) was administered in mares in both the transition period and the ovulatory season. A total of 200 Paint Horses, Quarter Horses, and crossbred mares were used during the transition season (July to September) and the ovulatory season (October to February) of the southern hemisphere. The animals were divided into four groups. In the control group ($n = 72$), mares received 1 mL of saline; in deslorelin group ($n = 171$), 1.5 mg of deslorelin was administered by intramuscular (IM) injection; in hCG group ($n = 57$), 1,667 IU of hCG was administered IV; and in hCG + deslorelin group ($n = 438$), 1.5 mg of deslorelin (IM) and 1,667 IU of hCG (IV) were administered. The drugs were administered after follicles ≥ 35 mm in diameter were identified and grade III uterine edema was observed. At 48 hours after application, ultrasonography was performed to detect ovulation. During the transition period, the ovulation rates were 4.3% (control), 78.6% (deslorelin), 50% (hCG), and 73.3% (hCG + deslorelin). During ovulatory season, the ovulation rates were 16.4% (control), 68.8% (deslorelin), 60% (hCG), and 73% (hCG + deslorelin). There was no significant difference ($P > .05$) in the ovulation rate between the groups or the periods, except that the control group was lower than all others. Furthermore, both hCG and deslorelin are viable options for inducing ovulation during the transition period before ovulation season.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Increasing reproductive efficiency is a big challenge in equine reproduction. One of the barriers is the reproductive seasonality of this species [1], which decreases the incidence of ovulation in the breeding season. Therefore, in this context, the use of agents to induce ovulation has numerous benefits.

Between anestrus and normal cyclicity (no ovulation and ovulation), there is a transition period (TP) in the spring when the mares start their reproductive cycles. This is characterized by prolonged periods of estrus that is not always accompanied with ovulation [1]. Hormone therapy has several benefits including the extension of the ovulatory season (OS), which provides better reproductive efficiency of the mares [1]. This includes a reduction in the number of breedings or inseminations per cycle copulates and higher pregnancy rates [2,3].

The hormonal agents commonly used for the induction of ovulation in mares are human chorionic gonadotropin

* Corresponding author at: Marcelo Marcondes Seneda, PhD, Laboratório de Reprodução Animal, DCV-CCA-Uel, Londrina, PR 86051-990, Brazil.

E-mail address: mseneda@uel.br (M.M. Seneda).

(hCG) and gonadotropin-releasing hormone (GnRH). Gonadotropin-releasing hormone is usually administered in the form of a synthetic analog, deslorelin acetate. The selection of an inducing agent can be based on cost, efficacy, age of the mare, follicle size, previous use or success or personal preference, and the time of year [4].

The response to these ovulating agents is more variable in the TP. The most common option has been to administer hCG after the follicles reach a diameter of 30–35 mm [5]. Ovulation is induced in most mares 36–48 hours after treatment [6]. However, when hCG is given in several doses during the same breeding season, the ovulation rate can decrease because of the production of anti-hCG antibody [2,7–9]. Thus, an agonist of GnRH (deslorelin acetate) has been used for ovulation induction because repeated administrations do not diminish its effectiveness. When injectable deslorelin is administered in mares with follicles larger than 30 mm, ovulation occurs in 88% of mares 48 hours after administration in cyclic mares [10], and it does not result in a subsequent delayed return to estrus [2]. When administered, deslorelin induces secretion of gonadotropins by the pituitary gland and hCG promotes the regulation of the hypothalamic-pituitary-ovarian axis [11].

For embryo donor mares, it is considered to be a common practice to use a combination of both drugs (hCG + deslorelin) in the TP. However, there is scarce literature on the effectiveness of using a combination of hCG and deslorelin for induction of ovulation in the TP versus the OS. The objective of this study was to compare the rates of ovulation when mares were treated with or without deslorelin acetate and/or hCG during the TP and the OS.

2. Materials and Methods

A total of 200 Paint Horses, Quarter Horses, and cross-bred mares aged between 2.5 and 18 years with a body condition score of 5–8 (on a scale of 1–9) [12] were used. The animals were located in the southern hemisphere at 21° 28' 45" S and 47° 33' 03" W on two different farms. We considered the TP to be July 1 to September 30 and OS as October 1 to February 28. All animals experienced 5 hours of artificial lighting daily (between 5 PM and 10 PM) from June 21 until the time of first ovulation. The mares were randomly divided into four groups: saline (control), deslorelin (Sincrorrelin; Ouro Fino, Brazil), hCG (Vetecor; Hertape-Calier, Spain), and hCG + deslorelin. In the control group (n = 72), animals received 1 mL of saline (0.9% NaCl) by intramuscular (IM) injection for a total of 23 applications during the TP and 49 in the OS. In deslorelin group (n = 171), the animals received 1.5 mg of IM deslorelin, which included 14 injections in the TP and 157 in the OS. In the hCG group (n = 57), 1,667 IU of hCG IV was given 12 times in the TP and 45 times in OS. Finally, in hCG + deslorelin group (n = 438), 1,667 IU of hCG IV and 1.5 mg of IM deslorelin was given 105 times in the TP 105 and 333 times in the OS.

The mares were examined daily by transrectal ultrasonography until a dominant follicle was detected. The criteria for drug administration were the identification of one or more follicles ≥ 35 mm in diameter and the presence of grade III uterine edema (scale 1–3) [8]. Between 36 and

Table 1

Ovulation rate 48 hours after 738 inductions of 200 mares with deslorelin and/or hCG during the transition period or the ovulation season

Groups	Transition Period	Ovulatory Season
	Ovulation Induction % (n)	Ovulation Induction % (n)
Control	4.34 (1/23) ^{aA}	16.4 (13/49) ^{aA}
deslorelin	78.6 (11/14) ^{aB}	68.8 (108/157) ^{aB}
hCG	50 (6/12) ^{aB}	60 (27/45) ^{aB}
hCG + deslorelin	73.3 (77/105) ^{aB}	73 (243/333) ^{aB}
Total	61.7 (95/154)	67 (391/584)

^{A,B}Different superscript capital letters indicate significant differences between the two columns within a single row.

^{a,b}Different superscript lowercase letters indicate differences between the four rows within a single column ($P < .05$).

48 hours after drug application, we detected ovulation by ultrasonography.

The data were compared by analysis of variance using the statistical program SAEG (System for statistical analysis), and the results were compared using Tukey test. Values of $P \leq .05$ were considered significant.

3. Results and Discussion

In this experiment, 638 inductions of ovulation were performed. There were 154 inductions in the TP and 584 in the OS, with an average of 3.2 per animal. Both hCG and deslorelin were viable options for inducing ovulation during the critical transition phase before the OS. To our knowledge, this is the first report comparing this combination of drugs in different seasonal periods. We highlighted two major points: the feasibility of obtaining ovulations during the TP and that hCG and deslorelin have similar efficacy in inducing ovulation.

We did not find any difference in the effects of deslorelin, hCG, or hCG + deslorelin between the OS and the TP, but all three treatments were superior to saline in inducing ovulation in both seasons ($P < .05$; Table 1). Our results demonstrate that the coadministration of both drugs was not beneficial, which is of interest for farm operations, as hormone treatments are easier and less costly when performed with a single product.

We observed a peak in ovulations between 36 and 48 hours after treatment, which is similar to previous studies using deslorelin [9,13,14] or hCG [5,15] during the OS. Our data show similar ovulation rates for both periods, suggesting that treatment during the TP is a viable alternative way to anticipate the initiation of reproductive activities in mares. Additionally, it is important to emphasize that our data represent a large-scale approach following all steps of an experimental design. Therefore, our results may have a wide contribution to equine reproduction, not only for the induction of ovulation but also for all other aspects involving the efficiency of reproduction in mares, such as a better use of the stallions, higher conception rates, and a lower incidence of uterine infection.

4. Conclusions

We conclude that the TP (spring and winter) can be considered for the efficient induction of ovulation in mares

using deslorelin or hCG. The combination of hCG with deslorelin was also tested, but it presented no advantages.

References

- [1] Faria DR, Gradela A. Hormonioterapia aplicada à ginecologia equina. *Revista Brasileira de Reprodução Anim* 2010;34:114–22.
- [2] Samper JC. Induction of estrus and ovulation: why some mares respond and others do not. *Theriogenology* 2008;70:445–7.
- [3] Squires EL. Hormonal Manipulation of the mare: a review. *J Equine Vet Sci* 2008;28:11.
- [4] McCue PM, Magee C, Gee EK. Comparison of compounded deslorelin and hCG for induction of ovulation in mares. *J Equine Vet Sci* 2007;27:58–61.
- [5] Barbacini S, Zavaglia G, Gulden P, Marchi V, Necchi D. Retrospective study on the efficacy of hCG in equine artificial insemination program using frozen semen. *Equine Vet Educ* 2000;12:312–7.
- [6] Evans MJ, Gastal EL, Silva LA, Gastal MO, Kitson NE, Alexander SL, Irvine CHG. Plasma LH concentrations after administration of human chorionic gonadotrophin to estrous mares. *Anim Reprod Sci* 2006;94:191–4.
- [7] Siddiqui MA, Gastal EL, Gastal MO, Beg MA, Ginther OJ. Effect of HCG in the presence of HCG antibodies on the follicle, hormone concentrations, and oocyte in mares. *Reprod Domest Anim* 2009;44:474–9.
- [8] Ley WB. *Reprodução em éguas para veterinários de equinos*. São Paulo: Roca; 2006.
- [9] Farquhar VJ, McCue PM, Vanderwall DK, Squires EL. Efficacy of the GnRH agonist deslorelin acetate for inducing ovulation in mares relative to age of mare and season. *J Equine Vet Sci* 2000;20:722–4.
- [10] Berezowski CJ, Stitch KL, Wendt KM, Vest DJ. Clinical comparison of 3 products available to hasten ovulation in cyclic mares. *J Equine Vet Sci* 2004;24:6.
- [11] Figueiredo T, Paiva R, Kozicki LE, Kaercher F, Weiss RR, Santos IW, Muradas PR. Induction of ovulation in quarter horse mares through the use of deslorelin acetate and human chorionic gonadotrophin (hCG). *Braz Arch Biol Technol* 2011;54:517–21.
- [12] Lawrence LA. *Nutrient requirements and balancing rations for horses*. VA Coop Ext, Virginia; 1996. p. 406–73.
- [13] Blanchard TL, Brinsko SP, Rigby SL. Effects of deslorelin or hCG administration on reproductive performance in first postpartum estrus mares. *Theriogenology* 2002;58:165–9.
- [14] Samper JC, Jensen S, Sergeant J, Estrada A. Timing of induction of ovulation in mares treated with ovuplant or chorulon. *J Equine Vet Sci* 2002;22:320–3.
- [15] Janderwall DK, Juergens TD, Woods GL. Reproductive performance of commercial broodmares after induction of ovulation with hCG or Ovuplant (deslorelin). *J Equine Vet Sci* 2001;21:539–42.

ANEXO 2

Evaluation of reproductive cyclicity in female mules through morphology, ovarian structures and their use as embryo recipients

(Submetido à Revista Theriogenology)

Elsevier Editorial System(tm) for Theriogenology
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Evaluation of reproductive cyclicity in female mules through morphology, ovarian structures and their use as embryo recipients

Article Type: Original Research Article

Keywords: Mules; Follicle; Corpus luteum; Cyclicity; Recipient

Corresponding Author: Dr. Marcelo Marcondes Seneda, PhD

Corresponding Author's Institution: Londrina State University

First Author: Suellen M González

Order of Authors: Suellen M González; Roberta G Gomes; Anne K Souza; Camila B Silva; Katia C Silva-Santos; Marcelo Marcondes Seneda, PhD

Abstract: Mules are hybrid females, resulting from a cross between a donkey and mare. Few recent studies address the particularities of the reproductively infertile females. The proportion of cyclic animals as well as the possibility of the use of mules in reproductive biotechnologies are unknown. This article presents data on the comparative morphology of the ovary between mules and mares, the evaluation of the ovarian structures of female mules and the story of two births of foals after the transfer embryos from a donkey to mule recipients. During the reproductive season of riding horses in the Southern Hemisphere, the ovaries of female horses and mules were obtained from a local slaughterhouse. Differences between the ovaries of female horses versus mules were identified. We found evidence of cyclicity in 61.1% (44/72) of the mules, 45.8 (33/72) of whom had corpora lutea and 15.3 (11/72) had antral follicles. Three out of 11 recovered mule oocytes remained intact with regular distribution of granulosa cells. Due to the evidence of cyclicity in mules, embryos collected from a donkey were transferred into two cyclic female mules after the induction of ovulation. Eutocic births of donkey foals from the mules occurred after 372 and 379 days of gestation. The presence of corpora lutea, follicles and oocytes in the ovaries of female mules are associated with characteristics of cyclicity in these females. Thus, the occurrence of regular cycles in female mules provides the potential to be used in reproductive biotechnologies, such as embryo recipients.

November 3, 2014

Theriogenology

Fulvio Gandolfi

Editor-in-Chief

Dear Dr. Gandolfi,

The enclosed manuscript is hereby submitted to be considered for publication in Theriogenology. The information in the submitted manuscript has never been published, except in the proceedings of a scientific meeting with limited circulation.

We suggest that it is possible that mules may present a higher level of cyclicity than usually expected. Also, we highlighted the potential of mules as recipient of asinine embryos.

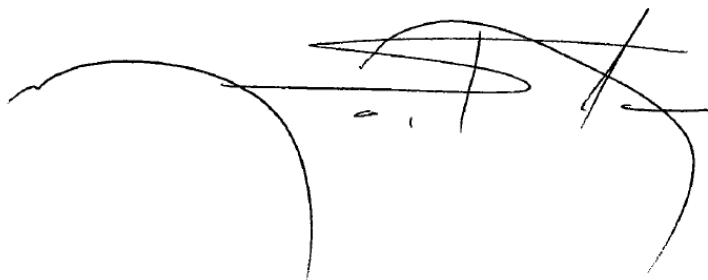
All authors are aware of the submission and agree to be listed as co-authors, as affirmed by the signature of the corresponding author.

TITLE: Evaluation of reproductive cyclicity in female mules through morphology, ovarian structures and their use as embryo recipients.

AUTHORS:

S.M. González, R.G. Gomes, A.K. Souza, C.B. Silva, K.C. Silva-Santos, M. M. Seneda

Corresponding Author:

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Seneda', with a large, sweeping flourish extending to the left and another to the right.

Marcelo Marcondes Seneda

Laboratório de Reprodução Animal DCV/CCA/UEL

Londrina PR Brazil 86051-990

PHONE + 55 43 3371-4064

FAX: + 55 43 3371-4063

E-mail: mseneda@uel.br

Highlights: “Evaluation of reproductive cyclicity in female mules through morphology, ovarian structures and their use as embryo recipients”

- To the best of our knowledge this is the first article presenting birth of donkey foals from cyclic mules used as recipients;
- We also present consistent data of cyclicity, including presence of large follicles, corpora lutea and of health oocytes in mule ovaries;
- For a better understanding, we performed morphological comparisons between mule and mare ovaries;
- Taking all together, we suggest that it is possible that mules may present a higher level of cyclicity than usually expected. Also, we highlighted the potential of mules as recipient of asinine embryos.

1 Evaluation of reproductive cyclicity in female mules through morphology, ovarian
2 structures and their use as embryo recipients

3

4 S.M. González, R.G. Gomes, A.K. Souza, C.B. Silva, K.C. Silva-Santos, M. M. Seneda

5

6 Laboratory of Animal Reproduction, State University of Londrina, Londrina, PR,

7 Brazil.

8

9 Correspondence Author:

10 Marcelo Marcondes Seneda

11 Laboratório de Reprodução Animal, DCV, CCA

12 Universidade Estadual de Londrina (UEL)

13 Londrina, PR, Brazil, 86051-990

14 Phone: +55 43 3371-4064

15 Fax: +55 43 3371-4063

16 Email: mseneda@uel.br

17

18 Original Research

19

20

21

22

23

24

25

26 Abstract

27

28 Mules are hybrid females, resulting from a cross between a donkey and mare. Few
29 recent studies address the particularities of the reproductively infertile females. The
30 proportion of cyclic animals as well as the possibility of the use of mules in
31 reproductive biotechnologies are unknown. This article presents data on the
32 comparative morphology of the ovary between mules and mares, the evaluation of the
33 ovarian structures of female mules and the story of two births of foals after the transfer
34 embryos from a donkey to mule recipients. During the reproductive season of riding
35 horses in the Southern Hemisphere, the ovaries of female horses and mules were
36 obtained from a local slaughterhouse. Differences between the ovaries of female horses
37 versus mules were identified. We found evidence of cyclicity in 61.1% (44/72) of the
38 mules, 45.8 (33/72) of whom had corpora lutea and 15.3 (11/72) had antral follicles.
39 Three out of 11 recovered mule oocytes remained intact with regular distribution of
40 granulosa cells. Due to the evidence of cyclicity in mules, embryos collected from a
41 donkey were transferred into two cyclic female mules after the induction of ovulation.
42 Eutocic births of donkey foals from the mules occurred after 372 and 379 days of
43 gestation. The presence of corpora lutea, follicles and oocytes in the ovaries of female
44 mules are associated with characteristics of cyclicity in these females. Thus, the
45 occurrence of regular cycles in female mules provides the potential to be used in
46 reproductive biotechnologies, such as embryo recipients.

47

48 Keywords: ovarian, mules, follicle, corpus luteum, cyclicity, receiving.

49

50 1. Introduction

51

52 Mules (*Equus mulus mulus*) are hybrids resulting from a cross between a donkey
53 (*Equus asinus*) and a horse (*Equus caballus*). Female mules were created to exhibit
54 husbandry patterns such as hardiness, resistance, adaptation to regions of semiarid and
55 arid climates and provide comfort in riding due to progress in motion [1, 2]; however,
56 little information on ovarian morphology and the reproductive aspects of female mules
57 exists.

58 The presence of follicles and corpora lutea in the ovaries of mules was first
59 described in 1675 [3]; however, not until many years later was the ability of oestrus
60 manifestation of these females, which are classically considered to be infertile [4, 5]. In
61 1850, De Nanzio [6] drew a sketch of the mule reproductive tract with information
62 about the size, shape and anatomy of the ovaries; however, De Nanzio did not specify
63 how many females were not observed and the dimensions of the sketched organs. The
64 proportion of cyclic animals, as well as the possibility of the use of mules in
65 reproductive biotechnologies remains unclear.

66 In this article, we present data from two studies: i) the comparison of ovarian
67 morphology between female mules and horses, and the evaluation of ovarian structures
68 of female mules; and ii) the report of two donkey foal births after the transfer of
69 embryos collected from female asses into receptor mules.

70

71 2. Materials and Methods

72

73 2.1 Experiment I - Macroscopic and functional evaluation of the ovaries of female 74 horses and mules.

75

76 *2.1.1 Collection and transportation of the ovaries*

77

78 During the reproductive season of riding horses in the southern hemisphere,
79 (latitude 23° 17' 34" S and longitude 51° 10' 24" W), the ovaries of female horses and
80 mules were obtained from a local slaughterhouse, 40 km away from the laboratory
81 (approximately 30 minutes). All of the animals exhibited signs of ovarian cyclicity
82 (presence of follicles and corpora lutea). The transport was carried out in a thermal
83 container in natura (room temperature, 20 °C).

84

85 *2.1.2 Processing of the ovaries*

86

87 In the laboratory, the ovaries were removed from the thermal container and kept
88 in a water bath at 36 °C. Using scissors, tweezers and a scalpel, the ligaments and
89 connective tissues of the ovaries were removed, and the ovaries were weighed on an
90 analytical balance (Bel[®], Monza-Italy).

91

92 *2.1.3 Morphological evaluation*

93

94 *2.1.3.1 Macroscopic evaluation of the ovaries*

95

96 First, the ovaries from the mares (n=26) and mules (n=26) were evaluated
97 macroscopically and classified according to size.

98

99 *2.1.3.2 Evaluation of the ovarian structures*

100

101 After the initial evaluation, ovaries (n=72) from the female mules were inspected
102 for the presence of external follicles and corpora lutea. The follicles were aspirated with
103 a 20 mL syringe containing heparin solution and a 40x12 mm needle (18 G). The
104 follicular fluid was maintained in a water bath at 36 °C until it was filtered with
105 Phosphate-Buffered Saline (PBS; Embriolife[®], Vitrocell, Brazil) prior to assessing the
106 presence of oocytes using a stereomicroscope (Nikon[®], Tokyo-Japan). This study did
107 not assess oocyte maturation and viability. The sagittal plane yielded two hemi-ovaries
108 for viewing internal tissue and possible ovarian follicles and CLs.

109

110 2.1.3.3 *Histological assessment of the ovaries*

111

112 The mule ovaries (n=3/72) were sectioned into two hemi-ovaries (1.5 cm x 1
113 cm), fixed in Bouin's solution for 24 hours and kept in 70% alcohol until they were
114 processed for histology. Subsequently, the tissues were dehydrated in increasing
115 concentrations of alcohol, diaphanized in xylene and embedded in paraffin. Serial
116 sections of 5 µm thick were generated using a rotary microtome (Leica[®], Wetzlar-
117 Germany), and every 50th histological section was mounted onto a blade. Specimens
118 were stained with periodic acid-Schiff (PAS) and hematoxylin. The slides were
119 evaluated under a light microscope (Nikon[®], Tokyo, Japan).

120

121 2.2 *Experiment II – Female mules as recipients of donkey embryo*

122

123 Based upon the occurrence of follicles, oocytes and corpora lutea in the ovaries
124 of mules, we sought to transplant embryos into these animals. On a property located in
125 Maua da Serra, Brazil-Paraná (Latitude: 23° 54'05" S, Longitude: 51° 13'46" W), two

126 mules 4 years of age with regular cycles were subjected to follicular control after
127 detection of estrus in a donor donkey. This same donkey was the embryo donor for two
128 mule recipients. Thus, reproduction management for embryo transfer was also used for
129 the two receptor mules.

130 The donor donkey presented pre-ovulatory follicles of 38 mm in diameter and
131 grade 4 uterine edema (scale 1-4) [7]. The induction of ovulation was conducted using
132 human chorionic gonadotropin (hCG; Vetecor[®], 2500 IU Hertape-Calier, Spain), which
133 was injected intramuscularly (IM).

134 The next day, the donkey was subjected to natural mating using a donkey.
135 Ovulation was identified by ultrasonography 48 h post-ride (D0 = day of ovulation). At
136 D8.5, the embryos were collected using the transcervical approach and a closed system
137 with approximately 1 liter of lactated ringer's solution (total of 2 liters). The recovered
138 embryos were washed in 10 drops of 100 μ L of Holding plus (Embriolife[®], Vitrocell,
139 Brazil) and transferred to recipient mules, which showed signs of estrus two days after
140 the donors.

141 The recipient mules were subjected to the induction of ovulation using hCG
142 2500 IU, IM, after ultrasound identification of a follicle of 37 mm in diameter and grade
143 3 uterine edema. Ovulation was confirmed by ultrasonography (D0=day of ovulation).
144 On the day of embryo transfer (D5), the mule had a rigid uterine tone and corpus luteum
145 of approximately 30 mm. Embryo transfer into the uterine body was aided by transrectal
146 palpation, due to the difficulty in passing through the small diameter of the cervix.

147 A diagnosis of pregnancy for the mule receptors was made five days after the
148 embryo transfer and confirmed at 60 days post-transfer, both by transrectal
149 ultrasonography. The pregnancies of the mule recipients were identified at day 16 and
150 confirmed at days 25 and 160 by transrectal ultrasonography.

151

152 3. Results

153

154 The ovaries of mares were kidney-shaped and weighed an average of 17.6 g. In
155 mules, the ovaries were elongated, rounded and kidney-shaped, with similar average
156 weights of 8.77 g. The mule ovaries had higher adhesion and vascular connective tissue,
157 and ligaments in relation to the mare ovaries.

158 Regarding ovarian structures, corpora lutea were found in 45.83% (33/72) and
159 antral follicles in 15.27% (11/72) of the ovaries of female mules (Figure 1A and B). The
160 average weight of 72 mare ovaries was 6.55 g. After aspiration of the follicles, 11
161 oocytes were detected, of which three were recovered that remained intact with cumulus
162 expansion; the others were atretic (Figure 1D).

163 After histological processing of the mule ovaries, 174 slides were analyzed.
164 Preantral (primordial and primary) follicles arranged in small clumps were observed in
165 only six histological sections. Twenty-one primary follicles and antral follicles in the
166 ovary of one mule were observed, whereas three primary follicles were observed in the
167 other evaluated ovary (Figure 1C).

168 Based on the evidence of cyclicity in mules, the transfer of donkey embryos into
169 two female mules after the induction of ovulation was carried out. Eutocic deliveries of
170 donkey foals after 372 and 379 days of gestation occurred (Figure 1E and F).

171

172 4. Discussion

173

174 According to our knowledge this is the first article to report the birth of donkeys
175 from cyclic mule used as embryo recipient. Also, we found evidence of cyclicity in

176 61.1% (44/72) of the mules, 45.8 (33/72) of whom had corpora lutea and 15.3 (11/72)
177 had antral follicles. Three out of 11 recovered mule oocytes remained intact with regular
178 distribution of granulosa cells.

179 In the present work, all of the mare ovaries exhibited a kidney-shaped form, in
180 agreement with previous reports [7, 8]. Mule ovaries have been described as having an
181 almond form [6], which differs from the elongated and rounded kidney-shaped ovarian
182 forms observed in this study. Any differences in the reproductive physiology of these
183 species can be related to differences in ovarian size.

184 For mules, the presence of follicles and corpora lutea has been questioned due to
185 the lack of a description of cyclicity. The first evidence of cyclicity was proposed by
186 Stensen [3]. Subsequently, Taylor and Short [9] described the presence of follicles and
187 corpora lutea in the ovaries of fetal mules. In our experiment, the macroscopic
188 evaluation of the ovaries of adult female mules (n=72) revealed a high incidence of
189 cyclicity, with 15.27% and 45.83% of the mules exhibiting follicles and corpora lutea,
190 respectively. In addition, we report the recovery of 11 oocytes from adult mules, of
191 which three were intact. Taylor and Short [9] cited the presence of oocytes in the fetuses
192 of mules, but without viability. Therefore, such characteristics described in our
193 experiments suggest the presence of cyclicity in mules.

194 In relation to estrus detection and characteristic behavioral signs of estrus, an
195 expected difference occurs in mules, as is observed between donkeys and mares. Doubts
196 regarding the detection of estrus or whether estrus manifestation is perceptible may
197 persist.

198 The application of equine embryos transferred surgically into recipient mules
199 has been described by Davies et al. [10]. In contrast to our work, these authors utilized
200 hormonal treatment for the occurrence of the estrous cycle and synchronization of estrus

201 in female mules. After the transfer of nine embryos collected from four mares, four
202 pregnancies occurred that resulted in the birth of two foals. The difficulty in transferring
203 equine embryo into mules is described by Camillo et al. [11], in which the authors point
204 to the cyclicity of female mules and also the ovulation synchronization between donor
205 and recipient as decisive factors. These authors also reported the successful use of cyclic
206 mules as recipients of equine embryos.

207 Embryo transfer between horses was described by Allen [12, 13], in which
208 mares were used as donkey embryo recipients; however, this attempt was not
209 successful. The reported few developed or absent endometrial cups provides a
210 justification of preventing the development of the conceptus; however, in the same
211 study, a donkey that received equine embryo had larger and well-developed endometrial
212 cups and exhibited conceptus development. In our report, the mules proved to be
213 suitable recipients of gestated donkey embryos, suggesting that they display well-
214 developed endometrial cups, reaching the requirement for donkey conceptus. In this
215 context it may be stated that the female mule will emerge as a new alternative to gestate
216 donkeys, thus solving the low pregnancy rates obtained with mares.

217 The length of gestation of the mules used as recipients of donkey embryo (372
218 and 379 days) was longer than previously reported (348 days) [11], most likely due to
219 the difference in embryo species (donkey vs. equine). Others have suggested that when
220 a mule fetus gestates one of the equine species, the gestation period approximates the
221 expected value of a mare, however, as described in this study, the mule had a longer
222 gestation similar to the physiological gestation period of a donkey. We also confirmed
223 the excellent maternal ability of female mules, as described by Camillo et al. [11].
224 Observations include the protective behavior in relation to the mule foal, and sufficient

225 amounts of milk in the udders prior to and after the birth. Additionally, the foal feedings
226 were performed efficiently and the foals became satiated.

227 The morphological evaluation of the ovaries of female mules revealed that there
228 are differences in the format when compared to the ovaries of mares. The presence of
229 corpora lutea, follicles and oocytes in the ovaries of female mules are associated with
230 characteristics of cyclicity, which is in agreement with the birth of two donkeys after the
231 successful transfer of embryo into mule recipients. Thus, we suggest the mules may be
232 evaluated to be potentially used in reproduction biotechnologies.

233

234 References

235

236 [1] Dijkman JT. A note on the influence of negative gradients on the energy expenditure
237 of donkeys walking, carrying and pulling loads. *Animal Production* 1992; 54:153-156.

238

239 [2] Varshney JP, Gupta AK. The donkey and its potential – a review. *International J.*
240 *Anim. Sci.* 1994; 9:157-167.

241

242 [3] Stensen. *Ova viviparorum spectantes observationes. Th. Bartholini Acta Hafniens*
243 *1675; 2:219-232.*

244

245 [4] Nishikawa Y, Sugie T. Studies on reproductive ability of mules. On functions of
246 ovaries. *Bull. Natn. Instagrie.Sci.* 1952; 3:61.

247

248 [5] Bielanski, W. Observations on ovulation processes in she-mules. *Bull. Acad. poi.*
249 *Sci. Cl. II Sér. Sci. biol.* 1955; 3:243.

250

251 [6] De Nanzio, F. *Intorno al concepimento ed alla figliatura di una mula*. Nápoles:
252 Stamperia e Cartiere Del Fibreno 1850; pp.29.

253

254 [7] Kainer RA. *Internal Reproductive anatomy*. In: Mckinnon AO, Voss JL. *Equine*
255 *Reproduction* 1993; pp.165.

256 .

257 [8] Dyce KM, Sack WO, Wensing CJG. *Tratado de anatomia veterinária*, 2th ed.; 1996.

258

259 [9] Taylor MJ, Short RV. *Development of the germ cells in the ovary of the mule and*
260 *hinny*. *F. Reprod. Fert.* 1973; 32:441-445.

261

262 [10] Davies CJ, Antezak DF, Allen WR. *Reproduction in mules: embryo transfer using*
263 *sterile recipients*. *Equine Vet. J.* 1985; 3:63-67.

264

265 [11] Camillo F, Vannozzi I, Rota A, Di Luzio B, Romagnoli S, Aria G, Allen WR.
266 *Successful Non-Surgical Transfer of Horse Embryos to Mule Recipients*. *Reprod. Dom.*
267 *Anim.* 2003; 38:380-385.

268

269 [12] Allen WR. *Immunological aspects of the endometrial cup reaction and the effects*
270 *of xenogeneic pregnancy in horses and donkeys*. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 1982a; 31:57-
271 94.

272

273 [13] Allen WR, Skidmore JA, Stewart F, Antczak DF. Effects of fetal genotype and
274 uterine environment on placental developments in equids. J Reprod Fert. 1993; 97:55–
275 60.

276

277

278

279

280

281

282

283

284

285

286

287

288

289

290

291

292

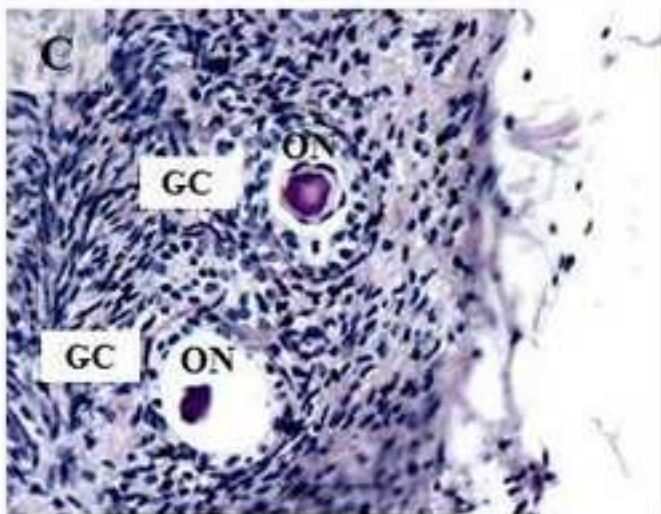
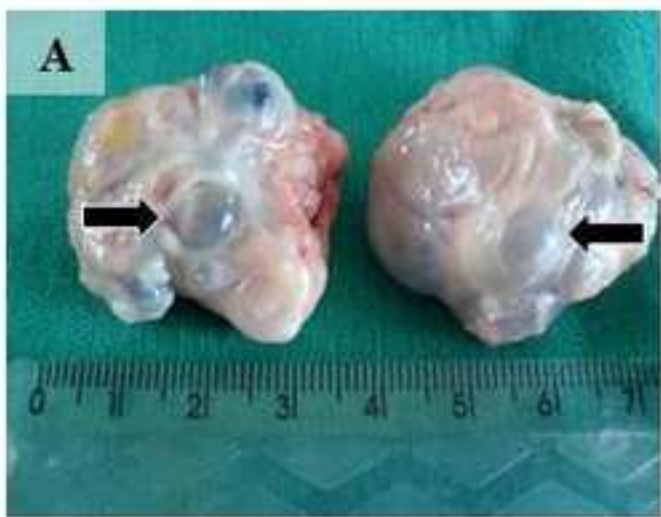
293

294

295

296

297 **Figure 1.** Reproductive cyclicity in female mules. **A:** the presence of follicles in the
298 ovaries of mules (arrows); **B:** the presence of corpora lutea in the ovaries of mules; **C:**
299 photomicrograph of histologic section of ovarian tissue with primary follicles.
300 Coloration PAS (Periodic Acid Schiff). 40x magnification; **D:** oocyte recovered that
301 remained intact with cumulus expansion; **E and F:** the female recipients mules with
302 donkey foals.
303



ANEXO 3

Taxa de recuperação embrionária em éguas submetidas à caminhada com útero repleto de Ringer Lactato

(Publicado na Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais)

Taxa de recuperação embrionária em éguas submetidas à caminhada com útero repleto de Ringer Lactato

Recovery rate of embryos in mares walking with a filled uterus

Roberta Garbelini Gomes^[a], Camila Bizarro da Silva^[b], Thales Ricardo Rigo Barreiros^[c], Marcelo Marcondes Seneda^[d]

^[a] Médica veterinária, doutoranda em Ciência Animal, Programa de Pós-Graduação da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR – Brasil, e-mail: robs_vet@hotmail.com

^[b] Médica veterinária, mestranda em Ciência Animal, Programa de Pós-Graduação da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR – Brasil, e-mail: camilabizarros@gmail.com

^[c] Médico veterinário, doutor em Ciência Animal, professor na Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP), Bandeirantes, PR – Brasil, e-mail: thalesrigo@gmail.com

^[d] Médico veterinário, doutor em Reprodução Animal, professor adjunto na Universidade Estadual de Londrina (UEL), Laboratório de Reprodução Animal (DCV/CCA), Londrina, PR – Brasil, e-mail: mseneda@uel.br

* Autora para correspondência

Resumo

Está comprovada, na espécie bovina, o acréscimo de recuperação de embriões ao redor de 30,0 % quando as doadoras são submetidas a um certo período de caminhada com útero repleto de líquido após a última lavagem uterina. Relatos da literatura preconizam similar estratégia para éguas doadoras de embriões. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de submeter éguas à caminhada com útero repleto de Ringer Lactato na recuperação de embriões. Os procedimentos transcervicais (n=115) de recuperação embrionária foram efetuados em éguas Quarto de Milha (n=34) e, em 87 casos (grupo caminhada), realizou-se caminhada de 15 a 20 minutos com o útero repleto de Ringer na etapa da terceira lavagem. Os resultados foram comparados com 28 procedimentos obtidos através do procedimento convencional (lavagem sem caminhada - grupo controle). No grupo controle obteve-se uma eficiência de recuperação embrionária de 67 % (19/28), enquanto no grupo caminhada a taxa foi de 54 % (47/87). A taxa de recuperação de embriões entre os lavados não demonstrou uma diferença significativa. Conclui-se que a estratégia da caminhada com útero repleto em éguas doadoras de embriões no dia da coleta não traz vantagens.

Palavras-chave: Taxa de recuperação embrionária. Transferência de embriões. Equinos.



Abstract

In cattle, there is approximately a 30.0 % increase in number of embryos when the donor performs a period of walking while the uterus is filled with liquid during the last uterine flushing. Some reports have advocated a similar strategy for collecting donor mare embryos. This study evaluated the effect of walking the mares while the uterus was filled with Ringer's lactate solution for the recovery of embryos. Transcervical procedures (n = 115) for embryo recovery were performed in Quarter Horse mares (n = 34), and 87 procedures (Walking group) were performed following a 15-20 minute walk while the uterus was filled with Ringer's lactate solution during the third wash step. The results were compared with those obtained from 28 mares that underwent the conventional procedure (washing without walking - control group). In the control group it was obtained an embryo recovery efficiency of 67 % (19/28), while in the walking group the rate was 54 % (47/87). The embryo recovery rate was not significantly different between the groups (P < 0.05). In conclusion, the strategy of walking a donor mare with a filled uterus on the day of embryo collection is not advantageous.

Keywords: Recovery rate embryo. Embryo transfer. Equine.

Introdução

A técnica de transferência de embriões (TE) é uma biotécnica de grande importância na espécie equina, e vem apresentando um crescimento promissor nos últimos anos (FERREIRA; MEIRA, 2011). O Brasil tem grande expressão neste segmento, com 15.200 procedimentos de colheita de embriões em 2010, os quais resultaram em 12.422 embriões transferidos (STROUD; CALLESEN, 2012).

Apesar do expressivo crescimento da técnica, poucos avanços têm sido relatados nas últimas décadas quanto à obtenção de embriões. Entre os aspectos mais críticos estão a eficiência na lavagem uterina e as taxas de recuperação embrionária (FLEURY et al., 2001). Na espécie bovina, o principal incremento foi obtido por Castro Neto et al. (2005) ao proporem uma segunda drenagem do conteúdo uterino realizada após um período de espera, mantendo o útero repleto com o meio de lavagem. Após este procedimento, obteve-se incremento de aproximadamente 30% de embriões em comparação à coleta convencional.

Na espécie equina, as alternativas para aumentar a taxa de recuperação embrionária consistiram em massagem transretal do útero após as lavagens (VANDERWALL, 2000) ou a submissão da égua a uma caminhada curta, promovendo movimentação uterina (ALVARENGA; CARMO; LANDIM-ALVARENGA, 2008).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficiência da recuperação de embriões em éguas submetidas ou não à caminhada com útero repleto após a segunda lavagem, drenando o conteúdo na terceira.

Material e métodos

Animais e grupos experimentais

Foram utilizadas éguas (n = 34) da raça Quarto de Milha, mantidas em pasto com água e sal mineral *ad libitum* acrescidas de concentrado (1% do peso vivo ao dia). As doadoras de embriões foram divididas em dois grupos. No grupo controle, 9 éguas foram submetidas a 28 procedimentos de colheita de embriões, com média de 3,1 procedimentos de colheita por doadora, sendo que cada procedimento foi composto por três lavados uterinos sem caminhada (protocolo padrão). No grupo caminhada, 25 éguas foram submetidas a 87 procedimentos de colheita de embriões (média 3,48 procedimentos de colheita por doadora). Cada procedimento de colheita de embriões também foi composto por três lavados uterinos, sendo que após a 3ª repleção uterina com Ringer Lactato as doadoras foram submetidas a caminhadas de 15 a 20 minutos com o útero repleto. Em seguida, procedeu-se a drenagem do conteúdo uterino. As caminhadas foram realizadas com o animal guiado pelo cabresto e a sonda coletora foi mantida na cérvice.

Controle folicular e inseminação artificial

As doadoras foram submetidas a exames ultrassonográficos a cada dois dias (Ultrassom portátil Mindray®, transdutor linear - frequência de 5 MHz - modelo DP2200 VET), visando a detecção de um ou mais folículos ≥ 35 mm e presença de edema uterino grau 3 (escala 0 a 5) (SAMPER, 1997). Diante desses achados, foi realizada a indução da ovulação com hormônio Gonadotrofina coriônica humana (hCG; 1667 UI, IV ou IM; Vetecor®, Hertape Calier Saúde Animal S/A, Juatuba/MG, Brasil) associado à deslorelina (1 mg/IM, Sincrorrelin, Ourofino®, Cravinhos/SP, Brasil). No dia subsequente, foi realizada a inseminação artificial com sêmen fresco ou refrigerado, oriundos de três garanhões de fertilidade comprovada submetidos ao exame andrológico a cada colheita de sêmen. A ovulação foi detectada, em média, 36 horas após a indução, considerada como D0.

Colheita de embriões

As colheitas dos embriões (lavagem uterina) foram realizadas 7 e 8 dias após a ovulação (d7 e d8), por meio de sistema fechado de uma via (procedimento não cirúrgico, transcervical), consistindo em três lavagens uterinas com 1,5 a 2,0 litros de Ringer Lactato por lavado.

Antes de cada procedimento de colheita de embriões, já no tronco de contenção, as doadoras foram submetidas à retirada das fezes da ampola retal, enfaixamento da cauda, higienização do períneo e vulva com água e sabão neutro e secagem com papel toalha. Em seguida, uma sonda estéril (Bivona®) preenchida com Ringer Lactato foi introduzida através da vagina com luva lubrificada e estéril (Propilenoglicol, Polietilenoglicol, Hidroxipropilcelulose e Ácido Láctico, KY-gel®; Jonhson & Jonhson, Brasil). A sonda foi posicionada na cérvix no início do corpo uterino e inflado o balonete com 30 a 45 ml de ar dependendo da dilatação da cérvix. Em seguida, a sonda era tracionada cuidadosamente para que permanesse em uma posição capaz de vedar o orifício interno da cérvix, visando evitar o refluxo do líquido a ser infundido no útero.

Cada lavado uterino consistiu na repleção uterina com 1,5 a 2,0 litros de Ringer com Lactato à temperatura ambiente compatível com o tamanho do

útero da doadora. Uma vez preenchido, o útero era massageado via transretal e, em seguida, realizada a recuperação do fluido em filtros coletores de embriões de 75 μ m. Para a recuperação completa do fluido infundido, foi realizada a massagem uterina. O fluxo de drenagem foi controlado através de presilhas acopladas à sonda. O conteúdo de cada uma das lavagens foi recuperado em um filtro coletor diferente previamente identificado, com a permanência de no mínimo 20 ml de fluido no filtro após cada lavado para evitar a desidratação do embrião.

Localização e avaliação embrionária

O conteúdo de cada lavagem foi depositado em placas de petri (100 x 20 mm), as quais foram separadas e identificadas individualmente. Cada placa foi submetida a lavados com delicados jatos de Ringer com Lactato mediante seringa de 20 ml acoplada à agulha 40 x 12 mm, para posterior varredura de estruturas em lupa estereoscópica (Modelo HLX Electra). Os embriões encontrados foram classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento (mórula, blastocisto inicial, blastocisto ou blastocisto expandido) e com o grau de qualidade (escala de 1 a 5, sendo 1 excelente e 5 morto ou degenerado) (SQUIRES, 1993). Além disso, foram realizadas anotações a respeito do lavado que pôde ser recuperado.

Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise de variância não paramétrica (Kruskal-Wallis), sendo significativo quando $p < 0,05$.

Resultados

Foram realizados 115 procedimentos de colheita de embriões em todo o experimento. No grupo controle, foram realizados 28 procedimentos de colheita de embriões em nove doadoras, as quais foram submetidas a três lavados uterinos, sem caminhada no 3º lavado por procedimento de colheita. No grupo caminhada, foram realizados 87 procedimentos de colheitas de embriões em 25 éguas, seguida de caminhada antes da drenagem no filtro coletor do 3º lavado de cada procedimento de colheita. Os resultados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Número de embriões e taxa de recuperação nas três lavagens uterinas realizadas em éguas submetidas ou não à caminhada por 15 a 20 minutos com útero repleto de Ringer Lactato.

Grupo	Éguas n	Procedimentos n	Taxa de Recuperação (%)	Embriões n	1º Lavagem % (n)	2º Lavagem % (n)	3º Lavagem % (n)
Controle	09	28	67,8% (19/28)	19	52,6 (10/19) ^{Aa}	36,8 (7/19) ^{Ab}	10,5 (2/19) ^{Bc}
Caminhada	25	87	54,0% (47/87)	47	44,6 (21/47) ^{Aa}	34,0 (16/47) ^{Ab}	21,2 (10/47) ^{Bc}

Nota: $p < 0,05$.

Legenda: Letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença entre os lavados no mesmo grupo;

Letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença entre os lavados dos diferentes grupos.

Fonte: Dados da pesquisa.

Discussão

Os trabalhos com a metodologia de repleção uterina e caminhada haviam sido realizados somente na espécie bovina (CASTRO NETO et al., 2005; CRUZ et al., 2008). Este é o primeiro estudo em que se propõe a caminhada com o útero repleto na espécie equina, visando liberar possíveis estruturas embrionárias “presas” entre as pregas endometriais e oviduto.

As taxas de recuperação embrionária no presente experimento (54% a 67,8%) estão próximas dos resultados de Vazquez et al. (2010), os quais reportam taxas de recuperação embrionária variando de 61 a 76% em programa de transferência de embriões na espécie equina, levando-se em consideração diferentes variáveis como temperatura do ambiente, tipo de sêmen, exercício e ovulação. Independentemente do método de colheita empregado, diversos estudos demonstram que a taxa de recuperação embrionária na espécie equina varia entre 40 a 80% (HINRICHS, 1990; RIERA; McDONOUGH, 1993; SQUIRES, 1993; TISCHNER; TISCHNER, 1996; FLEURY, 1998; FLEURY et al., 2001; SQUIRES et al., 2003; CAMARGO et al., 2013b).

O presente trabalho empregou a utilização de sêmen fresco ou refrigerado de três garanhões de fertilidade comprovada. Conforme Camargo et al. (2013a), sêmen fresco ou refrigerado apresentam resultados semelhantes na inseminação artificial para programas de transferência de embriões.

A manutenção do útero distendido com fluido durante a caminhada poderá promover a movimentação do órgão, contribuindo em desfazer as pregas endometriais e/ou favorecer a liberação de embriões eventualmente aderidos no limite entre o útero e a tuba (CASTRO NETO et al., 2005; CRUZ et al.,

2008). Castro Neto et al. (2005) obtiveram, em bovinos, 30% de melhora na taxa de recuperação embrionária com o preenchimento do útero por fluido seguido de caminhada. Contrariamente, no presente estudo, não houve benefícios em submeter as doadoras a uma caminhada com útero repleto no terceiro lavado, pois a eficiência de recuperação embrionária não diferiu do grupo controle. Uma possível razão para isto deve-se ao fato de que a maioria dos embriões na espécie equina são recuperados no primeiro lavado (IMEL et al., 1981; MEIRA; HENRY, 1991; FLEURY et al., 2001). Imel et al. (1981), Meira & Henry (1991) e Fleury et al. (2001), corroboram nossos resultados ao relatarem que a maioria dos embriões na espécie equina é recuperada no 1º e 2º lavados, sendo esta a provável explicação para a não obtenção de resultados pós-caminhada no 3º lavado. No presente estudo obteve-se diferença numérica na porcentagem de embriões recuperados no 3º lavado. No grupo caminhada, a taxa foi de 21,2%, enquanto que no controle foi de 10,5%, não diferindo estatisticamente.

Hinrichs (1990) propôs como forma de aumentar as taxas de recuperação embrionária a retenção de fluido, por 3 minutos, dentro do útero distendido antes da drenagem de cada uma das três lavagens. Foram utilizadas 14 éguas e realizados 20 procedimentos de colheita de embriões, sendo recuperados 21 embriões (105% de taxa de recuperação embrionária) devido à presença de duplas ovulações em alguns ciclos reprodutivos. Estes resultados não corroboram os dados do presente experimento em que, mesmo com a caminhada, obteve-se 54% de taxa de recuperação. Uma plausível explicação poderia se embasar em função da metodologia proposta (somente após o 3º lavado), visando otimizar o tempo gasto executando-se a técnica nos três lavados assim

como feito por Hinrichs (1990). Entretanto, como a maioria dos embriões é recuperada nos 1º e 2º lavados, não se obteve resultados satisfatórios como do referido autor. Por isso propõe-se a metodologia empregada no presente trabalho apenas no primeiro lavado. Dessa forma, pôde-se ter um acréscimo nas taxas de recuperação embrionária no primeiro lavado, diminuindo os gastos com o meio e o tempo.

Conclusão

Conclui-se que a caminhada com o útero repleto de fluido após o 3º lavado não incrementou a taxa de recuperação embrionária na espécie equina. Maiores estudos com o mesmo delineamento poderiam ser realizados durante o primeiro lavado, adicionando-se ocitocina para efeitos comparativos.

Referências

- ALVARENGA, M. A.; CARMO, M. T.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. Superovulation in mares: limitations and perspectives. *Pferdeheilkunde*, v. 24, n. 1, p. 88-91, 2008.
- CAMARGO, C. E. et al. Aspectos relacionados com a recuperação embrionária em éguas da raça Brasileiro de Hipismo, utilizadas em programa comercial de transferência de embrião. *Veterinária e Zootecnia*, v. 20, n. 4, p. 74-83, 2013a.
- CAMARGO, C. E. et al. Some factors affecting the rate of pregnancy after embryo transfer derived from the Brazilian Jumper horse breed. *Journal of Equine Veterinary Science*, v. 33, n. 11, p. 924-929, 2013b. doi:10.1016/j.jevs.2013.01.008.
- CASTRO NETO, A. S. et al. Improvement in embryo recovery using double uterine flushing. *Theriogenology*, v. 63, n. 5, p. 1249-1255, 2005. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.03.022
- CRUZ, F. B. et al. Recoleta uterina como estratégia para aumentar a taxa de embriões em fêmeas bovinas de corte e leite. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 36, n. 3, p. 249-254, 2008.
- FERREIRA, J. C.; MEIRA, C. Aplicação da ultrassonografia colorida Doppler em programas de transferência de embriões equinos. *Ciência Rural*, v. 41, n. 6, p. 1063-1069, 2011. doi:10.1590/S0103-84782011000600023.
- FLEURY, J. J. O dia da colheita na taxa de recuperação de embriões em equinos em uma central de transferência de embriões comercial. *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS*, v. 26, supl. 1, p. 268, 1998.
- FLEURY, J. J. et al. Fatores que afetam a recuperação embrionária e os índices de prenhez após transferência transcervical em equinos da raça Mangalarga. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 38, n. 1, p. 29-33, 2001. doi:10.1590/S1413-95962001000100005.
- HINRICH, K. Work in progress: a simple technique that may improve the rate of embryo recovery on uterine flushing in mares. *Theriogenology*, v. 33, n. 5, p. 937-942, 1990. PMID:16726790.
- IMEL, K. J. **Recovery, culture and transfer of equine embryos**. MS Thesis, Colorado State University, Fort Collins, CO, USA. 1981.
- MEIRA, C.; HENRY, M. Evaluation of two non-surgical equine embryo transfer methods. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 44, p. 712-713, 1991.
- RIERA, F. L.; McDONOUGH, J. Commercial embryo transfer in polo ponies in Argentina. *Equine Veterinary Journal*, v. 25, n. S15, p. 116-118, 1993. doi:10.1111/j.2042-3306.1993.tb04843.x.
- SAMPER, J. C. Ultrasonographic appearance and the use of uterine edema to time ovulation in mares. In: ANNUAL CONVENTION OF AMERICAN ASSOCIATION OF EQUINE PRACTITIONERS, 43., 1997, Phoenix. *Proceedings...* Phoenix, AZ: AAEP, 1997. p. 41-43.
- SQUIRES, E. L. Embryo transfer. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p. 357-367.
- SQUIRES, E. L. et al. Embryo technologies in the horse. *Theriogenology*, v. 59, n. 1, p. 151-70, 2003. doi:10.1016/S0093-691X(02)01268-2.
- STROUD, B.; CALLESEN, H. IETS statement on worldwide ET statistics for 2010. *Animal Reproduction*, v. 9, n. 3, p. 210-216, 2012.

TISCHNER, M., TISCHNER, M. Recovery, splitting and transfer of equine embryos. **Animal Breeding Abstract**, v. 65, p. 321, 1996.

VANDERWALL, D. K. Current equine embryo transfer techniques. In: BALL, B. A. (Ed.) **Recent advances in equine theriogenology**. Ithaca, NY: International Veterinary Information Service (IVIS), 2000. p. 1-8.

VAZQUEZ, J. J. et al. Influence of environmental temperature, exercise, semen type and ovulation characteristics on reproductive performance in a commercial embryo transfer program. **Animal Reproduction Science**, v. 121, n. 1-2, p. 301-302, 2010. doi:10.1016/j.anireprosci.2010.04.097.

Recebido: 18/10/2013

Received: 10/18/2013

Aprovado: 18/09/2014

Approved: 09/18/2014