



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ROBERTA GARBELINI GOMES

**EFEITO DO TEMPO E TEMPERATURA SOBRE A
VIABILIDADE DE FOLÍCULOS OVARIANOS EQUINOS
TRANSPORTADOS EM MEM OU PBS**

Londrina
2010

ROBERTA GARBELINI GOMES

**EFEITO DO TEMPO E TEMPERATURA SOBRE A
VIABILIDADE DE FOLÍCULOS OVARIANOS EQUINOS
TRANSPORTADOS EM MEM OU PBS**

Dissertação 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 Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda

Londrina
2010

**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 do tempo e temperatura sobre a viabilidade de folículos ovarianos equinos transportados em MEM ou PBS / Roberta Garbelini Gomes. – Londrina, 2010.

70 f. : il.

Orientador: Marcelo Marcondes Seneda.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2010.

Inclui bibliografia.

1. Reprodução animal – Teses. 2. Folículos ovarianos – Teses. 3. Ovários – Equinos – Teses. 4. Animais – Preservação de órgãos, tecidos, etc. – Teses. 5. Equinos – 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 DO TEMPO E TEMPERATURA SOBRE A VIABILIDADE DE
FOLÍCULOS OVARIANOS EQUINOS TRANSPORTADOS EM MEM
OU PBS**

Dissertação 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 Mestre em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda
UEL – Londrina – PR

Prof^a. Dr^a. Maria Isabel Mello Martins
UEL – Londrina – PR

Prof^a. Dr^a. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga
UNESP – SP

Londrina, 05 de novembro de 2010.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

A minha irmã e cunhado,

Aos meus familiares,

Ao meu futuro esposo,

por tudo que representam em minha vida.

Com amor, dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela tamanha força que me proporcionou para que eu conseguisse finalizar mais esta etapa de crucial importância para esta longa trajetória acadêmica que escolhi para cumprir.

Ao Professor Marcelo Marcondes Seneda pela ilustre orientação, presença constante e principalmente pela amizade, ajuda espiritual e companheirismo, mostrando caminhos alternativos em vencer as etapas da vida. Agradeço de coração e com certeza também me espelho em você.

À Dr^a. Evelyn pela amizade, parceria, auxílio, correção, qualificação e co-orientação neste trabalho.

A todos do Laboratório de Reprodução Animal da UEL, que de um jeito ou de outro tiveram suas mãos presentes em qualquer uma das etapas de execução deste experimento, Aletéia, Priscila, Lívia, Evelyn, Kátia, Marilu, Gustavo, Thiago, Letícia, Fabiana e Mariana, além dos residentes da Clínica Médica, Cirúrgica e Reprodução de Grandes Animais da UEL.

Ao Prof. Dr. Thales e Prof^a. Dr^a. Nilva pela execução da análise estatística.

À Prof^a. Dr^a. Wanessa Blaschi pela amizade e participação da banca de qualificação.

Aos membros (pessoas e animais) do Frigorífico Santa Fé pela doação de materiais para realização deste experimento.

À Prof^a. Dr^a. Maria Isabel Mello Martins e Prof^a. Dr^a. Fernanda da Cruz Landim e Alvarenga pela disponibilidade em participar como membros da banca de avaliação desta defesa.

Aos membros do Laboratório de Anatomia Patológica da UEL, em especial à Joelma Lucioli e ao Laboratório de apoio à Pesquisa Agropecuária da UEL (LAPA).

À Helenice pelo carinho dedicado aos alunos da pós-graduação e ao Prof. Dr. Amauri por nos acolher e orientar.

Aos meus amigos de trabalho da UEL e da Fazenda Santa Helena por me ceder horas do expediente para que eu conseguisse realizar este experimento.

E por último, mas não menos importante agradeço de coração ao meus pais “Carlos” e “Cida” e irmã “Gaby” e cunhado “Rafa” por fazerem parte de minha vida e a Deus por vocês estarem presentes nesta data tão especial. Vocês são as pessoas mais importantes de minha vida. Largo tudo por vocês.

Á Deus por ter posto uma família tão acolhedora em meu caminho (Ilana, Nelson, Aline e Rafael).

Ao Renato, pelo companheirismo, amor, amizade, tolerância, apoio e felicidade proporcionada nestes 9 anos de namoro (aproximadamente). Te amo muito!

E aos meus queridos familiares (Tia Marlene, Vera, Fernandinha, Alexandre) e meus avós (*in memorian*).

Agradeço muito!

Obrigada!

“Combati o bom combate, acabei a carreira, guardei a fé”.

(Timóteo II – Bíblia Sagrada)

GOMES, Roberta Garbelini. **Efeito do tempo e temperatura sobre a viabilidade de folículos ovarianos equinos transportados em MEM ou PBS.** 2010. 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

RESUMO

No presente trabalho investigou-se a eficiência da solução de PBS (Phosphate-buffered saline) e MEM (Meio Essencial Mínimo) na preservação de folículos pré-antrais e antrais equinos *in situ*, em diferentes temperaturas e períodos de tempo. Os ovários (n=10) foram obtidos em abatedouro. Cada ovário foi dividido em 19 fragmentos. Um fragmento foi aleatoriamente designado como controle e imediatamente fixado em Bouin para análise histológica (T1 - controle). Os outros 18 fragmentos foram distribuídos em tubos contendo 10 mL de solução de PBS ou MEM a 4, 20 ou 39°C, por 4, 12 ou 24 horas. Um total de 2567 folículos foram examinados, sendo 1752 primordiais, 764 primários, 34 secundários e sete antrais. A conservação de fragmentos ovarianos equinos em ambas as soluções reduziu significativamente a porcentagem de folículos morfológicamente normais com o aumento do tempo e temperatura comparado com o grupo controle. A 39°C a degeneração folicular ocorreu em todos os folículos analisados a partir de 12 horas de conservação em ambos os meios. A solução de PBS apresentou maior quantidade de folículos morfológicamente normais a 4°C por até 4 horas que a solução de MEM ($P < 0,01$). Os folículos primordiais apresentaram-se mais resistentes à conservação que os folículos primários e secundários em todos os meios, tempos e temperaturas. A exceção ocorreu a 4°C por 12 horas em PBS, condição na qual os folículos primários e secundários foram mais resistentes. Os folículos antrais apresentaram viabilidade quando conservados em MEM a 4°C por até 4 horas. Neste trabalho os folículos pré-antrais equinos foram melhor conservados *in situ* a 4°C em PBS por até 4 horas.

Palavras-chave: Equino. Conservação. Ovário. Folículos.

GOMES, Roberta Garbelini. **Effect of time and temperature on preantral follicles from ovaries equine transported in MEM or PBS.** 2010. 70 f. Dissertation (Master's Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

ABSTRACT

The present study investigated the efficiency of PBS (Phosphate-buffered saline) and MEM (Minimum Essential Medium) on the preservation of *in situ* preantral and antral equine follicles at different temperatures and periods of time. The ovaries (n = 10) were taken from a slaughterhouse. Each ovary was divided into 19 fragments. A fragment was randomly designated as control and immediately fixed in Bouin for histological analysis (T1 - control). The other 18 fragments were distributed in tubes containing 10 mL of PBS or MEM at 4, 20 or 39°C, for 4, 12 or 24 hours. A total of 2567 follicles were examined: being 1752 primordial, 764 primary, 34 secondary and seven antral. The storage of equine ovarian fragments in both solutions significantly reduced the percentage of morphologically normal follicles after time and temperature were increased when compared to the control group. At 39°C, follicular degeneration occurred in all follicles examined after 12 hours of preservation in both media. PBS had higher amounts of morphologically normal follicles at 4°C for 4 hours than MEM (P <0.01). Primordial follicles were more resistant to conservation than primary and secondary follicles in all solutions, times and temperatures. An exception was observed at 4°C for 12 hours in PBS, condition in which the primary and secondary follicles were more resistant. Antral follicles were viable when stored in MEM at 4°C for 4 hours. In this work, equine preantral follicles were better preserved *in situ* in PBS at 4°C for up to 4 hours.

Keywords: Equine. Storage. Ovarian. Follicles.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1** – Diagrama comparando as relações entre as camadas cortical e medular de ovários equinos e de outras espécies 18
- Figura 2** – Vista frontal do trato reprodutivo suspenso após remoção de outras vísceras abdominais..... 19
- Figura 3** – Representação esquemática dos folículos ovarianos (Adaptado de Rodgers *et al.*, 1999). 1. Oócito primário; 2. Célula da pré-granulosa; 3. Membrana basal; 4. Células da granulosa; 5. Cavidade antral; 6. Célula da teca; 7. Oócito secundário 21

ARTIGO A – Transporte e armazenamento de tecido ovariano equino para utilização em biotécnicas reprodutivas

- Figura 1** – Abatedouro de equinos (Foto cedida por Gercio Luiz Bonesi)..... 34

ARTIGO B – Efeito do tempo e temperatura sobre a viabilidade e ativação de folículos ovarianos equinos transportados em MEM ou PBS

- Figura 1** – Protocolo experimental para conservação de folículos ovarianos equinos *in situ* 50
- Figura 2** – A: Total de folículos de acordo com as classes foliculares analisados em todos os tratamentos; B: Total de folículos degenerados e morfológicamente normais analisados em todos os tratamentos..... 59
- Figura 3** – Efeito da temperatura e do tempo de conservação sobre a porcentagem de folículos de tecido ovariano equino mantidos em PBS ou MEM. (*) difere significativamente do controle ($P < 0,01$); Letras minúsculas (a, b, c) diferença entre valores de temperaturas ($P < 0,01$); Letras maiúsculas (A, B, C) diferença entre períodos de incubação ($P < 0,01$) 60
- Figura 4** – Fragmento ovariano após coloração com PAS-Hematoxilina, mostrando folículo primordial viável (400x). ON: Oócito normal; CG: Células da granulosa 62

Figura 5 –	Fragmento ovariano após coloração com PAS-Hematoxilina, mostrando folículo primordial degenerado (400x). OD: Oócito degenerado; CGD: Células da granulosa degenerada.....	63
Figura 6 –	Fragmento ovariano após coloração com PAS-Hematoxilina, mostrando folículo primário viável (400x). ON: Oócito normal; CG: Células da granulosa.....	64
Figura 7 –	Fragmento ovariano após coloração com PAS-Hematoxilina, mostrando folículo primário degenerado (400x). OD: Oócito degenerado; CGD: Células da granulosa degenerada.....	65
Figura 8 –	Fragmento ovariano após coloração com PAS-Hematoxilina, mostrando folículo secundário viável (400x). ON: Oócito normal; CG: Células da granulosa	66
Figura 9 –	Fragmento ovariano após coloração com PAS-Hematoxilina, mostrando folículo secundário degenerado (400x). OD: Oócito degenerado; CGD: Células da granulosa degenerada.....	67
Figura 10 –	Fragmento ovariano após coloração com PAS-Hematoxilina, mostrando folículo antral viável (400x). ON: Oócito normal; CG: Células da granulosa; NO: Núcleo do oócito	68
Figura 11 –	Fragmento ovariano após coloração com PAS-Hematoxilina, mostrando folículo antral degenerado (400x). OD: Oócito degenerado; CGD: Células da granulosa degenerada.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CG	Células da granulosa
CGD	Células da granulosa degenerada
CGP	Células Germinativas Primordiais
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FOPA	Folículos ovarianos pré-antrais
FSH	<i>Follicle Stimulant Hormone</i> - Hormônio Folículo Estimulante
GIFT	<i>Gamete Intrafallopian Transfer</i> - Transferência de gametas intrafalopiana
IA	Inseminação Artificial
ICSI	<i>Intracytoplasmic Sperm Injection</i> - Injeção intracitoplasmática de espermatozóides
LH	<i>Luteinizing Hormone</i> - Hormônio Luteinizante
MEM	Meio essencial mínimo
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
MOIFOPA	Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais
OD	Oócito degenerado
ON	Oócito normal
PAS	<i>Periodic Acid-Schiff</i> - Ácido Periódico de Schiff
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> - Solução Tampão de Fosfato
PIVE	Produção <i>In vitro</i> de Embriões
TE	Transferência de Embriões
UEL	Universidade Estadual de Londrina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	HIPÓTESE	15
3	OBJETIVOS	16
4	REVISÃO DE LITERATURA	17
4.1	FISIOLOGIA REPRODUTIVA	17
4.2	OVÁRIO DE EQUINOS	17
4.3	OOGÊNESE	19
4.4	FOLICULOGÊNESE	20
4.5	CLASSIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS FOLÍCULOS	21
4.5.1	Folículos Pré-antrais	22
4.5.1.1	Folículos primordiais	22
4.5.1.2	Folículos primários	23
4.5.1.3	Folículos secundários	23
4.5.1	Folículos Antrais	23
4.5.2.1	Folículos terciários	24
4.5.2.2	Folículos de De Graaf ou pré-ovulatórios	24
4.6	ATRESIA FOLICULAR	24
4.7	POPULAÇÃO FOLICULAR EM OVÁRIOS MAMÍFEROS	25
4.8	CONSERVAÇÃO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS	25
	REFERÊNCIAS	27
5	ARTIGO DE REVISÃO	31
	<i>ARTIGO A - Transporte e armazenamento de tecido ovariano equino para utilização em biotécnicas reprodutivas</i>	31
	Resumo	32
	Abstract	32
	Introdução	33
	Biotécnicas da reprodução em equinos	34

Meios e transporte de ovários para utilização de oócitos na reprodução equina.....	36
Considerações finais	38
REFERÊNCIAS	39
6 ARTIGO EXPERIMENTAL	44
<i>ARTIGO B - Efeito do tempo e temperatura sobre a viabilidade e ativação de folículos ovarianos equinos transportados em MEM ou PBS</i>	44
Resumo	45
1 Introdução.....	46
2 Material e métodos	47
2.1 Colheita dos ovários	47
2.2 Meios	48
2.3 Protocolo experimental.....	48
2.4 Análise qualitativa dos folículos ovarianos equinos.....	48
2.5 Análise estatística	50
3 Resultados.....	51
4 Discussão	53
5 Referências	56
7 CONCLUSÕES	70

1 INTRODUÇÃO

Diversas biotécnicas na área da reprodução animal vêm sendo desenvolvidas, visando o melhoramento genético de animais domésticos, principalmente quanto àqueles de interesse econômico. Dentre estas biotécnicas, podemos destacar a Inseminação Artificial (IA), a Transferência de Embriões (TE), a Produção *In vitro* de Embriões (PIVE), a transgênese, a clonagem, a transferência de gametas intrafalopiana (GIFT), injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) e, mais recentemente, a Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais (MOIFOPA) (FIGUEIREDO, 1995).

A manipulação de folículos ovarianos pré-antrais para qualquer biotécnica requer a viabilidade destes folículos, a qual diminui com o aumento do tempo de conservação. Por conseguinte, um dos entraves do amplo aproveitamento de oócitos inclusos em folículos ovarianos é a dificuldade em manter a viabilidade folicular após a remoção e transporte dos ovários, pois a obtenção dos ovários dá-se muitas vezes em locais distante dos laboratórios de reprodução animal.

Neste contexto, o desenvolvimento de um meio de transporte, em tempo e temperatura ideais de conservação para os fragmentos ovarianos é uma etapa crucial e de suma importância para posterior utilização de oócitos inclusos em folículos ovarianos. Esta metodologia possibilitará uma melhor compreensão dos diversos fatores implicados na foliculogênese e no processo de atresia. Além da contribuição para a área acadêmica, vislumbra-se ainda um incremento no segmento aplicado, com o fornecimento de milhares de oócitos viáveis para as biotécnicas de PIVE, transgenia e clonagem.

Na espécie equina há uma enorme escassez de informações quanto às condições ideais para o transporte de tecido ovariano com preservação de folículos pré-antrais, sendo que comumente, estas se baseiam em relatos de outras espécies.

Considerando os aspectos supracitados, o objetivo do presente trabalho é avaliar o efeito do tempo, temperatura e meio de conservação sobre a viabilidade e ativação de folículos ovarianos na espécie equina.

2 HIPÓTESE

A viabilidade de folículos pré-antrais e antrais eqüinos varia conforme a temperatura, tempo e meios de cultura utilizados durante a conservação *in situ*.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar o impacto das variáveis temperatura, meios de cultura e tempo de conservação *in situ* sobre a viabilidade de folículos ovarianos na espécie equina.

3.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a viabilidade de folículos pré-antrais e antrais nos seguintes tempos: 4, 12 ou 24 horas.
- Avaliar a viabilidade de folículos pré-antrais e antrais nas seguintes temperaturas: 4, 20 ou 39°C.
- Avaliar a viabilidade de folículos pré-antrais e antrais nos meios MEM ou PBS.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 FISIOLOGIA REPRODUTIVA

A espécie equina é poliéstrica estacional, ou seja, a estação ovulatória ocorre entre primavera e verão, estando intimamente associada com a disponibilidade de alimento, aumento da quantidade de luz diária e temperatura. O ciclo estral na espécie equina dura em torno de 21 dias, sendo o proestro de aproximadamente 2 dias, o estro em torno de 7 dias e o diestro 13 a 14 dias. As fêmeas equinas possuem diversas condições que diferem de outras espécies de mamíferos, como por exemplo, a ovulação ocorre diante de progressiva elevação das concentrações de hormônio luteinizante (LH) por vários dias e atinge sua máxima concentração um dia após a ovulação. A duração da secreção de LH na égua está associada com o surgimento da ovulação sendo considerada a mais longa de todos os mamíferos (MARKOVIC *et al.*, 2002).

4.2 OVÁRIO DE EQUINOS

O ovário desempenha funções endócrina e exócrina ou gametogênica, sendo a primeira responsável pela produção e liberação de hormônios esteróides e diversos peptídeos, e a segunda responsável pela produção e liberação de oócitos (BLANCHARD *et al.*, 2003), a qual é exercida pela interação de dois fenômenos, a oogênese e a foliculogênese (GINTHER, 1979; EVANS *et al.*, 2007).

O ovário equino difere de outras espécies de mamíferos domésticos por desenvolver modificações expressivas durante a fase fetal, como possuir a fossa ovárica, o tecido cortical corresponder à porção central do parênquima, possuir abundante estroma fibroso e conter frequentemente tecido adrenocortical ectópico (NAVES *et al.*, 2008).

As gônadas originam-se de espessamentos conhecidos como cristas gonadais formadas no terço médio dos ductos mesonéfricos. No embrião, as células germinativas primordiais migram do endoderma do saco vitelínico para as cristas gonadais e logo após inicia-se a diferenciação gonadal, quando estas células passam a ser denominadas

ovogônias ou espermatogônias. Este processo de diferenciação gonadal na espécie equina ocorre por volta de 39 a 45 dias de gestação. As gônadas fetais eqüinas de 7 a 8 meses de idade gestacional são maiores que os ovários das éguas neste mesmo período gestacional (NAVES *et al.*, 2008).

O ovário equino possui forma de rim, sendo o ovário esquerdo normalmente maior que o direito. A fossa ovulatória é uma estrutura única e exclusiva desta espécie, e se localiza na borda ventral (côncava) do tecido ovariano. É formada por uma pequena área onde os folículos se desenvolvem e ovulam, facilitando a chegada do oócito ao tecido conectivo (MARKOVIC *et al.*, 2002).

O ovário mamífero é constituído pelas regiões cortical e medular, sendo que nas éguas estão em posições contrárias às outras espécies. Na espécie equina, a região cortical, borda mais ventral e côncava, que se localiza próxima a fossa ovulatória, contém folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento, bem como corpos lúteos, *albicans* e hemorrágicos (Figura 1) (BLANCHARD *et al.*, 2003; EVANS *et al.*, 2007).

A região medular, 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 (Figura 1) (GINTHER, 1979; MARKOVIC *et al.*, 2002; BLANCHARD *et al.*, 2003). Pequenos vasos sangüíneos estendem-se, a partir da medula, para dentro do córtex ovariano (CORMACK, 1991; EVANS *et al.*, 1997; MARKOVIV *et al.*, 2003).

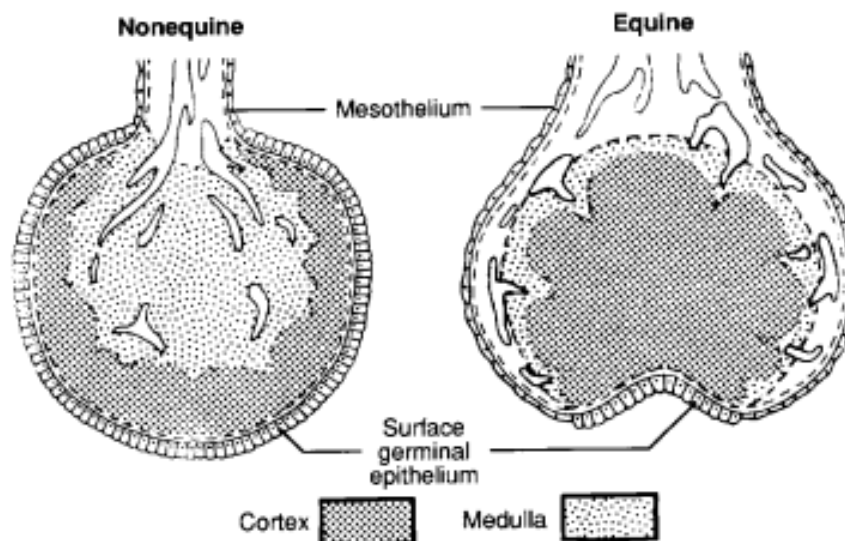


Figura 1 – Diagrama comparando as relações entre as camadas cortical e medular de ovários equinos e de outras espécies (GINTHER, 1979).

Em equinos, os ovários estão suspensos na região sublombar da cavidade abdominal pelo ligamento mesovárico e apresentam pouca mobilidade. Os ovários medem 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). Por exemplo, ovários de éguas que se apresentam 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).

Devido ao ovário equino ser grande quando comparado ao ovário de outras espécies, as técnicas de histologia convencionais são muitas vezes inadequadas para observação das estruturas ovarianas mais internas, sendo necessária muitas vezes, a análise microscópica interna tridimensional (MARKOVIC *et al.*, 2002).

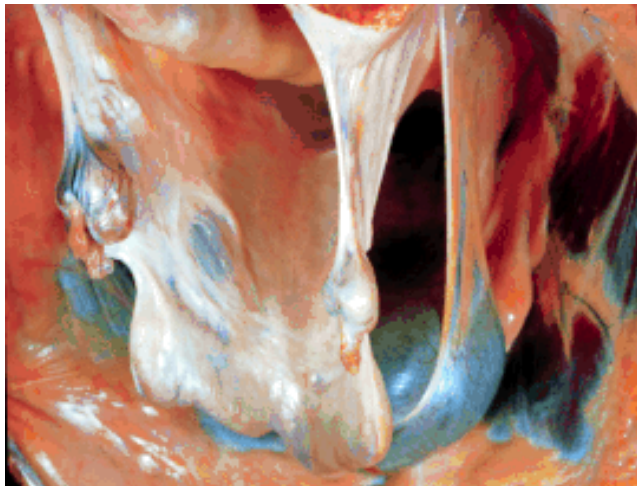


Figura 2 – Vista frontal do trato reprodutivo suspenso após remoção de outras vísceras abdominais (GINTHER, 1979).

4.3 OOGÊNESE

Os animais domésticos nascem com um estoque de oócitos oriundos da vida fetal em decorrência de dois processos conhecidos como oogênese e foliculogênese (SAUMANDE, 1991).

A oogênese em mamíferos pode ser definida como uma seqüência de eventos através dos quais as células germinativas primordiais (CGP) desenvolvem-se e

diferenciam-se até a formação do oócito haplóide fecundável (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 (WASSARMAN, 1988; EVANS *et al.*, 2007).

Ao nascimento, as fêmeas mamíferas possuem em seus ovários oócitos no estágio de diplóteno da prófase I da meiose, os quais não possuem capacidade de reassumir a meiose ou de sofrerem fertilização. Sendo assim, os oócitos permanecem em estágio de imaturidade conhecido como núcleo dictiado ou vesícula germinativa (DOWNS, 1990).

Após um processo marcado pelo crescimento celular e pela redistribuição de organelas citoplasmáticas, as CGP, dentro do ovário, multiplicam-se ativamente e transformam-se em oogônias (GORDON, 1994); estas iniciam a meiose e diferenciam-se em oócitos (HIRSHFIELD, 1991). Os oócitos permanecem nesse estágio (prófase I) por vários anos, até que a puberdade seja alcançada e comecem os ciclos reprodutivos, quando a meiose é retomada imediatamente antes da ovulação (MOORE & PERSAUD, 1994). Os ovócitos ficam parados no estágio de metáfase II até o momento da fertilização, onde ocorrerá a expulsão do segundo corpúsculo polar e a formação do oócito haplóide fecundável (CRAN & MOOR, 1990; MOORE & PERSAUD, 1994).

4.4 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 ou de De Graaf (SAUMANDE, 1991; MOORE & PERSAUD, 1994).

A foliculogênese é um processo altamente seletivo onde poucos folículos se tornam dominantes e a maioria sofre atresia. Este processo pode ser dividido 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 (Figura 3) (FIGUEIREDO, 1995).

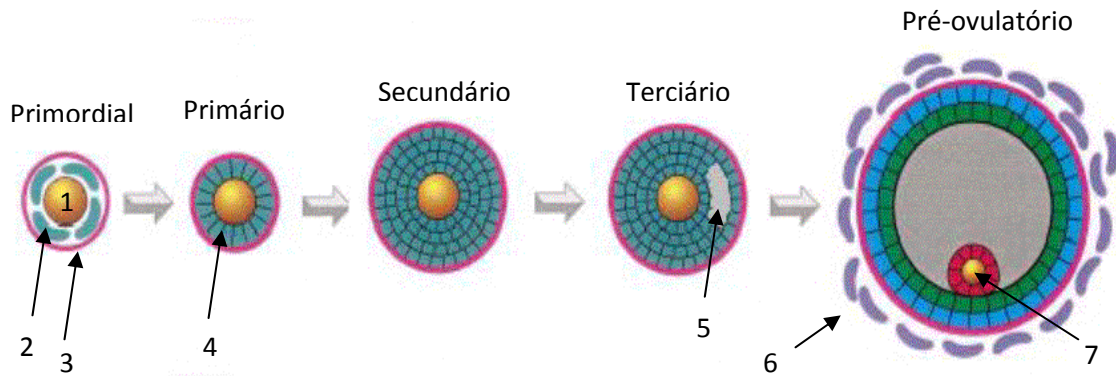


Figura 3 – Representação esquemática dos folículos ovarianos (Adaptado de Rodgers *et al.*, 1999). 1. Oócito primário; 2. Célula da pré-granulosa; 3. Membrana basal; 4. Células da granulosa; 5. Cavidade antral; 6. Célula da teca; 7. Oócito secundário.

Os folículos ovarianos são unidades morfológicas e funcionais onde células somáticas e germinativas estão intimamente associadas e são 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 fase pré-natal, alguns folículos primordiais são ativados, crescem e diferenciam-se em folículos primários, secundários e terciários. Somente na vida pós-natal, sob efeito hormonal, os folículos podem atingir o estágio pré-ovulatório (FORTUNE, 1994).

A população folicular ovariana é bastante heterogênea e se localiza no córtex ovariano (SAUMANDE, 1991). De acordo com seu grau de evolução, os folículos podem ser divididos em: folículos pré-antrais ou não cavitários (primordiais, em transição, primários e secundários) e folículos antrais ou cavitários (terciários e pré-ovulatórios) (GINTHER, 1979; HULSHOF *et al.*, 1994).

4.5 CLASSIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS FOLÍCULOS OVARIANOS

Os folículos ovarianos são diferenciados entre si pela forma e número de camadas de células que circundam o oócito (FIGUEIREDO *et al.*, 1995). Os folículos pré-antrais foram classificados de acordo com Hulshof *et al.* (1994) em primordiais, primários, secundários e os folículos 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.

Os folículos também podem ser classificados de acordo com a sua viabilidade, como folículos viáveis (apresenta 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.*, 1996).

4.5.1 Folículos Pré-Antrais

Os folículos pré-antrais representam cerca de 90% da população folicular do ovário (ERICKSON, 1986) e constituem o estoque de gametas femininos durante a vida reprodutiva do animal (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 cúbica, proliferação destas células e aumento de tamanho do oócito (HIRSHFIELD, 1991).

4.5.1.1 Folículos primordiais

Também denominados folículos de reserva ou quiescentes, os folículos primordiais compreendem cerca de 90% a 95% de toda a população folicular presente no ovário e são constituídos por um oócito central circundado por uma camada de 4 a 8 células da pré-granulosa de forma pavimentosa (ERICKSON, 1986).

4.5.1.2 Folículos primários

Os folículos primordiais após sua ativação passam a ser denominados de folículos primários. Estes últimos são constituídos por um oócito central circundado por uma única camada de células (11 a 12) da granulosa de forma cúbica (HULSHOF *et al.*, 1994). Além disso, o oócito aumenta de volume, ao mesmo tempo em que surge ao seu redor a zona pelúcida, estrutura que permanece ao redor do oócito por todo o desenvolvimento folicular e início do desenvolvimento embrionário (GEORGE *et al.*, 1998; ANDRADE *et al.*, 2002).

4.5.1.3 Folículos secundários

Os folículos secundários são caracterizados por um oócito central circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa de forma cúbica. Neste estágio, a zona pelúcida se torna evidente. Os folículos secundários mais avançados apresentam as fibras do tecido conjuntivo organizadas paralelamente à membrana basal para formar a camada de células tecais (VAN DEN HURK *et al.*, 1997).

4.5.2 Folículos Antrais

Folículos antrais podem ser classificados como folículos terciários e folículos de De Graaf, denominados ainda maduros, dominantes ou pré-ovulatórios, podendo medir aproximadamente 35 a 50 mm de diâmetro na espécie equina (GINTHER, 1979; MARKOVIC *et al.*, 2002). Com a intensa proliferação das células da granulosa, ocorre o surgimento de uma cavidade preenchida por fluido folicular conhecida como antro folicular, sendo esta uma característica crucial do folículo antral (GINTHER, 1979; ANDRADE *et al.*, 2002). A formação desta cavidade antral devido ao crescimento e desenvolvimento folicular é estritamente dependente de gonadotrofinas (TELFER 1996).

4.5.2.1 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 externa (GORDON, 1994).

4.5.2.2 Folículos de De Graaf ou pré-ovulatórios

O folículo de De Graaf ou pré-ovulatório, que representa o estágio terminal do desenvolvimento folicular (HULSHOF *et al.*, 1994), apresenta uma grande cavidade preenchida pelo líquido folicular e o oócito aderido à parede do folículo pelas células foliculares. O conjunto de células que envolvem o oócito é denominado *corona radiata* (GEORGE *et al.*, 1998; BANKS, 1992). Este pode chegar a medir 35 a 50 mm de diâmetro na espécie equina (GINTHER, 1979).

4.6 ATRESIA FOLICULAR

Estima-se que cerca de 99,9% dos folículos de um ovário não chegam até a ovulação e sofrem um processo fisiológico conhecido como atresia, que causa a morte do folículo (TELFER, 1996).

A atresia folicular acomete todas as espécies domésticas e pode ocorrer em qualquer estágio do desenvolvimento folicular (MARKOVIC *et al.*, 2002), sendo mais evidente nos folículos antrais, especialmente quando estes atingem um tamanho no qual ocorre a diferenciação terminal das células da granulosa e da teca. Vários são os fatores que podem influenciar o processo de atresia, como idade, ciclo reprodutivo, gestação, hipofisectomia, ovariectomia unilateral, hormônios, nutrição e isquemia. Este processo fisiológico, de duração desconhecida, parece ser um dos elementos que controlam o número

de folículos selecionados a chegar até o processo ovulatório (SAUMANDE, 1991; LUSSIER *et al.*, 1987; HIRSHFIELD, 1988).

O primeiro sinal de atresia folicular é a ausência de figuras mitóticas nas camadas de células da granulosa. O núcleo das células da granulosa se torna picnótico subsequentemente, e estas células perdem o contato com a membrana basal (GINTHER, 1979).

Independentemente da fase na qual ocorre e, apesar de ser um fenômeno natural, a atresia reduz de maneira significativa o número de oócitos viáveis durante a vida reprodutiva de um animal, fazendo com que o potencial do ovário seja pouco aproveitado (ANDRADE *et al.*, 2002).

4.7 POPULAÇÃO FOLICULAR EM OVÁRIOS MAMÍFEROS

Estima-se que a população folicular na espécie equina, seja de 36.000 folículos por ovário (EVANS *et al.*, 2007; SZLACHTA & TISCHNER, 2008). Na espécie bovina, a população folicular está em torno de 235.000 folículos por ovário, podendo variar de 0 a 720.000 (BETTERIDGE *et al.*, 1989). Nas espécies caprina, ovina e na mulher, este número foi estimado em 37.646 (LUCCI *et al.*, 1999), 160.000 (DRIANCOURT, 1991) e 2.000.000 (ERICKSON, 1986), respectivamente. Vários fatores, além da variação individual, podem afetar o número de folículos presentes no ovário. Dentre eles, podem ser citados raça (CAHILL *et al.*, 1979), idade (ERICKSON, 1966; RÜSSE, 1983), níveis hormonais (PETERS, 1976), genética (ERICKSON, 1966), estado reprodutivo (ERICKSON *et al.*, 1986) e nutricional do animal (SCARAMUZZI *et al.*, 1993; SZLACHTA & TISCHNER, 2008).

4.8 CONSERVAÇÃO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS

Conforme descrito, é possível recuperar milhares de FOPA a partir de um único ovário. Porém, os entraves encontrados na realização desta biotecnologia estão relacionados à dificuldade de manutenção da qualidade folicular após remoção e transporte dos ovários, uma vez que geralmente os animais doadores de ovários se encontram distantes

dos laboratórios de reprodução. E, após o isolamento de um grande número de folículos do ambiente ovariano, torna-se impossível a manipulação momentos após ou no mesmo dia em que são extraídos do ovário sem ter a sua viabilidade comprometida antes do cultivo *in vitro*. Por esta razão, é crucial e fundamental o desenvolvimento de protocolos de conservação (resfriamento e/ou congelação), nos quais os FOPA poderiam ser mantidos a temperaturas entre 4°C e 20°C (resfriamento) ou -196°C (congelação), no interior do tecido ovariano (FIGUEIREDO *et al.*, 2007).

Diversos experimentos foram realizados em animais domésticos testando-se variados meios de conservação como água de côco, TCM199, solução salina, solução de Braun Collins, assim como tempo e temperaturas diferentes de transporte e conservação. Em ovinos e caprinos, os melhores resultados foram obtidos quando estes tecidos ovarianos foram mantidos a uma temperatura de 4°C por até 24 horas e, a morfologia destes folículos pré-antrais foi afetada quando os mesmos permaneceram a temperaturas de 20°C e 39°C (SILVA *et al.*, 2000; ANDRADE *et al.*, 2001; FERREIRA *et al.*, 2001; CARNEVALE & MACLELLAN, 2006). Já em suínos e bovinos, os melhores resultados quanto a morfologia dos folículos pré-antrais foram obtidos quando os mesmos permaneceram estocados em solução salina a 4°C por no máximo 18 horas e a 20°C por até 6 horas (LUCCI *et al.*, 2004; LUCCI *et al.*, 2007).

Devido às dificuldades observadas no cultivo *in vitro* de FOPA isolados do tecido ovariano ou mesmo *in situ* (SANTOS *et al.*, 2006), a congelação de fragmentos ovarianos vem permitindo a conservação até que sejam desenvolvidos protocolos eficientes de cultivo *in vitro*. Neste sentido, o tecido ovariano de cabras (RODRIGUES *et al.*, 2004), ovelhas (AMORIM *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2006) e vacas (LUCCI *et al.*, 2004) tem sido congelados na presença de diferentes agentes crioprotetores, os quais têm por finalidade proteger as células contra as crioinjúrias.

Apesar do grande avanço na conservação 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 não se tem relatos quanto à realização de protocolos eficientes de conservação ovariana. Isto devido ao fato da disponibilidade de oócitos ser um fator limitante, ou seja, há poucos abatedouros de equinos no Brasil e muitos outros países.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, C.A.; RONDINA, D.; RODRIGUES, A.P.R.; GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R. Cryopreservation of isolated ovine primordial follicles with propylene glycol and glycerol. **Fertil Steril**, v.81, p.735-740, 2003.
- ANDRADE, E. R.; AMORIM, C. A.; COSTA, S. H. F.; FERREIRA, M. A. L.; RODRIGUES, A. P. R.; DODE, M. A. N.; FIGUEIREDO, J. R. Preliminary study of short-term preservation of ovine ovarian tissue containing preantral follicles in saline solution or TCM199. **Veterinary Record**. v. 151, p. 452-53, 2002.
- ANDRADE, E. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; CARVALHO, F. C. A.; DODE, M. A. N.; FIGUEIREDO, J. R. Short-term maintenance of sheep preantral follicles in situ in 0,9% saline and Braun Collins solutions. **Small Ruminant Research**. v. 41, n. 2, p.141-149, 2001.
- BANKS, W. J. **Histologia Veterinária Aplicada**. 2. ed. São Paulo: Manole, p.565-572, 1992.
- BETTERIDGE, K. J.; SMITH, C.; STUBBINGS, R. B.; XU, K. P. & KING, W. A. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes *in vitro*. **J. Reprod. Fert.**, v.38, p.87-98, 1989.
- BLANCHARD, T. L.; VARNER, D. D.; SCHUMACHER, J.; LOVE, C. C.; BRINSKO, S. P.; RIGBY, S. L. **Manual of Equine Reproduction**. 2003.
- CAHILL, L.P.; MARIANA, J.C. & MAULÉON. Total Follicular Populations in Ewes of High and Low Ovulation Rates. **J. Reprod. Fert.**, v. 55, p. 27-36, 1979.
- CANIPARI, R. Oocyte-granulosa cells interactions. **Human reproduction Update**. v. 6, n. 3, p. 279-89, 2000.
- CARNEVALE, E. M.; MACLELLAN, L.J. Collection, evaluation, and use of oocytes in equine assisted reproduction. CARNEVALE, E. M. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**. v. 22, n.3, p. 843-56, 2006.
- CORMACK, D.H. O sistema reprodutor feminino. In: CORMACK, D.H. **Ham Histologia**, 9. ed, Guanabara Koogan, Brasil, p. 485-508, 1991.
- CRAN, D. G.; MOOR, R. M. Programming the oocyte for fertilization. In: BAVISTER, B. D.; CUMMINS, J.; ROLDAN, E. R. S. **Fertilization in mammals**. Norwell: Serono Symposia, p. 35-50, 1990.
- DOWNS, S. M. The maintenance of meiotic arrest in mammalian oocytes. In: BAVISTER, B. D.; CUMMINS, J.; ROLDAN, E. R. S. **Fertilization in mammals**. **Norwell: Serona Symposia**, p. 5-16, 1990.
- DRIANCOURT, M. A.; WEBB, R.; FRY, R. C. Does follicular dominance occur in ewe? **J. Reprod. Fert.**, v.93, p.63-70, 1991.

- ERICKSON, B.H. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. **J. Reprod. Fert.**, v. 10, p. 97-105, 1966.
- ERICKSON, G.F. An analysis of follicle development and ovum maturation. **Seminars in reproductive endocrinology**; v.4, p.233-254, 1986.
- EVANS, T. J.; CONSTANTINESCU, G. M.; GANJAN, V. K. Clinical reproductive anatomy and physiology of the mare. *In*: YOUNGQUIST, R. S. **Current Therapy in Large Animal Theriogenology**. p. 43-70, 1997.
- 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.
- FERREIRA, M. A. L.; BRASIL, A. F.; SILVA, J. R. V.; ANDRADE, E. R.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Effects of storage time and temperature on atresia of goat ovarian preantral follicles held in M199 with or without indole-3-acetic acid supplementation. **Theriogenology**. v. 55, p. 1607-17, 2001.
- 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. **Rev. Bras. Reprodução Animal**. v. 31, n. 2, p.143-52, 2007.
- FIGUEIREDO, J.R.; HULSHOF, S.C.J.; THIRY, M.; VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M.M.; NUSGENS, B. AND BECKERS, J.F. Extracellular matrix proteins and basement membrane: their identification in bovine ovaries and significance for the attachment of cultured preantral follicles. **Theriogenology**, v. 43, p. 845-858, 1995.
- FORTUNE, J. E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biol. Reprod.**, v. 50, p. 225-232, 1994.
- GEORGE, L. L.; ALVES, C. E. R.; CASTRO, R. R. L. **Histologia Comparada**. 2. ed., São Paulo, Rocca, p.237-240, 1998.
- GINTHER, O. J. **Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspects**. Equiservices. 1979.
- GORDON, I. Prenatal development of the bovine ovary. *In*: Gordon, I. **Laboratory production of cattle embryos**. Cambridge: CAB International: *Raven Press*, p. 4349, 1994.
- HIRSHFIELD, A. N. Development of follicles in the mammalian ovary. **Internat. Rew. Cytol.**, v.124, p.43-101, 1991.
- HIRSHFIELD, A.N. Size frequency analysis of atresia in cycling rats. **Biol. Reprod.**, v. 38, p. 1181-88, 1988.
- HULSHOF, S.C.J.; FIGUEIREDO, J.R.; BEKERS, J.F.; BEVERS, M.M.; VAN DEN HURK, R. Isolation and Characterization of preantral follicles from fetal bovine ovaries. **The Veterinary Quartely**, v. 2, n.16, p. 78-80, 1994.

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.171-178, 2001.

LUCCI, C. M.; KACINSKIS, M. A.; RUMPF, R.; BA'O, S. N. Effect of lowered temperatures and media on short-term preservation of zebu (*Bos indicus*) preantral ovarian follicles. **Theriogenology**. v. 61, p. 461-72, 2004.

LUCCI, C. M.; SHREIER, L. L.; MACHADO, G. M.; AMORIM, C. A.; BA'O, S. N.; DOBRINSKY, J. R. Effects of storing pig ovaries at 4 or 20° C for different periods of time on the morphology and viability of pre-antral follicles. **Reprod. Dom. Anim.** v. 42, p. 76-82, 2007.

LUCCI, C.M.; AMORIM, C.A.; RODRIGUES, A.P.; FIGUEIREDO, J.R.; BAO, S.N.; SILVA, J.R.; GONCALVES, P.B. Study of preantral follicle population *in situ* and after mechanical isolation from caprine ovaries at different reproductive stages. **Anim Reprod Sci.**, v.56(3-4), p.223-36, 1999.

LUSSIER, J.G.; MATTON, P. & DUFOUR, J.J. Growth rates of follicles in the ovary of the cow. **J. Reprod. Fert.**, v. 81, p. 301-307, 1987.

MARKOVIC, D.; PAVLOVIC, M.; PAVLOVIC, V. Seasonality, folliculogenesis and luteogenesis in mare ovaries. **Medicine and Biology**. v. 10, n. 3, p. 120-6, 2002.

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

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.

PETERS, H. The development and maturation of the ovary. **Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.**, v. 16, n. 3, p. 271-278, 1976.

RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; COSTA, S.H.F.; MATOS, M.H.T.; SANTOS, R.R.; LUCCI, C.M.; BAO, S.N.; FIGUEIREDO, J.R. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using glycerol and ethylene glycol. **Theriogenology**, v.61, p.1009-24, 2004.

RUSSE, I. Oogenesis in Cattle and Sheep. **Bibl. Anat.**, v. 24, p. 77-92, 1983.

SANTOS, R.R.; VAN DEN HURK, R.; RODRIGUES, A.P.R.; COSTA, S.H.F.; MARTINS, F.S.; MATOS, M.H.T.; CELESTINO, J.J.H.; FIGUEIREDO, J.R. Effect of cryopreservation on viability, activation and growth of *in situ* and isolated ovine earlystage follicles. **Anim Reprod Sci**, v.99, p.53-64, 2006.

SAUMANDE, J. La Folliculogenèse Chez les Ruminats. **Rec. Vet.**, v. 167, p. 205-18, 1991.

SCARAMUZZI, R.J., ADAMS, N.R., BAIRD, D.T., CAMPBELL, B.K., DOWNING, J.A., FINDLAY, J.K., HENDERSON, K.M., MARTIN, G.B., MCNATTY, K.P., MCNEILLY, A.S. & TSONIS, C.G. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 5, p. 459-478, 1993.

SILVA, J.R.V.; LUCCI, C.M.; CARVALHO, F.C.A.; BÁO, S.N.; COSTA, S.H.F.; SANTOS, R.R.; FIGUEIREDO, J.R. Effect of coconut water and braun-collins solutions at different temperatures and incubation times on the morphology of goat preantral follicles preserved *in vitro*. **Theriogenology**, v. 54, p. 809-22, 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. 33-35, 2008.

TELFER, E.E. The Development of Methods for Isolation and Culture of Preantral Follicles from Bovine and Porcine Ovaries. **Theriogenology**, v. 45, p. 101-110, 1996.

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

WANDJI, S.A., EPPIG, J.J. & FORTUNE, J.E. FSH and Growth Factor Affect the Growth and Endocrine Function *in vitro* of Granulosa Cells of Bovine Preantral Follicles. **Theriogenology**, 45:817-832, 1996.

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

5 ARTIGO DE REVISÃO

ARTIGO A

“Transporte e armazenamento de tecido ovariano equino para utilização em biotécnicas reprodutivas”

Transporte e armazenamento de tecido ovariano equino para utilização em biotécnicas reprodutivas

(Transport and storage of ovarian tissue for use in equine reproductive biotechnologies)

Roberta Garbelini Gomes¹; Marcelo Marcondes Seneda^{1,2}

¹ Laboratório de Reprodução Animal, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil, 86051-990

² Correspondência: mseneda@uel.br

Resumo

As biotécnicas da reprodução na espécie equina têm evoluído vagarosamente quando comparada a outras espécies como bovinos, ovinos e caprinos. Várias questões ainda necessitam de esclarecimento como a avaliação da competência biológica dos gametas, capacitação espermática, maturação *in vitro* de oócitos, desenvolvimento de protocolos de cultivo e até mesmo a definição dos eventos precoces da foliculogênese. O tecido ovariano de éguas no pós-morte poderá representar a última possibilidade de obtenção de material genético, podendo no futuro facilitar a obtenção de bancos de germoplasma, ressaltando mais expressivamente a importância de se estabelecer um protocolo ideal de conservação de oócitos para posterior aplicação em biotecnologia. No presente, o maior entrave quanto ao aproveitamento de oócitos inclusos em folículos ovarianos é a dificuldade em manter a viabilidade folicular após a remoção e transporte dos ovários. Sendo assim, o desenvolvimento de um meio de transporte, em tempo e temperatura ideais de conservação para os folículos ovarianos é uma etapa crucial e de suma importância para utilização de oócitos inclusos em folículos ovarianos para posterior utilização em biotécnicas.

Palavras-chave: equino, folículo, pré-antral, conservação.

Abstract

Reproduction biotechnologies in equine species have evolved slowly compared to other species such as cattle, sheep and goats. Several issues still need clarification: evaluating the biological competence of the gametes; sperm capacitation; *in vitro* maturation of oocytes; development of cultivation protocols and even the definition of early folliculogenesis; just to name a few examples. The afterlife ovarian tissue of mares could represent the last hope for obtaining genetic material, which may in future facilitate the acquisition of germplasm banks, expressively emphasizing the importance of establishing an optimal protocol for oocytes storage for later use in biotechnology. Currently, the biggest obstacle for the use of oocytes enclosed in follicles is the difficulty in maintaining follicular viability after ovaries removal and transportation. Therefore, developing means of transport, time and temperature for optimal ovarian follicle conservation is crucial and critical for use of oocytes enclosed in follicles for later use in biotechnologies.

Keywords: equine, follicle, preantral, conservation.

Introdução

A população mundial de equídeos encontra-se estável nas últimas décadas e é estimada atualmente em 113.473.522 cabeças, sendo 58.770.171 equinos, 43.496.677 asininos e 11.206.674 muares. Deve-se destacar na última década a redução da população de equinos na Ásia, principalmente na China, de 8.916.154 cabeças em 2000 para 6.823.465 cabeças em 2008, associada à migração interna da população humana, com menor utilização dos equídeos no transporte e agricultura e maior consumo de carne equina. Por outro lado, nos Estados Unidos houve aumento expressivo da população de equinos, de 5.240.000 cabeças em 2000 para 9.500.000 cabeças em 2008, em parte devido a restrições legais internas para o abate e exportação de carne de equídeos, ocorrendo o fechamento de todos os abatedouros equinos do país (Almeida & Silva, 2010).

No Brasil, a população de equídeos é estimada atualmente em 7.986.023 cabeças, sendo 5.541.702 equinos, 1.130.795 asininos e 1.313.526 muares. A população nacional de equídeos é a quarta maior do mundo, e tem se mantido estável na última década. Na América do Sul, além do Brasil, a produção de equinos é destaque na Argentina, com rebanho estimado em 3.680.000 animais e na Colômbia, com 2.520.000 animais (Almeida & Silva, 2010).

O Paraná é o Estado Brasileiro que mais exportava carne equina (Figura 1). Dos sete abatedouros de equinos que o Brasil possui, dois estavam localizados no Estado do Paraná, um em Santa Fé e outro em Apucarana, no entanto, ambos encontram-se com suas atividades paralisadas. Estas unidades exportavam carne para países como Itália, Bélgica, Holanda, Suécia, Suíça e Japão. O número de animais abatidos e de dinheiro movimentado com a exportação de carne equina no Paraná correspondia a mais de 50% da produção nacional de carne equina exportada (Santin, W. Disponível em: <<http://www.paginarural.com.br/noticia/95426/estado-e-o-cdeao-da-carne-de-cavalo>> Acesso em: 08 agosto 2010).

A equideocultura brasileira ocupa posição de destaque internacional não só pelo expressivo número de animais, como também pela excelência de seu plantel. Adicionalmente, a indústria do cavalo é uma importante área geradora de divisas e empregos no Brasil. Hoje, o Brasil é um país de referência na pesquisa e na utilização de biotécnicas aplicadas à

reprodução equina. Contudo, para se manter um país competitivo, faz-se necessário a incorporação de novas biotécnicas para acelerar e facilitar o melhoramento genético (Carmo *et al.*, 2002).

O objetivo do presente trabalho é relatar a importância do correto aproveitamento de ovários equinos pós-morte, com ênfase nos critérios de conservação e transporte.



Figura 1. Abatedouro de equinos (Foto cedida por Gercio Luiz Bonesi).

Biotécnicas da reprodução em equinos

Nas últimas décadas, diversas biotécnicas da reprodução assistida têm sido desenvolvidas com a finalidade de aumentar a utilização do potencial reprodutivo em fêmeas mamíferas, tais como a IA, a TE, a FIV, a transgênese, a clonagem, a GIFT e, mais recentemente, a MOIFOPA (Figueiredo, 1995; Muruvi *et al.*, 2005), as quais tem despertado grande interesse em criadores e associações de raças equinas. Entretanto, a utilização em larga escala destes procedimentos depende da disponibilidade de oócitos maturados, que constituem uma pequena porção dos oócitos presentes no ovário (Muruvi *et al.*, 2005).

A inseminação artificial (IA) é a biotecnologia da reprodução que mais se mostrou

economicamente viável e de fácil implementação em todas as espécies de animais domésticos. Embora o uso da IA em equinos tenha uma citação mais antiga (1322), ela não acompanhou a evolução científica na mesma intensidade como em outras espécies como bovinos e ovinos. No Brasil, os primeiros registros sobre o uso da IA em equinos foi em 1928 por Lima Corrêa e as primeiras ocorreram em 1931 e 1932 no Rio Grande do Sul. A espécie equina é a única em que os índices de fertilidade com a utilização da IA ultrapassa os índices da monta natural. Além disso, outras vantagens da utilização desta biotécnica são o controle sanitário, progresso genético e economia do garanhão. No entanto, a IA também tem suas desvantagens como grande variabilidade e imprevisibilidade na tolerância a diferentes diluidores, refrigeração e congelamento entre os ejaculados dos garanhões (Pimentel & Carneiro, 2008).

As vantagens da Transferência de embriões são a obtenção de produtos de éguas problemáticas e idosas, aumento da produção de éguas geneticamente superiores, obtenção de produtos de éguas que estão em treinamento sem a necessidade de passar pelos processos de gestação e lactação e obtenção de produtos de potras com dois anos de idade sem afetar o seu desenvolvimento (Pimentel & Carneiro, 2008). Diferentemente das outras espécies, nos equinos a transferência de embriões congelados obteve avanços limitados. Dentre os fatores responsáveis temos a dificuldade em induzir a superovulação, o embrião equino ser envolto por uma membrana acelular denominada cápsula que impede a penetração de substâncias crioprotetoras dificultando o congelamento destes embriões nas fases de blastocisto ou blastocisto expandido. Sendo assim, pesquisas concluíram que os embriões de sexto dia suportam melhor o processo de criopreservação que embriões de sétimo e oitavo dia (Pimentel & Carneiro, 2008).

Infelizmente na espécie equina até o presente momento tem-se poucos relatos quanto à produção de embriões através da fertilização *in vitro* (FIV) assim como se faz corriqueiramente na outras espécies. Em razão ainda do número limitado de abatedouros de equinos, o tempo da colheita dos ovários para a realização da aspiração dos oócitos tem uma variação considerável dificultando conseqüentemente os estudos devido ao comprometimento da viabilidade dos oócitos (Pimentel & Carneiro, 2008).

A clonagem é uma biotecnologia que vem sendo aplicada na espécie equina como forma de salvar genética equina de valor. Diversos clones de muare já foram produzidos por células fetais e também oriundos de células de animais adultos como doadores. Apesar dos estudos iniciais de prenhez oriundas de clonagem equina ter uma pobre eficiência quanto ao nascimento destes produtos de clones (75 a 100% das gestações são perdidas), técnicas mais recentes tem sido mais eficientes com taxas de prenhez por embrião transferidos e 50% ou

mais prenhez chegando a termo (Hinrichs, 2006).

Nos últimos anos, tem se aumentado o interesse quanto a obtenção de potros via reprodução assistida de éguas que morreram subitamente ou foram submetidas à eutanásia devido a questões médicas. Nestas situações, os ovários de éguas podem ser coletados após a morte e processados para a recuperação de oócitos (Preis *et al.*, 2004).

Em equinos as pesquisas a respeito dos eventos precoces da fertilização têm progredido muito lentamente quando comparado a outras espécies de animais domésticos. O sucesso na produção *in vitro* de embriões depende de diversos fatores como disponibilidade de oócitos imaturos saudáveis, capacitação espermática com eficiência, ótimas condições de cultivo e métodos de maturação *in vitro* (Parrish *et al.*, 1986; Xu *et al.*, 1987).

Pesquisas com folículos pré-antrais de outras espécies como camundongos resultaram na obtenção de crescimento folicular, formação de antro, ovulação *in vitro* e obtenção de produtos através dos procedimentos de FIV e MIV. Até o presente momento, não há nenhuma documentação na literatura quanto à obtenção de progênies de equinos oriundos da MOIFOPA. Além disso, há uma grande escassez de relatos descrevendo a distribuição e morfologia de folículos pré-antrais de éguas (Szlachta & Tischner, 2008).

Devido à escassez de pesquisas quanto às condições ideais para transporte de tecido ovariano equino, as únicas alternativas atuais são os dados com outras espécies. No entanto, face às importantes diferenças anátomo-fisiológicas, compreende-se claramente a necessidade do estabelecimento de condições apropriadas para a espécie equina (Ribeiro *et al.*, 2008).

Meios e transporte de ovários para utilização de oócitos na reprodução equina

A diminuta disponibilidade de oócitos para utilização em pesquisas na espécie equina tem sido o principal fator limitante para o desenvolvimento de biotécnicas da reprodução assistida. No entanto, esta situação pode ser melhor contornada através da utilização do grande número de oócitos que estão inclusos nos folículos pré-antrais ovarianos (Telfer, 1996), os quais estão presentes em números consideráveis (centenas a milhões) dependendo da espécie (Lucci *et al.*, 2004; Lopes *et al.*, 2009; Lima *et al.*, 2010).

A redução do número de abatedouros de equinos em todo o continente Americano é uma realidade. Esta situação restringe o acesso aos tecidos ovarianos equinos reduzindo o progresso das pesquisas com relação a esta espécie (Preis *et al.*, 2004).

Ovários de éguas no pós-morte, constituem uma importante fonte de material biológico, para obtenção e cultivo de oócitos. Sendo assim, os fatores relacionados ao transporte destes ovários são fundamentais para as biotécnicas posteriores. Em geral, adota-se

empiricamente um meio enriquecido para este propósito, como TCM-199, soluções salinas acrescidas de antibióticos, solução comercial de lavagem de embrião e PBS (Carnevale & Maclellan, 2006). Um estudo comparativo entre meios seria essencial, pois a qualidade do oócito incluso no folículo pré-antral depende do meio, tempo e temperatura para sua correta conservação e transporte até o laboratório (Matos *et al.*, 2004).

Neste contexto, o estabelecimento de protocolos ideais (meios, tempo e temperatura) de conservação do tecido ovariano torna-se importantes quando se utilizará folículos pré-antrais nas técnicas da reprodução (Andrade *et al.*, 2002; Costa *et al.*, 2005), pois o sucesso na criopreservação e ou cultivo de folículos pré-antrais depende da qualidade dos oócitos inclusos nestes folículos (Andrade *et al.*, 2001; Carvalho *et al.*, 2001).

Diversas pesquisas têm sido relatadas quanto a conservação em curtos períodos de folículos pré-antrais em diferentes meios e temperaturas em outras espécies como caprinos (Silva *et al.*, 2000; 2001; Carvalho *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2001), ovinos (Andrade *et al.*, 2001; 2002; Matos *et al.*, 2004), camundongos (Eppig & O'Brien, 1996), bovinos (Figueiredo *et al.*, 1994; Gutierrez *et al.*, 2000; Lucci *et al.*, 2004), humanos (Roy & Treacy, 1993), búfalos (Sharma *et al.*, 2009), caninos (Lopes *et al.*, 2009) e suínos (Lucci *et al.*, 2007). Porém, na espécie equina pouco se tem publicado quanto a protocolos de conservação do tecido ovariano para posterior cultivo ou recuperação de oócitos.

A temperatura de transporte afeta muito a qualidade do oócito equino, sendo reportado até o presente momento temperaturas como 4°C, 9 a 16°C, 22 a 30°C, e 30 a 35°C. Nestes experimentos foram observados que os ovários não podem permanecer mais que 3 horas entre 20°C e 30°C ou mais que 2 horas de 35 a 37°C no intuito de prevenir a apoptose de células da granulosa (Carnevale & Maclellan, 2006).

O transporte dos ovários até os laboratórios requer um tempo de armazenagem para o processamento. Os períodos descritos na literatura têm variado de 1 a 24 horas. No entanto, alguns estudos reportaram altas taxas de maturação oocitária quando estes oócito foram coletados diretamente no abatedouro, sugerindo que um curto período de transporte até o laboratório poderá influenciar a competência meiótica do oócito (Carnevale & Maclellan, 2006).

Alguns autores têm reportado o efeito de tempos e temperaturas de transporte de ovários equinos oriundos de abatedouros para posterior colheita de oócitos. Del Campo *et al.* (1995) transportou ovários equinos inteiros em solução salina em temperaturas variando de 30 a 35°C por 3 a 15 horas, obtendo taxas de maturação oocitária de 49%. Guignot *et al.* (1999) relatou que ovários equinos podem ser transportados por até 6 a 8 horas em temperaturas

variando de 27 a 37°C com taxas de maturação em torno de 37 a 44%. Contrariamente, Love *et al.* (2003) obteve resultados inferiores quanto a maturação oocitária quando os ovários foram mantidos por longos períodos (3 a 9 horas) nestas mesmas condições.

Mesmo assim, a temperatura ideal, o tempo e meios de armazenamento para o transporte do tecido ovariano equino ainda não foram determinadas, sendo a única alternativa a coleta dos oócitos e transporte dos mesmos em meios de incubação (Carnevale & Maclellan, 2006).

Considerações finais

Apesar dos grandes avanços das biotécnicas da reprodução na espécie equina nos últimos anos, diversos aspectos ainda necessitam de esclarecimento. As principais questões estão associadas com a avaliação da competência biológica dos gametas e com o próprio sistema de cultivo (Pimentel & Carneiro, 2008).

Pelo tecido ovariano de éguas no pós-morte representar a última possibilidade de obtenção de produtos com o devido valor genético, este material é considerado insubstituível (Ribeiro *et al.*, 2008), enfatizando mais expressivamente a importância da conservação ideal deste material genético para posterior manipulação.

A correta conservação do tecido ovariano com a manutenção da viabilidade dos gametas femininos requer condições ideais de temperatura, meios e período de armazenagem.

REFERÊNCIAS

Almeida, F. Q.; Silva, V. P. Progresso científico em equideocultura na 1ª década do século XXI. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v. 39, p. 119-29, 2010.

Andrade, E. R.; Amorim, C. A.; Costa, S. H. F.; Ferreira, M. A. L.; Rodrigues, A. P. R.; Dode, M. A. N.; Figueiredo, J. R. Preliminary study of short-term preservation of ovine ovarian tissue containing preantral follicles in saline solution or TCM199. *Veterinary Record*. v. 151, p. 452-53, 2002.

Andrade, E. R.; Rodrigues, A. P. R.; Amorim, C. A.; Carvalho, F. C. A.; Dode, M. A. N.; Figueiredo, J. R. Short-term maintenance of sheep preantral follicles in situ in 0,9% saline and Braun Collins solutions. *Small Ruminant Research*. v. 41, n. 2, p.141-149, 2001.

Carmo, M.T.; Trinque, C.L.N.; Lima, M.M.; Medeiros, A.S.L.; Alvarenga, M.A Estudo da incidência de múltiplas ovulações em éguas da raça Brasileiro de Hipismo e suas implicações em um programa de transferência de embriões. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. Belo Horizonte, v. 26, n. 3, p. 252 -4, 2002.

Carnevale, E. M.; Maclellan, L.J. Collection, evaluation, and use of oocytes in equine assisted reproduction. In: Carnevale, E. M. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. v. 22, n.3, p. 843-56, 2006.

Carvalho, F.C.A.; Lucci, C.M.; Silva, J.R.V.; Andrade, E.R.; Bão, S.N.; Figueiredo, J.R. Effect of Braun-collins and saline solutions at different temperatures and incubation times on the quality of goat preantral follicles preserved in situ. *Animal Reproduction Science*. v. 66, p. 195-208, 2001.

Costa, S.H.F.; Andrade, E.R.; Silva, J.R.V.; Rodrigues, A.P.R.; Amorim, C.A.; Lôbo, R.N.B.; Ohashi, O.M.; Figueiredo, J.R. Preservation of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue in saline or TCM 199 solutions. *Small Ruminant Research*. v. 58, p. 189-93, 2005.

Del Campo, M. R.; Donoso, X.; Parrish, J. J.; Ginther, O. J. Selection of follicles, preculture oocyte evaluation, and duration of culture for in vitro maturation of equine oocytes.

Theriogenology, v. 43, p. 1141-53, 1995.

Eppig, J.J. & O'Brien, M.J. Development *in vitro* of Mouse Oocytes from Primordial Follicles. Biol. Reprod., v.54, p.197-207, 1996.

Ferreira, M.A.L.; Figueiredo, J.R. Morphological and ultrastructural changes occurring during degeneration of goat preantral follicles preserved *in vitro*. Animal Reproduction Science. v. 66, p. 109-23, 2001.

Figueiredo, J. R. Isolement, caractérisation et culture et follicules préantraux chez les bovins. Liege-Belgique: Université de Liège, These PhD. p. 113, 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.

Guignot, F.; Bezar, J.; Palmer, E. Effect of time during transport of excised mare ovaries on oocyte recovery rate and quality after in vitro maturation. Theriogenology, v. 52, p. 757-66, 1999.

Gutierrez, C.G.; Ralph, J.H.; Telfer, E.E.; Wilmut, I. & Webb, R. Growth and Antrum Formation of Bovine Preantral Follicles in Long-Term Culture *in vitro*. Biol. Reprod., v.62, p.1322-28, 2000.

Hinrichs, K. Equine Cloning. Carnevale, E. M. Veterinary Clinics of North America: Equine Practice. v. 22, n.3, p. 857-66, 2006.

Lima, G.L.; Costa, L.L.M.; Cavalcanti, D.M.L.P.; Rodrigues, C.M.F.; Freire, F.A.M.; Fontenele-Neto, J.; Silva, A.R. Short-term storage of canine preantral ovarian follicles using a powdered coconut water (ACP®)-based medium. Theriogenology. v. 74, p. 146-52, 2010.

Lopes, C. P.; Santos, R. R.; Celestino, J, J. H.; Melo, M. A. P.; Chaves, R. N.; Campello, C. C.; Silva, J. R. V.; Bao, S. N.; Jewgenowb, K.; Figueiredo, J. R. Short-term preservation of canine preantral follicles: Effects of temperature, medium and time. *Animal Reproduction Science*. v. 115, p. 201-14, 2009.

Love, L. B.; Choi, Y. H.; Love, C. C.; Varner, D. D.; Hinrichs, K. Effect of ovary storage and oocyte transport method on maturation rate of horse oocytes. *Theriogenology*, v. 59, p. 765-74, 2003.

Lucci, C.M.; Kacinskis, M.A.; Rumpf, R.; Bao, S.N. Effect of lowered temperatures and media on short-term preservation of zebu (*Bos indicus*) preantral ovarian follicles. *Theriogenology*. v. 61, p. 461-72, 2004.

Lucci, C.M.; Shreier, L.L.; Machado, G.M.; Amorim, C.A.; Bao, S.N.; Dobrinsky, J.R. Effects of storing pig ovaries at 4 or 20°C for different periods of time on the morphology and viability of pre-antral follicles. *Reprod. Dom. Anim*. v. 42, p. 76–82, 2007.

Matos, M.H.T.; Andrade, E.R.; Lucci, C.M.; Bao, S.N.; Silva, J.R.V.; Santos, R.R.; Ferreira, M.A.L.; Costa, S.H.F.; Celestino, J.J.H.; Figueiredo, J.R. Morphological and ultrastructural analysis of sheep primordial follicles preserved in 0,9% saline solution and TCM 199. *Theriogenology*. v. 62, p. 65-80, 2004.

Muruvi, W.; Picton, H. M.; Rodway, R.G.; Joyce, I.M. In vitro growth of oocytes from primordial follicles isolated from frozen–thawed lamb ovaries. *Theriogenology*. v. 64, p. 1357–70, 2005.

Parrish, J. J.; Susko-Parrish, J. L.; Leibfried-Rutledge, M. L.; Critser, E. S.; Eyestone, W. H.; First, N. L. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. *Theriogenology*, v. 25, p. 591-600, 1986.

Pimentel, C. V.; Carneiro, G. F. Biotecnicas aplicadas a reproducao de equinos. *In: Gonalvez, P. B. D.; Figueiredo, J. R.; Freitas, V. J. F. Biotecnicas aplicadas a reproducao animal*. 2^a edicao, Editora Roca, 2008.

Preis, K.A.; Carnevale, E.M.; Coutinho da Silva, M.A.; Caracciolo di Brienza, V.; Gomes, G.M.; Maclellan, L.J.; Squires, E.L. *In vitro* maturation and transfer of equine oocytes after transport of ovaries at 12 or 22°C. *Theriogenology*. v. 61, p. 1215-23, 2004.

Ribeiro, B.I.; Love, L.B.; Choi, Y.H.; Hinrichs, K. Transport of equine ovaries for assisted reproduction. *Animal Reproduction Science*. v. 108, p. 171-9, 2008.

Roy, S. K. & Treacy, B. J. Isolation and Long-Term Culture of Human Preantral Follicles. *Fertil. Steril.*, 59:783-790, 1993.

Santin, Wilhan. PR: Estado é o campeão da carne de cavalo. Disponível em:
<<http://www.paginarural.com.br/noticia/95426/estado-e-o-cdeao-da-carne-de-cavalo>> Acesso em: 08 agosto 2010.

Sharma, G.T.; Dubey, P.K.; Meur, S.K. Effect of different mechanical isolation techniques on developmental competence and survival of buffalo ovarian preantral follicles. *Livestock Science*. v. 123, p. 300-5, 2009.

Silva, J.R.V.; Bão, S.N.; Lucci, C.M.; Carvalho, F.C.A.; Andrade, E.R.; Ferreira, M.A.L.; Figueiredo, J.R. Morphological and ultrastructural changes occurring during degeneration of goat preantral follicles preserved *in vitro*. *Animal Reproduction Science*. v. 66, p. 109-23, 2001.

Silva, J.R.V.; Lucci, C.M.; Carvalho, F.C.A.; Bão, S.N.; Costa, S.H.F.; Santos, R.R.; Figueiredo, J.R. Effect of coconut water and braun-collins solutions at different temperatures and incubation times on the morphology of goat preantral follicles preserved *in vitro*. *Theriogenology*. v. 54, p. 809-22, 2000.

Szlachta, M.; Tischner, M. Distribution, morphology and ultrastructure of preantral follicles in the ovary of the mare. *Havemeyer Foundation Monograph Series*. v. 5, p. 33-5, 2008.

Telfer, E.E. The development of methods for isolation and culture of preantral follicles from bovine and porcine ovaries. *Theriogenology*. v. 45, p. 101-10, 1996.

Xu, K. P.; Greve, T.; Callesen, H.; Hyttel, P. Pregnancy resulting from cattle oocyte matured and fertilized *in vitro*. J. Reprod. Fertil.. v. 81, p. 501-04, 1987.

6 ARTIGO EXPERIMENTAL

ARTIGO B

“Efeito do tempo e temperatura sobre a viabilidade de folículos ovarianos equinos transportados em MEM ou PBS”

Efeito do tempo e temperatura sobre a viabilidade de folículos ovarianos equinos transportados em MEM ou PBS.

R.G. Gomes¹; E.R. Andrade¹; A. Ciquini¹; T.R.R. Barreiros²; N.A.N. Fonseca¹; M.M. Seneda^{1*}

1 Laboratório de Reprodução Animal, DCV-CCA-UEL, Londrina PR, 86051-990 Brazil

2 Laboratório de Reprodução Animal – Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP), Campus Luiz Meneghel, Bandeirantes PR, 86360-000 Brazil

*Corresponding author: Marcelo Marcondes Seneda. Laboratório de Reprodução Animal, DCV, CCA, UEL, Londrina, PR, 86051-990, Brazil. Phone 55 (43) 3371-4064 Fax 55 (43) 3371-4063 mseneda@uel.br

Resumo

No presente trabalho investigou-se a eficiência da solução de PBS (Phosphate-buffered saline) e MEM (Meio Essencial Mínimo) na preservação de folículos pré-antrais e antrais eqüinos *in situ*, em diferentes temperaturas e períodos de tempo. Os ovários (n=10) foram obtidos em abatedouro. Cada ovário foi dividido em 19 fragmentos. Um fragmento foi aleatoriamente designado como controle e imediatamente fixado em Bouin para análise histológica (T1 - controle). Os outros 18 fragmentos foram distribuídos em tubos contendo 10 mL de solução de PBS ou MEM a 4, 20 ou 39°C, por 4, 12 ou 24 horas. Um total de 2567 folículos foram examinados, sendo 1752 primordiais, 764 primários, 34 secundários e sete antrais. A conservação de fragmentos ovarianos eqüinos em ambas as soluções reduziu significativamente a porcentagem de folículos morfolologicamente normais com o aumento do tempo e temperatura comparado com o grupo controle. A 39°C a degeneração folicular ocorreu em todos os folículos analisados a partir de 12 horas de conservação em ambos os meios. A solução de PBS apresentou maior quantidade de folículos morfolologicamente normais a 4°C por até 4 horas que a solução de MEM ($P < 0,01$). Os folículos primordiais apresentaram-se mais resistentes à conservação que os folículos primários e secundários em todos os meios, tempos e temperaturas. A exceção ocorreu a 4°C por 12 horas em PBS, condição na qual os folículos primários e secundários foram mais resistentes. Os folículos antrais apresentaram viabilidade quando conservados em MEM a 4°C por até 4 horas. Neste trabalho os folículos pré-antrais eqüinos foram melhor conservados *in situ* a 4°C em PBS por até 4 horas.

Palavras-chave: eqüino, conservação, ovário, folículos.

1 Introdução

Nos últimos anos, tem aumentado o interesse em se obter potros oriundos de biotécnicas da reprodução assistida de éguas que morreram ou foram submetidas à eutanásia. Nestas situações, os ovários destes animais podem ser coletados no pós-morte e processados na tentativa de se recuperar oócitos viáveis [3,22,23].

A manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais poderá contribuir para a multiplicação de animais de alto valor zootécnico ou em via de extinção. Além disso, a obtenção de oócitos é fundamental para biotécnicas como produção *in vitro* de embriões, clonagem e transgênese. Adicionalmente, a criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais ou *in situ* é de grande importância na constituição de bancos de germoplasma animal [10].

Os folículos pré-antrais representam cerca de 90% da população folicular e apenas 10% correspondem a folículos antrais. Porém, a maioria destes folículos (99,9%) não se desenvolve até a ovulação e acabam sofrendo um processo conhecido como atresia [1,6,15,20,28]. O resultado disso é a reduzida produção de oócitos viáveis pelas fêmeas durante sua vida reprodutiva [21].

A utilização de oócitos equinos tem sido bastante limitada, devido à dificuldade de acesso ao material pela escassez de abatedouros desta espécie. Tal fato ocorre em muitos países, provavelmente devido a problemas econômicos, políticas de exportação e também questões ligadas ao bem estar animal [12,17,22].

Sendo assim, o desenvolvimento de protocolos de conservação do tecido ovariano torna-se crucial para o máximo aproveitamento de oócitos nas diversas biotécnicas da reprodução na espécie equina [2,4,6].

Até o presente momento, diversas pesquisas têm sido realizadas quanto a conservação de tecido ovariano em curtos períodos, combinando diferentes temperaturas e meios em várias espécies como camundongos [8], caprinos [4,9,27], ovinos [2,21], bovinos [11,13,19], caninos [16], humanos [24], búfalos [25] e suínos [20]. Entretanto, a literatura é escassa em estudos sobre conservação de folículos ovarianos na espécie equina.

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do tempo, temperatura e meio de conservação sobre a viabilidade de folículos ovarianos na espécie equina.

2 Material e métodos

2.1 Colheita dos ovários

Apenas um dos ovários (n=10) oriundos de 10 éguas (sem corpo lúteo e sem folículo dominante) de diversas raças em anestro estacional (Abril a Junho/2008) foram coletados no abatedouro “Santa Fé”, localizado na cidade de Santa Fé no Estado do Paraná, Brasil, à aproximadamente 150 km do Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Estadual de Londrina (UEL) (1h30’), imediatamente após o abate das mesmas.

Após a colheita das amostras, os ovários foram dissecados com lâmina de bisturi, retirando-se todo o tecido adiposo e conectivo, cortado sagitalmente e a porção cortical (mais interna) foi dividida em 19 fragmentos de aproximadamente 3 x 3 x 1 mm. Em seguida, estes fragmentos foram lavados em álcool 70% por aproximadamente 10 segundos e logo após, em solução salina 0,9%.

2.2 Meios

A eficiência de dois diferentes meios foram avaliados *in situ* com relação à conservação dos folículos pré-antrais e antrais de eqüinos. Os meios testados foram: Meio Essencial Mínimo (MEM) (Gibco, Grand Island, NY, USA, Cat. No. 41500-034) e Solução de Phosphate-Buffered Saline (PBS) (Sigma, St Louis, MO, USA).

2.3 Protocolo experimental

Um fragmento de cada ovário foi aleatória e imediatamente fixado em solução de Bouin por 24 horas como controle (T1). Os outros 18 fragmentos foram distribuídos em tubos de 15 mL contendo 10 mL de MEM ou PBS a 4, 20 ou 39°C e conservados por 4, 12 ou 24 horas como mostra a Figura 1. Os tubos contendo os fragmentos e meios permaneceram imersos em água nas temperaturas descritas. Chegando ao laboratório, os tubos a 4°C foram mantidos em geladeira, a 20°C em caixas de isopor e a 39°C em banho-maria. Todos os tubos permaneceram imersos em água e a temperatura da mesma foi ajustada de acordo com a necessidade com auxílio de termômetros e controlada rigorosamente durante todo o período experimental.

2.4 Análise qualitativa dos folículos ovarianos equinos

Todos os fragmentos foram submetidos à fixação em Bouin por 24 horas, desidratados em álcool, diafanizados em xilol, infiltrados em parafina e seccionados seriadamente à espessura de 5 µm. A cada cinco secções, os cortes foram montados em lâminas e corados

com ácido periódico de Schiff (PAS) - hematoxilina. Todas as secções foram examinadas usando microscopia óptica (200x e 400x – Binocular Nikon® Eclipse E-200), por um único examinador.

Os folículos foram classificados de acordo com o seu estágio de desenvolvimento, em primordiais (oócito circundado por uma camada de células da pré-granulosa de formato pavimentoso), primários (oócito circundado por uma camada de células da granulosa de formato cúbico), secundários (oócito circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa de formato cúbico) e antrais (oócito circundado pela zona pelúcida com várias camadas de células da granulosa e cavidade antral) [14].

Em cada um dos tratamentos, foram avaliados microscopicamente todos os folículos pré-antrais e antrais presentes.

A qualidade folicular foi avaliada baseada na integridade da membrana basal, densidade celular, presença ou ausência de picnose e integridade do oócito. Baseando-se nestes parâmetros, os folículos foram classificados em morfologicamente normais ou degenerados (oócito ou oócito mais célula da granulosa degenerados) [15].

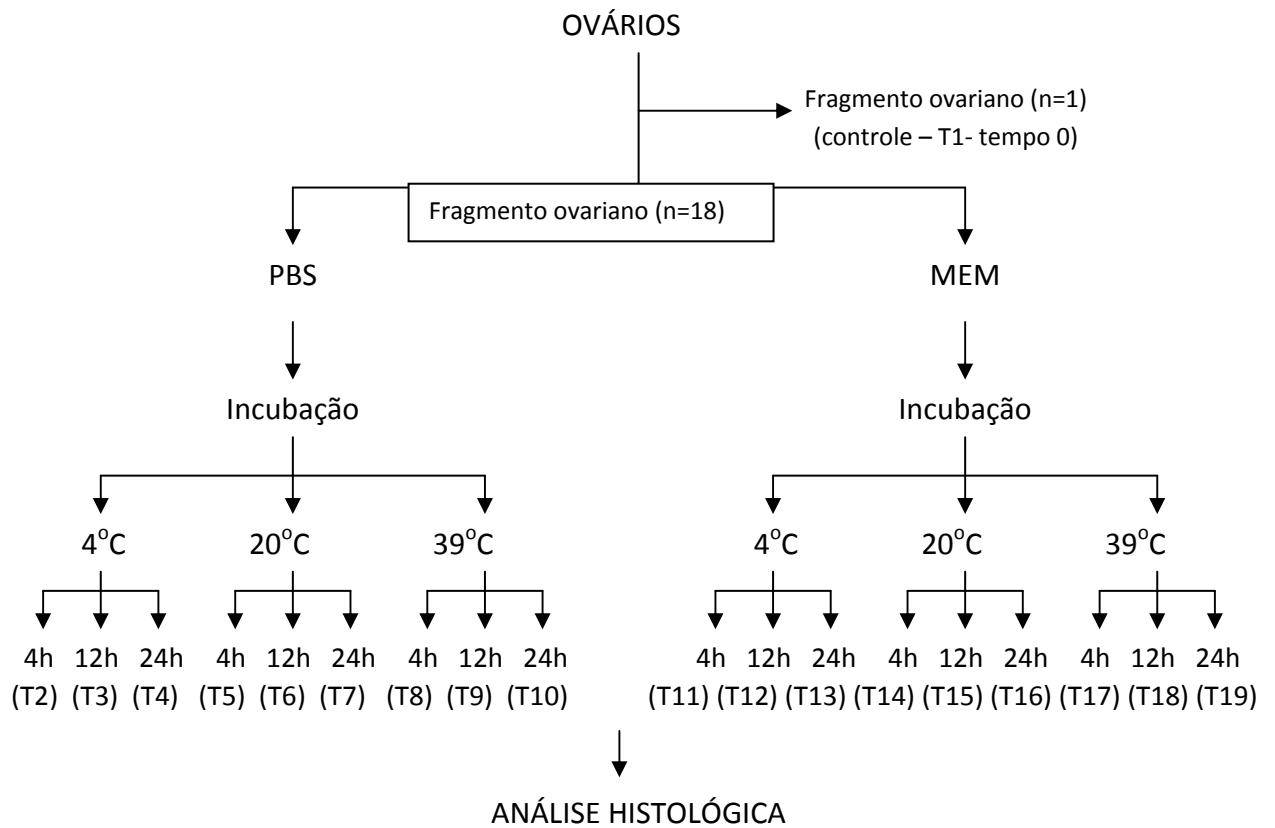


Figura 1. Protocolo experimental para conservação de folículos ovarianos equinos *in situ*.

2.5 Análise estatística

As diferenças entre os tempos, temperaturas e meios foram analisadas através do teste qui-quadrado. Os valores foram considerados significantes estatisticamente quando $P < 0,01$.

3 Resultados

De um total 3000 lâminas, foram obtidos 2.567 folículos sendo 1.752 folículos primordiais (68,25%) (Figura 2, 4 e 5), 774 folículos primários (30,15%) (Figura 6 e 7), 34 folículos secundários (1,32%) (Figura 8 e 9) e sete folículos antrais (0,28%) (Figura 10 e 11).

Nos diferentes tratamentos testados, incluindo o controle, os folículos morfológicamente normais apresentaram oócito esférico com citoplasma uniforme e células da granulosa bem organizadas sem presença de núcleo picnótico (Figura 4). Já os folículos degenerados apresentaram oócito retraído, células da granulosa desorganizadas e baixa densidade celular, e em nenhum dos tratamentos foi observado picnose nas células da granulosa (Figura 5). Um total de 2212 folículos foram analisados e apresentaram degeneração (86,17%) e 355 (13,83%) se apresentaram morfológicamente normais (Figura 2).

A Figura 3 mostra o efeito da temperatura e tempo de conservação sobre a porcentagem de folículos pré-antrais e antrais morfológicamente normais incubados em PBS e MEM. A incubação dos folículos pré-antrais e antrais equinos em ambas as soluções em todas as temperaturas (4, 20 ou 39°C) apresentou diminuição da viabilidade folicular significativamente comparado com o controle (Tempo 0 - T1) em todos os tempos testados. É importante ressaltar que o controle apresentou apenas 2% de folículos degenerados.

O efeito do tempo de incubação em cada solução a cada temperatura foi analisada separadamente (Figura 3). A porcentagem de folículos morfológicamente normais foi afetada com o passar do tempo de conservação em quaisquer uma das temperaturas e soluções testadas. A 39°C em ambos os meios foi possível observar que a degeneração folicular foi intensa a partir de 12 horas de incubação, com ausência total de estruturas morfológicamente normais, apresentando diferença significativa com relação ao controle.

Em relação ao efeito das temperaturas durante os mesmo períodos de conservação, os resultados mostram que houve uma diminuição significativa da viabilidade folicular em ambos os meios em todas as temperaturas, no entanto, a 4°C os folículos viáveis se apresentaram em maior porcentagem que nas temperaturas mais elevadas ($P < 0,01$).

Os meios testados foram comparadas nas mesmas temperaturas e períodos de incubação. A solução PBS apresentou porcentagem significativamente maior de folículos morfológicamente normais a 4°C por até 4 horas de incubação comparado com o MEM.

Com relação às classes foliculares, foram analisados folículos primordiais (I) e folículos ativados (II), constituídos pelos folículos primários e secundários (Tabela 1). Os resultados mostraram que após a conservação a 4°C por 4 horas houve uma maior quantidade de folículos primordiais morfológicamente normais tanto no meio PBS como no MEM quando comparado aos folículos ativados, apresentando diferença significativa entres os meios ($P < 0,01$). A 4°C por 12 horas, o meio PBS apresentou maior quantidade de folículos ativados morfológicamente normais que folículos primordiais e o meio MEM apresentou resultados contrários ($P < 0,01$).

Apesar de não haver diferença significativa, houve a possível interpretação de que o meio PBS a 4°C poderia favorecer a preservação folicular em 12 horas de conservação.

Com relação aos folículos antrais, apenas sete folículos foram encontrados sendo três (42,86%) viáveis e quatro (57,14%) degenerados. Apesar de não haver diferença significativa, apenas a 4°C por 4 horas no meio MEM foi possível visualizar folículos antrais morfológicamente normais.

4 Discussão

Para o nosso conhecimento, este é o primeiro experimento que quantifica a viabilidade folicular *in situ* após fragmentação do tecido ovariano equino e conservação em diferentes meios, temperaturas e períodos de incubação.

O estudo mostra que folículos pré-antrais equinos podem ser conservados *in situ* com sucesso em PBS a 4°C por até 4 horas de incubação. Com o aumento do tempo de incubação, a porcentagem de degeneração folicular aumentou progressivamente comparada com o controle (Tempo 0). No presente experimento, os folículos primordiais apresentaram picnose no núcleo dos oócitos, já os folículos antrais não apresentaram picnose das células da granulosa. Este resultado mostra que a degeneração de oócitos é o modo de atresia mais frequentemente observado em folículos pré-antrais, sendo assim, o oócito é muito mais sensível aos eventos da degeneração que as células da granulosa [26]. É importante enfatizar que a presença de picnose nas células da granulosa não ocorreu devido ao curto período de incubação que os fragmentos ovarianos foram submetidos [1,4,27]. A picnose é geralmente encontrada em folículos conservados por mais de 48 horas e pode ser considerado o primeiro indicador de atresia em folículos antrais. A picnose da célula da granulosa é quase que ausente nos folículos pré-antrais, mas é vista nos folículos com antro [1,2,4,26,27].

A conservação em qualquer um dos meios a 20 e 39°C aumentou a taxa de degeneração independentemente do tempo de incubação dos folículos ovarianos equinos. A porcentagem de folículos morfolologicamente normais durante a incubação diminuiu com o aumento da temperatura de 4°C para 20°C e 39°C. A hipotermia promoveu uma preservação mais eficiente da morfologia dos folículos. Isto pode ser explicado pela redução do metabolismo seguido pela diminuição dos requerimentos de oxigênio e nutrientes tanto

quanto a produção de metabólitos, os quais são criticamente importantes já que as células estão em condições isquêmicas [4,5,15,19].

Oócitos equinos foram satisfatoriamente maturados (44 a 49%) quando o tecido ovariano inteiro foi transportado por 3 a 15 horas a temperaturas variando de 27°C a 37°C em solução salina [7,12], porém estes experimentos não utilizaram oócitos inclusos em folículos pré-antrais oriundos de tecido ovariano fragmentado. Já Love *et al.* (2003) relatou resultados inferiores a estes quando o tecido ovariano inteiro foi mantido por longos períodos (3 a 9 horas) nas mesmas condições supracitadas.

Diversos estudos realizados com outras espécies corroboram os nossos resultados, ou seja, a conservação a 4°C e 20°C preservou a morfologia dos folículos em bovinos [19], caprinos [4,9,18,26,27], ovinos [1,2,21], cadelas [15,16] e suínos [20]. Os folículos oriundos destas espécies mostraram-se mais resistentes aos tempos e temperaturas de conservação em comparação com os de equinos. No presente experimento, foi observado grande quantidade de folículos degenerados em todos os tratamentos (86,17%), o que difere de outros autores os quais observaram uma grande quantidade de oócitos viáveis inclusos em folículos pré-antrais [18].

A solução PBS apresentou melhores resultados após conservação dos folículos sob baixas temperaturas que a solução MEM. O PBS também foi utilizado na conservação de oócitos caprinos [6] e caninos [15] sob baixas temperaturas com os mesmo resultados satisfatórios, sendo tão efetivo quanto outros na preservação de folículos pré-antrais sob baixas temperaturas de conservação [1]. Neste estudo, foi possível notar que a solução de composição mais simples (PBS) apresentou efeito significativo sobre a porcentagem de folículos morfologicamente normais comparado com um meio mais rico em nutrientes (MEM). Isto pode ter ocorrido devido à temperatura ser um fator muito mais importante para a preservação de folículos pré-antrais em fragmentos ovarianos do que a própria composição

do meio [1,4,27]. Uma maior disponibilidade de nutrientes pode não ser capaz de melhorar a viabilidade folicular nestes casos, porque uma temperatura mais baixa e condições anaeróbicas não são ideais para o metabolismo celular [19].

A fragmentação da camada cortical (mais interna) do tecido ovariano equino promoveu uma fácil localização dos folículos pré-antrais e antrais, porém a densidade folicular visualizada foi muito inferior quando comparado com tecido ovariano de outras espécies. Isto também é afirmado por Szlachta & Tischner (2008) os quais encontraram folículos em tecido ovariano equino em qualquer porção da camada cortical.

Com relação à melhor viabilidade apresentada pelos folículos primordiais em relação aos ativados (primários e secundários) a 4°C, uma explicação seria a de que oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais são menores e menos ativos metabolicamente, podendo estes ser mais tolerantes ao processo de conservação [21].

Os folículos antrais encontrados neste experimento apresentaram-se em pequena quantidade (n=7) devido ao período em que o tecido ovariano foi coletado (anestro estacional), mesmo assim, podemos observar que estes folículos se apresentaram aparentemente mais exigentes quanto ao meio de conservação que os folículos primordiais, conforme já relatado por outros autores [19].

Este experimento permite concluir em primeira instância, que folículos ovarianos da espécie equina seccionados em pequenos fragmentos podem ser conservados com sucesso a 4°C por até 4 horas em PBS e, que estes podem ser encontrados em qualquer porção da camada cortical do tecido ovariano.

5 Referências

- [1] Andrade ER, Amorim CA, Matos MHT, Rodrigues APR, Silva JRV, Dode MAN, Figueiredo JR. Evaluation of saline and coconut water solutions in the preservation of sheep preantral follicles in situ. *Small Ruminant Research* 2002;43:235-43.
- [2] Andrade ER, Rodrigues APR, Amorim CA, Carvalho FCA, Dode MAN, Figueiredo JR. Short-term maintenance of sheep preantral follicles in situ in 0,9% saline and Braun-Collins solution. *Small Ruminant Research* 2001;41:141-9.
- [3] Carnevale EM, Maclellan LJ. Collection, evaluation, and use of oocytes in equine assisted reproduction. In: Carnevale EM. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*. 2006;22(3):843-56.
- [4] Carvalho FCA, Lucci CM, Silva JRV, Andrade ER, Bão SN, Figueiredo JR. Effect of Braun-collins and saline solutions at different temperatures and incubation times on the quality of goat preantral follicles preserved in situ. *Animal Reproduction Science* 2001;66:195-208.
- [5] Celestino JJH, Santos RR, Lopes CAP, Martins FS, Matos MHT, Melo MAP, Bão SN, Rodrigues, APR, Silva JRV, Figueiredo JR. Preservation of bovine preantral follicle viability and ultra-structure after cooling and freezing of ovarian tissue. *Animal Reproduction Science* 2008;108:309-18.
- [6] Costa SHF, Andrade ER, Silva JRV, Rodrigues APR, Amorim CA, Lôbo RNB, Ohashi OM, Figueiredo JR. Preservation of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue in saline or TCM 199 solutions. *Small Ruminant Research* 2005;58:189-93.
- [7] Del Campo MR, Donoso X, Parrish JJ, Ginther OJ. Selection of follicles, preculture oocyte evaluation, and duration of culture for in vitro maturation of equine oocytes. *Theriogenology* 1995;43:1141-53.

- [8] Eppig JJ & O'Brien MJ. Development *in vitro* of Mouse Oocytes from Primordial Follicles. Biol. Reprod.,1996;54:197-207.
- [9] Ferreira MAL, Brasil AF, Silva JRV, Andrade ER, Rodrigues APR, Figueiredo JR. Effects of storage time and temperature on atresia of goat ovarian preantral follicles held in M199 with or without indole-3-acetic acid supplementation. Theriogenology 2001;55:1607-17.
- [10] Figueiredo JR, Celestino JJH, Rodrigues APR, Silva JRV. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção *in vitro* de embriões em larga escala. Rev. Bras. Reprodução Animal. 2007;31(2):143-52.
- [11] Figueiredo JR, Husholf SCJ, Van Den Hurk R, Nusgens B, Bevers MM, Ectors FJ, Beckers JF. Preservation of Oocyte and Granulosa Cell Morphology in Bovine Preantral Follicles Cultured in Vitro. Theriogenology, 1994;41:1333-46.
- [12] Guignot F, Bezaud J, Palmer E. Effect of time during transport of excised mare ovaries on oocyte recovery rate and quality after *in vitro* maturation. Theriogenology 1999;52:757-66.
- [13] Gutierrez CG, Ralph JH, Telfer EE, Wilnut I, Webb R. Growth and Antrum Formation of Bovine Preantral Follicles in Long-Term Culture *in vitro*. Biol. Reprod., 2000;62:1322-28.
- [14] Hulshof SCJ, Figueiredo JR, Bekers JF, Bevers MM, Van den Hurk R. Isolation and Characterization of preantral follicles from fetal bovine ovaries. The Veterinary Quarterly, 1994;2(16):78-80.
- [15] Lima GL, Costa LLM, Cavalcanti DMLP, Rodrigues CMF, Freire FAM, Fontenele-Neto JD, Silva AR. Short-term storage of canine preantral ovarian follicles using a powdered coconut water (ACP®)-based medium. Theriogenology 2010;74:146-52.
- [16] Lopes CAP, Santos RR, Celestino JJH, Melo MAP, Chaves RN, Campello CC, Silva JRV, Bão SN, Jewgenow K, Figueiredo JR. Short-term preservation of canine preantral

follicles: Effects of temperature, médium and time. *Animal Reproduction Science* 2009;115:201-14.

[17] Love LB, Choi YH, Love CC, Varner DD, Hinrichs K. Effect of ovary storage and oocyte transport method on maturation rate of horse oocytes. *Theriogenology* 2003;59:765-74.

[18] Lucci CM, Amorim CA, Rodrigues AP, Figueiredo JR, Báo SN, Silva JR, Gonçalves PB. Study of preantral follicle population in situ and after mechanical isolation from caprine ovaries at different reproductive stages. *Animal Reproduction Science* 1999;56:223-36.

[19] Lucci CM, Kacinskis MA, Rumpf R, Báo SN. Effect of lowered temperatures and media on short-term preservation of zebu (*Bos indicus*) preantral ovarian follicles. *Theriogenology* 2004;61:461-72.

[20] Lucci CM, Shreier LL, Machado GM, Amorim CA, Báo SN, Dobrinsky JR. Effects of storing pig ovaries at 4 or 20°C for different periods of time on the morphology and viability of pre-antral follicles. *Reprod. Dom. Anim.* 2007;42:76–82.

[21] Matos MHT, Andrade ER, Lucci CM, Báo SN, Silva JRV, Santos RR, Ferreira MAL, Costa SHF, Celestino JJH, Figueiredo JR. Morphological and ultrastructural analysis of sheep primordial follicles preserved in 0,9% saline solution and TCM 199. *Theriogenology* 2004;62:65-80.

[22] Preis KA, Carnevale EM, Coutinho da Silva MA, Caracciolo di Brienza V, Gomes GM, Maclellan LJ, Squires EL. *In vitro* maturation and transfer of equine oocytes after transport of ovaries at 12 or 22°C. *Theriogenology* 2004;61:1215-23.

[23] Ribeiro BI, Love LB, Choi YH, Hinrichs K. Transport of equine ovaries for assisted reproduction. *Animal Reproduction Science* 2008;108:171-9.

[24] Roy SK, Treacy BJ. Isolation and Long-Term Culture of Human Preantral Follicles. *Fertil. Steril.*, 1993;59:783-90.

[25] Sharma GT, Dubey PK, Meur SK. Effect of different mechanical isolation techniques on developmental competence and survival of buffalo ovarian preantral follicles. *Livestock Science* 2009;123:300-5.

[26] Silva JRV, Bão SN, Lucci CM, Carvalho FCA, Andrade ER, Ferreira MAL, Figueiredo JR. Morphological and ultrastructural changes occurring during degeneration of goat preantral follicles preserved *in vitro*. *Animal Reproduction Science* 2001;66:109-23.

[27] Silva JRV, Lucci CM, Carvalho FCA, Bão SN, Costa SHF, Santos RR Figueiredo JR. Effect of coconut water and braun-collins solutions at different temperatures and incubation times on the morphology of goat preantral follicles preserved *in vitro*. *Theriogenology* 2000;54:809-22.

[28] 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.

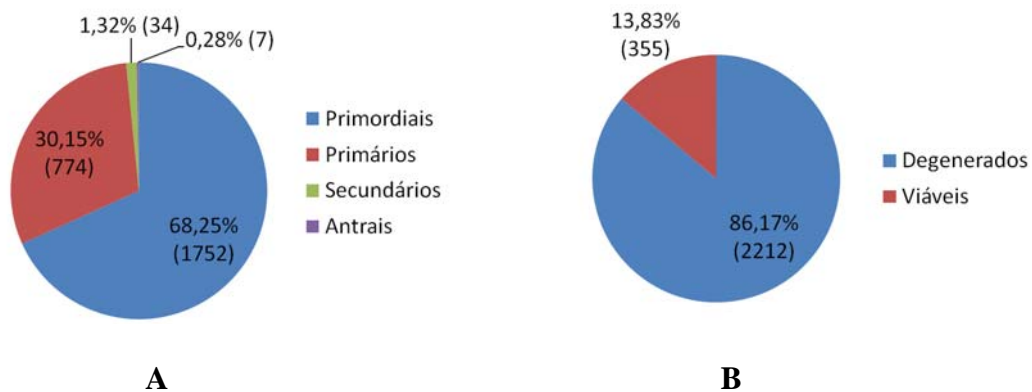


Figura 2. A: Total de folículos de acordo com as classes foliculares analisados em todos os tratamentos; B: Total de folículos degenerados e morfologicamente normais analisados em todos os tratamentos.

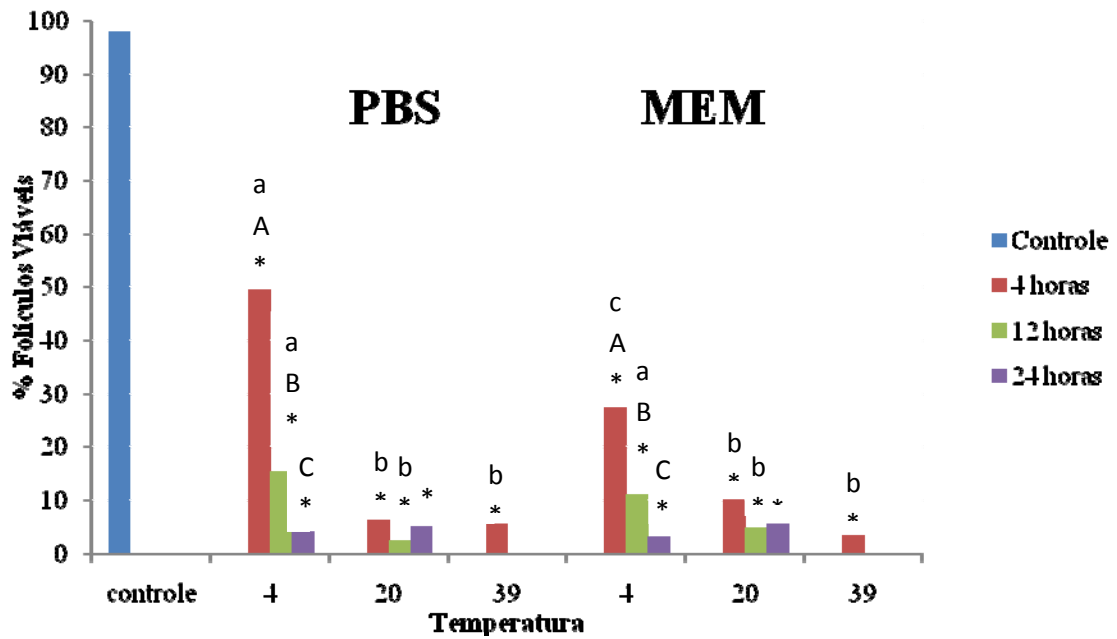


Figura 3. Efeito da temperatura e do tempo de conservação sobre a porcentagem de folículos viáveis de tecido ovariano equino mantidos em PBS ou MEM. (*) difere significativamente do controle ($P < 0,01$). Letras minúsculas (a, b, c) diferença entre valores de temperaturas ($P < 0,01$); Letras maiúsculas (A, B, C) diferença entre períodos de incubação ($P < 0,01$).

Tabela 1: Efeito da temperatura e do tempo de conservação sobre a porcentagem de folículos primordiais (I) e folículos ativados (II) viáveis de tecido ovariano equino mantidos em PBS ou MEM.

Grupo	T °C	Tempo					
		0					
Controle		I		II			
		97,7 (43/44)		100 (34/34)			
		Tempo (horas)					
		4		12		24	
		I	II	I	II	I	II
PBS	4	54,5	44,4	11,5	30,0	5,0	0,0
		(90/165)* ^{aA}	(20/45)* ^a	(9/78)* ^{aB}	(6/20)* ^a	(8/160)* ^B	(0/35)*
	20	5,7 (5/87)* ^b	7,5	2,5	2,0	2,9	9,0
			(3/40)* ^b	(2/79)* ^b	(1/49)* ^b	(2/67)*	(3/33)*
	39	4,8	6,3	0 (0/27)*	0 (0/41)*	0 (0/91)*	0
		(5/103)* ^b	(5/79)* ^b				(0/35)*
MEM	4	29,2	19,5	13,2	3,4	4,0	0
		(53/181)* ^{cA}	(9/46)* ^c	(13/98)* ^{aB}	(1/29)* ^b	(6/147)* ^C	(0/50)*
	20	13,6	4,3	5,6	2,2(1/44)* ^b	6,6	3,7
		(16/117)* ^d	(3/69)* ^b	(5/64)* ^{ab}		(6/90)*	(2/53)*
	39	2,1 (1/47)* ^b	4,6	0 (0/40)*	0 (0/46)*	0 (0/41)*	0
			(2/43)* ^b				(0/10)*

Letras minúsculas indicam diferença entre os valores nas mesmas colunas.

Letras maiúsculas indicam diferença entre os valores nas mesmas linhas.

* indicam diferença entre os valores em relação ao controle.

I - Folículos primordiais

II - Folículos Ativados (primários e secundários) (P < 0,01)

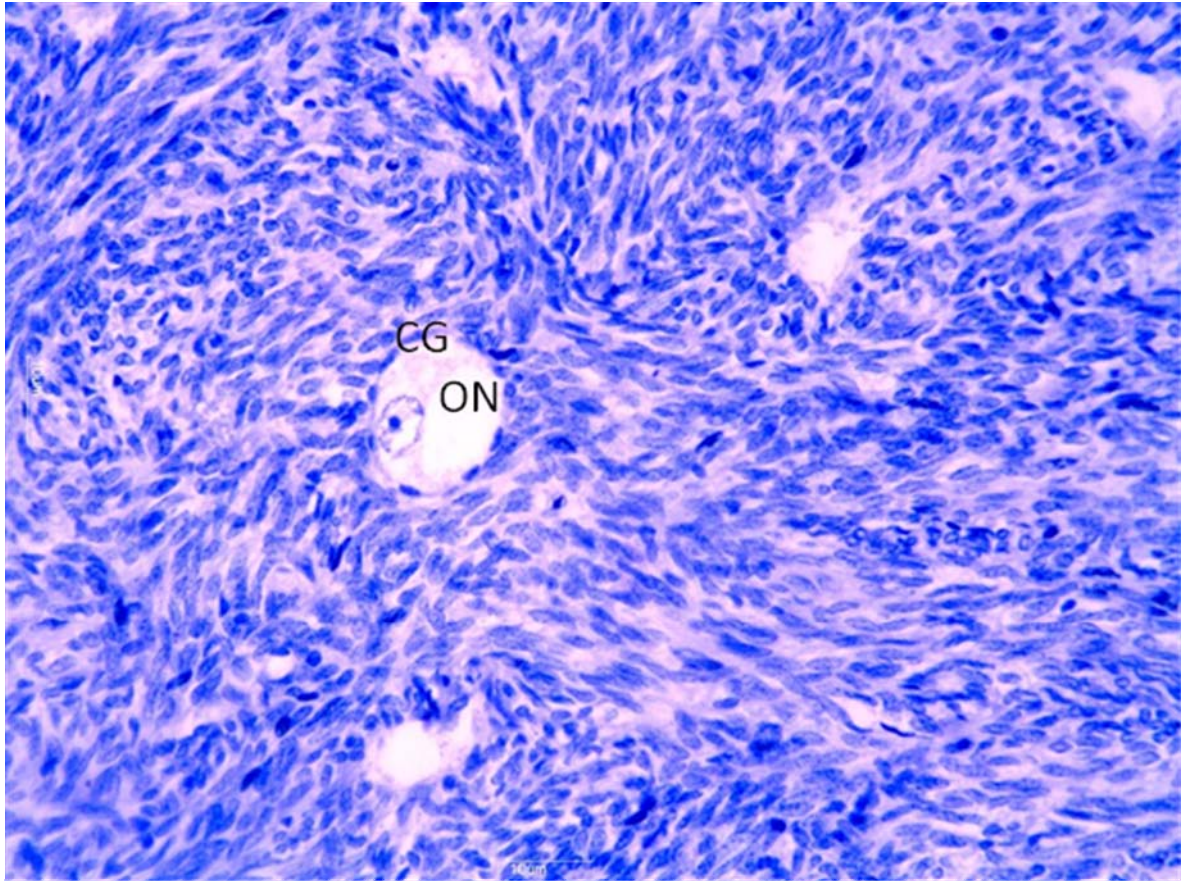


Figura 4. Fragmento ovariano após coloração com PAS-Hematoxilina, mostrando folículo primordial viável (400x). ON: Oócito normal; CG: Células da granulosa.

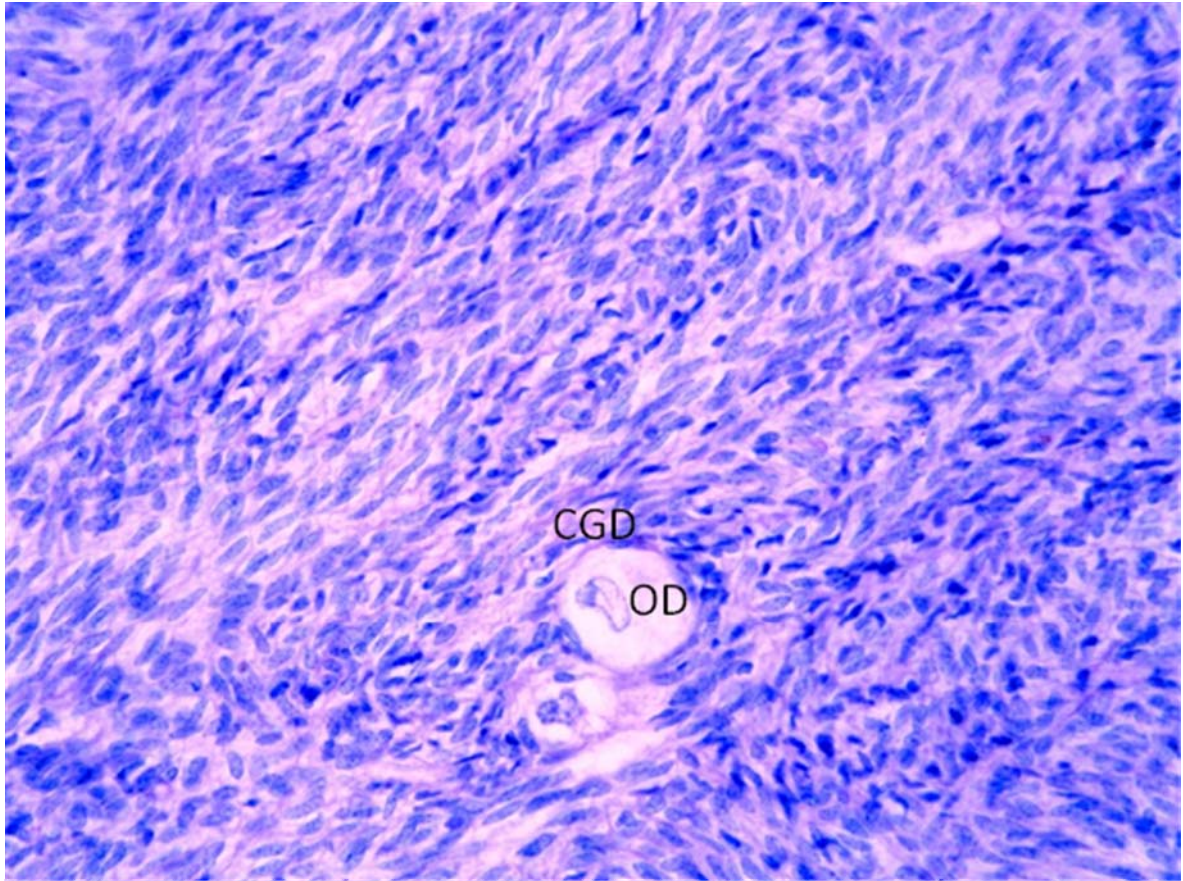


Figura 5. Fragmento ovariano após coloração com PAS-Hematoxilina, mostrando folículo primordial degenerado (400x). OD: Oócito degenerado; CGD: Células da granulosa degeneradas.

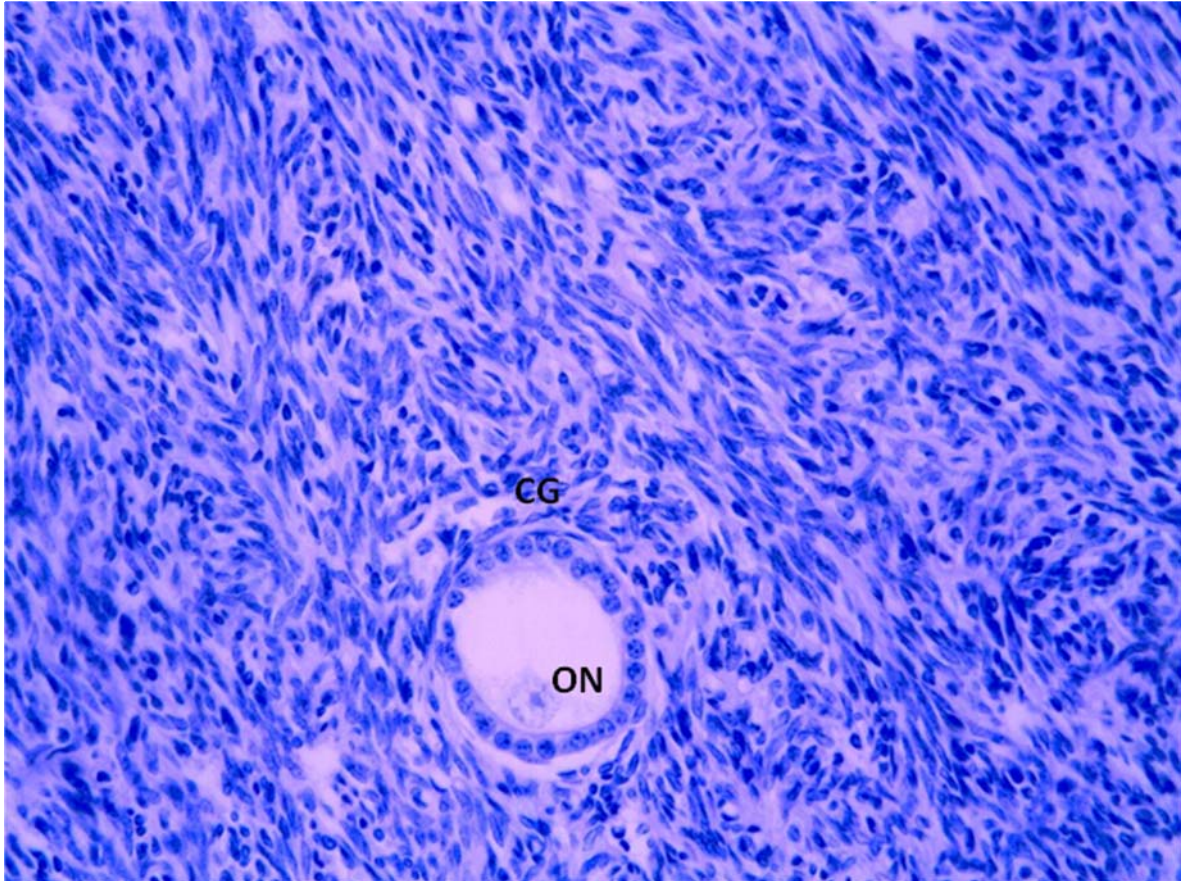


Figura 6. Fragmento ovariano após coloração com PAS-Hematoxilina, mostrando folículo primário viável (400x). ON: Oócito normal; CG: Células da granulosa.

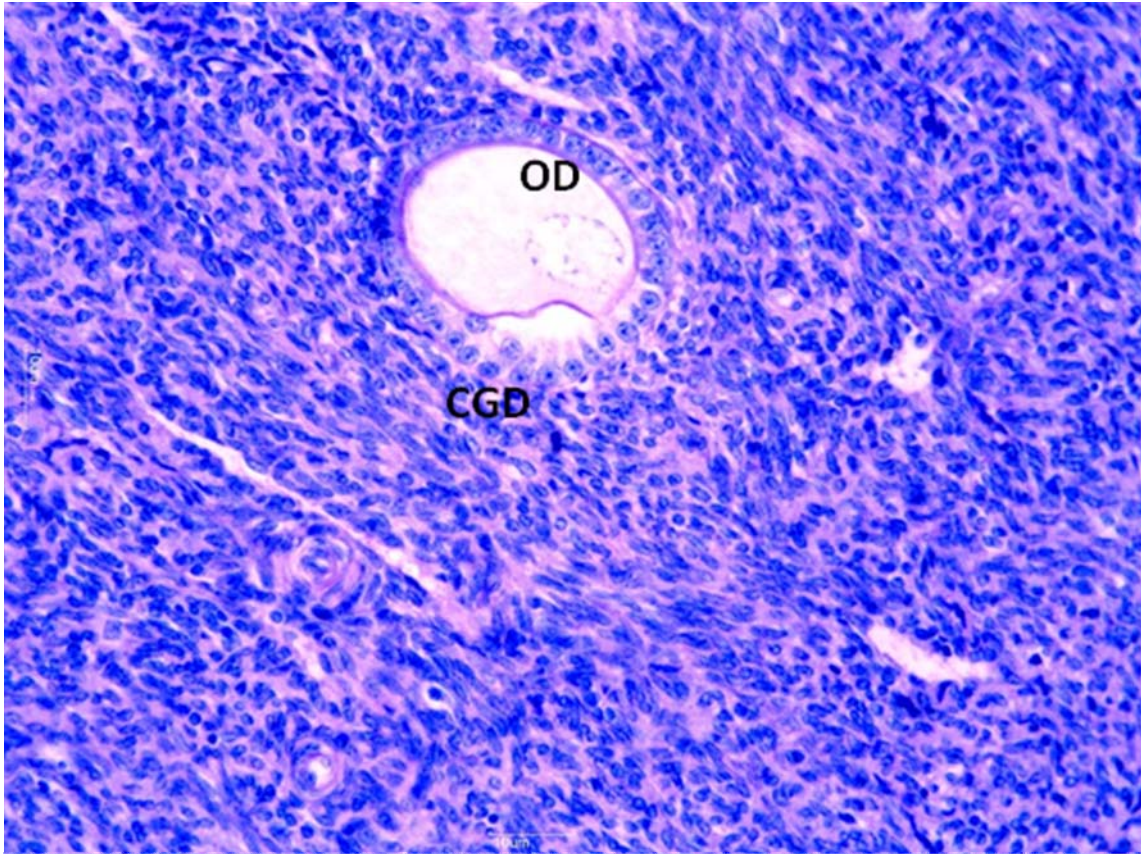


Figura 7. Fragmento ovariano após coloração com PAS-Hematoxilina, mostrando folículo primário degenerado (400x). OD: Oócito degenerado; CGD: Células da granulosa degeneradas.

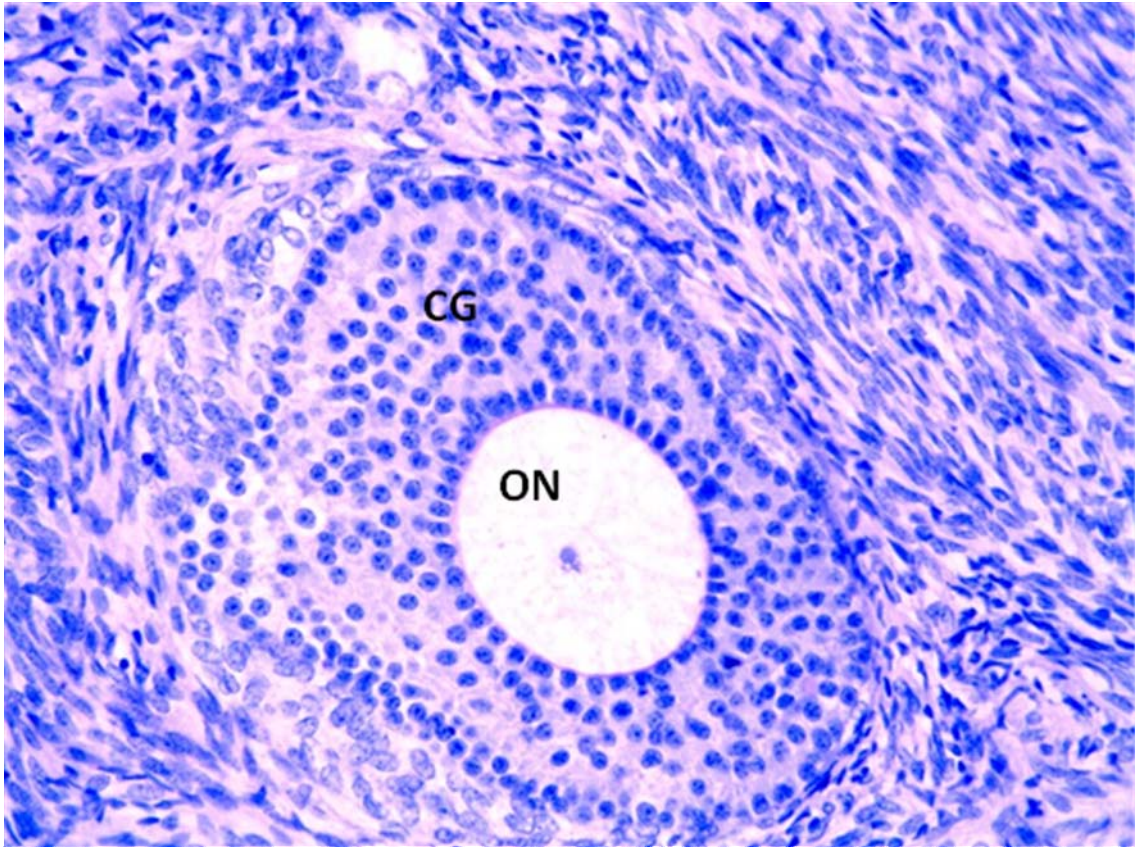


Figura 8. Fragmento ovariano após coloração com PAS-Hematoxilina, mostrando folículo secundário viável (400x). ON: Oócito normal; CG: Células da granulosa.

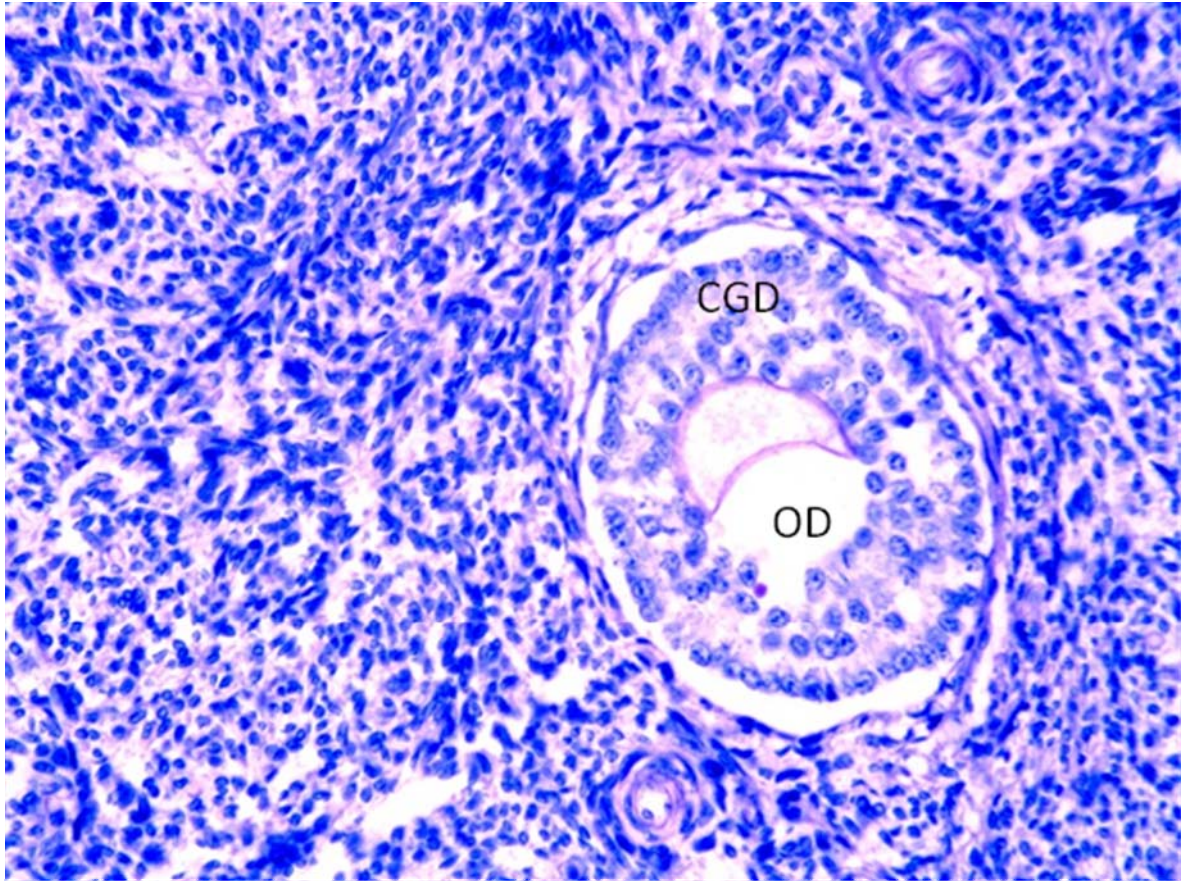


Figura 9. Fragmento ovariano após coloração com PAS-Hematoxilina, mostrando folículo secundário degenerado (400x). OD: Oócito degenerado; CGD: Células da granulosa degeneradas.

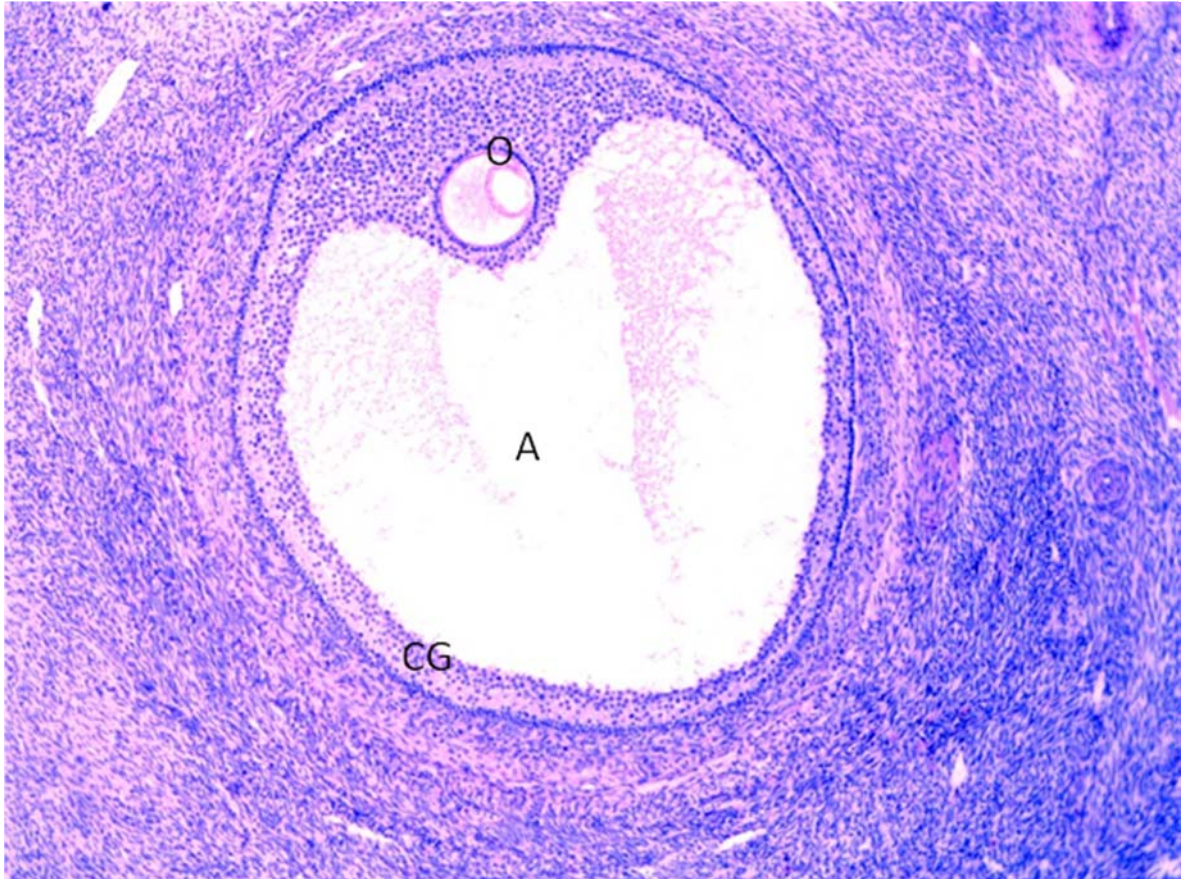


Figura 10. Fragmento ovariano após coloração com PAS-Hematoxilina, mostrando folículo antral (400x). O: Oócito; CG: Células da granulosa; A: Antro.

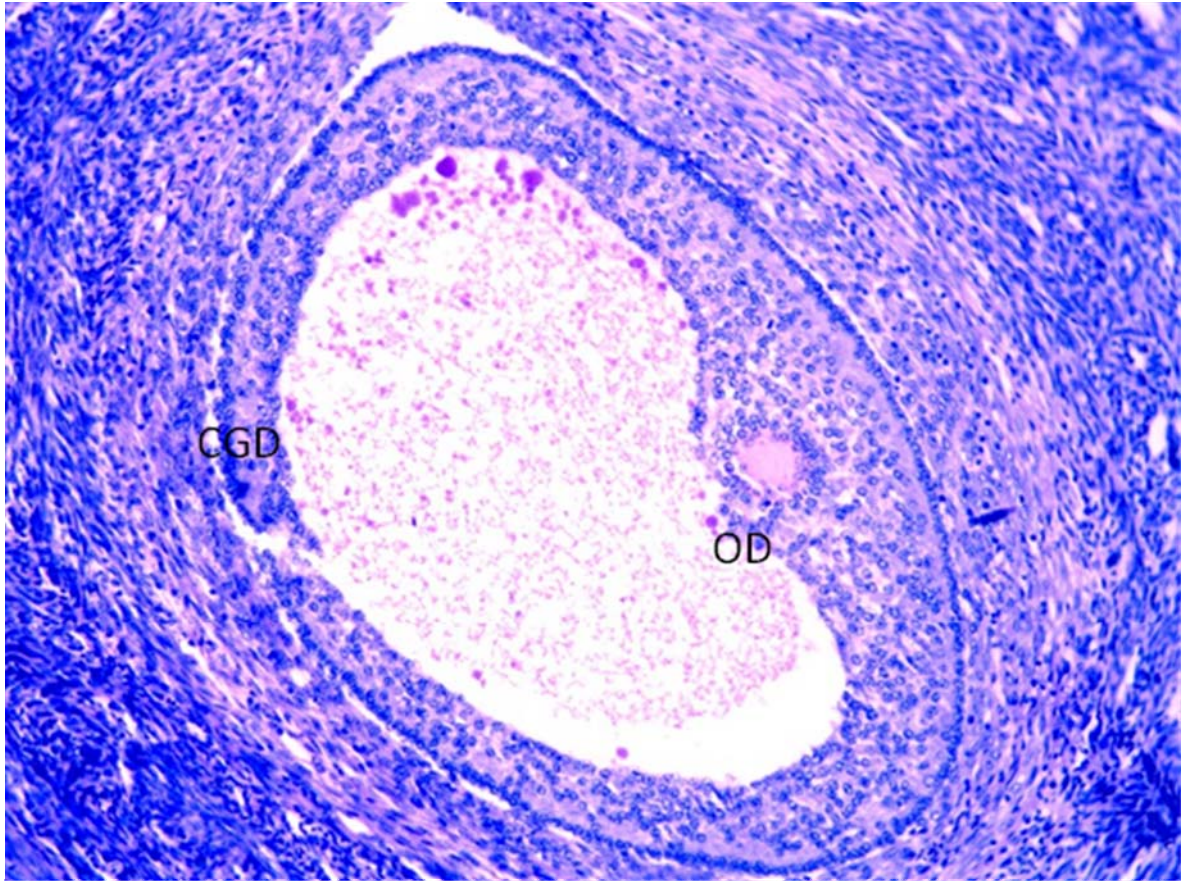


Figura 11. Fragmento ovariano após coloração com PAS-Hematoxilina, mostrando folículo antral degenerado (400x). OD: Oócito degenerado; CGD: Células da granulosa degeneradas.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nos permite concluir que:

- Folículos pré-antrais equinos inclusos em pequenos fragmentos ovarianos podem ser conservados com sucesso a 4°C por até 4 horas em PBS.
- A temperatura foi o principal fator para a preservação de folículos pré-antrais em fragmentos ovarianos equinos.
- Os folículos primordiais apresentam melhor viabilidade que os primários e secundários a 4°C.