

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Faculdade de Medicina Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Veterinárias

ISOLAMENTO E CRIOPRESERVAÇÃO DE
FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS CANINOS

Kele Amaral Alves
Médica Veterinária

Uberlândia – Minas Gerais - Brasil
Dezembro de 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Faculdade de Medicina Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

ISOLAMENTO E CRIOPRESERVAÇÃO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS CANINOS

Kele Amaral Alves

Orientador: Prof. Dr. José Octavio Jacomini

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Saúde Animal

Linha de Pesquisa: Morfologia e Eficiência Reprodutiva

Uberlândia – MG
Dezembro de 2010

“Voglio e ‘potere ed è incapace”

DEDICATÓRIA

Ao Bênnner, meu marido, por ser a força que sustenta meus ideais, com paciência e amor.

Aos meus filhos Gabriel e Giovanna, sem vocês eu nada seria.

Aos meus pais, Benedicto e Nílza, pelo apoio, amor e exemplo de perseverança.

A minha irmã Denise, pelo apoio incondicional.

Com muito amor, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por todos seus desafios, os quais nos torna dignos das vitórias.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Octavio Jacomini, pela disponibilidade e prontidão, seus ensinamentos e humildade carregarei como lições por toda a vida. Pessoa admirável.

Ao Prof. Dr. Marcelo Emílio Beletti, pelos ensinamentos, paciência, perspicácia e incentivo.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais por acreditar, incentivar e financiar estes estudos.

A toda minha família, irmãos, sogros, cunhados, sobrinhos e a minha auxiliar, pela grande ajuda e torcida.

Aos professores do laboratório de reprodução animal, Dr^a. Ricarda Maria dos Santos e Dr^a. Teresinha Inês de Assumpção, pelo auxílio, atenção e convívio agradável.

À Prof^a. Dr^a. Eneida César Mastrantonio pela amizade e por aceitar e gentilmente participar da banca da defesa desta dissertação.

Aos técnicos dos laboratórios de reprodução animal e de histologia Maria Helena, Rui, Marcelo, Fabrício e Mariane, pelas horas extras dedicadas, paciência e disponibilidade. Muito obrigada.

Aos professores, técnicos e alunos que participam do projeto de castração de cães e gatos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária – UFU, que sempre tiveram boa vontade, educação e paciência.

Aos colegas graduandos, mestrandos Livia, Marília, Carina, e toda turma do PPGCV-Mestrado ingressante em Julho de 2009, pelo auxílio e bons momentos de descontração.

Aos colegas do Hospital Veterinário do Triângulo pelo apoio e compreensão.

Aos funcionários da coordenação da Faculdade de Medicina Veterinária-UFU, em especial Célia e Leocídio.

Agradeço aos professores envolvidos no PPGCV e à Universidade Federal de Uberlândia, pela oportunidade e pela dedicação.

A todos que não foram aqui mencionados, mas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Os meus mais sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	9
1 - Introdução.....	10
2 – Ciclo estral de cadelas.....	11
3 – Ovogênese e foliculogênese.....	13
4 – Isolamento de folículos pré-antrais.....	16
5 – Criopreservação de folículos pré-antrais	18
Referências.....	20
CAPÍTULO 2- EFEITO DO INTERVALO DE SECÇÃO SOBRE O ISOLAMENTO MECÂNICO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS DE CADELAS.....	28
Resumo.....	29
Introdução.....	30
Material e Métodos.....	31
Resultados e Discussão.....	33
Conclusões.....	37
Referências.....	38
CAPÍTULO 3- CRIOPRESERVAÇÃO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS CANINOS COM GLICEROL E ETILENOGLICOL.....	42
Resumo.....	43
Introdução.....	44
Material e Métodos.....	46
Resultados e Discussão.....	47
Conclusões.....	50
Referências	51

LISTA DE ABREVIACÕES

CGP	Células germinativas primordiais
°C	Graus Celsius
EGF	Fator de crescimento epidermal
ETIL	Etilenoglicol
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FOPA	Folículo pré-antral
FSH	Hormônio folículo estimulante
GLI	Glicerol
IP	Iodeto de propídeo
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina
LH	Hormônio luteinizante
µm	Micrmetro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
M	Molar
MOIFOPA	Manipulação de ovócitos inclusos em folículos pré-antrais
PBS	Tampão fosfato salino
pg	Picograma
rpm	Rotações por minuto
TE	Transferência de embriões
TGFα	Fator de crescimento transformante-α
TGFβ	Fator de crescimento transformante-β
TZP	Processos citoplasmáticos transzonais

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2	Página
Tabela 1 Número de folículos pré-antrais recuperados de ovários de cadelas de acordo com o intervalo de corte utilizado. Média e erro padrão.....	34
Tabela 2 Efeito do intervalo de corte sobre a porcentagem de folículos pré-antrais cobertos com células da granulosa isolados de ovários de cadelas e o número de células da granulosa presentes após o procedimento mecânico. Média e erro padrão.....	35
Tabela 3 Viabilidade de folículos pré-antrais de cadelas avaliados pelo iodeto de propídeo em diferentes intervalos de corte...	37
 Capítulo 3	
Tabela 1 Porcentagem de folículos pré-antrais de cadelas viáveis após teste de toxicidade com diferentes concentrações (1,5 e 3,0M) de glicerol e etilenoglicol.....	48
Tabela 2 Porcentagem de folículos pré-antrais de cadelas viáveis após criopreservação/descongelação com diferentes concentrações (1,5 e 3,0M) de glicerol e etilenoglicol.....	49

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 2		Página
Figura 1	Avaliação da presença de células da granulosa (CG) de folículo pré-antral de cadela marcado pelo corante Hoechst 33342 sob microscopia de fluorescência. Barra corresponde 20 µm.....	35
Capítulo 3		
Figura 1	Análise da viabilidade de folículo pré-antral de cadela após criopreservação e descongelação. Folículo pré-antral não viável em contraste de fase (A) e com ovócito (o) marcado por iodeto de propídeo (B). Microscopia de fluorescência...	49

ISOLAMENTO E CRIOPRESERVAÇÃO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS CANINOS

RESUMO - Objetivou-se com este estudo avaliar a viabilidade de folículos pré-antrais de ovários caninos após os procedimentos de isolamento mecânico em diferentes intervalos de cortes e de criopreservação com os crioprotetores glicerol e etilenoglicol. No primeiro experimento testou-se o isolamento dos folículos pré-antrais caninos com o fatiador de tecidos (tissue chopper) programado em dois intervalos de secção (250 e 500 μm) no intuito de avaliar qual espessura de corte proporcionaria um número satisfatório de estruturas preservando sua integridade estrutural. O número de folículos isolados nas espessuras testadas não diferiu estatisticamente, sendo 25200 para o intervalo de 250 μm e 11000 para o intervalo de 500 μm ($p=0,08$). A viabilidade e a qualidade medidas pela integridade da membrana celular e presença de células da granulosa apresentaram melhores resultados junto aos folículos isolados na espessura de 500 μm . No segundo experimento seguinte utilizou-se o método de isolamento mecânico com o aparelho fatiador de tecidos calibrado para cortes na espessura de 500 μm (espessura do corte) e as amostras do pool folicular foram submetidas à análise de viabilidade com o corante iodeto de propídeo, perante os seguintes procedimentos: após o isolamento (grupo controle), período de estabilização com glicerol e etilenoglicol nas concentrações de 1,5 ou 3M (teste de toxicidade), após congelação e descongelação com glicerol e etilenoglicol em duas concentrações diferentes. No teste de toxicidade, apenas o grupo que utilizou etilenoglicol a 1,5 M (51,5%) não apresentou redução significativa da viabilidade folicular em relação ao controle (63,2%). Após os procedimentos de criopreservação, a viabilidade foi consideravelmente menor em todos os grupos, sendo 12% para glicerol a 1,5 M e 14% para 3,0 M e 15,5% para etilenoglicol a 1,5 M e 28% para 3,0 M. Conclui-se que o etilenoglicol demonstrou os melhores resultados após o período de exposição e procedimentos de criopreservação/dcongelação.

Palavras-chave: crioprotetores, iodeto de propídeo, toxicidade, viabilidade

ISOLATION AND CRIOPRESERVATION OF CANINE PREANTRAL FOLLICLES

ABSTRACT – The aim of this study was evaluate the canine preantral follicles after mechanical isolation procedures on different sectioning intervals, and of cryopreservation with the cryoprotectants glycerol and ethylene glycol. The isolation methodology used a tissue chopper device programmed on two thicknesses (250 e 500 μm) with the purpose to evaluate which provide a satisfactory number of structures preserving its integrity. The number of isolated follicles did not statistically differed between the tested thicknesses, being 25200 for 250 μm and 11000 μm ($p=0,08$). Viability and quality, measured by follicular membrane integrity and granulous cells presence, showed better results in the group of follicles isolated of 500 μm thicknesses. The following experiment submitted canine preantral follicles mechanically isolated to viability assay with propidium iodide dye, under the following procedures: after isolation (control group), after exposure period with glycerol or ethylene glycol on 1,5 or 3M (toxicity test), and after freezing/thawing with cryoprotectants at two different concentrations. On the toxicity test only the group that used ethylene glycol at 1,5 M did not shown significant reduction of viability (51,5%) compared with control group (63,2%). After cryopreservation, the follicular viability was significantly lower in all groups, being, 12% for glycerol at 1,5 M, 15,5% for ethylene glycol at 1,5 M, 14% for glycerol at 3 M and 28% for ethylene glycol at 3 M. This study concludes that ethylene glycol demonstrated the best results after the exposure period and freezing/thawing procedures.

Keywords: cryoprotectants, propidium iodide, toxicity, viability

CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

Na sociedade moderna o termo animal de estimação tem integração familiar, com contato mais próximo ao homem, e o cão é a espécie que mais se destaca nesta convivência. Neste contexto, o interesse por todas as áreas de saúde e bem estar caninos cresceu substancialmente nos últimos anos. Porém, a reprodução dos cães ainda não apresenta avanços compatíveis às necessidades do mercado.

A anatomia do aparelho reprodutivo das cadelas não permite acesso fácil, o que pode representar entraves à adoção de biotécnicas reprodutivas avançadas como a transferência de embriões (TE) e a fertilização *in vitro* (FIV), deixando a inseminação artificial como a alternativa mais viável, no entanto menos produtiva.

Carrol *et al.* (1991) consideram que o ovário mamífero possui enorme capital ovocitário incluso em folículos pré antrais (FOPA) e que apenas uma mínima porção destes (0,1%) será disponibilizada para os ciclos reprodutivos. Este fato gerou o interesse de diversos estudos sobre o isolamento e cultivo de folículos pré-antrais no intuito de evitar esta grande perda folicular (FIGUEIREDO *et al.*, 1993; HULSHOF *et al.*, 1994; RODRIGUES *et al.*, 1998).

De acordo com Figueiredo *et al.* (1993) a biotécnica de manipulação *in vitro* de ovócitos inclusos em folículos pré-antrais (MOIFOPA) tem grande importância tanto para pesquisa básica quanto para a reprodução animal, contribuindo para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na foliculogênese pré-antral e poderá proporcionar a multiplicação de animais de alto valor genético ou ameaçados de extinção. Outra consequência imediata desta biotecnologia é a possibilidade de congelamento de FOPA isolados ou *in situ* (no interior de tecido ovariano) a qual poderia ter uma importância capital na constituição de bancos de germoplasma animal, através da conservação dos ovócitos (FIGUEIREDO *et al.*, 2007). Lopes (2008) demonstrou que a morfologia de folículos pré-antrais caninos permanece íntegra após o procedimento de criopreservação com etilenoglicol a 1,5M.

Para obtenção de uma grande população de FOPA viáveis foram desenvolvidas diversas técnicas de isolamento dos mesmos, constituídas pelos métodos enzimáticos e/ou mecânicos, descritos em estudos com diversas espécies como bovinos (FIGUEIREDO *et al.*, 1993; HULSHOLF, 1994), suínos (GREENWALD

e MOOR, 1989; ALVES, 2010), camundongos (CARROLL *et al.*, 1991; EPPIG, 1996), gatos domésticos (JEWGENOW e PITRA, 1993), felinos selvagens (JEWGENOW *et al.*, 1996) e primatas (DOMINGUES *et al.*, 2003).

O'Brien *et al.*, (2003) relataram a produção de embriões e o nascimento de 59 camundongos saudáveis a partir do cultivo de folículos pré-antrais. Em espécies domésticas, os FOPA de suínos e caprinos avançaram até a fase de blastocisto após o cultivo, maturação e fecundação *in vitro* (WU *et al.*, 2001; FIGUEIREDO, 2009a). Bolamba *et al.*, (1998) demonstraram que ovócitos inclusos em folículos pré-antrais em estágio avançado de desenvolvimento de cadelas tem competência para maturação nuclear durante o cultivo.

A aplicação da MOIFOPA para a espécie canina poderá tanto contribuir para aumentar a eficiência reprodutiva de raças raras e/ou de alto valor econômico, como para testar a viabilidade da técnica em espécies selvagens semelhantes, que estejam em vias de extinção.

Objetivou-se com este estudo, verificar a eficiência do método de isolamento mecânico e criopreservação de folículos pré antrais de cadelas, testando a viabilidade após cada procedimento.

2. CICLO ESTRAL DE CADELAS

A percepção de todos os caracteres relacionados ao ciclo reprodutivo das fêmeas caninas é essencial para alcançar os melhores resultados em desempenho reprodutivo.

O ciclo estral das cadelas consiste em quatro fases distintas: proestro, estro, diestro e anestro (ETTINGER, 1992). O proestro é o período de recrutamento e desenvolvimento folicular sensibilizados pelo hormônio folículo estimulante (FSH), caracterizado pelo aumento das concentrações séricas de estrógeno, sintetizado pelas células da granulosa. O pico das concentrações estrogênicas pode chegar a 70 pg/mL, e com duração de um a dois dias, precedendo o pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH) (VALTONEN e JALKANEN, 1993). Observa-se o início do sangramento vaginal, edemaciação vulvar, atração de machos e rejeição ao cruzamento, com duração média de nove dias (CONCANNON, 1986).

O LH é uma gonadotrofina liberada pela hipófise anterior e estimula a maturação, luteinização e ovulação dos folículos ovarianos e apresenta oscilações durante o proestro, elevando-se em amplitude e frequência ao final do período, até alcançar um extremo em aproximadamente 48 horas antes da maioria das ovulações (ETTINGER, 1992).

O estro dura sete dias em média e coincide com o declínio da concentração sérica de estrógeno e a elevação da concentração de progesterona, ambos atuando em sinergismo, com feedback positivo na hipófise, resultando na onda pré-ovulatória de LH (FELDMAN e NELSON, 1996). A cadela não apresenta mais sangramento vaginal e se torna receptiva ao macho (CHRISTIANSEN, 1988).

De acordo com Concannon e Verstegen (2005), a ovulação ocorre em média dois dias após o surgimento da onda pré-ovulatória de LH e os ovócitos liberados apresentam-se imaturos, na prófase da meiose I, sendo denominados ovócitos primários, não podendo, portanto, ser fecundados imediatamente após sua liberação. A maturação ovocitária ocorre nas tubas uterinas e está completa após 48 a 72 horas da ovulação. Alguns autores (HOST e PHEMISTER, 1974; RODRIGUES e RODRIGUES, 2002) utilizam a nomenclatura de metaestro para designar a fase final do estro onde a receptividade ao macho ainda persiste.

A fase de diestro é marcada por altas doses de progesterona sérica em fêmeas gestantes ou não, pois o corpo lúteo é mantido por até dois meses, independente da condição reprodutiva (CONCANNON *et al.*, 1989). A transição entre um ciclo estral e outro, com baixos níveis de progesterona sérica e quiescência de hormônios gonadotróficos é denominada anestro, que pode durar entre um e seis meses, de acordo com fatores raciais, etários, sanitários, nutricionais e ambientais das fêmeas caninas (JOHNSTON, 2001). Embora ocorra baixa variação hormonal nesta fase, os ovários e a hipófise permanecem em constante atividade (RODRIGUES e RODRIGUES, 2002).

O ovário é um órgão composto de medula e córtex, onde a medula é a região que concentra tecido conjuntivo denso, inervação e vascularização. O córtex ovariano contém folículos em diferentes estádios de desenvolvimento, corpos lúteos e/ou albicans (HAFEZ, 1995). Além dos nutrientes e hormônios provenientes da corrente sanguínea, fatores produzidos pelos diferentes tipos celulares contribuem

para a formação de um sistema bastante complexo que regula as funções do ovário, ou seja, a produção de gametas e hormônios (LEITÃO *et al.*, 2009).

3. OVOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE

A associação de cada ovócito a células foliculares, dentro do ovário, possui o potencial de perpetuar a espécie, gerando novos indivíduos. Para isso, é necessário que ocorram de forma dinâmica e ordenada uma sequência de eventos complexos, como a formação dos folículos durante a fase fetal, a ativação dos mesmos na puberdade e o perfeito sinergismo com fatores extrínsecos ao ovário, para maximizar as chances de fertilização do ovócito (BINELLI *et al.*, 2009).

A ovogênese é caracterizada pela produção de ovogônias pelas células germinativas primordiais (CGP) e pela proliferação mitótica de células epiteliais internas originadas de uma interação de diversos tipos celulares, ainda na fase pré-natal. Este processo inicia-se antes do nascimento e desenvolve-se por meses ou anos nos animais adultos (DERUSSI e LOPES, 2009).

No embrião, as células germinativas primordiais, localizadas na parede do saco vitelínico, migram para as gônadas em desenvolvimento, perdem suas características de motilidade e sofrem extensiva proliferação celular e redistribuição das organelas citoplasmáticas transformando-se em ovogônias (SADEU *et al.*, 2006). Uma vez formadas, as ovogônias entram em meiose e diferenciam-se em ovócitos. No estágio de diplóteno da primeira divisão meiótica ou vesícula germinativa, ocorre a primeira interrupção de divisão meiótica e a formação de ovócitos primários, que permanecem neste estágio até a puberdade (MOORE e PERSAUD, 1994). Diferentemente de outras espécies, a ovogênese na cadela pode ocorrer até dois meses após o nascimento, visto que foram observadas células em proliferação na região do córtex ovariano (FAYER- HOSKEN *et al.*, 2000).

Coincidentemente ao início da primeira divisão meiótica, os folículos primordiais emergem do final do cordão distal e consistem em um ovócito circundado por uma camada de células somáticas escamosas denominadas a seguir de células da granulosa. Este cordão de células somáticas tem duas origens: das células

epiteliais superficiais em migração descendente no ovário e das células derivadas do mesonéfron migrando ascendentemente através do ovário. (VAN DEN HURK, 2005).

A função do folículo ovariano é proporcionar um ambiente ideal para a manutenção da viabilidade, bem como, o crescimento e maturação do ovócito (GONÇALVES *et al.*, 2001). Sua classificação ocorre de acordo com o grau de evolução em pré-antrais, compreendendo os primordiais, primários e secundários, e em antrais, que contêm uma área preenchida por fluido folicular, denominada antro, e compreendem os folículos terciários (subordinados e dominantes) e pré-ovulatórios. Os folículos pré-ovulatórios apresentam todos os componentes presentes nos terciários, contudo o ovócito apresenta-se maturo e no estágio final de desenvolvimento folicular (FIGUEIREDO, 1993) Os folículos pré-antrais representam cerca de 90 a 95% de toda população folicular (MACHADO *et al.*, 2002).

Os folículos primordiais nas cadelas foram identificados 17 a 54 dias após o nascimento, contendo ovócitos pequenos com 25µm de diâmetro e formados por uma única camada de células da granulosa. Nesse estágio, a comunicação entre o ovócito e as células foliculares é incompleta, e a zona pelúcida começa a ser formada (SONGSASEN e WILDT, 2007). O número de folículos primordiais diminui durante toda a vida por degeneração e inibição de crescimento. Telfer e Gosden (1987) relataram uma média de 200.000 folículos primordiais em cadelas de um a dois anos e de 6.000 em cadelas de sete a onze anos.

Os folículos primários apresentam uma camada de células de formato cubóide e foram detectados por volta de 120 dias após o nascimento com ovócitos medindo cerca de 78 µm de diâmetro (DURRANT *et al.*, 1998). Nos ovócitos primários, as mitocôndrias estão em número crescente, refletindo um aumento natural da atividade metabólica (SONGSASEN e WILDT, 2007). Os grânulos lipídicos aumentam em quantidade durante todo o processo da ovogênese, fato que resulta em uma aparência escura marcante do ovócito canino, diferentemente de outras espécies de mamíferos. A função fisiológica destes grânulos não é conhecida. Sabe-se que ocupam 5% da área citoplasmática e acredita-se que sejam importantes como reserva nutricional durante o desenvolvimento embrionário visto que o processo pré-implantação é relativamente longo (LANDIM-ALVARENGA e BICUDO, 1997).

A multiplicação das células da granulosa dos folículos primários leva à formação de várias camadas dessas células ao redor do ovócito, formando o folículo secundário (HULSHOF *et al.*, 1994). Nestes folículos, em estádios mais avançados, as fibras de tecido conjuntivo organizam-se paralelamente e a zona pelúcida pode ser identificada, atingindo um diâmetro de aproximadamente 100 μm (GONÇALVES *et al.*, 2001).

De acordo com Van den Hurk e Zhao (2005), a partir do momento em que ocorre a formação do antro, os folículos passam a ser denominados terciários ou antrais. Durante o desenvolvimento folicular, a produção de fluido antral é intensificada pelo aumento da vascularização folicular e permeabilidade dos vasos sanguíneos, os quais estão fortemente relacionados com o aumento do folículo antral. Este fluido pode servir como fonte de substâncias regulatórias derivadas do sangue e de secreções das células foliculares, ou seja, gonadotrofinas, esteróides, fatores de crescimento, enzimas e lipoproteínas.

Uma característica intrigante da gametogênese na cadela é a presença de folículos multi ovocitários denominados anteriormente de poliovulatórios (PAYAN-CARREIRA e PIRES, 2008). A origem destes folículos vem sendo relacionada a uma falha nos estádios iniciais da foliculogênese, em que a taxa de diferenciação das células germinativas é mais rápida que das células somáticas circundantes, resultando na inclusão de diversas células germinativas dentro do folículo (BRISTOL-GOULD e WOODRUFF, 2006).

Os mecanismos que controlam a ativação de folículos permanecem pouco elucidados, principalmente em animais de interesse zootécnico (BINELLI *et al.*, 2009). Entretanto, acredita-se que vários fatores de crescimento produzidos pelas células foliculares como a ativina, EGF (Epidermal Growth Factor), FGF (Fibroblast Growth Factor), TGF- α (Transforming Growth Factor-alfa), TGF- β (Transforming Growth Factor-beta) e IGF-1 (Insulin-like Growth Factor), atuem modulando a ação das gonadotrofinas FSH e LH, controlando a foliculogênese, esteroidogênese e atresia folicular (LEITÃO, 2009).

Segundo Albertini *et al.* (2001), a proliferação e diferenciação das células da granulosa é influenciada diretamente pelo ovócito com a secreção de mediadores parácrinos, e através de extensões destas células na zona pelúcida, denominadas

processos citoplasmáticos transzonais (TZP) onde junções do tipo “gap” permitem transporte bidirecional de moléculas reguladoras.

4. ISOLAMENTO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS

O ovário mamífero contém milhares de ovócitos inclusos em folículos pré-antrais (FOPA). Entretanto, a grande maioria destes folículos (99,9%) não chega até a ovulação, sendo eliminada pelo processo de atresia folicular. Com o propósito de recuperar um grande número de ovócitos inclusos em FOPA, vem sendo desenvolvida a biotécnica de Manipulação de Ovócitos Inclusos em Folículos Pré-antrais (MOIFOPA). Esta biotécnica poderá fornecer milhares de ovócitos para cultivo, que poderão servir a diversas aplicações científicas e reprodutivas (FIGUEIREDO *et al.*, 1999).

Segundo Figueiredo *et al.*, (2009a), no campo da pesquisa fundamental e biomolecular, o cultivo *in vitro* dos FOPA, poderá elucidar aspectos da regulação da foliculogênese e identificação da expressividade gênica envolvida na mesma. Para indústria farmacêutica, será possível a realização de testes da ação dos fármacos sobre o desenvolvimento folicular, além de testes de biossegurança e desenvolvimento de vacinas para imunoesterilização. Os mesmos autores afirmam também que com procedimentos de conservação e criopreservação dos FOPA será possível constituir bancos de material genético para a espécie humana, animais de alto valor zootécnico ou em vias de extinção, visando cultivo e produção *in vitro* de embriões.

O princípio dos métodos de isolamento folicular consiste na dissociação ou separação dos folículos pré-antrais dos demais componentes do estroma ovariano (fibroblastos, fibras colágenas e elásticas, fibronectina, etc.) utilizando-se para isto, instrumentos mecânicos ou processos de digestão enzimática (FIGUEIREDO *et al.*, 2007).

O desenvolvimento de protocolos mecânico ou enzimático de isolamento folicular é de fundamental importância para obtenção de um grande número de folículos pré-antrais, os quais poderão ser utilizados em programas de criopreservação e/ou cultivo *in vitro* (MACHADO *et al.*, 2002). O uso de enzimas

proteolíticas para resgate folicular foi descrito por Durrant *et al.* (1998) que utilizaram a enzima colagenase para isolamento de FOPA de ovários de cadelas, assim como descrito em outras espécies: camundongos (EPPIG, 1996) e hamsters (ROY e GREENWALD, 1985), suínos (GREENWALD e MOOR, 1989), bovinos (CARAMBULA *et al.*, 1996a), gatos (JEWGENOW e PITRA, 1993) e também em humanos (ROY e TREACY, 1993).

Os métodos mecânicos contam com aparelhos fatiadores de tecido (Tissue Chopper), mixers, tesouras cirúrgicas, fórceps, agulhas dissecantes, pipetas e malhas de filtração para realizar a dissociação dos FOPA com o tecido ovariano. Este tipo de isolamento já foi demonstrado com ovários bovinos (BASSO e ESPER, 2007; LUCCI *et al.*, 2002), suínos (ALVES, 2010), caprinos (RODRIGUES *et al.*, 1998), primatas (DOMINGUES *et al.*, 2003) entre outros. Estes procedimentos têm a vantagem de oferecer menor risco de danos a estrutura folicular, sendo mais econômico, rápido e de fácil execução, quando comparado aos métodos de digestão enzimática (FIGUEIREDO *et al.*, 1993).

A qualidade dos folículos pré-antrais é um parâmetro muito importante a ser avaliado, pois se essas estruturas não apresentarem viabilidade para criopreservação e/ou cultivo, o procedimento pode ser considerado inútil.

Segundo Matos *et al.* (2007) existem diversas substâncias para avaliar a viabilidade folicular, seja testando a integridade da membrana celular com o corante azul de trypan, seja avaliando o número de células da granulosa com o corante Hoescht ou com corantes fluorescentes que coram células que apresentam incapacidade de expulsar os mesmos pela desativação dos sistemas de transporte ativo como o iodeto de propídeo e o brometo de etídio. Jewgenow e Stolte (1996) e Machado *et al.* (2002) descrevem a utilização do azul de trypan para avaliar a viabilidade de FOPA isolados em diferentes espécies. Por outro lado, Lopes *et al.* (2009) e Alves (2010) utilizaram corantes fluorescentes na avaliação qualitativa de FOPA caninos e suínos, respectivamente.

5. CRIOPRESERVAÇÃO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS

A criopreservação consiste na preservação de material biológico a baixas temperaturas, geralmente em nitrogênio líquido a -196°C , onde a energia cinética molecular é muito baixa e as reações metabólicas impulsionadas por energia térmica ocorrem muito lentamente em contraste com a elevada viscosidade (KARTHA, 1985). Desse modo, a viabilidade durante o armazenamento pode ser estendida por longos períodos de tempo, mantendo a estabilidade do material genético (STUSHNOFF e SEUFFERHELD, 1995). A desidratação, a tolerância aos agentes crioprotetores, resfriamento e reaquecimento são fatores que podem influenciar a capacidade de sobrevivência do material biológico (SANTOS *et al.*, 2008).

Agentes crioprotetores estabilizam a membrana, produzindo a saída da água intracelular, minimizando a formação de cristais de gelo e proporcionando desta forma, melhor conservação das estruturas (HAFEZ, 1995). Esses agentes aumentam a viscosidade do meio, diminuindo o ponto de congelação e a concentração de eletrólitos o que reduz o risco de danos osmóticos. Dentre os crioprotetores intracelulares podemos citar o glicerol, etileno glicol, propilenoglicol e dimetilsulfóxido, ambos são capazes de proteger as células, mas, contudo, podem apresentar efeitos tóxicos ou facilitar a entrada de agentes tóxicos nas células (SANTOS, 2007).

Santos *et al.* (2006) descreveram que o método de congelação mais utilizado para gametas femininos é o lento, onde as células são expostas a baixas concentrações de crioprotetor, por um período que varia de 20 a 60 minutos, acondicionadas em congelador programável estabilizado a temperatura de -5°C , seguido de cristalização manual com objeto metálico congelado em nitrogênio líquido e de resfriamento lento ($0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$) até -32°C . Posteriormente, procede-se o armazenamento em nitrogênio líquido (-196°C). A conservação bem sucedida de gametas de mamíferos tem inúmeros benefícios práticos, econômicos e éticos, que poderão trazer impactos aos programas de reprodução animal e de concepção humana assistida (ZHOU *et al.*, 2010). Avanços significativos nesta área têm sido obtidos, formando bancos de reserva genômica com relativo sucesso na criopreservação de sêmen, a qual implementou a reprodução animal.

Reciprocamente, a maioria dos estudos com ovócitos mamíferos demonstram grande dificuldade de se atingir resultados satisfatórios na criopreservação (WOODS *et al.*, 2004).

O processo de criopreservação pode causar degeneração dos ovócitos, desmontando os microtúbulos celulares, pela a formação de cristais de gelo e trocas osmóticas rápidas ou massivas e pela relativa toxicidade dos crioprotetores (KO *et al.*, 2008). Em razão de superar esses problemas, a criopreservação de folículos pré-antrais emerge como uma alternativa promissora para reservas criogênicas de gametas femininos (LOPES, 2008).

A vantagem de se preservar ovócitos imaturos em folículos pré-antrais é que eles são menores, possuem menos organelas e não tem a zona pelúcida totalmente formada, tornando-os potencialmente mais fáceis de congelar (OKTAY *et al.*, 1998). Além disso, há a vantagem que os folículos pré-antrais podem ser disponibilizados para criopreservação em números muito maiores que das células maduras (RUTHERFORD e GOSDEN, 1999).

REFERÊNCIAS

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

ALVES, B.G. **Isolamento, quantificação e classificação de folículos pré-antrais de suínos**. 2010. 53f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Brasil.

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

BINELLI, M.; PORTELA, V.M.; MURPHY, B.D. Dinâmica ovariana e eficiência reprodutiva: estado da arte. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 18, 2009, Belo Horizonte, MG. **Anais ...** Belo Horizonte: CBRA, 2009.

BOLAMBA, D.; BORDEN-RUSS, K.D.; DURRANT, B.S. In vitro maturation of domestic dog oocytes cultured in advanced preantral and early antral follicles. **Theriogenology**, v.49, p.933-942, 1998.

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

CARAMBULA, S.F.; GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; NEVES, J.P.; COSTA, L.F.S. Dissociação mecânica e enzimática de ovários de fetos bovinos para o isolamento de folículos pré-antrais. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v.24, p.235, 1996a.

CARROL, J.; WHITTINGHAN, D.G.; WOOD, M.J. Effect of gonadotrophin environment on growth and development of isolated mouse primary ovarian follicles. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.93, p.71-79, 1991.

CHRISTIANSEN, I.J. Ginecologia da fêmea normal. In: _____. **Reprodução no cão e gato**. 1ed. São Paulo: Manole, 1988, p.3-45.

CONCANNON, P.W. **Canine physiology of reproduction**. In: BURKE, T.J. Small animal reproduction and infertility: a clinical approach to diagnosis and treatment. 1 ed. Philadelphia: Lea e Febiger, 1986, p.23-77.

CONCANNON, P.W.; MCCANN, J.P.; TEMPLE, M. Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.39, p.3-25, 1989.

CONCANNON, P.W.; VERSTEGEN, J. Some unique aspects of canine and feline reproduction important in veterinary practice. In: **World Small Animal Veterinary Association**, v.30, p.1-8, 2005.

DERUSSI, A.A.P.; LOPES, M.D. Fisiologia da ovulação, da fertilização e do desenvolvimento embrionário inicial na cadela. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, p. 231-237, 2009.

DOMINGUES, S.F.S.; FERREIRA, H.S.; MUNIZ, J.A.P.C.; LIMA, A.K.F.; OHASHI, O.M.; FIGUEIREDO, J.R.; SILVA, L.D.M. Mechanical isolation of capuchin monkey (*Cebus apella*) preantral ovarian follicles. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 3, p.301-308, 2003.

DURRANT, B.S.; PRATT, N.C.; RUSS, K.D.; BOLAMBA, D. Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. **Theriogenology**, v.49, p.917-932, 1998.

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

ETTINGER, S.J. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 3 ed. São Paulo: Manole, 1992. v.4, p.1857-1869.

FAYRER-HOSKEN, R.A.; DOOKWAH, H.D.; BRANDON, C.I. Immunocontrol in dogs. **Animal Reproduction Science**, v.60/61, p.365-372, 2000.

FELDMAN, E.C.; NELSON, R.W. Ovarian cycle and vaginal cytology. In: _____. **Canine and Feline endocrinology and reproduction**. 2 ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996, p.529-546.

FIGUEIREDO, J.R.; HULSHOF, S.C.J.; VAN DEN HURK, R.; ECTORS, F.J.; NUSGENS, B.; BEVERS, M.M.; BECKERS, J.F. Development of a combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. **Theriogenology**, v.40, p.789-799, 1993.

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

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

FIGUEIREDO, J.R. Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões. **O Embrião**. n.44, p.8, 2009a.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Editora Varela, 2001. 340p.

GREENWALD, G.S.; MOOR, R.M. Isolation and preliminary characterization of pig primordial follicles. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.87, p.561-571, 1989.

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 6.ed. São Paulo: Manole, 1995. 582p.

HOST, P.A.; PHEMISTER, R.D. Onset of diestrus in the Beagle bitch: definition and significance. **American Journal of Veterinary Research**, v.35, p.401-406, 1974.

HULSHOF, S.C.J.; FIGUEIREDO, J.R.; BECKERS, J.F.; BEVERS, M.M. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **Veterinary Quarterly**, v.16, p.78-80, 1994.

JEWGENOW, K.; PITRA, C. Hormone-controlled culture of secondary follicles of domestic cats. **Theriogenology**, v.39, p.527-535, 1993.

JEWGENOW, K.; STOLTE, M. Isolation of preantral follicles from nondomestic cats - viability and ultrastructural investigations. **Animal Reproduction Science**, v.44, p.183-193, 1996.

JOHNSTON, S.D.; ROOT KUSTRITZ, M.V.; OLSON, P.N. The canine estrus cycle. In: **Canine and Feline Theriogenology**. 1ed. Philadelphia, PA: Saunders, 2001. p16-31.

KARTHA, K.K. Meristem culture and germplasm preservation. In: KARTHA, K.K. **Cryopreservation of plant cells and organs**. 1ed. Boca Raton: CRC Press, 1985, p.115-134.

KO, C.S.; DING, D.C.; CHU, T.W.; CHU, Y.N.; CHEN, I.C.; CHEN, W.H.; WU, G.J. Changes to the meiotic spindle and zona pellucida of mature oocytes following different cryopreservation methods. **Animal Reproduction Science**, v. 105, p.272-282, 2008.

LANDIM-ALVARENGA, F.C.; BICUDO, S.D. Ultrastructural study of pré-implantation dog embryos. **Brazilian Journal of Morphology Science**, v. 14, p. 213-217, 1997.

LEITÃO, C.C.F.; BRITO, I.R.; FROTA, I.M.A.; SILVA, J.R.V. Importância dos fatores de crescimento locais na regulação da foliculogênese ovariana em mamíferos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.37, p.215-224, 2009.

LOPES, C.A.P. **Utilização da biotécnica de manipulação de ovócitos inclusos em folículos pré-antrais para a avaliação in vitro do potencial de anticorpos anti-zona pelúcida para a imunoesterilização de cadelas**. 2008. 154f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Brasil.

LOPES, C.A.P.; SANTOS, R.R.; CELESTINO, J.J.H.; MELO, M.A.P.; CHAVES, R.N.; CAMPELLO, C.C.; SILVA, J.R.V.; BÃO, S.N.; JEWGENOW, K.; FIGUEIREDO, J.R. Short-term preservation of canine preantral follicles: Effects of temperature, médium and time. **Animal Reproduction Science**, v.115, p.201-214, 2009.

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

MACHADO, V.P.; RODRIGUES, A.P.R.; BRASIL, A.F.; AMORIM, C.A.; MATOS, M.H.T.; SANTOS, R.R.; FIGUEIREDO, J.R. Isolamento mecânico e enzimático de folículos ovarianos pré-antrais de fetos caprinos. **Ciência Animal**, v.12, p.83-91, 2002.

MATOS, M.H.T.; SILVA, J.R.V.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Técnicas para avaliação da qualidade de folículos ovarianos pré-antrais cultivados in vitro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.433-442, 2007.

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

O'BRIEN, M.J.; PENDOLA, J.K.; EPPIG, J.J. A revised protocol for in vitro development of mouse oocyte from primordial follicles dramatically improves their development competence. **Biology of Reproduction**, v.68, p.1682-1686, 2003.

OKTAY, K.; NEWTON, H.; AUBARD, Y.; SALHA, O.; GOSDEN, R.G. Cryopreservation of immature human oocytes and ovarian tissue: an emerging technology? **Fertility and Sterility**, v. 69, p.1-7, 1998.

PAYAN-CARREIRA, R.; PIRES, M.A. Multioocyte follicles in domestic dogs: A survey of frequency of occurrence. **Theriogenology**, v. 69, p.977-982, 2008.

RODRIGUES, B.A.; RODRIGUES, J.L. Endocrinologia reprodutiva na cadela. **Clínica Veterinária**, v. 40, p.50-58, 2002.

RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; LUCCI, C.M.; FIGUEIREDO, J.R.; GONÇALVES, P.B.D.; BEM, A.R. Isolamento mecânico de folículos ovarianos pré-antrais em cabras. **Ciência Rural**, v.28, n.3, p.477-482, 1998.

ROY, S.K.; GREENWALD, G.S. An enzymatic method for dissociation of intact follicles from the hamster ovary: histological and quantitative aspects. **Biology of Reproduction**, v.32, p.203-215, 1985.

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

RUTHERFORD, A.J.; GOSDEN, R.G. Ovarian tissue cryopreservation: a practical option? **Acta Paediatric Supplement**, v.433, p.8-13, 1999.

SADEU, J.C.; CORTVRINDT, R.; RON-EL, R.; KASTERTEIN, E.; SMITZ, J. Morphological and ultrastructural evaluation of cultured froze-thawed human fetal ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, v.85, p.1130-1141, 2006.

SANTOS, R.R.; RODRIGUEZ, A.P.R.; AMORIM, C.A.; COSTA, S.H.F.; MATOS, M.H.T.; SILVA, J.R.V.; CELESTINO, J.J.H.; MARTINS, F.S.; SARAIVA, M.V.A.; MELO, M.A.P.; FIGUEIREDO, J.R. Teste de toxicidade e criopreservação de folículos pré-antrais ovinos isolados utilizando Glicerol, Etilenoglicol, Dimetilsulfóxido e Propanodiol. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, v.43, n.2, p. 250-255, 2006.

SANTOS, R.R. **Cryopreservation of caprine ovarian tissue: recovery of gonadal function after auto-transplantation**. 2007. 144f. Thesis (Doctorat) – Utrecht University, Utrecht, The Netherlands.

SANTOS, R.R.; CELESTINO, J.J.H.; LOPES, C.A.P.; MELO, M.A.P.; RODRIGUES, A. P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, p.9-15, 2008.

SONGSASEN, N.; WILDT, D.E. Oocyte biology and challenges in developing *in vitro* maturation system in the domestic dog. **Animal Reproduction Science**, v.98, p.2-22, 2007.

STUSHNOFF, C.; SEUFFERHELD, M. Cryopreservation of apple (*Malus species*) genetic resources. In: BAJAJ, Y.P.S. **Biotechnology in agriculture and forestry: cryopreservation of plant germplasm**, Berlim: Springer-Verlag, 1995. p.87-101.

TELFER, E.; GOSDEN, R.G. A quantitative cytological study of polyovular follicles in mammalian ovaries with particular reference to the domestic bitch (*Canis familiars*). **Journal of Reproduction and Fertility**, v.81, p.137-147, 1987.

VALTONEN, M.; JALKANEN, L. Species-specific features of oestrus development and blastogenesis in domestic canine species. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.39, p.133-137, 1993.

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

WOODS, E.J.; BENSON, J.D.; AGCA, Y.; CRISTER, J.K. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. **Cryobiology**, v.48, p.146-156, 2004.

WU, J.; BENJAMIN, R.E.; CARRELL, D.T. In vitro growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. **Biology of Reproduction**, v.64, p.375-381, 2001.

ZHOU, X.L.; NAIB, A.AL.; SUN, D.W.; LONERGAN, P. Bovine oocyte vitrification using the Cryotop method: Effect of cumulus cells and vitrification protocol on survival and subsequent development. **Cryobiology**, v.61, p.66-72, 2010.

**CAPÍTULO 2 - EFEITO DO INTERVALO DE SECÇÃO SOBRE O ISOLAMENTO
MECÂNICO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS DE CADELAS**

Efeito do Intervalo de Secção Sobre o Isolamento Mecânico de Folículos Pré-antrais de Cadelas.

RESUMO O propósito deste estudo foi avaliar a quantidade e a viabilidade de folículos pré-antrais isolados mecanicamente de ovários de cadelas em dois intervalos de secção diferentes. Ovários de fêmeas caninas (n=10) foram seccionados com o aparelho tissue chopper em intervalos de 250 e 500 μm . Para quantificação folicular utilizou-se o microscópio invertido e para análise de viabilidade e qualidade, optou-se pelo microscópio invertido com fluorescência, associando os corantes fluorescentes Hoescht e iodeto de propídeo ao pool de folículos isolados. O número de folículos isolados nas espessuras testadas não diferiu estatisticamente, sendo 25200 para o intervalo de 250 μm e 11000 para o intervalo de 500 μm ($p=0,08$). A viabilidade e a qualidade medidas pela integridade da membrana basal, e presença de células da granulosa apresentaram melhores resultados junto aos folículos isolados na espessura de 500 μm , concluindo que este intervalo preserva melhor os folículos pré antrais isolados.

Palavras-chave: iodeto de propídeo, ovário, quantificação folicular

ABSTRACT The purpose of this study, was evaluate the quantity and viability of bitches preantral follicles mechanically isolated on two sectioning intervals. Canine ovaries (n=10) were cut with a tissue chopper device, programmed to 250 and 500 μm . The inverted microscope was used for follicular quantifying, and for viability and quality analysis, was chosen the sweep laser microscope, associating fluorescent dyes, Hoescht and propidium iodide with the pool of isolated follicles. The number of isolated follicles did not statistically differed between the tested thicknesses, being 25200 for 250 μm and 11000 μm ($p=0,08$). Viability and quality, measured by follicular membrane integrity and granulous cells presence, showed better results in the group of follicles isolated of 500 μm thicknesses, concluding that this interval provides better preservation on preantral follicles.

Keywords: follicular quantifying, ovary, propidium iodide

Introdução

A utilização das biotécnicas reprodutivas em pequenos animais tem sido limitada, mas essa realidade está se modificando em razão do alto valor econômico de algumas raças ou animais individualmente e da disponibilização dessas tecnologias. Um fator que limita o maior acesso dessas tecnologias em cães é a anatomia e a fisiologia peculiares nas fêmeas caninas (LOPES, 2001). Diferente das demais espécies, pouco sucesso tem sido obtido com a transferência de embriões, bem como com a indução da superovulação em cadelas (TSUTSUI *et al.*, 1989).

O ovário mamífero contém milhares de ovócitos inclusos em folículos pré-antrais (FOPA). Entretanto, a grande maioria destes folículos (99,9%) não chega até a ovulação, sendo eliminada por meio do processo de atresia folicular (MACHADO *et al.* 2002). Se os folículos pré-antrais puderem ser isolados e maturados *in vitro*, os ovócitos estocados neles serão efetivamente resgatados em larga escala (KERONG *et al.* 2007).

Entre as biotécnicas reprodutivas, destaca-se a manipulação de ovócitos inclusos em folículos pré-antrais (MOIFOPA), com objetivo de resgatar ou isolar folículos pré-antrais (FOPA) a partir dos ovários antes que eles se tornem atrésicos, cultivando e maturando-os (FIGUEIREDO *et al.* 2002). Os FOPA são classificados em folículos primordiais, primários e secundários. Os primordiais são menores e possuem uma camada de células da granulosa de forma pavimentosa. Os folículos primários apresentam uma camada de células da granulosa de formato cubóide. Já os folículos secundários possuem mais de uma camada de células da granulosa com formato cubóide (HULSHOF *et al.* 1994).

A manipulação *in vitro* de ovócitos recuperados da população de folículos ovarianos pré-antrais, além de servir de modelo nas investigações sobre os complexos mecanismos da foliculogênese inicial, tem um grande impacto na reprodução assistida de espécies em extinção e em animais de produção de alto valor genético. As possibilidades do emprego dos folículos ovarianos pré-antrais em sistemas de crescimento, maturação e fecundação *in vitro* abre um leque de novas alternativas para a seleção e melhoramento genético animal (FIGUEIREDO *et al.* 1993; TELFER *et al.* 1999).

Para o isolamento de FOPA podem ser utilizados métodos mecânicos e/ou enzimáticos. O princípio dos métodos de isolamento folicular consiste na dissociação ou separação dos folículos pré-antrais dos demais componentes do estroma ovariano (fibroblastos, fibras colágenas e elásticas, fibronectina, etc.) utilizando-se para isto, instrumentos mecânicos associados ou não aos enzimáticos. Nos procedimentos mecânicos, os equipamentos mais comumente utilizados são o fatiador de tecidos (tissue chopper), mixers, tesouras cirúrgicas, pequenos fórceps e agulhas dissecantes. Referente aos processos enzimáticos, as enzimas proteolíticas mais utilizadas são a colagenase, tripsina e pronase, sendo a primeira empregada na maioria dos trabalhos (FIGUEIREDO *et al.* 2007). Em contraste aos procedimentos enzimáticos, métodos mecânicos têm a vantagem de oferecer menor risco de danos à estrutura folicular, sendo mais econômicos, rápidos e de maior facilidade de execução (DOMINGUES *et al.* 2003).

Devido à proximidade filogenética dos cães com diversas espécies ameaçadas de extinção como o lobo Guará e o alto valor econômico de algumas raças raras, o aperfeiçoamento da biotécnica de MOIFOPA pode beneficiar estas espécies.

Objetivou-se com este estudo quantificar e avaliar a viabilidade de folículos pré-antrais de cadelas, isolados após procedimento mecânico no aparelho fatiador de tecidos, utilizando dois intervalos seccionais diferentes.

Material e Métodos

O experimento foi realizado nos laboratórios de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Morfologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia - UFU, no período de Novembro de 2009 a Março de 2010.

Foram utilizados 10 ovários de cadelas adultas jovens, sem raça definida, obtidos por meio de procedimento cirúrgico de ovariectomia, realizados no Hospital Veterinário da UFU e em clínicas veterinárias no município de Uberlândia – MG, seguindo padrões de ética cirúrgica e anestésica.

Após a coleta, os ovários foram lavados com álcool 70°, acondicionados em frascos com solução tampão fosfatado (PBS) resfriado a 4°C e conduzidos ao laboratório dentro de uma caixa de isopor no período máximo de duas horas.

No procedimento de isolamento mecânico utilizou-se o aparelho fatiador de tecidos Tissue Chopper (The Mickle Laboratory Engineering CO., Gomshal, Surrey, England) calibrado para espessuras de corte de 250 µm e 500 µm, dividindo o mesmo número de ovários para cada uma. Para uma fragmentação mais eficiente, os ovários foram umedecidos no cortador de tecidos com solução de PBS e os cortes foram realizados nos sentidos longitudinal e transversal. Os fragmentos ovarianos obtidos foram colocados em solução de cinco mL de PBS e dissociados mecanicamente por repetidos movimentos de sucção e ejeção utilizando-se, sucessivamente, pipetas de Pasteur calibradas a 1600 µm (20 movimentos) e 600 µm (20 movimentos) de diâmetro. A suspensão obtida foi filtrada, primeiramente, em malha de náilon de 500 µm e, posteriormente, de 100 µm de diâmetro, com a finalidade de separar os FOPA dos fragmentos de tecido ovariano com dimensões maiores que 100 µm de diâmetro, procedimento adaptado de Rodrigues *et al.* (1998).

Para estimar a quantidade de FOPA isolados utilizou-se a metodologia adaptada de Figueiredo *et al.* (1993). O filtrado resultante (cinco mL) foi cuidadosamente agitado para a dispersão dos folículos. Em seguida, colocou-se em placa de Petri, uma amostra de 50 µL do pool processado, sob microscópio invertido (Motic® AE21 Trino) para a contagem dos folículos isolados, em aumento de 120 vezes. O número de folículos pré-antrais observados foi multiplicado por 20 para adequar os valores de microlitros para mililitros e, posteriormente, pelo volume final (5 mL), estimando a quantidade total de folículos para cada ovário.

A avaliação quanto à presença de células da granulosa foi realizada em microscópio de varredura a laser confocal (Laser Scanning Microscope® - LSM 510 meta) acoplado ao microscópio invertido (Axiovert® 200 M), utilizando 1 µL do corante fluorescente Hoescht 33342 (B2261: Sigma Aldrich®, St Louis, USA) em 1000 µL (concentração final de 10 µg/mL) do pool de folículos isolados. Para avaliar a viabilidade folicular, também no mesmo aparelho, utilizou-se 50 µL do corante fluorescente iodeto de propídeo (P3566: Invitrogen®, Carlsbad, CA, USA) em 50 µL (concentração final de 10 µg/mL) do pool folicular. Ambas as amostras ficaram 30

minutos em estufa a 37°C ao abrigo da luz, fornecendo uma alíquota de 70µL cada para análise entre lâmina e lamínula.

A análise estatística foi realizada utilizando o programa Bioestat® 5.0 e os dados expressados como média e erro padrão. Os dados paramétricos foram submetidos ao teste t que avaliou os dados de quantificação folicular e o teste de Mann-Whitney o número de células da granulosa. A viabilidade e a classificação folicular quanto à presença de células da granulosa foram analisadas pelo teste Qui-quadrado. Os resultados foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

Ambos os intervalos de corte proveram uma quantidade satisfatória de FOPA isolados por ovário, sendo 25200 ± 6676 estruturas recuperadas no intervalo de 250 µm e 11000 ± 2727 no intervalo de 500 µm. Uma alta variação individual de folículos foi observada nos dois intervalos de corte, com valores oscilando entre 7700 e 42000. Vários estudos em diferentes espécies (suíno: GREENWALD e MOOR, 1989 e ALVES, 2010; canino: DURRANT *et al.* 1998; felinos: JEWGENOW, 1996; caprinos: RODRIGUES *et al.* 1998) reportaram grandes variações na quantidade de folículos isolados por ovário, independente do tipo de procedimento adotado (enzimático ou mecânico).

No presente trabalho, o intervalo de corte de 250 µm proporcionou um incremento considerável no número de folículos isolados (Tabela 1) em relação ao intervalo de 500 µm, mas a análise estatística constatou que esses valores não apresentaram diferença entre si ($p=0,08$). Domingues *et al.* (2003) isolaram mecanicamente folículos pré-antrais de ovários de primatas (*Cebus apella*), testando espessuras de corte de 250, 500, 750 e 1000 µm e reportaram que o número de FOPA obtidos no corte de 500 µm (300830) foi estatisticamente superior aos demais. Estudo com ovários bovinos seccionados mecanicamente em oito espessuras de corte (25, 50, 75, 100, 125, 150, 175 e 200 µm) demonstrou que com o intervalo de 125 µm obteve-se o maior número (25632) de folículos isolados (LUCCI *et al.* 2002). Em ovinos, Amorim *et al.* (2000) evidenciaram a influência da

espessura de corte no total de folículos isolados por ovário, onde a melhor taxa de recuperação foi observada na secção de 87,5 µm (6368).

Tabela 1 – Número de folículos pré-antrais recuperados de ovários de cadelas de acordo com o intervalo de corte utilizado. Média e erro padrão.

Ovário (n)	Intervalo de Corte (µm)	Folículos Isolados/Ovário	Variação
5	250	25200 ± 6676	7700 - 42000
5	500	11000 ± 2727	6200 - 21400

p>0,05

Para melhor identificação dos FOPA isolados, utilizou-se o corante Hoechst 33342 que por corar componentes nucleares, permite a visualização individual de células da granulosa além da determinação de seu número e forma (Figura 1). No presente estudo o intervalo de 500 µm demonstrou um maior número de folículos cobertos com células da granulosa e uma tendência de maior número destas estruturas por folículo isolado quando comparado ao intervalo de 250 µm (Tabela 2). Estes dados indicam que o maior intervalo de corte preserva melhor a morfologia dos folículos pré-antrais, resultando em melhor qualidade dos mesmos.

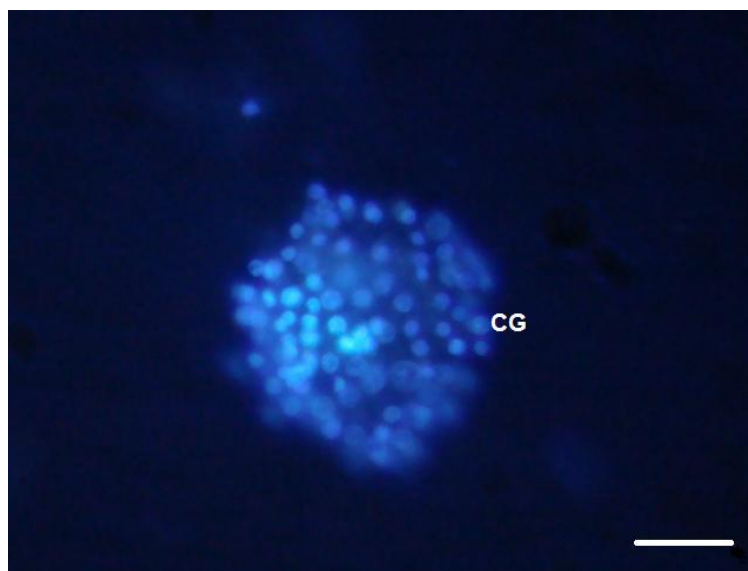


Figura 1 – Avaliação da presença de células da granulosa (CG) de folículo pré-antral de cadela marcado pelo corante Hoechst 33342 sob microscopia de fluorescência. Barra corresponde 10 µm.

Tabela 2 – Efeito do intervalo de corte sobre a porcentagem de folículos pré-antrais cobertos com células da granulosa isolados de ovários de cadelas e o número de células da granulosa presentes após o procedimento mecânico. Média e erro padrão.

Intervalo de corte (μm)	% Folículos Pré-antrais Cobertos	Nº células da granulosa
250	37,86 (39/103) ^a	2,83 $\pm$ 0,69
500	60,31 (38/63) ^b	6,96 $\pm$ 2,40

Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente. $p < 0,05$.

Alguns pesquisadores (NAYUDU *et al.* 1992; JEWGENOW, 1998) observaram que folículos que conservam sua estrutura apresentam uma ou mais camadas de células da granulosa circundantes ao ovócito e aderidas à membrana basal. A presença da membrana basal em folículos isolados pode afetar a eficiência do cultivo *in vitro* oferecendo uma série de vantagens, como a preservação da morfologia celular e manutenção da adesão aos componentes extracelulares (FIGUEIREDO *et al.* 1994; MACHADO *et al.* 2002). Vários corantes como o azul de trypan, calceína-AM e etídio homodímero podem ser associados ao corante Hoechst 33342 para testar a viabilidade, número de células da granulosa e integridade de folículos pré-antrais caninos em diferentes meios de preservação (LOPES *et al.* 2009).

As células da granulosa são indispensáveis para o crescimento do ovócito, diferenciação, divisão nuclear, maturação citoplasmática e atividade transcripcional genômica (VAN DEN HURK, 2005). Estas células estão ligadas entre si e com o ovócito através de junções do tipo gap nas zonas de transposição citoplasmática, onde ocorre comunicação bidirecional, permitindo a troca de nutrientes, precursores metabólicos (aminoácidos e nucleotídeos), moléculas informacionais (hormônios, neurotropinas e fatores de crescimento) e sinais estimulatórios e inibitórios da meiose. Assim, o ovócito pode promover ativamente o crescimento e a diferenciação das células foliculares, do mesmo modo que as células da granulosa estimulam o crescimento e a diferenciação do ovócito (ANDERSON e ALBERTINI, 1976).

As células foliculares e o ovócito possuem um sistema de transporte ativo, gerando um gradiente eletroquímico que é fundamental para o perfeito

funcionamento celular. Quando esse sistema falha (morte celular) ocorre a despolarização da membrana citoplasmática e sua conseqüente permeabilização. O corante fluorescente iodeto de propídeo foi o escolhido para testar a viabilidade dos folículos isolados, devido ao fato de não atravessar as membranas citoplasmáticas polarizadas, corando então, apenas as células mortas de vermelho (SILVA *et al.* 2001).

Os resultados obtidos (Tabela 3) apontaram diferenças significantes na viabilidade dos FOPA, entre os intervalos de corte adotados para o isolamento. Alves (2010) utilizou iodeto de propídeo no pool de estruturas foliculares isoladas mecanicamente de ovários suínos e constatou taxa de viabilidade de 76%, próxima à encontrada no intervalo de 500 μ m deste trabalho.

Lopes *et al.* (2009) reportaram resultados semelhantes de taxa de viabilidade (79 a 83%) em cadelas, após o isolamento de FOPA no tissue chopper, utilizando intervalo de corte de 87,5 μ m. Em felinos não domésticos, Jewgenow *et al.* (1996), observaram taxas de integridade de membrana dos folículos pré-antrais, isolados mecanicamente, entre 20 e 50%. Machado *et al.* (2002) avaliando a viabilidade de folículos pré-antrais de fetos caprinos, isolados pelos métodos enzimático e mecânico, concluíram que ambos procedimentos podem ser usados com a mesma eficiência, apesar do método enzimático apresentar maior porcentagem de FOPA viáveis (84% *versus* 75%).

Tabela 3 – Viabilidade de folículos pré-antrais de cadelas avaliados pelo iodeto de propídeo em diferentes intervalos de corte

Intervalo de corte (μ m)	% Folículos Pré-antrais	
	Viáveis	Não viáveis
250	48,72 (38/78) ^a	51,28 (40/78)
500	74,55 (41/55) ^b	25,45 (14/55)

Letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente. $p < 0,05$. Teste Qui-quadrado.

Conclusões

O isolamento mecânico mostrou-se eficiente em ambos os intervalos de corte quanto à recuperação de folículos pré-antrais de cadelas, porém o intervalo de 500

μm propiciou melhor viabilidade e qualidade das estruturas foliculares isoladas, sendo tais parâmetros essenciais para posterior cultivo *in vitro*.

REFERÊNCIAS

ALVES, B.G. **Isolamento, quantificação e classificação de folículos pré-antrais de suínos. 2010.** 53f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária/Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

ANDERSON, E.; ALBERTINI, D.F. Gap junctions between oocyte and companion follicle cells in the mammalian ovary. **Journal of Cellular Biology**, v.71, p.680-686, 1976.

AMORIM, C.A.; RODRIGUES, A.P.R.; LUCCI, C.M.; FIGUEIREDO, J.R.; GONÇALVES, P.B.D. Effect of sectioning on the number of isolated ovine pre -antral follicles. **Small Ruminant Research**, v.37, p.269-277, 2000.

DOMINGUES, S.F.S.; FERREIRA, H.S.; MUNIZ, J.A.P.C.; LIMA, A.K.F.; OHASHI, O.M.; FIGUEIREDO, J.R.; SILVA, L.D.M. Mechanical isolation of capuchin monkey (*Cebus apella*) preantral ovarian follicles. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 3, p.301-308, 2003.

DURRANT, B.S.; PRATT, N.C.; RUSS, K.D.; BOLAMBA, D. Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. **Theriogenology**, v.49, p.917-932, 1998.

FIGUEIREDO, J.R.; HULSHOF, S.C.J.; VAN DEN HURK, R.; ECTORS, F.J.; NUSGENS, B.; BEVERS, M.M.; BECKERS, J.F. Development of a combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. **Theriogenology**, v.40, p.789-799, 1993.

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

FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A. Manipulação de Oócitos Incluídos em Folículos Ovarianos Pré-antrais – MOIFOPA. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, 1.ed. São Paulo: Editora Varela, 2002. p.227-260.

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

GREENWALD, G.S.; MOOR, R.M. Isolation and preliminary characterization of pig primordial follicles. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.87, p.561-571, 1989.

HULSHOF, S.C.J.; FIGUEIREDO, J.R.; BECKERS, J.F.; BEVERS, M.M. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **Veterinary Quarterly**, v.16, p.78-80, 1994.

JEWGENOW, K.; STOLTE, M. Isolation of preantral follicles from nondomestic cats- viability and ultrastructural investigations. **Animal Reproduction Science**, v.44, p.183-193, 1996.

JEWGENOW, K. Role of media, protein and energy supplements on maintenance of morphology and DNA-Synthesis of small preantral domestic cat follicle during short-term culture. **Theriogenology**, v.49, p.1567-1577, 1998.

KERONG, S.; XUEFENG, Y.; LIYING, D.; DENGKE, P.A.N.; YUNHAI, Z.; YONGHUI, Z.; XUEMEI, D.; XIAOXIANG, H.; CHANGXIN, W.; NING, L. Advanced methods of isolation and identification of porcine primordial follicles. **Animal Reproduction Science**, v.101, p.1637-171, 2007.

LOPES, M.D. Técnicas de reprodução assistida em pequenos animais. **Revista de Educação Contínua CRMV-SP**, v.4, p.33-39, 2001.

LOPES, C.A.P.; SANTOS, R.R.; CELESTINO, J.J.H.; MELO, M.A.P.; CHAVES, R.N.; CAMPELLO, C.C.; SILVA, J.R.V.; BÁO, S.N.; JEWGENOW, K.; FIGUEIREDO, J.R. Short-term preservation of canine preantral follicles: Effects of temperature, médium and time. **Animal Reproduction Science**, v.115, p.201-214, 2009.

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

MACHADO, V.P.; RODRIGUES, A.P.R.; BRASIL, A.F.; AMORIM, C.A.; MATOS, M.H.T.; SANTOS, R.R.; FIGUEIREDO, J.R. Isolamento mecânico e enzimático de folículos ovarianos pré-antrais de fetos caprinos. **Ciência Animal**, v.12, p.83-91, 2002.

NAYUDU, P.L.; OSBORNE, O.S. Factors influencing the rate of preantral and antral growth of mouse ovarian follicles in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.95, p.349-362, 1992.

RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; LUCCI, C.M.; FIGUEIREDO, J.R.; GONÇALVES, P.B.D.; BEM, A.R. Isolamento mecânico de folículos ovarianos pré-antrais em cabras. **Ciência Rural**, v.28, n.3, p.477-482, 1998.

SILVA, T.L.; REIS, A.; HEWITT, C. Citometria de fluxo: funcionalidade celular on-line em bioprocessos. **Biology Biotechnology**, p.32-40, 2001.

TELFER, E.E.; WEBB, R.; MOOR, R.M. New approaches to increasing oocyte yield from ruminants. **Animal Science**, v.68, p.285-298, 1999.

TSUTSUI, T.; SHIMADA, K.; NISHI, M.; KUBO, N.; MURAO, I.; SHIMIZU, T.; OGASA, A. An experimental trial on embryo transfer in the dog. **Japanese Journal of Veterinary Science**, v.51, p.797-800, 1989.

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

CAPÍTULO 3 - CRIOPRESERVAÇÃO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS CANINOS COM GLICEROL E ETILENOGLICOL

Criopreservação de Folículos Pré-antrais Caninos com Glicerol e Etilenoglicol

RESUMO – Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito dos crioprotetores glicerol e etilenoglicol em duas concentrações (1,5 M e 3,0 M) sobre a viabilidade de folículos pré-antrais caninos após exposição e criopreservação. Foram utilizados ovários de cadelas sem raça definida (n=8), submetidos ao processo de isolamento mecânico simples para resgate dos folículos pré-antrais. Em seguida, amostras do pool folicular, foram destinadas a avaliação imediata da viabilidade, após o teste de toxicidade com exposição de 20 minutos ao glicerol e etilenoglicol e após congelamento/ descongelamento, utilizando o corante fluorescente iodeto de propídeo em microscópio invertido. Os folículos foram considerados viáveis se não estivessem corados. No teste de toxicidade, apenas o grupo que utilizou etilenoglicol a 1,5 M (51,5%) não apresentou redução significativa da viabilidade folicular em relação ao controle (63,2%). Após os procedimentos de criopreservação, a viabilidade foi consideravelmente menor em todos os grupos, sendo 12% para glicerol a 1,5 M, 15,5% para etilenoglicol a 1,5 M, 14% para glicerol a 3,0 M e 28% para etilenoglicol a 3,0 M. Ressaltando-se a necessidade de aperfeiçoamento das técnicas de criopreservação de folículos pré-antrais caninos, conclui-se que o etilenoglicol demonstrou os melhores resultados após o período de exposição e procedimentos de criopreservação/descongelamento.

Palavras-Chave: crioprotetores, descongelamento, toxicidade, viabilidade

ABSTRACT The aim of this work was evaluate glycerol and ethylene glycol cryoprotective effects at 1,5 M and 3,0 M under canine preantral follicles viability after exposure and cryopreservation. Eight ovarian of non defined breed bitches was mechanically isolated to rescue the preantral follicles. Then were separated aliquots for immediate evaluation of viability, after toxicity test with 20 minutes of exposure and after cryopreservation with glycerol and ethylene glycol using propidium iodide dye at confocal inverted microscope. The follicles were considered viable if were not stained. On the toxicity test only the group that used ethylene glycol at 1,5 M did not shown significant reduction of viability (51,5%) compared with control group (63,2%).

After cryopreservation, the follicular viability was significantly lower in all groups, being, 12% for glycerol at 1,5 M, 15,5% for ethylene glycol at 1,5 M, 14% for glycerol at 3 M and 28% for ethylene glycol at 3 M. Emphasizing the need for improvement of canine preantral follicles cryopreservation, this study concludes that ethylene glycol demonstrated the best results after the exposure period and freezing/thawing procedures.

Keywords: cryoprotectants, thawing, toxicity, viability

Introdução

A biotecnologia de isolamento de folículos pré-antrais (FOPA) e a manipulação dos ovócitos inclusos nos mesmos proporciona o acesso a uma fonte de material genético que está destinada a atresia folicular. Estas técnicas podem aumentar a eficiência reprodutiva de animais de alto valor zootécnico e contribuir na preservação de animais em vias de extinção, fornecer informações sobre o processo de foliculogênese e constituir um banco de material genético disponível a diversas possibilidades como a clonagem, a transgenia e pesquisas de medicamentos.

Os resultados obtidos de diferentes trabalhos demonstram que independente do tipo de procedimento utilizado para o isolamento folicular (mecânico ou enzimático), milhares de FOPA viáveis podem ser recuperados por ovário (AMORIM *et al.*, 2000; FIGUEIREDO *et al.*, 2002; ALVES, 2010). Dessa forma, é necessário o desenvolvimento de técnicas eficientes de conservação dos FOPA isolados, uma vez que a manipulação e cultivo imediatos de um grande número destas estruturas tornar-se-ia inexequível (SANTOS *et al.*, 2006).

A criopreservação é uma excelente alternativa para estocagem de um grande número de ovócitos imaturos, além de representar uma oportunidade de proteger a capacidade reprodutiva humana e animal, assim como preservar o material genético de raças raras ou espécies ameaçadas de extinção (AMORIM *et al.*, 2003). Zhou *et al.* (2010) trabalharam com vitrificação de ovócitos em diferentes fases do ciclo meiótico e observaram maior eficiência daqueles em fase de vesícula germinativa

(imaturos) nas taxas de clivagem e na produção de blastocistos quando comparados àqueles em metáfase II, indicando melhor resistência a crioinjúria.

Durante o processo de congelação existem dois fatores que podem levar à morte celular: a formação de gelo intracelular e o choque osmótico. Esses efeitos negativos podem ser reduzidos ou evitados com a utilização de agentes crioprotetores, que permitem preservar as células vivas a temperaturas extremamente baixas. De acordo com Stachecki e Cohen (2004), os efeitos do gelo intracelular e do choque osmótico são fatores letais se as células não são tratadas apropriadamente.

A adição de crioprotetores durante o processo de congelamento permite uma curva de congelamento lenta, estabilizando a membrana celular, produzindo a saída da água intracelular, minimizando a formação de cristais de gelo e o desequilíbrio hidroeletrólítico, proporcionando desta forma melhor conservação das estruturas (HAFEZ, 1995). Os eventos iniciais (período de equilíbrio) durante a congelação e descongelação podem levar a severos danos ou morte celular, uma vez que a maioria dos crioprotetores possui características citotóxicas ou podem facilitar a entrada de agentes tóxicos nas células. Segundo El-Naggar *et al.* (2006) as células ou tecidos criopreservados devem ser descongelados de forma rápida, a fim de reduzir a ação tóxica dos agentes criopreservantes. Estes agentes devem ser removidos em uma a três lavagens consecutivas (RODRIGUES *et al.*, 2004).

Para aplicar um protocolo de criopreservação, é necessário determinar o agente crioprotetor mais indicado, sua concentração, tempo de exposição e método de remoção. Um dos métodos de avaliação da qualidade folicular é testando a integridade da membrana basal, seja utilizando o corante vital azul de trypan (JEWGENOW *et al.*, 1998) ou marcadores fluorescentes que só penetram em células cuja integridade de membrana está prejudicada como o iodeto de propídeo (ALVES, 2010).

Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito dos crioprotetores glicerol e etilenoglicol em duas concentrações (1,5 M e 3,0 M) sobre a viabilidade de FOPA caninos após exposição e criopreservação

Material e Métodos

Os ovários (n=8) foram coletados de cadelas adultas sem raça definida (SRD) após o procedimento de ovariectomia realizada no hospital veterinário da Universidade Federal de Uberlândia. Após a coleta foram lavados em álcool 70% durante 10 segundos e armazenados em solução salina tamponada fosfatada (PBS) a 4°C e transportados ao laboratório. Em seguida, os ovários foram submetidos ao procedimento mecânico de isolamento, utilizando o aparelho fatiador de tecidos Tissue Chopper (The Mickle Laboratory Engineering CO. Gomshal, Surrey, England) ajustado para intervalos de corte de 500 µm. Os fragmentos foram colocados em recipiente contendo 15 mL de PBS com 10% de soro fetal bovino para dissociação celular, utilizando-se sucessivamente pipetas de Pasteur de 1600 e 600 µm de diâmetro (20 movimentos cada). Posteriormente, a suspensão foi filtrada em malhas de náilon de 500 µm e 100 µm, respectivamente.

Da suspensão de FOPA isolados foram retiradas 9 amostras de 1000 µL cada. No primeiro grupo denominado controle foi adicionado o corante fluorescente iodeto de propídeo (IP) na concentração final de 10 µg/mL (Invitrogen® P3566). Após 10 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz foram retirados 50 µL e colocados em lâmina e lamínula para leitura da viabilidade em microscópio invertido com fluorescência (Laser Scanning Microscope® - LSM 510 Meta). Os crioprotetores foram preparados nas concentrações de 3 e 6 M, para obter as concentrações finais de 1,5 e 3 M, quando misturados ao pool folicular. No teste de toxicidade, foram separadas quatro amostras do pool, onde se acrescentou 1 mL da solução de glicerol ou de etilenoglicol (1,5 e 3 M), sendo denominados: segundo (TGli-1,5), terceiro (TGli-3,0), quarto (TEtil-1,5) e quinto (TEtil-3,0) grupos. Depois do período de estabilização de 20 minutos à temperatura ambiente as amostras, para remoção do crioprotetor, foram centrifugadas duas vezes (1000 rpm/20°C/2') e ressuspensas com PBS para posterior análise da viabilidade com IP, constituindo o teste de toxicidade.

Os grupos destinados à criopreservação (sexto (CGli-1,5), sétimo (CGli-3,0), oitavo (CEtil-1,5) e nono (CEtil-3,0)) receberam glicerol e etilenoglicol e após o período de estabilização de 20 minutos foram envasados em palhetas de 0,5 mL

(quatro palhetas para cada grupo) e acondicionadas no congelador programável (BTC 900 Compact, Biocom®) estabilizado a temperatura de -5°C. Em seguida foi realizada manualmente a cristalização e o resfriamento lento (0,5°C/min) até -32°C. Por fim, as palhetas foram armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C) durante 20 dias.

O descongelamento rápido foi realizado expondo-se as palhetas à temperatura ambiente por 10 segundos e em banho-maria a 37°C, por mais 30 segundos, dispensando o material em criotubos plásticos (Eppendorf® 3810) de dois mL. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e coradas com IP, seguindo o mesmo protocolo adotado para os grupos controle e toxicidade. Cada par ovariano constituiu uma repetição e foram realizadas quatro repetições. Em cada grupo foram analisados 200 folículos.

O teste estatístico não paramétrico Qui-quadrado dentro do programa Bio-Estat 5.0 foi utilizado para analisar os efeitos do glicerol e do etilenoglicol em diferentes concentrações (1,5 e 3M) sobre a porcentagem de folículos pré-antrais viáveis em relação ao controle. Valores foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

No presente estudo foi aplicado o método de isolamento mecânico simples usando o fatiador de tecidos (Tissue Chopper) para resgatar os folículos pré-antrais. Este procedimento é rápido (15 minutos) e permite o isolamento de um grande número de folículos estruturalmente normais. A taxa de viabilidade do grupo controle após análise com corante fluorescente iodeto de propídeo foi de 63,2%, resultado próximo aos de Lopes *et al.* (2009) que obtiveram 67% de viabilidade em FOPA caninos com o mesmo método.

O teste de toxicidade fornece parâmetros importantes dos efeitos deletérios dos criopreservantes sobre as células durante o período de estabilização. O grupo TEtil-1,5 foi o único a não apresentar redução significativa da viabilidade dos FOPA em relação ao grupo controle (Tabela 1). Segundo Mullen *et al.* (2008), uma das teorias primárias de injúrias celulares durante a criopreservação seria o stress

osmótico causado pela presença de crioprotetores no meio de congelamento, além da inerente toxicidade destes componentes.

Tabela 1 - Porcentagem de folículos pré-antrais de cadelas viáveis após teste de toxicidade com diferentes concentrações (1,5 e 3,0M) de glicerol e etilenoglicol.

Fopa	Teste de Toxicidade				
	Controle	TGli-1,5	TGli-3,0	TEtil-1,5	TEtil-3,0
Viáveis (%)	63,2 ^a	47,5 ^b	28,5 ^c	51,5 ^{ab}	33,5 ^c
Viáveis/Total	158/250	95/200	57/200	103/200	67/200

Teste Qui-quadrado. Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente. $p < 0,05$

TGli1,5: Teste de toxicidade com glicerol a 1,5M

TGli3,0: Teste de toxicidade com glicerol a 3,0M

TEtil1,5: Teste de toxicidade com etilenoglicol a 1,5M

TEtil3,0: Teste de toxicidade com etilenoglicol a 3,0M

O crioprotetor glicerol tem peso molecular alto (92,10) comparado ao etilenoglicol (62,07) (MASSIP, 2001), esta característica confere ao glicerol baixa permeabilidade de membrana, induzindo a severos danos citoplasmáticos (SZELL *et al.*, 1986). Diversos estudos têm demonstrado que a exposição de tecido ovariano ou folículos pré-antrais isolados ao glicerol, resulta em uma redução substancial na porcentagem de folículos viáveis em diferentes espécies (caninos: LOPES, 2008; caprinos: RODRIGUES *et al.*, 2004; ovinos: SANTOS *et al.*, 2006).

Os tratamentos com a mesma concentração de crioprotetores apresentaram-se similares no número de FOPA viáveis após o teste de toxicidade, o que está de acordo com resultados de Santos *et al.* (2006) testando a toxicidade dos mesmos crioprotetores em folículos pré-antrais ovinos isolados. Por outro lado, Lucci *et al.* (2004), observaram que a exposição ao etilenoglicol 1,5 M resultou em elevado decréscimo de FOPA bovinos viáveis, ao contrário dos resultados obtidos com glicerol na mesma concentração. Esta discrepância é explicada pelo fato de células de diferentes espécies poderem apresentar respostas diferenciadas perante os tratamentos com crioprotetores (COCERO *et al.*, 1996).

Após o procedimento de criopreservação/descongelação o número de FOPA viáveis (Figura 1) em todos os grupos foi significativamente reduzido ($P < 0,05$) com base nos valores do grupo controle, demonstrando eficiência de preservação

semelhante entre si (Tabela 2). Assim, a formação de gelo intra-celular, provavelmente, resultou em danos aos folículos durante o processo de criopreservação/descongelação. Lopes (2008), hipotetizou que a concentração de crioprotetores em 1,5 M não foi suficiente para proteger as células contra a crioinjúria. Em concentrações adequadas os crioprotetores devem inibir a formação de cristais de gelo e induzir ao desenvolvimento do estado de vitrificação no qual a água foi solidificada, mas não se expandiu (JAIN e PAULSON, 2006).

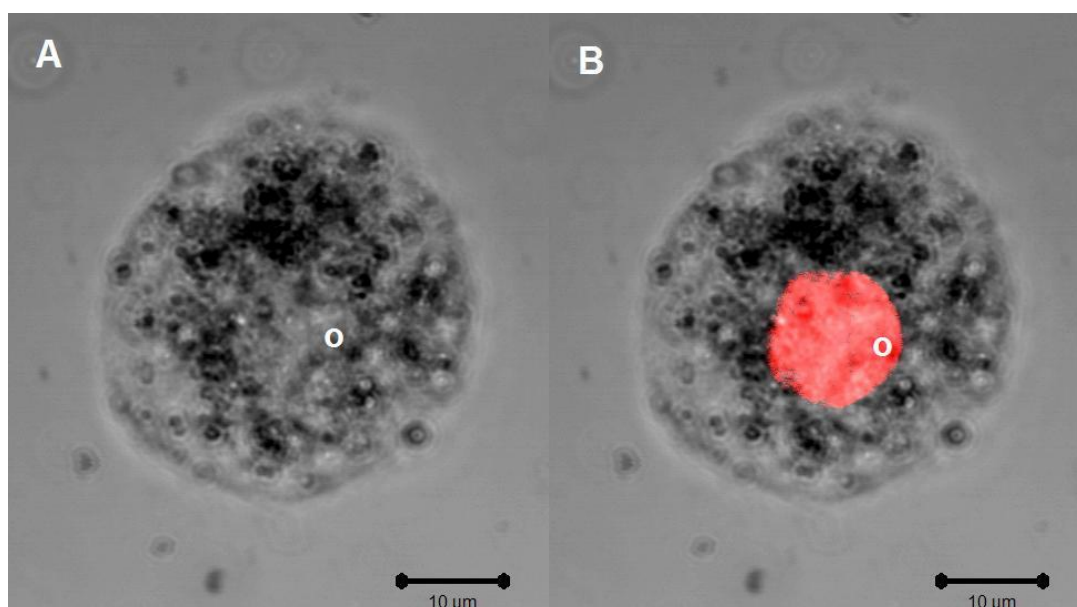


Figura 1 – Análise da viabilidade de folículo pré-antral de cadela após criopreservação e descongelação. Folículo pré-antral não viável em contraste de fase (A) e com núcleo do ovócito (o) marcado por iodeto de propídeo (B). Microscopia de fluorescência.

Tabela 2 - Porcentagem de folículos pré-antrais de cadelas viáveis após criopreservação/descongelação com diferentes concentrações (1,5 e 3,0M) de glicerol e etilenoglicol.

Fopa	Teste de Criopreservação/Descongelação				
	Controle	CGli1,5	CGli3,0	CEtil1,5	CEtil3,0
Viáveis (%)	63,2 ^a	12,0 ^b	15,5 ^b	14,0 ^b	28,0 ^c
Viáveis/Total	158/250	24/200	31/200	28/200	56/200

Teste Qui-quadrado. Letras diferentes na mesma linha diferem estatisticamente. $p < 0,05$

CGli1,5: Teste de criopreservação/descongelação com glicerol a 1,5M

CGli3,0: Teste de criopreservação/descongelação com glicerol a 3,0M

CEtil1,5: Teste de criopreservação/descongelação com etilenoglicol a 1,5M

CEtil3,0: Teste de criopreservação/descongelação com etilenoglicol a 3,0M

O glicerol apresentou baixa eficiência na criopreservação de FOPA caninos neste estudo, apontando a necessidade de aprimoramento do período de equilíbrio e da concentração para garantir sua melhor penetração nas células. Santos *et al.* (2006) compararam os efeitos da exposição e da criopreservação sobre a viabilidade de folículos pré-antrais ovinos isolados, utilizando glicerol, etilenoglicol, dimetilsulfóxido e propanodiol como crioprotetores nas concentrações de 1,5 e 3,0M e relataram que as menores taxas foram obtidas com glicerol em ambas concentrações. Trabalhando com criopreservação de tecido ovariano humano, Hovatta (2001) verificou que o etilenoglicol penetra no tecido mais rapidamente que o glicerol, o qual constitui o crioprotetor de ação mais lenta e consequentemente o menos eficiente.

O nono grupo (CEtil 3,0) apresentou o melhor resultado de preservação da viabilidade dos FOPA após o processo de criopreservação. Rodrigues *et al.* (2004) demonstraram significativo aumento nas porcentagens de FOPA caprino criopreservados alterando as concentrações de etilenoglicol de 1,5 para 3,0M. Amorim *et al.* (2003) e Lima *et al.* (2006) testaram diferentes concentrações de etilenoglicol na criopreservação de FOPA ovinos isolados e FOPA felinos *in situ* e reportaram resultados satisfatórios nas taxas de sobrevivência folicular.

A comparação entre o teste de toxicidade e o congelamento/ descongelamento com o mesmo crioprotetor, na mesma concentração, apontou o grupo que utilizou etilenoglicol a 3,0M na criopreservação (CEtil 3,0) como o único a não apresentar redução significativa da viabilidade dos FOPA em relação ao teste de toxicidade (TEtil 3,0). Santos *et al.* (2006) testando diversos criopreservantes realizou a mesma comparação entre procedimentos e notaram decréscimo significativo da viabilidade dos FOPA ovinos, com o uso do glicerol nas concentrações de 1,5 e 3,0 M.

Conclusões

Dentre os criopreservantes, o etilenoglicol apresentou os melhores resultados de viabilidade de folículos pré-antrais caninos isolados, no teste de toxicidade a 1,5 M e na criopreservação a 3,0 M de concentração final.

REFERÊNCIAS

ALVES, B.G. **Isolamento, quantificação e classificação de folículos pré-antrais de suínos. 2010.** 53f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

AMORIM, C.A.; RODRIGUES, A.P.R.; LUCCI, C.M.; FIGUEIREDO, J.R.; GONÇALVES, P.B.D. Effect of sectioning on the number of isolated ovine preantral follicles. **Small Ruminant Research**, v.37, p.269-277, 2000.

AMORIM, C.A.; RONDINA, D.; RODRIGUES, A.P.R.; COSTA, S.H.F.; GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; GIORGETTI, A. Isolated ovine primordial follicles cryopreserved in different concentrations of ethylene glycol. **Theriogenology**, v.60, p.735-742, 2003.

COCERO, M.J.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; BARRAGAN, M.L. Differences on post-thawing survival between ovine morula and blastocysts cryopreserved with ethylene glycol and glycerol. **Cryobiology**, v.33, p.502-507, 1996.

EL-NAGGAR, M.M.; AL-MASHAT, F.M.; ELAYAT, A.A.; SIBIANY, A.R.; ARDAWI, M.S.; BADAWOUD, M.H. Effect of thawing rate and post-thaw culture on the cryopreserved fetal rat islets: functional and morphological correlation. **Life Science**, v.78, p.1925-1932, 2006.

FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A. Manipulação de Oócitos Incluídos em Folículos Ovarianos Pré-antrais – MOIFOPA. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, 1.ed. São Paulo: Editora Varela, 2002. p.227-260.

HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**, 6.ed. São Paulo: Manole, 1995, 582p.

HOVATTA, O. Cryopreservation and culture of human primordial ovarian follicles. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.169, p.95-97, 2000.

JAIN, J.K.; PAULSON, R.J. Oocyte cryopreservation. **Fertility and Sterility**, v.86, p.1037-1046, 2006.

JEWGENOW, K.; PENFOLD, L.M.; MEYER, H.H.D; WILDT, D.E. Viability of small preantral ovarian follicles from domestic cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.112, p.39-47, 1998.

LIMA, A.K.F.; SILVA, A.R.; SANTOS, R.R.; SALLES, D.M.; EVANGELISTA, A.F.; FIGUEIREDO, J.R.; SILVA, L.D.M. Cryopreservation of preantral ovarian follicles *in situ* from domestic cats (*Felis catus*) using different cryoprotective agents. **Theriogenology**, v.66, p.1664-1666, 2006.

LOPES, C.A.P. **Utilização da biotécnica de manipulação de ovócitos inclusos em folículos pré-antrais para a avaliação in vitro do potencial de anticorpos anti-zona pelúcida para a imunoesterilização de cadelas.** 2008. 154f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, Brasil.

LOPES, C.A.P.; SANTOS, R.R.; CELESTINO, J.J.H.; MELO, M.A.P.; CHAVES, R.N.; CAMPELLO, C.C.; SILVA, J.R.V.; BÃO, S.N.; JEWGENOW, K.; FIGUEIREDO, J.R. Short-term preservation of canine preantral follicles: Effects of temperature, médium and time. **Animal Reproduction Science**, v.115, p.201-214, 2009.

LUCCI, C.M.; KACINSKI, M.A.; LOPES, L.H.R.; RUMPF, R.; BÃO, S.N. Effect of different cryoprotectants on the structural preservation of follicles in frozen zebu bovine (*Bos indicus*) ovarian tissue. **Theriogenology**, v.61, p.1101-1114, 2004.

MASSIP, A. Cryopreservation of embryos of farm animals. **Reproduction of Domestic Animals**, v.36, p.49-55, 2001.

MULLEN, S.F.; LI, M.; CHEN, Z.; CRISTER, J.K. Human oocyte vitrification: the permeability of metaphase II oocytes to water and ethylene glycol and the appliance toward vitrification. **Fertility and Sterility**, v.89, p.1812-1825, 2008.

RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; COSTA, S.H.F.; MATOS, M.H.T.; SANTOS, R.R.; LUCCI, C.M.; BÁO, S.N.; FIGUEIREDO, J.R. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using glycerol and ethylene glycol. **Theriogenology**, v.61, p.1009-1024, 2004.

SANTOS, R.R.; RODRIGUEZ, A.P.R.; AMORIM, C.A.; COSTA, S.H.F.; MATOS, M.H.T.; SILVA, J.R.V.; CELESTINO, J.J.H.; MARTINS, F.S.; SARAIVA, M.V.A.; MELO, M.A.P.; FIGUEIREDO, J.R. Teste de toxicidade e criopreservação de folículos pré-antrais ovinos isolados utilizando Glicerol, Etilenoglicol, Dimetilsulfóxido e Propanodiol. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, v.43, n.2, p. 250-255, 2006.

STACHECKI, J.J.; COHEN, J. Symposium: cryopreservation and assisted human conception. **Reproduction Biomedicine Online**, v.9, p.152-163, 2004.

SZÉLL, A.; SHELTON, J.N. Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. **Journal of reproduction and fertility**, v.78, p.699-703, 1986

ZHOU, X.L.; NAIB, A.AL.; SUN, D.W.; LONERGAN, P. Bovine oocyte vitrification using the Cryotop method: Effect of cumulus cells and vitrification protocol on survival and subsequent development. **Cryobiology**, v.61, p.66-72, 2010.