



PROLIFERAÇÃO CELULAR DE FOLÍCULOS OVARIANOS MULTIOÓCITOS EM FÊMEAS *BOS INDICUS*

Machado, F. Z.¹; **Bergamo, L. Z.^{1*}**; Silva, C. B.¹; Gonzalez, S. M.¹; Otonel, R. A. A.²; Silva-Santos, K. C.¹; Seneda, M. M.¹

¹Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal - REPROA, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil. *e-mail: larissabergamo1@hotmail.com.

²Departamento de Clínicas Veterinárias, Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil.

Área de conhecimento: Produção e Sustentabilidade.

Palavras-chave: bovino, desenvolvimento folicular, PCNA.

Introdução

A produção de animais geneticamente superiores remete a maior eficiência reprodutiva. Fêmeas da raça Nelore (*Bos indicus*) possuem uma maior quantidade de folículos ovarianos quando comparadas a fêmeas *Bos taurus* (BATISTA *et al.*, 2014). Em fêmeas bovinas já foi relatado a presença de folículos multioócitos, porém até o momento, não é bem compreendido o papel desses folículos nos ovários desta espécie (SILVA-SANTOS *et al.*, 2011). Hipóteses já foram aventadas em relação a origem dos folículos multioócitos. Uma delas é a de que estes folículos derivem de uma falha das células germinativas durante o início das fases da foliculogênese. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a proliferação celular de folículos ovarianos multioócitos em fêmeas *Bos indicus*, através da técnica de imunohistoquímica.

Material e métodos

Foram coletados ovários (n=30) de vacas Nelores cíclicas, entre 72-96 meses e escore de condição corporal 4-4,5 (escala de 1 a 5), acondicionados separadamente por animal e transportados em solução salina NaCl 0,9% a 30°C. Para a detecção da proliferação celular nos folículos ovarianos multioócitos utilizou-se apenas um ovário do par de cada fêmea, de acordo com a ausência de corpo lúteo e folículo pré-ovulatório. Os ovários foram seccionados em fragmentos de 1x1x0,3cm, fixados em solução de formalina tamponada a 10%, processados e submetidas à avaliação imunohistoquímica.

A proliferação celular foi avaliada a partir da detecção específica do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). Os anticorpos utilizados foram: anticorpo primário; mouse anti-PCNA (anticorpo monoclonal clone PC10, Novex®, diluição 1:100), e anticorpo secundário: goat anti-mouse, Invitrogen, diluição 1:100). Os



protocolos, controles positivos e negativos foram utilizados de acordo com as instruções do fabricante.

A avaliação da imunomarcação para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) foi qualitativa, ou seja, pela presença ou ausência de imunomarcação.

Resultados e Discussão

O presente estudo constatou a presença de 33 folículos multioócitos contendo de dois até sete oócitos inclusos em um único folículo. Os folículos multioócitos encontrados pertenciam às categorias foliculares, tais como primordiais (n=28), primários (n=4) e secundários (n=1). Todos os folículos apresentaram marcação para proliferação celular, nos quais os multioócitos primordiais e primários obtiveram apenas o citoplasma e núcleo marcados, corroborando com a maior atividade proliferativa nestes estágios foliculares, e demonstrando que estes folículos possuem atividade proliferativa. Portanto, os dados do presente estudo confirmam a capacidade da marcação imunohistoquímica por PCNA em demonstrar atividade proliferativa nos diferentes estágios de desenvolvimento dos folículos ovarianos (REYNAUD *et al.*, 2009).

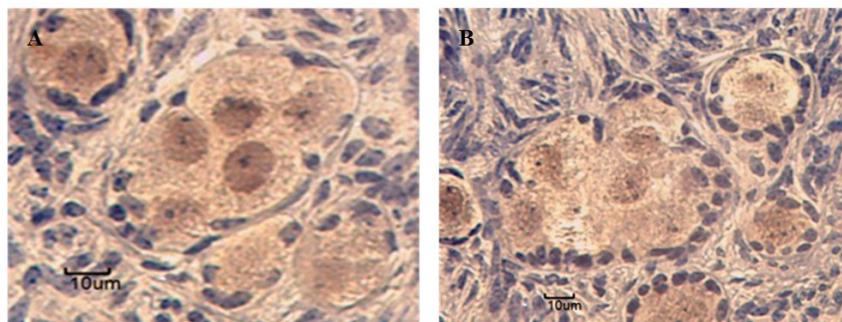


Figura 1 -Folículos ovarianos multioócitos marcados na cor castanha para o antígeno PCNA. Imunomarcação de núcleo e citoplasma de folículos primordiais (A) e primários (B).

Sabe-se que folículos multioócitos são encontrados em maior quantidade em fetos, novilhas e vacas *Bos taurus* quando comparados a *Bos indicus*, porém, a frequência de folículos multioócitos é extremamente variada entre as espécies e dentro da mesma, podendo variar também entre os indivíduos (SILVA-SANTOS *et al.*, 2011). Até o momento, não é bem compreendido o papel dos folículos multioócitos nos ovários de fêmeas bovinas adultas, embora já tenham sido relatados nesta espécie (SILVA-SANTOS *et al.*, 2011).

Oktay *et al.* (1995) demonstraram em seus estudos que os marcadores para proliferação são sensíveis para identificar a atividade celular e o início do crescimento folicular. A imunomarcação pelo PCNA já foi demonstrada em diferentes fases foliculares em diferentes espécies, como em ratos, bovinos e suínos, no entanto,



esta marcação não foi verificada em folículos primordiais das respectivas espécies (OKTAY *et al.*, 1995).

Conclusões

Em fêmeas Nelore, os folículos multioócitos de diferentes estágios de desenvolvimento demonstraram marcação imunohistoquímica por PCNA, indicando a presença de atividade proliferativa nestes estágios iniciais dos folículos ovarianos. Dessa forma, a avaliação morfológica e proliferativa de folículos ovarianos através de marcadores de proliferação celular pode contribuir para a compreensão dos mecanismos envolvidos na foliculogênese de folículos multioócitos em fêmeas bovinas.

Suporte financeiro

CAPES, CNPq.

Referências

- BATISTA, E. O. S.; MACEDO, G. G.; SALA, R. V.; ORTOLAN, M. D. D. V.; SA FILHO, M. F.; DEL VALLE, T. A.; JESUS, E. F.; LOPES, R. N. V. R.; RENNO, F. R.; BARUSELLI, P. S. Plasma Antimullerian Hormone as a Predictor of Ovarian Antral Follicular Population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) Heifers. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlim, v. 49, n. 3, p. 448-452, 2014.
- OKTAY, K.; SCHENKEN, R. S.; NELSON, J. F. Proliferating Cell Nuclear Antigen Marks the Initiation of Follicular Growth in the Rat. **Biology of Reproduction**, v. 53, n. 2, p. 295-301, 1995.
- REYNAUD, K.; VIARIS, D. E.; LESEGNO, C.; CHEBROUT, M.; THOUMIRE, S.; CHASTANT-MAILLARD, S. Follicle population, cumulus mucification, and oocyte chromatin configuration during the periovulatory period in the female dog. **Theriogenology**, New York, v. 72, n. 8, p. 1120-1131, 2009.
- SILVA-SANTOS, K. C.; SENEDA, M. M. Multioocyte follicles in adult mammalian ovaries. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 8, n. 3/4, p. 58-67, 2011.