



INTERVALO DE SUBSTITUIÇÃO DO MEIO DE CULTIVO *IN VITRO* AFETA A INTEGRIDADE E O DESENVOLVIMENTO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS EQUINOS – RESULTADOS PRELIMINARES

Silva, C.B.¹; Lindquist, A.G.^{1*}; González, S.M.¹; Búfalo, I.¹; Sarapião, F.D.¹; Costa, C.B.¹; Seneda, M.M.¹

¹Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (ReproA) – Universidade Estadual de Londrina – Londrina – Paraná – Brasil. *andressalindquist@gmail.com

Área de conhecimento: Produção e Sustentabilidade.

Palavras-chave: ovário equino, troca de meio, morfologia folicular.

Introdução

A eficiência do sistema de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais está relacionada com a elaboração e substituição do meio com condições adequadas para o desenvolvimento folicular. Em equinos, esta biotecnologia reprodutiva não está totalmente estabelecida. Investigações recentes sugerem períodos distintos de cultivo *in vitro* nas diversas espécies. Nestas, a troca do meio de cultivo pode ser feita totalmente ou parcialmente e ainda com intervalo de um, dois, três ou seis dias (TSURIBE *et al.*, 2008). Para a espécie equina, o intervalo de troca do meio de cultivo *in vitro* não foi estabelecido, sendo necessária a execução de pesquisas aplicadas para continuidade do avanço neste segmento. Portanto, o objetivo da presente investigação foi avaliar o efeito da troca do meio a cada 24 ou 48 horas no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais da espécie equina.

Material e Métodos

Ovários (n=5) de cinco éguas em anestro sazonal foram coletados de abatedouro localizado a aproximadamente 40 km do laboratório. O transporte dos ovários ao laboratório foi feito em recipiente térmico (4° C) com PBS suplementado de 200 mg/mL de penicilina e 200 mg/mL de estreptomicina (GOMES *et al.*, 2015).

No laboratório, seccionou-se cada ovário no plano sagital. A porção do parênquima (interno) dos cinco ovários selecionados foi cortada em fragmentos de cerca de 3 x 3 x 1 mm. Cada fragmento foi destinado de acordo como o ilustrado na figura 1. Um fragmento de cada ovário foi aleatoriamente selecionado e imediatamente fixado em Bouin para análise histológica (grupo controle; Dia 0). Os fragmentos remanescentes foram cultivados individualmente em alíquotas de 1 mL do meio de cultivo em placas de 24 poços com atmosfera de 5% de CO₂ em ar e umidade saturada a 38,5° C. O meio de cultivo base utilizado foi o meio essencial mínimo (MEM) suplementado de acordo com Gomes *et al.* (2015). Os fragmentos foram cultivados por dois ou seis dias e o meio substituído conforme o tratamento, 24 ou 48 horas. No final do período de cultivo, os fragmentos ovarianos foram



fixados em Bouin e destinados à histologia clássica. Os cortes foram feitos na espessura de 5 μm . Realizou-se a coloração com ácido periódico de Schiff (PAS) e Hematoxilina.

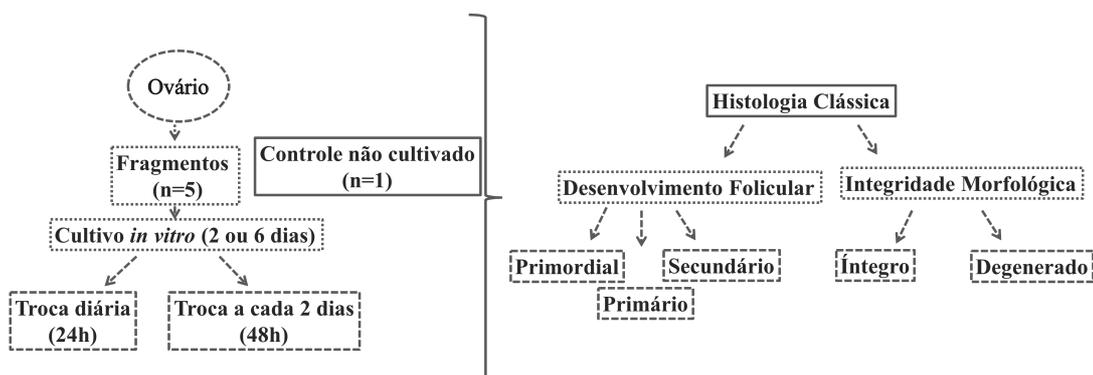


Figura 1 - Protocolo experimental do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais equinos *in situ* com diferentes intervalos de troca do meio.

Todas as secções foram examinadas através de microscopia óptica e classificadas quanto à integridade e o desenvolvimento folicular. A análise dos dados foi realizada através do teste de Fisher com nível de significância de $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

Foram avaliados 200 folículos entre o controle e os tratamentos, 43,5% (87/200) eram folículos primordiais, 56,5% (113/200) em desenvolvimento, e 59,25% (119/200) eram morfologicamente íntegros.

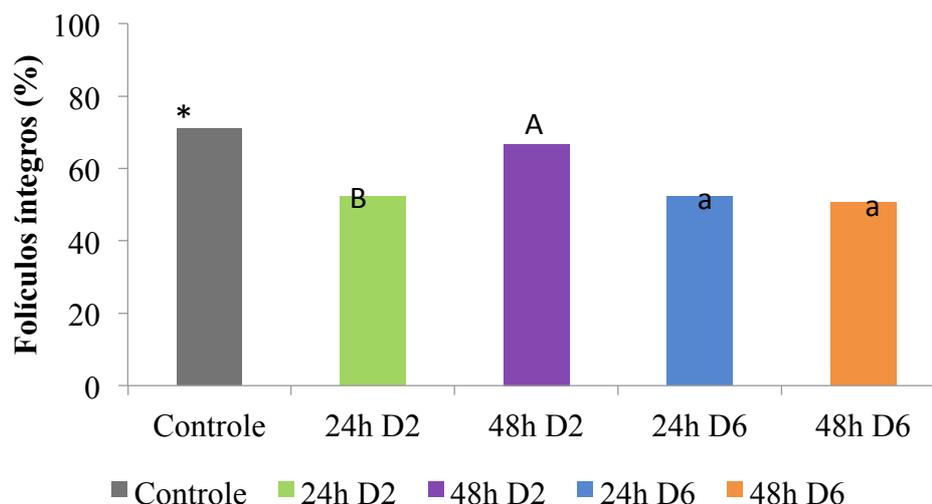


Figura 2 - Percentagem de folículos pré-antrais equinos conforme a integridade morfológica, o período e intervalo de substituição de meio durante o cultivo *in vitro*.

^{A,B} Diferença significativa entre o intervalo de substituição de 24h ou 48h com dois dias de cultivo ($p \leq 0,05$).

^{a,b} Diferença significativa entre o intervalo de substituição de 24h ou 48h com seis dias de cultivo ($p \leq 0,05$).



No cultivo *in vitro* realizado por dois dias houve diferença significativa em relação à integridade folicular na substituição do meio manejado a cada dois dias em relação a troca diária ($p < 0,05$; Figura 2). Em relação à integridade morfológica dos folículos cultivados por um período de seis dias não houve diferença estatística ao comparar os tipos de substituição do meio ($p > 0,05$).

Haag *et al.* (2013) realizaram cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos equinos durante sete dias. Neste estudo, utilizaram a troca total do meio a cada dois dias, obtendo 65,5% de folículos totais íntegros. Nossa investigação encontrou resultados semelhantes (59,25%) ao estudo de Haag *et al.* (2013), no entanto pudemos verificar que a troca diária (24h) após dois dias de cultivo também foi benéfica e repercute na manutenção da integridade folicular.

Conclusões

Constatamos que a troca total do meio de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos para espécie equina, pode ser substituído a cada dois dias e após a primeira troca pode ser realizado a troca diariamente ou a cada dois dias.

Suporte Financeiro

CNPq e Fundação Araucária

Referências

GOMES, R. G.; LISBOA, L. A.; SILVA, C. B.; MAX, M. C.; MARINO, P. C.; OLIVEIRA, R. L.; GONZALEZ, S. M.; SANTOS, M. M.; BARREIROS, T. R. R.; MARINHO, L. S. R.; SENEDA, M. M. Improvement of development of equine preantral follicles after six days of *in vitro* culture with ascorbic acid supplementation, **Theriogenology**, v.84, p.750-755, 2015.

HAAG, K. T.; MAGALHÃES-PADILHA, D. M.; FONSECA, G. R.; WISCHRAL, A.; GASTAL, M. O.; KING, S. S.; JONES, K. L.; FIGUEIREDO, J.R.; GASTAL, E.L. *In vitro* culture of equine preantral follicles obtained via the Biopsy Pick-Up method. **Theriogenology**, v. 79, p.911-917, 2013.

TSURIBE, P. M.; GOBBO, C. A. M.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. Viability of primordial follicles derived from cryopreserved ovine ovarian cortex tissue. **Fertility Sterility**, v.91, p.1976-1983, 2008.