



EFICIÊNCIA DO MEIO MEM EM PROPORCIONAR INTEGRIDADE E DESENVOLVIMENTO NO CULTIVO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS BOVINOS

Silva, C. B.^{1*}; Santos, M. M.¹; Gonzalez, S. M.¹; Búfalo, I.¹; Lisboa, L. A.¹; Seneda, M. M.¹

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

Palavras-chave: desenvolvimento folicular, *in situ*, MEM.

Introdução

Tendo em vista a ampla diversidade no metabolismo celular, várias são as exigências nutricionais das células foliculares durante o desenvolvimento *in vitro*. Em geral, os meios de cultivo, como o meio essencial mínimo (MEM), são compostos por diferentes substratos, tais como, sais inorgânicos, aminoácidos, vitaminas entre outras substâncias (Rossetto *et al.*, 2013). Ainda é possível adicionar antioxidantes, proteínas, nutrientes, glicoproteínas, antibióticos, agentes tampão, hormônios e fatores de crescimento. No entanto, a interação de todos esses componentes adicionados ao meio base é algo complexo e pouco compreendido. Alguns trabalhos têm mostrado que o meio MEM isoladamente pode ser eficaz em promover a manutenção da integridade e o desenvolvimento folicular *in vitro* (Gomes *et al.*, 2015). Deste modo, o objetivo deste estudo foi determinar a eficácia do meio essencial mínimo (MEM) no cultivo de folículos pré-antrais inclusos no córtex do ovário bovino por dois ou seis dias.

Material e métodos

Ovários (n=20) foram coletados de abatedouro local a partir de 10 fêmeas Nelore adultas cíclicas e escore corporal entre 3,0 a 3,5 (escala de 0 a 5). Depois da coleta, os ovários foram lavados em etanol 70% e solução tampão. O córtex do ovário foi dividido em fragmentos de aproximadamente 3x3x1 mm e cultivados de acordo com o protocolo descrito na figura 1.

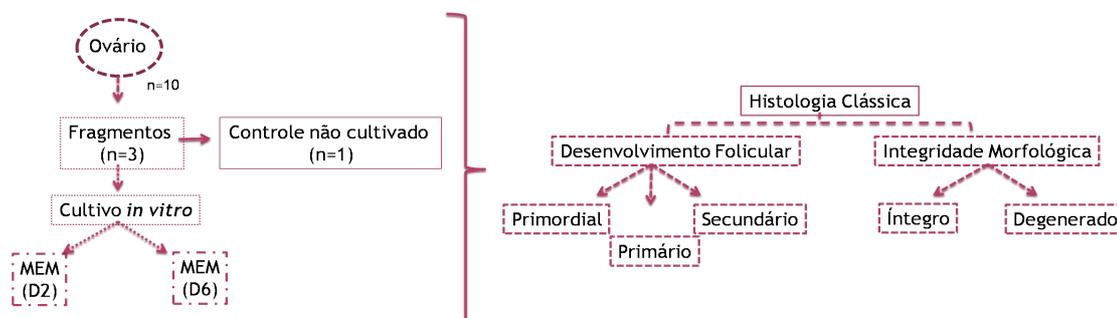


Figura 1 - Protocolo experimental para o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais bovinos *in situ* por 2 ou 6 dias.

Os fragmentos foram cultivados individualmente em MEM⁺ (suplementado com insulina, transferina e selênio (ITS), piruvato, glutamina, hipoxantina e albumina sérica bovina (BSA; Gomes *et al.*, 2015). Após o cultivo por dois ou seis dias, todos os fragmentos foram fixados em Bouin por 24 horas e processados para histologia clássica com a coloração de Ácido Periódico de Schiff (PAS) e Hematoxilina.

Os dados foram submetidos aos testes de normalidade e homogeneidade de variância, posteriormente submetidos à ANOVA e teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Resultados e Discussão

No presente estudo, foram analisados 1500 folículos pré-antrais bovinos cultivados *in situ* em MEM⁺. A quantidade de folículos pré-antrais viáveis e em desenvolvimento estão representados na tabela 1. O controle não cultivado (D0) consistiu no parâmetro para avaliação das condições *in vivo* durante o experimento. Neste caso, observou-se que os tratamentos foram eficientes em manter a viabilidade e proporcionar o desenvolvimento folicular em MEM⁺ por dois dias e MEM⁺ por seis dias de cultivo *in vitro* ($p > 0,05$).

Tabela 1 – Número e percentagem de desenvolvimento de folículos pré-antrais viáveis não cultivados e cultivados em meio essencial mínimo suplementado (MEM⁺) por 2 ou 6 dias.

Tratamento	Folículos primordiais n	Folículos em Desenvolvimento n	Total Viáveis n (%)	Desenvolvimento % (n)
Controle D0	295	49	344 (68.8) [*]	14.2 (49/344) [*]
MEM ⁺ D2	36	127	163 (32.6) ^a	77.9 (127/163) ^a
MEM ⁺ D6	21	83	104 (20.8) ^a	79.8 (83/104) ^a
Folículos Totais	352	259	611	171.9

^{ab} Diferença significativa entre linhas ($p \leq 0,05$).

^{*} Não houve comparação com D0.



Um fator essencial para o sucesso durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais consiste na composição do meio. Diferentes são os meios comerciais utilizados para o cultivo. Estes meios devem servir um ou mais das seguintes funções: 1) a sobrevivência imediata (uma solução de sal equilibrada, com pH e pressão osmótica específica); 2) sobrevivência prolongada (uma solução de sal equilibrada suplementado com várias formulação de compostos orgânicos e/ou de soro); 3) O crescimento indeterminado; 4) e outras funções especializadas. Entretanto, não existe um padrão para composição destes meios, sendo os mais utilizados, MEM, TCM-199 e McCoy. O parâmetro utilizado para avaliação da eficiência do meio se faz principalmente através da porcentagem de folículos viáveis e em desenvolvimento presente nos fragmentos cultivados (Jimenez *et al.*, 2016). Neste estudo, o MEM⁺ foi eficiente em proporcionar o desenvolvimento dos folículos com porcentagens de 77.9 e 79.8% para 2 ou 6 dias, respectivamente.

O MEM é utilizado tanto para o cultivo de tecido ovariano bovino quanto de folículos pré-antrais isolados (Rossetto *et al.*, 2013). Para tanto, este estudo utilizou o MEM suplementado com substratos capazes de auxiliar na manutenção da morfologia e do desenvolvimento dos folículos. Em um estudo comparando a composição do meio MEM, observou-se um aumento significativo na porcentagem de folículos morfológicamente normais de 29,4% (meio controle, apenas MEM) para 78,0% (meio tratado, quando acrescido de substratos). Estes resultados podem ser atribuídos a um maior número de nucleotídeos e aminoácidos presente na composição do MEM (Jimenez *et al.*, 2016). Por outro lado, meios de cultivo sem a suplementação de hipoxantina e outros substratos energéticos (glutamina e piruvato) mostraram uma redução na sobrevivência dos folículos pré-antrais de bovinos (Araújo *et al.*, 2014). Isto demonstra que a falta de protocolos padronizados e a diferença na composição dos meios podem afetar o cultivo *in vitro* de folículos e também explicar os diferentes resultados encontrados por diversos grupos de pesquisa.

Conclusões

Conclui-se que o MEM é um meio eficaz para preservar a morfologia de folículos pré-antrais bovinos, garantindo a sua viabilidade e crescimento depois de um cultivo *in situ* de até seis dias.

Suporte financeiro

CAPES e CNPq.

Referências

ARAÚJO, V.R.; GASTAL, M.O.; FIGUEIREDO, J.R.; GASTAL, E.L. *In vitro* culture of bovine preantnal follicles: a review. **Reproductive Biology Endocrinology**, v. 12, p. 78, 2014.



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.

JIMENEZ, C. R.; ARAÚJO, V. R.; PENITENTE-FILHO, J. M.; DE AZEVEDO, J. L.; SILVEIRA, R. G.; TORRES, C. A. The base medium affects ultrastructure and survival of bovine preantral follicles cultured in vitro. **Theriogenology**, v. 85, n. 6, p.1019-1029, 2016.

ROSSETTO, R.; SANTOS, R. R.; SILVA, G. M.; DUARTE, A. B. G.; SILVA, C. M. G.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Comparative study on the in vitro development of caprine and bovine preantral follicles. **Small Ruminant Research**, v. 113, p. 167-170, 2013.