

AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIIS BOVINOS ISOLADOS A FRESCO E APÓS CONSERVAÇÃO DO TECIDO OVARIANO: RESULTADOS PRELIMINARES.

Basso, A. C.¹; Ferreira, M. A. L.²; Andrade, E. R.²; Rodrigues, A. P.²; Figueiredo, J. R.²; Esper, C. R.³.

¹Departamento de Reprodução Animal - FMVZ/USP, ²Laboratório de Manipulação de Oócitos de Folículos Pré-Antrais - FAVET/UECE, ³Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal - FCAV/UNESP.
E-mail: abassovet@hotmail.com

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de biotecnologias da Reprodução Animal são condições indispensáveis para o incremento da eficiência reprodutiva dos rebanhos mundiais. Dentre elas, destacam-se a Fertilização *in vitro*, a Clonagem e, mais recentemente, a Micromanipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais (MOIFOPA). Na espécie bovina, alguns estudos mostram que, por diferentes métodos de conservação, os folículos pré-antrais podem permanecer viáveis desde a colheita até o isolamento (YANG *et al.*, 1990) em diferentes meios de cultivo e por diferentes períodos de tempo (6, 12 ou 24 horas). Sendo assim, diante de um aumento no tempo entre a colheita e o processamento, faz-se necessário estabelecer métodos eficientes de conservação que não alterem a viabilidade das células foliculares ou do oócito. Desta forma, a finalidade deste estudo foi avaliar a viabilidade dos folículos pré-antrais bovinos após dois tratamentos de conservação com variação de tempo e temperatura desde a colheita até o isolamento.

OBJETIVO

O presente estudo teve como objetivo investigar a viabilidade de folículos ovarianos pré-antrais de bovinos isolados a partir de ovários frescos coletados em abatedouros e após resfriamento a 4° C, por um período de 24 horas.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados seis ovários obtidos em abatedouro. No momento da colheita, os ovários eram submetidos a duas lavagens sucessivas em álcool e em PBS a 39°C e divididos em duas metades. Uma metade de cada ovário era armazenada em PBS a 39°C, onde permanecia durante o período de transporte de aproximadamente 1 hora, antes de se proceder o isolamento dos folículos pré-antrais (Tratamento 1). A outra metade era armazenada em PBS a 4°C e assim conservada por um período de 24 horas antes de se proceder o isolamento (Tratamento 2). O isolamento dos folículos pré-antrais era realizado com "Tissue Chopper" (The Mickle Laboratory Engineering CO, Gomshal, Surrey, England) calibrado para realizar cortes sucessivos a intervalos de 100 µm. Os fragmentos ovarianos obtidos eram dissociados mecanicamente por meio de repetidos movimentos de sucção e ejeção utilizando-se pipetas de Pasteur de 1000 µm (40 movimentos) e de 600 µm (40 movimentos) de diâmetro. Em seguida, a suspensão era sucessivamente filtrada em malhas de Nylon de 500 µm e 100 µm de diâmetro. A viabilidade dos oócitos, bem como das células granulosas dos folículos pré-antrais foi verificada em Microscópio Invertido com auxílio de coloração vital Trypan Blue (0,4%).

BIBLIOGRAFIA

- AZAMBUJA, R. M.; KRAEMER, D. C.; WESTHUSIN, M. E. Effect of low temperatures on *in vitro* matured bovine oocytes. *Theriogenology*, 49:1155-1164, 1998.
SOLANO, R.; ARMAS, R.; PUPO, C. A.; CASTRO, F. O. Short term preservation of intrafollicular oocytes at 4°C. *Theriogenology*, 41:299, 1994.
TWAGIRAMUNGU, H.; MORIN, N.; GUILBAULT, L. A.; SIRARD, M. A.; BOUSQUET, D. Media and time oocyte transport influence their developmental competence for *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology*, 49:299, 1998.
YANG, N. S.; LU, K. H.; GORDON, I. *In vitro* fertilization (IVF) and culture (IVC) of bovine oocyte from stored ovaries. *Theriogenology*, 33:352, 1990.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação com Trypan Blue mostrou que 92,66% dos folículos isolados estavam viáveis após o Tratamento 1 e 93% deles permaneciam viáveis quando realizado o Tratamento 2. Estes resultados indicam que a conservação dos fragmentos de ovário bovino a 4°C por 24 horas não reduzia significativamente ($p < 0,05$) a porcentagem de folículos pré-antrais morfológicamente normais quando comparado com a conservação a 39°C pelo tempo de transporte. Resultados semelhantes foram obtidos por SOLANO *et al.*, 1994, com a conservação do tecido ovariano bovino a 4°C, em PBS, por até 24 horas, onde os oócitos provenientes de FOPA não perderam a capacidade de maturação, fecundação e clivagem inicial. No entanto, em outros estudos, a mesma temperatura reduziu o desenvolvimento de zigotos até blastocistos (YANG *et al.*, 1990; AZAMBUJA *et al.*, 1998). Em contraposição, ovários bovinos também foram conservados a 37°C por 4 h (YANG *et al.*, 1990) ou a 38,5°C por 6 h (TWAGIRAMUNGU *et al.*, 1998) sem afetar o desenvolvimento até blastocistos, porém, a conservação *in situ* dos FOPA a 20°C por 12 h ou a 39°C por 4 h reduziu a viabilidade ovocitária.

TABELA 1: Viabilidade dos Folículos Pré-antrais isolados e corados com Trypan Blue.

	T1 - 39°C / 1 hora		T2 - 4°C / 24 horas	
	VIAVEIS	NAO VIAVEIS	VIAVEIS	NAO VIAVEIS
Repetição 1	93	7	91	9
Repetição 2	92	8	92	8
Repetição 3	95	5	97	3
Repetição 4	93	7	94	6
Repetição 5	93	7	95	5
Repetição 6	90	10	89	11
Total Folículos	556	44	558	42
%	92,66 %	7,34 %	93,00 %	7,00 %

GRÁFICO 1: Número de Folículos Pré-antrais viáveis após Tratamentos 1 e 2.

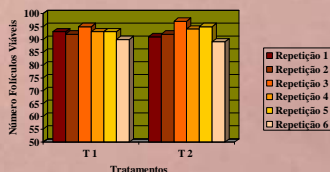
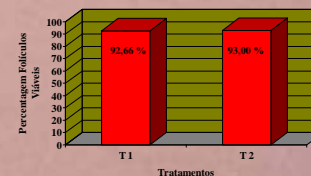


GRÁFICO 2: Percentagem de Folículos Ovarianos Pré-antrais viáveis após os Tratamentos 1 e 2.



CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que folículos ovarianos pré-antrais de bovinos podem ser isolados logo após a colheita ou então conservados por até 24 horas sem prejuízo para a viabilidade das células, neste sentido, deve-se primeiramente estabelecer a temperatura, o tempo e o meio de conservação a serem adotados.

SUPORTE FINANCEIRO: FAPESP