



# ESTUDO DO DESENVOLVIMENTO IN VITRO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS DE FETOS BOVINOS: PADRONIZAÇÃO DA TÉCNICA



Basso, A. C. <sup>1</sup>; Avelino, K.B. <sup>2</sup>; Vantini, R. <sup>2</sup>; Garcia, J.M. <sup>2</sup>; Esper, C.R. <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Reprodução Animal - FMVZ/USP, <sup>2</sup> Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal - FCAV/UNESP.

E-mail: acbusp@hotmail.com

## INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de um sistema de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais tem importantes aplicações biotecnológicas devido ao seu potencial para a produção de um grande número de oócitos para produção e transferência de embriões. O primeiro passo para a conquista deste estudo seria determinar o efeito de diferentes componentes do sistema de cultivo, como fontes protéicas, substrato para o desenvolvimento de uma matrix extracelular, bem como diferentes concentrações de gonadotrofinas. Os principais indicativos de sucesso na padronização desta técnica são a taxa de crescimento folicular, a formação de antro e a taxa de recuperação de complexos *cumulus*-oócito.

## MATERIAL E MÉTODOS

Ovários de fetos bovinos eram colhidos em abatedouro, asépticamente individualizados e armazenados em PBS com 3% de BSA e amicacina, a 35°C. Os folículos pré-antrais eram isolados mecanicamente em um cortador de tecidos ajustado para cortes de 750 µm e, após o processamento, eram transferidos para meio de lavagem composto por TCM199 acrescido de 25 mM de bicarbonato de sódio, 20 mM de tampão Hepes, 0,23 mM de piruvato, 15 µg/ml de amicacina e 5% de BSA. Após seleção e lavagem dos folículos isolados, eram transferidos para placas de 24 fossas contendo 300 µl do meio de cultivo, sob óleo mineral. O meio de cultivo testado neste experimento era composto por DMEM acrescido de 15 µg/ml de amicacina, 25 mM de Bicarbonato de Sódio, 5% de BSA, 10 µg/ml de insulina, 10 µg/ml de transferrina, 5 µg/ml de selênio, 2 mM de L-glutamina, 100 µg/ml de L-ácido ascórbico e 1 U/ml de FSH recombinante humano. Os folículos eram incubados em atmosfera umidificada, com 5% de CO<sub>2</sub> em ar e temperatura de 38,5°C. A reposição de meio fresco era realizada a cada 48 horas durante um período de cultivo de 6 dias.

## RESULTADOS

Ao final deste período observamos apenas a formação de monocamada de células somáticas sem aparente crescimento dos folículos pré-antrais.



Fig 1: Folículo ovariano primário de feto bovino mostrando a membrana basal envolvendo uma camada de células granulosas.



Fig 2: Folículos ovarianos primários de feto bovino.



Fig 3: Folículo ovariano secundário de feto bovino mostrando mais de uma camada de células granulosas cuboidais.

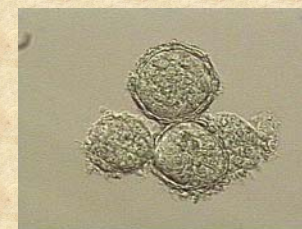


Fig 4: Grupo de folículos ovarianos pré-antrais de fetos bovinos em diferentes estádios de desenvolvimento.

## CONCLUSÃO

Concluímos por este estudo que um período de cultivo mais longo, o uso de substrato adequado e uma melhor padronização do meio de cultivo são necessários para observar o desenvolvimento folicular *in vitro*, bem como a produção de oócitos meioticamente competentes.

Apoio Financeiro: FAPESP