

RESUMO 31

EFEITO DA ANGIOTENSINA II NA SOBREVIVÊNCIA DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS CULTIVADOS *IN VITRO*Bruno, J.B.¹; Alves, A.M.C.V.¹; Lima, L.F.¹; Celestino, J.J.H.¹; Lima-Verde, I.B.²; Matos, M.H.T.³; Saraiva, M.V.A.¹; Campello, C.C.¹; Silva, J.R.V.⁴; Figueiredo, J.R.¹

¹Faculdade de Medicina Veterinária, LAMOFOPA, PPGCV, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE; ²Instituto de Pesquisa e Tecnologia, Universidade Tiradentes, Aracaju, SE; ³Núcleo de Biotecnologia Aplicada ao Desenvolvimento Folicular Ovariano, Universidade do Vale do São Francisco, Petrolina, PE; ⁴Núcleo de Biotecnologia de Sobral (NUBIS), Universidade Federal do Ceará, Sobral, CE - Brasil
E-mail: jamilbezebrbruno@yahoo.com.br

O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da Angiotensina II (ANG II) sobre a sobrevivência, ativação e crescimento de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro*. O córtex ovariano de cabras adultas sem raça definida (n=4) foi dividido em pequenos fragmentos e um fragmento foi imediatamente fixado (controle fresco) e os demais foram cultivados *in vitro* por 1 ou 7 dias a 39°C e 5% CO₂ em α-Meio Essencial Mínimo suplementado (α-MEM*) sozinhos ou com diferentes concentrações de ANG II (1, 5, 10, 50 ou 100 ng/mL). Fragmentos ovarianos não-cultivados (controle fresco) e cultivados foram processados para análise histológica. Folículos foram classificados como primordial ou em desenvolvimento (transição, primário e secundário), bem como normal ou degenerado. Os dados foram submetidos à análise de variância seguida pelos testes de Dunnett e t de Student, ambos a um nível de significância de 5%. Nossos achados indicaram que quando comparados com o αMEM*sozinho, a adição de 10 ou 50 ng/mL de ANG II resultou em percentagens significativamente superiores de folículos pré-antrais normais após 7 dias de cultivo. Com a progressão do período de cultivo de 1 para 7 dias, todos os tratamentos mantiveram a percentagem de folículos normais, exceto o αMEM* sozinhos ou adicionado de 100 ng/mL de ANG II. O cultivo de tecido ovariano por 1 ou 7 dias, aumentou a percentagem de ativação folicular em todos os tratamentos quando comparados com o controle fresco. Em relação ao diâmetro folicular e oocitário após 7 dias de cultivo, todos os tratamentos com ANG II apresentaram valores similares ao αMEM*sozinho. Em conclusão, este estudo demonstrou que após 7 dias de cultivo *in vitro*, 10 ou 50 ng/mL de ANG II mantém a morfologia de folículos pré-antrais caprinos.

RESUMO 32

EXPRESSÃO DO RNAm DOS FATORES DE CRESCIMENTO FIBROBLÁSTICO (FGFs) E SEUS RECEPTORES (FGFRs) DURANTE A MATUREZAÇÃO *IN VITRO* DE COCs BOVINOSCaixeta, E.S.¹; Machado, M.F.¹; Ripamonte, P.¹; Lima, P.F.¹; Castilho, A.C.S.¹; Bueno da Silva, R.¹; Barros, C.M.²; Price, C.A.³; Buratini Jr., J.¹

¹Departamento de Fisiologia, Instituto de Biociências, UNESP, SP; ²Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências, UNESP, SP - Brasil; ³Centre de Recherché en Reproduction Animale, University of Montreal - Canada
E-mail: caixeta@gmail.com

O oócito participa ativamente dos mecanismos reguladores da maturação do complexo cumulus-oócito (COC) via secreção de fatores parácrinos. Recentemente, detectamos a expressão de fatores de crescimento fibroblástico (FGFs) no oócito e seus receptores nas células do cumulus (CC; FGF-10 e seus receptores FGFR1b e 2b; FGF-8, 16 e 17 e seus receptores FGFR2c e 3c), sugerindo o envolvimento do sistema FGF na regulação da diferenciação das CC. O objetivo deste trabalho foi determinar o padrão de expressão dos RNAm destes FGFs e seus receptores nos oócitos e nas CC, respectivamente, durante a maturação *in vitro* de COCs bovinos. COCs imaturos (graus 1 e 2) foram obtidos de folículos de 2-8 mm provenientes de ovários de abatedouro (predominantemente *Bos indicus*). Para o grupo imaturo, oócitos e CC provenientes de 20 COCs foram separados e em seguida armazenados a -80°C. Grupos de 20 COCs foram cultivados por 4, 8, 12, 16 e 20 horas, na presença (10ng/ml) ou ausência de FSH. Após o cultivo os oócitos e as CC foram separados e estocados a -80°C. O RNA total foi extraído de pools de 20 oócitos e das CC correspondentes utilizando o kit RNeasy® (Qiagen). Somente os oócitos provenientes do cultivo com FSH foram utilizados para análise de expressão do RNAm dos FGFs, enquanto a quantificação do RNAm dos FGFRs nas células do cumulus foi realizada nos grupos com e sem FSH. A expressão de RNAm foi investigada por RT-PCR em tempo real e normalizada pela Ciclofilina-A (CYC-A). A quantificação relativa do RNAm foi determinada pela equação de Pfaffl. Os efeitos do tempo e do tratamento com FSH durante o cultivo foram testados por ANOVA e os grupos foram comparados pelo teste de Tukey-Kramer HSD. O nível de significância foi considerado P<0,05. Os RNAm do FGF8, 10 e 16 foram detectados em oócitos sem variações durante a maturação *in vitro*. A expressão do FGF-17 foi detectada consistentemente somente em oócitos imaturos. Baseado na média de Ct (números de ciclo do PCR), o FGF16 foi o mais expresso (31 ciclos), seguido pelo FGF10 (35,5 ciclos), enquanto a expressão do FGF8 e 17 mostrou-se mais fraca (37 ciclos). Com relação aos receptores, a expressão do FGFR1b e 2c foi estimulada às 4 horas de maturação na presença ou ausência de FSH. O RNAm do FGFR3c também foi estimulado às 4 horas de maturação, porém, apenas na presença de FSH. Além disso, o FSH estimulou a expressão gênica do FGFR2c e 3c até 8 e 20 horas de maturação, respectivamente. A expressão do FGFR2b foi detectada em CC e não foi afetada pelo tempo ou tratamento com FSH. Em conclusão, os RNAm do FGF-16 e -10 são consistentemente expressos pelo oócito bovino durante a maturação *in vitro* dos COCs. A expressão dos receptores ativados por estes FGFs mostrou-se regulada ao longo do tempo e pelo tratamento com FSH durante a maturação, sugerindo o envolvimento dos FGFs oocitários no controle da diferenciação das CC. Suporte Financeiro: FAPESP.

RESUMO 33

INCIDÊNCIA DE ATRESIA MORFOLÓGICA E DETECÇÃO DE APOPTOSE VIA CASPASE-3 DURANTE A MOBILIZAÇÃO E CRESCIMENTO FOLICULAR OVARIANO EM CAMUNDONGOS

Campos Junior, P.H.A.^{1,2}; Assunção, C.M.^{1,2}; Carvalho, B.C.²; Batista, R.I.T.P.²; Viana, J.H.M.²

¹Bolsista de IC CNPq; ²Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG - Brasil
E-mail: phaci@lg.com.br

Atresia folicular é um evento chave durante a seleção de folículos ovulatórios, e ocorre em todos os estágios de desenvolvimento folicular. Diferenças na dinâmica folicular entre espécies podem estar associadas a variações na incidência de atresia em estágios foliculares específicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a incidência de apoptose (via ativação de caspase-3) e atresia morfológica em diferentes estágios do desenvolvimento folicular e sua relação com a população folicular e padrão de mobilização em camundongos. Ovários de camundongos Swiss (n = 6, G1), F1 Swiss x C57BL/6 (n = 6, G2), C57BL/6 (n = 6, G3), e F1 C57BL/6 x Swiss (n = 6, G4), todos com 60 dias, foram fixados e processados para histologia (quantificação folicular) e de F1 Swiss x C57BL/6 (n = 8) foram utilizados para imunolocalização de caspase-3 ativa, através de imunohistoquímica. Os resultados foram analisados pelos testes de Tukey e Kruskal-Wallis. A população de folículos primordiais dos animais do G3 foi menor que dos demais grupos (7565±1845 vs. 17180±3159, 14785±3319 e 13325±2685 para G3, G1, G2 e G4, respectivamente; P<0,05). No entanto, G3 apresentou maior taxa de mobilização folicular (29,2% vs. 18,2%, 17,3% e 13% para G3, G1, G2 e G4, respectivamente; P < 0,05), o que acarretou em um número de folículos antrais semelhante entre os grupos (P > 0,05). Coerentemente, a menor reserva folicular em G3 foi também associada a uma menor taxa de atresia neste grupo (11,4% vs. 17,2%, 16,7% e 13% para G3, G1, G2 e G4, respectivamente; P < 0,05). De acordo com a imunolocalização de caspase-3 durante o desenvolvimento folicular, foi observado maior (P < 0,05) número de folículos imunopositivos nos estágios finais da foliologênese pré-antral (24,8%), sugerindo que em camundongos a apoptose via caspase-3 ocorre precocemente, quando comparada a grandes animais. Desta forma, conclui-se que a relação entre reserva ovariana e número de folículos em fase antral é regulada pelo balanço entre mobilização e atresia folicular, e que a atresia folicular ocorre de forma predominante no final do desenvolvimento pré-antral em camundongos. Apoio: CNPq/Fapemig/Embrapa