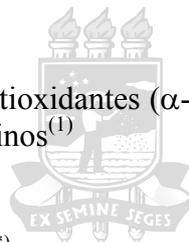


**Título:** Utilização de substâncias antioxidantes ( $\alpha$ -tocoferol e ternatina) no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos<sup>(1)</sup>**Autor:** Isabel Bezerra Lima-Verde**Orientador:** Paulo Fernandes de Lima<sup>(\*)</sup>**Resumo**

O objetivo foi avaliar os efeitos do  $\alpha$ -tocoferol e da ternatina sobre morfologia, ativação e crescimento de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro* e realizar uma revisão de literatura sobre temas relacionados com a origem do estresse oxidativo e das espécies reativas de oxigênio, bem como os mecanismos protetores contra os radicais livres, as implicações destes no ovário e embrião mamífero e o papel do óxido nítrico neste processo. No primeiro trabalho, o córtex ovariano foi dividido em fragmentos, sendo um destes imediatamente fixado (controle). O restante dos fragmentos foi cultivado *in vitro* por 1 ou 5 dias a 39°C e 5% CO<sub>2</sub>, em Meio Essencial Mínimo (MEM) suplementado e adicionado ou não de 5, 10 ou 15  $\mu$ M de  $\alpha$ -tocoferol ou ternatina. Os fragmentos do controle, bem como os cultivados, foram fixados em 10% de formol ou em 2% de paraformaldeído e 2,5% de glutaraldeído em 0,1M de tampão cacodilato de sódio para análise histológica e ultra-estrutural, respectivamente. Os folículos foram classificados em primordiais ou em desenvolvimento, bem como em normais ou degenerados. Quando comparados com o controle, o cultivo *in vitro* levou a uma redução nas percentagens de folículos pré-antrais morfologicamente normais em todos os tratamentos com  $\alpha$ -tocoferol ou ternatina ( $P < 0,05$ ), após 5 dias de cultivo. No entanto, quando comparado com o controle, o cultivo de córtex ovariano, por 5 dias, aumentou as taxas de ativação folicular em todos os tratamentos ( $P < 0,05$ ). Em comparação com o MEM sozinho, a adição de  $\alpha$ -tocoferol ou ternatina no meio de cultivo não influenciou a ativação folicular ( $P > 0,05$ ), exceto no dia 1 de cultivo, quando as concentrações de 5 e 15  $\mu$ M foram utilizadas, respectivamente, e mostraram um aumento significativo nos percentuais de ativação folicular, em comparação aos outros tratamentos. A análise ultra-estrutural mostrou que folículos cultivados por 5 dias em meio contendo antioxidantes estavam degenerados. Esta degeneração não ocorreu nos folículos tratados apenas com MEM ou no controle, os quais mantiveram sua integridade ultra-estrutural. Em conclusão, este trabalho demonstrou que  $\alpha$ -tocoferol e ternatina podem promover ativação folicular, no entanto, a adição destes antioxidantes nas concentrações testadas reduziu a viabilidade folicular após o cultivo *in vitro*. No segundo trabalho, verificou-se que as espécies reativas de oxigênio (EROs) ou de nitrogênio (ERN) ou radicais livres são produtos do metabolismo orgânico normal e seu acúmulo pode gerar o estresse oxidativo. Este, por sua vez, causa injúrias celulares podendo levá-las à morte, estando este processo envolvido com a degeneração e/ou apoptose celular durante o desenvolvimento embrionário e em diferentes órgãos, como o ovário mamífero. No ovário de camundongas são produzidas EROs durante a regressão luteal, e estas estão envolvidas no processo de ativação folicular e retomada espontânea da meiose em oócitos. Embora sejam produzidos durante processos fisiológicos, o acúmulo de radicais livres no ovário mamífero pode desencadear patologias. No embrião, os radicais livres são produzidos normalmente devido ao metabolismo normal. Porém em ambientes *in vitro* com altas concentrações de oxigênio, o desenvolvimento do embrião pode ser prejudicado. O óxido nítrico é considerado um radical livre e participa de processos patológicos e fisiológicos como inflamação, ovulação, implantação embrionária e contração uterina. Para proteger os sistemas biológicos dos danos celulares causados pelos radicais livres, o organismo utiliza enzimas como catalase, superóxido-dismutase e glutatona peroxidase, e mecanismos que incluem substâncias antioxidantes tais como vitamina C, vitamina E,  $\beta$ -caroteno dentre outras.

**Palavras-chave:** caprino, ovário, oogenese

<sup>(1)</sup>Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco em 22.05.2006.

<sup>(\*)</sup>Autor para correspondência (paulolima4045@hotmail.com)

**Title:** Use of antioxidants ( $\alpha$ -tocopherol and ternatin) in *in vitro* culture of goat preantral follicles<sup>(1)</sup>**Author:** Isabel Bezerra Lima-Verde**Advisor:** Paulo Fernandes de Lima<sup>(\*)</sup>**Abstract**

The objective was to evaluate the effects of  $\alpha$ -tocopherol and ternatin on morphology and activation of goat preantral follicles cultured *in vitro* and realize a review including the origin of oxidative stress and reactive oxygen specie, as well as the mechanisms that protect the organism against free radicals, implications of them in mammalian ovary and embryo and the role of nitric oxide in this process. In the first work, the ovarian cortex was divided into small pieces and one fragment was immediately fixed (control). The remaining fragments were *in vitro* cultured for 1 or 5 days at 39°C and 5% CO<sub>2</sub>, in Minimum Essential Medium (MEM) supplemented and added or not by 5, 10 or 15  $\mu$ M of  $\alpha$ -tocopherol or ternatin. Control and cultured ovarian fragments were fixed in 10% formaline or in 2% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in 0.1M sodium cacodylate buffer for histological and ultrastructural analysis, respectively. Follicles were classified as primordial or developing, as well as normal or degenerated. When compared with control, *in vitro* culture led to a decrease in the percentages of morphologically normal preantral follicles in all treatments with  $\alpha$ -tocopherol or ternatin ( $P < 0.05$ ) after 5-days culture. Furthermore, when compared with control, culture of ovarian cortex for 5 days increased the percentages of follicular activation in all treatments ( $P < 0.05$ ). In comparison with MEM alone, addition of  $\alpha$ -tocopherol or ternatin in the culture medium did not affect follicular activation ( $P > 0.05$ ), except at day 1 of culture, when concentrations of 5 and 15  $\mu$ M were used, respectively, and showed a significant increase of follicular activation, in comparison with others treatments. Ultrastructural analysis showed that follicles cultured for 5 days in medium containing antioxidants were degenerated. This degeneration did not occur in follicles treated with MEM alone or control, which maintained their ultrastructural integrity. In conclusion, this study demonstrated that  $\alpha$ -tocopherol and ternatin can promote follicular activation, however the addition of antioxidants in the tested concentrations reduced the follicular viability after *in vitro* culture. The second work verified that reactive oxygen (ROS) or nitrogen (RNS) specie or free radicals are products of normal organic metabolism and their accumulation can generate the oxidative stress. Then, this stress causes cellular damage, leading to death. This process is involved with cellular degeneration and/or apoptosis during embryos development and in different organs, such as the mammalian ovary. In murine ovary, ROS are produced during luteal regression and they are involved in the process of follicular activation and spontaneous meiosis resumption in oocytes. Although these are physiological processes, accumulation of free radicals in the mammalian ovary may unchain pathologies. In the embryo, free radicals are normally produced due to normal metabolism. However, in *in vitro* environment with high oxygen concentrations, embryo development can be damaged. Nitric oxide is considered a free radical and takes part in pathological and physiological processes, such as inflammation, ovulation, embryo implantation and uterine contraction. To protect the biological systems from cellular damage caused by free radicals, the organism uses enzymatic mechanism, which involves, for instance, catalysis, superoxide-dismutase and glutathione peroxidase and others that include antioxidants substances, such as C vitamin, E vitamin,  $\beta$ -carotene etc.

**Key-words:** caprine, ovary, oogenesis

<sup>(1)</sup>Master's Dissertation presented at Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária of the Universidade Federal Rural de Pernambuco on 05.22.2006

<sup>(\*)</sup>Corresponding Author (paulolima4045@hotmail.com)