



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LARISSA ZAMPARONE BERGAMO

**EFEITO DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL
NO DESENVOLVIMENTO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIIS DE
FÊMEAS
BOS TAURUS INDICUS CULTIVADOS *IN VITRO***

Londrina
2017

LARISSA ZAMPARONE BERGAMO

**EFEITO DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL
NO DESENVOLVIMENTO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIIS DE
FÊMEAS
*BOS TAURUS INDICUS CULTIVADOS IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Área de Concentração: Produção Animal).

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda.

Londrina
2017

LARISSA ZAMPARONE BERGAMO

**EFEITO DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL
NO DESENVOLVIMENTO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIOS DE
FÊMEAS
*BOS TAURUS INDICUS CULTIVADOS IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina, como requisito à obtenção do título de Mestre em Ciência Animal (Área de Concentração: Produção Animal).

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Kátia Cristina Silva-Santos
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Luiz Francisco Machado Pfeifer
Universidade Federal de Rondônia - UNIR

Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 22 de fevereiro de 2017.

O presente trabalho foi realizado junto ao Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (REPROA), Departamento de Clínicas Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (Área de Concentração: Produção Animal), sob orientação do Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda.

Os recursos financeiros para o desenvolvimento do projeto foram obtidos junto a:

- 1. CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior / MEC.**
- 2. CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.**

DEDICO

Aos meus pais, Wilson e Silvana, e ao meu irmão, Vitor, com todo meu amor e gratidão, por sempre me apoiarem e incentivarem todos os meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente à Deus, pela oportunidade de reparação e evolução, por toda a sabedoria concedida, pelo privilégio da Fé, minha força maior, que me leva a continuar prosseguindo e por não me deixar desistir dos meus sonhos e objetivos.

Agradeço ao apoio, dedicação e carinho da minha família que sempre acreditaram na minha capacidade e principalmente por não medirem esforços em me amparar sempre que necessitei.

Ao meu pai, Wilson, por sempre ser o meu herói, fonte de exemplo e admiração e à minha mãe, Silvana, aquela pela qual daria minha vida sem pensar duas vezes. Por sempre colocarem nossa família como prioridade em suas vidas, por abdicarem uma vida toda e darem o seu melhor à nossa família, e por sempre me ensinar ser uma pessoa melhor com todo carinho e amor.

Ao meu irmão, Vitor, que veio nessa encarnação para me ensinar a ter mais paciência com as pessoas e ser mais calma (estou me esforçando para isso, juro!).

Agradeço ao meu orientador, Professor Doutor Marcelo Marcondes Seneda, pela imensa confiança e consideração durante todo período do mestrado, e principalmente por depositar em mim suas expectativas, e acreditar que eu seria capaz de cumpri-las.

Agradeço as minhas melhores amigas, Larissa Rizzardi e Isabela Camilo, pela amizade verdadeira e incentivo durante todos os anos da graduação e agora na pós-graduação. Obrigado por sempre estarem ao meu lado segurando a minha mão e me apoiando nas minhas decisões.

Agradeço a minha grande amiga e companheira de trabalho Camila Bizarro por todas as risadas, ensinamentos, broncas e ombro amigo, sem hesitar, quando eu mais precisei, e principalmente por acreditar que eu conseguiria realizar todas as etapas desse experimento.

Agradeço à Professora Doutora Kátia e ao Professor Doutor Luiz Pfeifer por terem aceito participar da minha banca de defesa e também por dividirem comigo suas ideias e experiências. É uma honra tê-los em minha banca! Obrigada pela oportunidade de conviver com profissionais de tão alto gabarito e ética.

Agradeço imensamente a toda equipe do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (ReproA) por todos os experimentos, congressos, simpósios e

momentos de confraternização em que tive o prazer de compartilhar. Meu muito obrigada para: Camila Bortoliero, Paula, Camila Rosa, Suellen, Fernanda, Andressa, Isabela, Fábio Morotti, Denis, Anne, Gustavo, Emanuel, Fábio Moraes e Nathália.

Agradeço ao grupo do Cultivo (ReproA) pela dedicação e união na execução de todos os experimentos. Foi um privilégio fazer parte deste grupo e conviver com todos vocês.

Agradeço à Capes pela bolsa científica concedida durante a execução deste trabalho, bem como a Universidade Estadual de Londrina e o Programa de Pós-graduação em Ciência Animal.

A todos os amigos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma não medindo esforços para me ajudar, pessoas essas que estiveram presentes em momentos distintos, e me fizeram avançar com firmeza e dedicação.

“Nunca deixe uma mente pequena te convencer
que seus sonhos são grandes demais!”

Autor Desconhecido

BERGAMO, Larissa Zamparone. **Efeito do Fator de Crescimento Epidermal no desenvolvimento de folículos pré-antrais de fêmeas *Bos taurus indicus* cultivados *in vitro***. 2017. 77f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

RESUMO

O Fator de Crescimento Epidermal (EGF) é considerado um potente fator mitogênico para as células foliculares. Produzido pelo oócito e pelas células da granulosa, o EGF possui um papel importante na modulação da foliculogênese ovariana. O objetivo do presente trabalho foi testar a adição de diferentes concentrações de EGF ao meio de cultivo *in vitro*, por 5 ou 10 dias, sobre o desenvolvimento de folículos pré-antrais inclusos em fragmentos ovarianos bovinos. Ovários (n=10) de fêmeas *Bos taurus indicus* (n=5) foram coletados em abatedouro local. Fragmentos (n=9) de tecido ovariano com aproximadamente 3x3x1 mm foram obtidos de cada animal. Um fragmento foi imediatamente fixado (fixador de Bouin) e processado para análise histológica (grupo controle; Dia 0), o restante foi colocado em MEM® (Gibco BRL, Rockville, MD, USA; osmolaridade 300 mOsm/L, pH 7,2) suplementado com penicilina (200 UI/mL) e estreptomicina (200 mg/mL) a 20° C, permanecendo por 1 hora (período de transporte até o laboratório). Os outros fragmentos foram cultivados *in vitro* durante 5 (D5) ou 10 dias (D10) em MEM⁺ ou MEM⁺ acrescido de diferentes concentrações de EGF (50, 100 ou 200 ng/mL), caracterizando os seguintes grupos: controle (D0); MEM⁺ (D5); MEM + 50 ng/mL de EGF (D5); MEM + 100 ng/mL de EGF (D5); MEM + 200 ng/mL de EGF (D5); MEM⁺ (D10); MEM + 50 ng/mL de EGF (D10); MEM + 100 ng/mL de EGF (D10); MEM + 200 ng/mL de EGF (D10). Os folículos pré-antrais foram avaliados por microscopia óptica e classificados de acordo com a fase de desenvolvimento (primordial ou em desenvolvimento) e a morfologia (íntegro ou degenerado). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Neste experimento, foram avaliados 2203 folículos contidos em 720 cortes histológicos, totalizando 240 lâminas e 45 fragmentos ovarianos. O tratamento controle não cultivado (D0) continha predominantemente folículos pré-antrais nos estágios primordial (82,8%), alguns primários e, raramente, folículos secundários (17,2%). Houve um aumento no número de folículos em desenvolvimento quando adicionado 100 ng/mL de EGF ao meio de cultivo, por 10 dias (48,4%), quando comparado com o tratamento controle (17,2%). Desta maneira, concluímos que a adição de 100 ng/mL de EGF, por 10 dias, ao meio de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais bovinos foi eficiente em promover o desenvolvimento e manter a integridade folicular.

Palavras-chave: *Bos taurus indicus*. Cultivo *in vitro*. EGF. Folículos ovarianos pré-antrais.

BERGAMO, Larissa Zamparone. **Effect of Epidermal Growth Factor on the development of preantral follicles of *Bos taurus indicus* females cultured in vitro.** 2017. 77p. Dissertation (Master in Animal Science) - State University of Londrina, Londrina, Parana, Brazil.

RESUMO

Epidermal Growth Factor (EGF) is considered a potent mitogenic factor for follicular cells. Produced by the oocyte and granulosa cells, EGF plays an important role in the modulation of ovarian folliculogenesis. The objective of the present work was to test the addition of different concentrations of EGF to the *in vitro* culture medium for 5 or 10 days on the development of preantral follicles included in bovine ovarian fragments. Ovaries (n=10) of *Bos taurus indicus* females (n=5) were collected at a local slaughterhouse. Ovarian tissue fragments (n=9) with approximately 3x3x1 mm were obtained from each animal. One fragment was immediately fixed (Bouin's fixative) and processed for histological analysis (control group: Day 0), the remainder was placed in MEM® (Gibco BRL, Rockville, MD, USA; osmolarity 300 mOsm/L, pH 7,2) supplemented with penicillin (200 IU/mL) and streptomycin (200 mg/mL) at 20°C, remaining for 1 hour (period of transport to the laboratory). The other fragments were *in vitro* cultured for 5 (D5) or 10 days (D10) in MEM⁺ or MEM⁺ plus different concentrations of EGF (50, 100 or 200 ng/mL), as the following groups: control (D0); MEM⁺ (D5); MEM + 50 ng/mL EGF (D5); MEM + 100 ng/mL EGF (D5); MEM + 200 ng/mL EGF (D5); MEM⁺ (D10); MEM + 50 ng/mL EGF (D10); MEM + 100 ng/mL EGF (D10); MEM + 200 ng/mL EGF (D10). The preantral follicles were evaluated by light microscopy and classified according to the stage of developmental (primordial or developing follicles) and morphology (intact or degenerate). The averages were compared by the Tukey's test ($P \leq 0.05$). In this experiment, 2,203 follicles in 720 histological sections were evaluated, totalizing 240 slides and 45 ovarian fragments. The non-cultivated control treatment (D0) predominantly presented preantral follicles at the primordial stage (82.8%), some primary follicles and rarely secondary follicles (17.2%). There was an increase in the number of developing follicles when 100 ng/mL EGF was added to the culture medium for 10 days (48.4%), compared to the control treatment (17.2%). In this way, we conclude that the addition of 100 ng/mL of EGF for 10 days to the *in vitro* culture medium of bovine preantral follicles was efficient in promoting follicles development and maintaining follicular integrity.

Keywords: *Bos taurus indicus*. *In vitro* culture. EGF. Ovarian preantral follicles.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura1** - Esquema representativo do desenvolvimento de folículos ovarianos pré-antrais e antrais da espécie bovina28
- Figura 2** - Esquema demonstrando os avanços e desafios que ainda precisam ser vencidos, para obtenção de oócitos competentes, ao realizar o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais33

ARTIGO CIENTÍFICO

- Figura 1** - Esquema representativo da distribuição dos grupos para cultivo *in vitro*, com adição do Fator de Crescimento Epidermal (EGF) na espécie bovina72
- Figura 2** - Fotomicrografia de cortes histológicos de ovário *Bos taurus indicus* cultivado *in vitro* por 5 ou 10 dias. Coloração de PAS e Hematoxilina (100 e 400X). **A** – Folículo Primordial; **B** – Folículo Primário (com uma camada completa de células da granulosa envolvendo o oócito); **C** – Folículo Primário (com uma camada completa e início de uma segunda camada de células da granulosa envolvendo o oócito); **D** – Folículo Secundário (com duas camadas completas de células da granulosa envolvendo o oócito; seta)73

LISTA DE TABELAS

ARTIGO CIENTÍFICO

- Tabela 1 -** Efeito da suplementação com Fator de Crescimento Epidermal (50, 100 ou 200 ng/mL) sobre a porcentagem média de folículos pré-antrais totais (íntegros e degenerados; primordiais e em desenvolvimento) em fragmentos ovarianos *Bos taurus indicus*, cultivados por 5 ou 10 dias74
- Tabela 2 -** Efeito da suplementação com Fator de Crescimento Epidermal (50, 100 ou 200 ng/mL) sobre a porcentagem média de folículos pré-antrais íntegros (primordiais e em desenvolvimento - primários e secundários) em fragmentos ovarianos *Bos taurus indicus*, cultivados por 5 ou 10 dias.....75

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	5
	REFERÊNCIAS	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	OVÁRIO	21
2.2	OOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE	22
2.3	FOLÍCULOS OVARIANOS	23
2.3.1	Folículos <i>Pré-Antrais</i>	24
2.3.1.1	Folículos primordiais	25
2.3.1.2	Folículos primários	25
2.3.1.3	Folículos secundários	26
2.3.2	<i>Folículos Antrais</i>	26
2.3.2.1	Folículos terciários	27
2.3.2.2	Folículos pré-ovulatórios	27
2.4	POPULAÇÃO FOLICULAR	28
2.5	ATRESIA FOLICULAR	29
2.6	MANIPULAÇÃO DE OÓCITOS INCLUSOS EM FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ- ANTRAIS (MOIFOPA)	31
2.6.1	<i>Cultivo In Vitro de Folículos Pré-Antrais</i>	33
2.6.2	<i>Importância da Composição do Meio de Cultivo Sobre o Desenvolvimento Folicular in vitro</i>	36
2.7	FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL (EGF)	37
	REFERÊNCIAS	40
3	HIPÓTESE	55
4	OBJETIVOS	56
4.1	OBJETIVO GERAL	56
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	56

5	ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO.....	57
	RESUMO	57
5.1	INTRODUÇÃO	58
5.2	MATERIAL E MÉTODOS	59
5.2.1	<i>Obtenção dos Ovários.....</i>	59
5.2.2	<i>Protocolo Experimental</i>	60
5.2.3	<i>Histologia Clássica</i>	61
5.2.4	<i>Classificação Folicular.....</i>	62
5.2.5	<i>Análise Estatística</i>	63
5.3	RESULTADOS.....	63
5.4	DISCUSSÃO	64
5.5	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS.....	68
6	CONCLUSÕES	76

1. INTRODUÇÃO

1
2
3 A reprodução é uma das áreas da ciência em maior desenvolvimento na
4 atualidade. Algumas biotécnicas associadas à reprodução têm apresentado um
5 crescimento extraordinário nos últimos anos, tanto no contexto molecular quanto
6 nos aspectos aplicados (STROUD, 2011).

7 A manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais (MOIFOPA)
8 encontra-se em franca expansão, notadamente utilizando o modelo animal.
9 Apesar dos consideráveis avanços no contexto mais aplicado da biotecnologia
10 reprodutiva, muitas questões ainda continuam sem respostas, especialmente no
11 conhecimento da produção de gametas e da fertilidade (FIGUEIREDO et al.,
12 2008).

13 Para maximização do potencial reprodutivo e diminuição da atresia
14 folicular *in vivo*, o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais poderia ser utilizado para
15 desvendar as diferentes substâncias envolvidas no desenvolvimento folicular. Do
16 mesmo modo, o estudo da influência do Fator de Crescimento Epidermal (EGF)
17 em folículos ovarianos pré-antrais, cultivados *in vitro*, poderia ser a chave para a
18 melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na regulação do início da
19 foliculogênese e no controle do desenvolvimento dos folículos ovarianos.
20 Existem hipóteses que indicam a atuação do EGF na proliferação das células da
21 granulosa *in vitro*, e ainda, na inibição da apoptose no cultivo *in vitro* de folículos
22 pré-antrais (MAO et al., 2004; ANDRADE et al., 2005).

23 Diante do exposto, torna-se essencial o desenvolvimento de um sistema
24 eficiente de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos, capaz de permitir o
25 desenvolvimento e a maturação completa dos oócitos inclusos em folículos
26 ovarianos pré-antrais.

1 É sabido que a reserva folicular ovariana é formada durante a vida fetal,
2 que permite que os folículos pré-antrais estejam presentes no ovário ao
3 nascimento (ZUCKERMAN, 1951; GOSDEN, 2004). A quantidade de folículos
4 primordiais (reserva folicular ovariana) é um importante indicador da capacidade
5 reprodutiva, podendo influenciar no desenvolvimento de biotécnicas
6 reprodutivas. Assim a utilização da MOIFOPA, especialmente na criação de
7 bovinos, possibilitaria o aumento da eficiência reprodutiva, através da otimização
8 do ovário (FIGUEIREDO et al., 2007; 2008; ANDRADE et al., 2012). Por esta
9 razão, o interesse sobre o tema tem aumentado consideravelmente nos últimos
10 anos (FIGUEIREDO et al., 2008; ANDRADE et al., 2012). Somando-se aos
11 aspectos dinâmicos da aplicação desta biotécnica, o estudo da foliculogênese
12 apresenta-se em momento extremamente importante. Vários sistemas de cultivo
13 foram desenvolvidos nas últimas duas décadas, e os avanços desta biotécnica
14 variam de acordo com o tipo de meio, sistema de cultivo empregado e
15 principalmente a espécie estudada (FORTUNE, 2003).

16 Os sistemas de cultivo rotineiramente adotados são o cultivo de folículos
17 pré-antrais inclusos no tecido ovariano (cultivo *in situ*) ou o método isolado
18 (cultivo isolado; HARTSHORNE, 1997; LUCCI et al., 2002). Adicionalmente,
19 existem os sistemas bidimensional e tridimensional, classificados conforme o
20 contato do folículo com o substrato. No sistema bidimensional, o folículo
21 encontra-se em contato direto com o substrato, enquanto no tridimensional, o
22 folículo encontra-se circundado pelo substrato (FIGUEIREDO et al., 2008;
23 ROSSETTO et al., 2011). Apesar da confirmação de animais nascidos (espécie
24 murina) a partir de folículos cultivados *in vitro* que se diferenciaram em oócitos,
25 ainda há muitas lacunas a serem consideradas para que esta possibilidade se

1 apresente como uma biotécnica consolidada e de eleição (EPPIG;
2 SCHROEDER, 1989).

3 Algumas substâncias como as gonadotrofinas e fatores de crescimento
4 têm um papel importante na regulação da função ovariana, desta forma o EGF
5 é considerado um potente fator mitogênico para as células foliculares
6 (CELESTINO et al., 2012). Produzido pelo oócito e pelas células da granulosa,
7 o EGF possui um papel importante na modulação da foliculogênese ovariana
8 (CELESTINO et a., 2009).

9 Estudos relatam a utilização do EGF em bovinos (raça Holandesa) apenas
10 em cultivo isolado (GUTIERREZ et al., 2000). Pesquisadores também já
11 demonstraram a eficiência do EGF sobre a formação de antro folicular, bem
12 como sobre o aumento do diâmetro oocitário e folicular (GUTIERREZ et al.,
13 2000; MAO et al., 2004), porém este fator de crescimento ainda não foi relatado
14 com fêmeas *Bos taurus indicus*, em cultivo *in situ*, utilizando gel de agarose.
15 Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de diferentes
16 concentrações do Fator de Crescimento Epidermal (EGF) e o tempo de cultivo
17 no desenvolvimento de folículos pré-antrais de fêmeas *Bos taurus indicus*
18 cultivados *in vitro*.

1 **REFERÊNCIAS**

2

3 ANDRADE, E. R.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A.; OLIVEIRA, J. A.;
4 BRACARENSE, A. P. F. R. L.; FIGUEIREDO, J. R.; TONIOLLI R. Interactions of
5 índole acetic acid with EGF and FSH in the culture of ovine preantral follicles.
6 **Teriogenology**, v. 64, n. 5, p. 1104-1113, 2005.

7

8 ANDRADE, E. R.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A.; BRACARENSE, A. P. F. R.
9 L.; FIGUEIREDO, J. R. Interactions of indole acetic acid with EGF and FSH in
10 the culture of ovine preantral follicles. **Theriogenology**, v. 64, n. 5, p. 1104-1113,
11 2012.

12

13 CELESTINO, J. J. H.; BRUNO, J. B.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H.;
14 SARAIVA, M. V.; CHAVES, R. N.; MARTINS, F. S.; LIMA, L. F.; NAME, K. P.;
15 CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Recombinant
16 epidermal growth factor maintains follicular ultrastructure and promotes the
17 transition to primary follicles in caprine ovarian tissue cultured in vitro.
18 **Reproductive Sciences**, v. 16, n. 3, p. 239-246, 2009.

19

20 CELESTINO, J. J. H.; SILVA, C. M. G.; CASTRO, S. V.; FIGUEIREDO, J. R.
21 Fator de crescimento epidermal como mediador de sobrevivência e
22 desenvolvimento folicular. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n.
23 3, p. 148-157, 2012.

- 1 EPPIG, J. J.; SCHROEDER, A. C. Capacity of mouse oocytes from preantral
2 follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth,
3 maturation, and fertilization *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 41, n. 2, p. 268–
4 276, 1989.
- 5
- 6 FIGUEIREDO, J. R.; CELESTINO, J. J. H.; RODRIGUES, A. P. R.; SILVA, J. R.
7 V. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e
8 produção *in vitro* de embriões em larga escala. **Revista Brasileira de**
9 **Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 143-152, 2007.
- 10
- 11 FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; SILVA, J. R. V.
12 Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. In:
13 GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas**
14 **aplicadas a reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Roca; v. 16, p. 303- 327,
15 2008.
- 16
- 17 FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of
18 primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction**
19 **Science**, v. 78, n. 3-4, p. 135-163, 2003.
- 20
- 21 GOSDEN, R. G. Germline stem cells in the postnatal ovary: is the ovary more
22 like a testis? **Human Reproduction Update**, v.10, n. 3, p.193-195, 2004.

- 1 GUTIERREZ, C. G.; RALPH, J. H.; TELFER, E. E.; WILMUT, I.; WEBB, R.
2 Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in
3 vitro. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 5, p. 1322-1328, 2000.
4
- 5 HARTSHORNE, G. M. *In vitro* culture of ovarian follicles. **Reviews of**
6 **Reproduction**, v. 2, n. 2, p. 94–104, 1997.
7
- 8 LUCCI, C. M.; RUMPF, R.; FIGUEIREDO, J. R.; BÁO, S. N. Zebu (*Bos indicus*)
9 ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of an
10 efficient isolation method. **Theriogenology**, v. 57, n. 5, p. 1467–83, 2002.
11
- 12 MAO, J.; SMITH, M. F.; RUCKER, E. B.; WU, G. M.; MCCAULEY, T. C.;
13 CANTLEY, T. C.; PRATHER, R. S.; DIDION, B. A.; DAY, B. N. Effect of epidermal
14 growth factor and insulin like growth factor 1 on porcine preantral follicular growth,
15 antrum formation, and stimulation of granulosa cell proliferation and suppression
16 of apoptosis in vitro. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 7, p. 1967-1975, 2004.
17
- 18 ROSSETTO, R.; LIMA, I. M. T.; SARAIVA, M. V. A.; LIMA-VERDE, E. T. S.;
19 FIGUEIREDO, J. R. Avanços no isolamento e sistemas de cultivo de folículos
20 pré-antrais. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 5, n. 1, p. 15-23, 2011.
21
- 22 STROUD, B. IETS 2011 Statistics and Data Retrieval Committee Report: The
23 year 2010 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals.
24 **Embryo Transfer Newsletter**, v. 29, p. 14-23, 2011.

- 1 ZUCKERMAN, S. The number of oocytes in the mature ovary. **Recent Progress**
- 2 **in Hormone Research**, v. 6, p. 63-109, 1951.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 OVÁRIO

O ovário desempenha duas principais funções para o sistema reprodutivo das fêmeas: função exócrina (ou gametogênica), sendo responsável pela diferenciação e liberação de um oócito maduro para fecundação, e função endócrina (ou esteroideogênica), responsável pela síntese e secreção de hormônios e fatores de crescimento (SARAIVA et al., 2010). O ovário apresenta diferentes formas e tamanhos, podendo variar de acordo com a espécie, raça e o estágio do ciclo estral em que o animal se encontra. Nos ruminantes, especificamente nos bovinos, o ovário possui formato de amêndoa, pesando em média 10 a 20 gramas na idade adulta (HAFEZ; HAFEZ, 2004), medindo aproximadamente 3,0 a 4,5 cm de comprimento e 1,5 a 2,0 cm de largura (NASCIMENTO et al., 2003).

Nos mamíferos, os ovários são constituídos por duas regiões, classificadas em córtex e medula ovariana, circunscrita por epitélio germinativo ou superficial, que “repousa” sob uma membrana basal (SILVA, 2005). No córtex ovariano, pode-se encontrar diferentes tipos celulares, que se desenvolvem em vários subtipos celulares. Podemos citar as células da granulosa, que se desenvolvem em células do cúmulus ou luteais, enquanto as células da teca se diferenciam em camada interna e externa (GORDON, 1994). Na maioria das espécies, a região medular está localizada mais internamente e apresenta um arranjo irregular de tecido nervoso, vascular (sanguíneo e linfático), fibroblástico e conjuntivo, que se comunica com o ovário através do hilo e sua principal função é nutrir e sustentar o ovário (SILVA, 2005). Na porção mais externa do ovário,

1 está localizada a região do córtex, essa região representa a região funcional do
2 ovário e é composta pelos folículos ovarianos e corpos lúteos (corpos albicans e
3 corpos hemorrágicos) em diferentes estágios de desenvolvimento ou atresia,
4 bem como por tecidos conectivos (colágeno – do tipo I e III, fibras reticulares e
5 fibroblastos; HAFEZ; HAFEZ, 2004).

6 No córtex ovariano, são encontrados diferentes tipos celulares, como as
7 células da granulosa (CGs) e células da teca. Durante a vida reprodutiva da
8 fêmea, a função do ovário é influenciada pela interação entre os fatores
9 endócrinos, autócrinos e parácrinos, que, juntos, atuam no processo de
10 desenvolvimento folicular e oocitário, conhecido como foliculogênese e
11 oogênese (HATZIRODOS et al., 2014).

12

13 2.2 OOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE

14

15 As fêmeas das espécies domésticas nascem com um estoque finito de
16 folículos ovarianos, formados ainda no decorrer da vida fetal, durante a
17 oogênese e a foliculogênese (SAUMANDE, 1991). A oogênese, em ruminantes,
18 pode ser definida como o desenvolvimento e a diferenciação das células
19 germinativas primordiais da fêmea, culminado com a formação do oócito
20 (RÜSSE, 1983), e se encerra somente após a fecundação. Já a foliculogênese
21 é um processo que se inicia com a formação do folículo primordial e culmina com
22 o estágio de folículo maduro, também conhecido como folículo de De Graaf ou
23 pré-ovulatório (SAUMANDE, 1981), com término no momento da ovulação do
24 folículo maduro.

25 A principal estrutura do ovário é denominada de folículo; esta é a estrutura
26 primordial do ovário e é composta por um oócito envolto por uma ou mais

1 camadas de células somáticas. Dependendo do estágio de desenvolvimento,
2 apresenta zona pelúcida e cavidade antral preenchida por líquido folicular
3 (FIGUEIREDO et al., 2008; SENEDA et al., 2008; AERTS; BOLS, 2010). Durante
4 a foliculogênese, a morfologia folicular é alterada, visto que o oócito cresce e as
5 células da granulosa circundantes se multiplicam e se diferenciam (BRISTOL-
6 GOULD; WOODRUFF, 2006). Os folículos então, são classificados em pré-
7 antrais ou não cavitários (primordiais, primários e secundários) e folículos antrais
8 ou cavitários (terciários e pré-ovulatórios).

9 Os folículos ovarianos iniciam seu desenvolvimento durante a vida fetal
10 com a transformação de células germinativas primordiais em oócitos. No período
11 da vida fetal, células germinativas primordiais migram para a região que será a
12 futura gônada, sofrem mitose e dão origem a oogônias (GONDOS et al., 1971).
13 Estas oogônias se diferenciam em oócitos, na primeira divisão meiótica. Os
14 folículos primordiais são formados no período perinatal, estagnando seu
15 desenvolvimento na prófase da primeira divisão meiótica, quando os oócitos
16 estão envoltos por uma única camada de células achatadas (FRITZ; SPEROFF,
17 2010; UYAR et al., 2013; CHOWDHURY et al., 2016).

18

19 2.3 FOLÍCULOS OVARIANOS

20

21 O folículo, unidade morfofuncional do ovário dos mamíferos, é uma
22 estrutura formada ainda durante a embriogênese e tem seu desenvolvimento
23 controlado por fatores endócrinos e parácrinos (MCGEE; HSUEH, 2008),
24 proporcionando um ambiente ideal para o crescimento e maturação do oócito
25 imaturo, permitindo que o oócito esteja maduro no momento da ovulação

1 (FIGUEIREDO et al., 2008). O desenvolvimento folicular e o crescimento do
2 oócito depende de uma comunicação bidirecional entre oócitos e células
3 somáticas. Os oócitos desempenham um papel essencial no controle da
4 proliferação e diferenciação de células da granulosa durante o desenvolvimento
5 folicular (ARAÚJO et al., 2014).

6 A população de folículos presente nos ovários é muito heterogênea e
7 esses diferentes tipos de folículos estão divididos em duas grandes classes: os
8 folículos pré-antrais ou não cavitários e os folículos antrais ou cavitários
9 (MATSUDA et al., 2012). Os folículos pré-antrais representam a fase inicial do
10 desenvolvimento folicular e compreendem os folículos primordiais, primários e
11 secundários. Os folículos desenvolvem-se para o estágio terciário e pré-
12 ovulatório e passam a conter uma cavidade (antro) repleta de fluido (VARGHESE
13 et al., 2008; AERTS; BOLS, 2010).

14

15 2.3.1 *Folículos Pré-Antrais*

16

17 Os folículos ovarianos pré-antrais são classificados de acordo com o
18 formato, tamanho e o número de camadas de células que circundam o oócito
19 imaturo em primordiais, primários e secundários (FIGUEIREDO et al., 2008).
20 Esses folículos compreendem 90 a 95% de toda a população folicular, dos quais
21 mais de 99% não chegarão até a ovulação, sofrendo atresia (ERICKSON, 1986;
22 MATSUDA et al., 2012). Isso demonstra o baixo aproveitamento de gametas
23 (CARROL et al., 1990; JOHNSON, 2003).

1 2.3.1.1 Folículos Primordiais

2

3 Os folículos primordiais estão envoltos por uma única camada de células
4 da pré-granulosa de formato achatado, rodeado por uma membrana basal
5 (UYAR et al., 2013; CHOWDHURY et al., 2016). Estes folículos são a primeira
6 geração de células foliculares (ARAÚJO et al., 2014) e o estágio a partir de onde
7 os folículos são recrutados. Cada folículo é composto por um oócito rodeado por
8 uma camada de 4 a 8 células da granulosa achatadas. O diâmetro do folículo
9 primordial bem como do oócito nele contido medem, respectivamente, 30 - 40
10 μm e 20 - 25 μm de diâmetro (BECKERS et al., 1996). Quando a população de
11 folículos primordiais é estabelecida, grupos de folículos, gradualmente e
12 sucessivamente saem do “*pool*” bloqueado (*pool* de reserva) e entram em fase
13 de crescimento.

14

15 2.3.1.2 Folículos Primários

16

17 Durante o início do crescimento folicular, numa fase conhecida como
18 ativação folicular, o folículo primordial sai do *pool* de reserva de folículos
19 quiescentes e entra no estágio de transição. A ativação folicular é caracterizada
20 por modificações da morfologia das células da granulosa, que passam a ter
21 formato cuboide. Desse modo, os folículos primários apresentam um oócito
22 rodeado por uma camada de 11 a 12 células da granulosa em formato cuboide.
23 Uma vez recrutado, o folículo primordial evolui para folículo primário, sendo
24 assim, dá-se início ao crescimento dos oócitos (ARAÚJO et al., 2014).

1 Segundo Beckers et al. (1996), o folículo primário possui diâmetro de 40 -
2 60 μm , contendo um oócito de 30 - 40 μm . A evolução do crescimento dos
3 folículos pré-antrais estaria relacionada com o aumento do diâmetro do oócito,
4 bem como a proliferação das células da granulosa (FIGUEIREDO et al., 1994).
5 Os folículos primordiais e primários não podem ser diferenciados através das
6 medidas de diâmetro, mas apenas pelas alterações morfológicas (HULSHOF et
7 al., 1994).

8

9 2.3.1.3 Folículos Secundários

10

11 Folículos secundários são caracterizados por possuírem duas ou mais
12 camadas de células da granulosa, deposição inicial da zona pelúcida (ZP),
13 formação de cortical e grânulos no citoplasma dos oócitos (ARAÚJO et al., 2014).
14 Os folículos secundários caracterizam-se pela presença de um oócito imaturo
15 central, podendo atingir 60 - 200 μm de diâmetro (BECKERS et al., 1996). Fibras
16 de tecido conectivo se posicionam paralelamente à membrana basal para formar
17 a camada tecal durante essa fase de crescimento do folículo secundário
18 (FIGUEREDO et al., 1997).

19

20 2.3.2 Folículos Antrais

21

22 A categoria de folículos antrais compreende os folículos terciários e os
23 folículos De Graaf ou também conhecidos como maduros, pré-ovulatórios ou
24 dominantes. Com a intensa proliferação das células da granulosa, há o
25 surgimento do antro folicular, uma área preenchida por fluido folicular,

1 característica do folículo antral (FIGUEIREDO et al., 2008). Na espécie bovina,
2 a cavidade antral pode se desenvolver em folículos cujos diâmetros variam de
3 0,14 - 0,28 mm. São necessários dois ciclos estrais para um folículo crescer do
4 início da formação do antro (0,13 mm) ao tamanho pré-ovulatório (LUSSIER et
5 al., 1987).

6

7 2.3.2.1 Folículos Terciários

8

9 Os folículos terciários são constituídos de um oócito circundado pela zona
10 pelúcida, várias camadas de células da granulosa, uma pequena cavidade
11 antral, uma membrana basal e duas camadas de células tecais (teca interna e
12 teca externa; GORDON, 1994).

13

14 2.3.2.2 Folículos Pré-ovulatórios

15

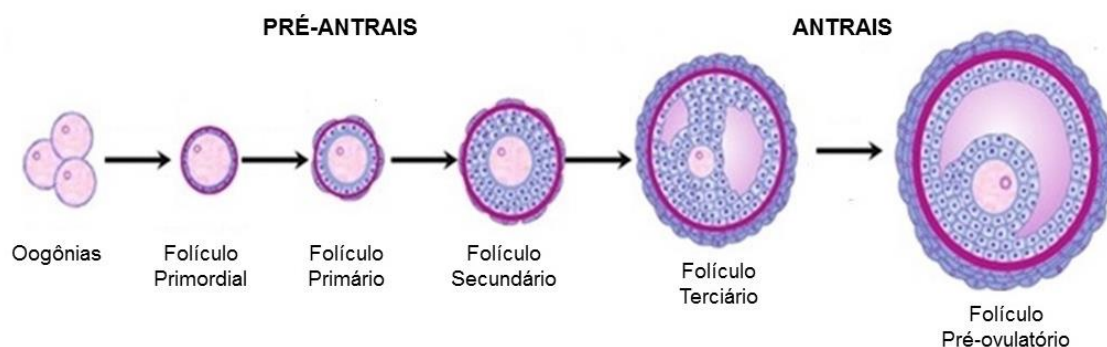
16 Os folículos pré-ovulatórios ou De Graaf representam o estágio terminal
17 do desenvolvimento folicular (Figura 1). Neles, predominam mitocôndrias
18 arredondadas, que caracterizam o completo crescimento do oócito em bovinos.
19 Retículo endoplasmático liso e rugoso são observados em grande quantidade.
20 Podem ser identificados grânulos da cortical e microtúbulos no ooplasma do
21 oócito.

22 O espaço perivitelino é formado neste estágio de desenvolvimento e há
23 um aumento no número de vesículas e de complexos de Golgi. É também no
24 final deste estágio que a função do nucléolo é inativada, como indica a
25 marginalização dos centros fibrilares, sinalizando uma presumível retração dos

1 genes rRNA do nucléolo. Concomitantemente, a atividade transcricional do
 2 oócito é diminuída (HYTTEL et al., 1997).

3

4 **Figura 1** – Esquema representativo do desenvolvimento de folículos ovarianos
 5 pré-antrais e antrais da espécie bovina.



6

7 **Fonte:** Adaptado de Araújo et al., 2014.

8

9 2.4 POPULAÇÃO FOLICULAR

10

11 A população de folículos pré-antrais foi estimada em ovários de fêmeas
 12 bovinas de diferentes idades e raças variando de 143.929 a 285.155 folículos
 13 em fetos, 76.851 a 109.673 folículos em novilhas, e 39.438 a 89.577 folículos em
 14 vacas, *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus*, respectivamente (SILVA-
 15 SANTOS et al., 2011) e a população de folículos primordiais de vacas de até 24
 16 meses de idade foi estimada em 130.000 folículos (ERICKSON, 1966). Foi
 17 descrita a população folicular ovariana de 37.646 folículos em cabras, sendo
 18 26.613 primordiais (LUCCI et al., 1999); 160.000 folículos em ovelhas
 19 (DRIANCOURT, 1991); 2.000.000 de folículos na mulher (ERICKSON, 1986) e,
 20 variação de 6.164 a 59.283 folículos em cadelas adultas, de acordo com
 21 tamanho do animal (LUNARDON et al., 2015). Na espécie equina, estima-se que

1 a população folicular seja ao redor de 36.000 folículos por ovário (EVANS;
2 CONSTANTINESCU; GANJAN, 2007).

3 A população de folículos presente no ovário é influenciada por diversos
4 fatores, tais como genética, raça, idade, níveis hormonais, estado reprodutivo,
5 variações individuais e nutricionais do animal (RÜSSE, 1983; SCARAMUZZI et
6 al., 2011; SILVA-SANTOS et al., 2011).

7

8 2.5 ATRESIA FOLICULAR

9

10 As fêmeas de todas as espécies domésticas possuem um estoque finito
11 de células germinativas, que se estabelece na vida fetal e, em seguida, é
12 utilizado durante a foliculogênese. Apesar de um grande *pool* inicial de folículos,
13 os folículos ovarianos que chegam ao estágio ovulatório são muito poucos, isso
14 é consequência do processo natural de atresia (ROTHCHILD, 2003;
15 HATZIRODOS et al., 2014), que pode ser influenciada por diferentes fatores, tais
16 como, idade, ciclo reprodutivo, lactação, gestação, hipofisectomia, ovarioectomia
17 unilateral, hormônios, nutrição e isquemia. Esse fato tem estimulado o interesse
18 no desenvolvimento de um sistema de cultivo que seja capaz de manter o
19 crescimento folicular e evitar esta perda de folículos pré-antrais (ARAÚJO et al.,
20 2014).

21 O processo de atresia ocorre principalmente por apoptose (morte celular
22 programada) das células da granulosa, em resposta à privação hormonal e
23 acomete mais de 99% dos folículos (MATSUDA et al., 2012). A atresia folicular
24 não é igualmente prevalente em todos os estádios de desenvolvimento folicular
25 (FORTUNE, 1994). A atresia pode ocorrer por via degenerativa e/ou apoptótica

1 (FIGUEIREDO et al., 1999) e ocorre tanto em folículos antrais como pré-antrais,
2 não estando exclusivamente relacionado com a dominância folicular (TILLY,
3 1996; MAGOFFIN et al., 2005). A apoptose no ovário tem um papel fundamental
4 na limitação do número de folículos que chegarão à ovulação e,
5 conseqüentemente, reduz o número de embriões por fêmea (KIESS;
6 GALLAHER, 1998).

7 As características estruturais e os eventos moleculares da apoptose
8 diferenciam esse tipo de morte celular da necrose, na qual um grupo de células
9 morre simultaneamente (TILLY, 1996), enquanto a apoptose sempre ocorre em
10 uma única célula circundada por células normais (KUAN; PASSARO, 1998). A
11 atresia é um processo fisiológico, de duração desconhecida, que parece ser um
12 dos elementos que controla o número de folículos selecionados até chegar à
13 ovulação.

14 O processo de atresia usualmente difere entre folículos pré-antrais
15 (primordiais, primários e secundários) e antrais (terciários e pré-ovulatórios). Em
16 folículos pré-antrais, as primeiras alterações indicativas de atresia ocorrem no
17 oócito, como, por exemplo, retração da cromatina nuclear e fragmentação
18 oocitária, o que desencadeia o processo de eliminação irreversível dos folículos
19 ovarianos nesta fase de desenvolvimento (MORITA; TILLY, 1999). É importante
20 ressaltar que, após a formação da cavidade antral, ocorre uma alteração na
21 sensibilidade do oócito e das células da granulosa. O aparecimento de células
22 da granulosa com núcleos picnóticos, onde se observa condensação da
23 cromatina e retração nuclear, podem ser considerados como os primeiros sinais
24 morfológicos de atresia, que são observados predominantemente em células da
25 granulosa em proximidade da cavidade antral. Posteriormente, fragmentos de

1 núcleos picnóticos ou corpos apoptóticos são observados na cavidade antral
2 (HUGHES; GOROSPE, 1991; TILLY, 1996).

3 Com a progressão da atresia, pode-se observar uma redução no número
4 de camadas das células da granulosa e invasão do folículo por fibroblastos e
5 macrófagos. Após estas drásticas mudanças na camada granulosa, o oócito,
6 frequentemente, sofre pseudo maturação, fragmenta-se e, finalmente, é
7 eliminado durante os estágios finais de atresia (BYSKOV, 1974).

8

9 2.6 MANIPULAÇÃO DE OÓCITOS INCLUSOS EM FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIOS 10 (MOIFOPA)

11

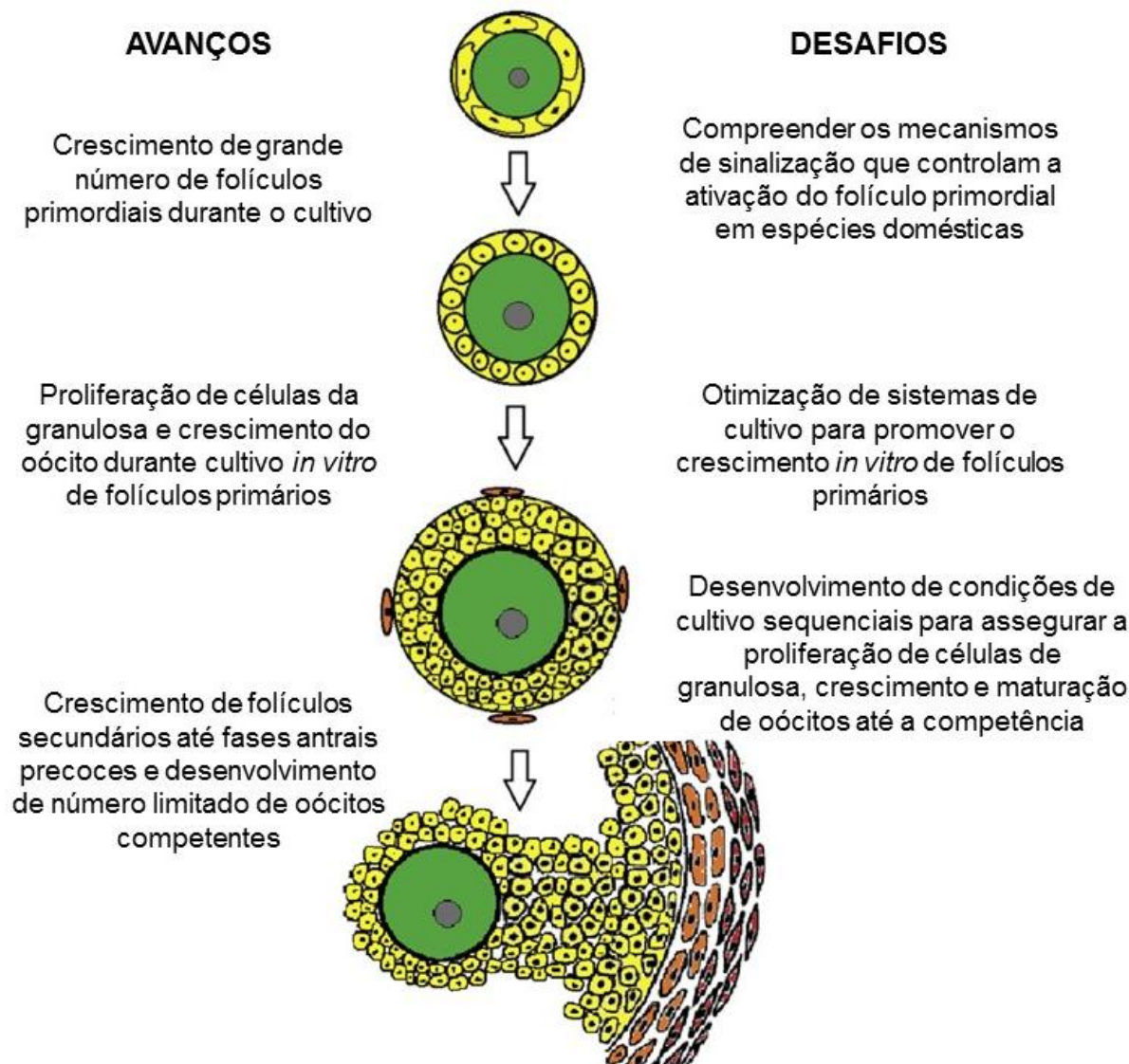
12 A MOIFOPA é uma biotécnica que utiliza folículos ovarianos pré-antrais
13 para o cultivo folicular *in vitro*, o qual objetiva promover o crescimento, maturação
14 e fecundação dos oócitos previamente inclusos em folículos ovarianos pré-
15 antrais (FOPA; FIGUEIREDO et al., 2007). Esta biotécnica tem papel importante
16 tanto na pesquisa básica como na aplicada. Na pesquisa básica, a MOIFOPA
17 poderá contribuir esclarecendo mecanismos de ativação folicular ainda
18 desconhecidos nos estágios iniciais da foliculogênese. Já na reprodução animal
19 aplicada, futuramente, o isolamento de FOPA de um ovário e posterior cultivo *in*
20 *vitro* de seus folículos até o estágio de maturação poderá contribuir com a
21 multiplicação de animais de alto valor zootécnico ou em vias de extinção. Além
22 disso, a MOIFOPA poderá fornecer um grande número de oócitos de um mesmo
23 animal, que poderão ser maturados *in vitro* e utilizados na padronização de
24 técnicas como de fecundação *in vitro* (FIV) e clonagem em diversas espécies.

1 As recentes melhorias nos métodos disponíveis para o estudo da ativação
2 do folículo primordial e o conhecimento dos processos celulares e vias de
3 sinalização abriram novas perspectivas. Contudo, o crescimento de folículos
4 primordiais até a maturação, dando origem ao oócito viável, em espécies
5 domésticas, é um processo longo e exige a compreensão dos efeitos fisiológicos
6 e farmacológicos.

7 Nas últimas duas décadas, a pesquisa sobre o crescimento *in vitro* do
8 folículo pré-antral e a maturação do oócito tem proporcionado fascinantes
9 avanços no conhecimento dos processos que regulam o crescimento do folículo
10 e a competência de desenvolvimento dos oócitos. Estes avanços incluem:
11 informações sobre o papel de vários hormônios e fatores de crescimento na
12 ativação *in vitro* de folículos primordiais; maior compreensão da via intracelular
13 envolvida no início do crescimento folicular primordial; crescimento dos folículos
14 primários e secundários até os estágios antrais; e produção de embriões a partir
15 de oócitos de folículos pré-antrais cultivados *in vitro* (SILVA et al., 2016).

16 Alguns estudos realizados com cabras, em cultivo *in vitro* isolado por 18
17 dias (MAGALHÃES et al., 2011), e com búfalos, em cultivo *in vitro* isolado por
18 100 dias (GUPTA et al., 2008), produziram oócitos viáveis permitindo maturação
19 e fecundação *in vitro*, dando origem a embriões. Porém, para muitas espécies,
20 esses resultados *in vitro* ainda são limitados, provavelmente devido à falta de
21 harmonia entre crescimento e diferenciação do oócito e células somáticas que o
22 circundam durante o complexo processo de desenvolvimento do folículo pré-
23 antral (Figura 2; SILVA et al., 2016).

- 1 **Figura 2** – Esquema demonstrando os avanços e desafios que ainda precisam
 2 ser vencidos para obtenção de oócitos competentes, ao realizar o cultivo *in vitro*
 3 de folículos pré-antrais.



4
 5 **Fonte:** Adaptado de SILVA et al., 2016.

6

7 2.6.1 Cultivo *in vitro* de Folículos Pré-Antrais

8

9 Três condições básicas devem ser fornecidas pelo modelo de cultivo
 10 ideal: manter a viabilidade dos folículos, preservar sua morfologia pré-existente
 11 *in vivo* e propiciar o crescimento e a maturação folicular. No entanto,

1 principalmente em animais domésticos, os sistemas de cultivo existentes ainda
2 atendem parcialmente os pré-requisitos acima citados (FIGUEREDO et al.,
3 2008). O desenvolvimento de um sistema de cultivo *in vitro* eficaz é possível
4 desde que seja mantida a regulação entre os fatores inibitórios e estimulatórios
5 presentes no ovário (NÓBREGA JUNIOR et al., 2014).

6 Outro fator que afeta a capacidade do folículo em responder aos diversos
7 estímulos é o substrato com que o folículo mantém contato. De acordo com o
8 contato do folículo com o substrato, pode-se classificar os sistemas de cultivo
9 em bi ou tridimensionais. No sistema bidimensional, o folículo se localiza em
10 cima do substrato, podendo ser cultivado sobre a placa de cultivo, envolto ou
11 não por ágar, por compostos da matriz extracelular purificados (colágeno do tipo
12 I, fibronectina, laminina e matrigel), ou ainda por monocamada de células
13 somáticas (células da granulosa, fibroblastos e outros componentes do tecido
14 ovariano; FIGUEIREDO et al., 2008). Já no sistema tridimensional, o folículo se
15 localiza no interior do substrato, ou seja, está completamente envolto por ele,
16 portanto, o crescimento do oócito e a proliferação das células da granulosa
17 ocorre de forma radial, iniciando no centro do folículo. Os substratos mais usados
18 nesse sistema são o colágeno do tipo I, o ágar (FIGUEIREDO et al., 2008) e,
19 recentemente, o polissacarídeo biocompatível conhecido como hidrogel de
20 alginato (BRITO et al., 2014; SILVA et al., 2015).

21 O sistema de cultivo *in situ* compreende o estudo da ativação folicular e o
22 crescimento dos folículos primários (SILVA et al., 2004). É um método
23 considerado fácil para cultivar os folículos e possui a vantagem de manter o
24 contato celular e a integridade (ABIR et al., 2006). Enquanto que o sistema de
25 cultivo isolado necessita de métodos para isolar os folículos presentes no córtex

1 ovariano. Os métodos desenvolvidos para o isolamento dos folículos ovarianos
2 são o isolamento mecânico e/ou enzimático. Os folículos isolados podem ser
3 cultivados em um sistema bidimensional ou tridimensional, no primeiro os
4 folículos são colocados diretamente sob a placa de cultivo ou uma matriz
5 extracelular, enquanto que o segundo consiste no sistema em que os folículos
6 são totalmente inclusos em uma matriz, capaz de manter a arquitetura original
7 do folículo ovariano (FIGUEIREDO et al., 2008).

8 O desenvolvimento de condições *in vitro* para promover o desempenho
9 folicular e o estudo da foliculogênese sob as circunstâncias *in vitro* pode ser
10 essencial para diminuir a atresia folicular geralmente ocorrida *in vivo* (ALVES et
11 al., 2013; ARAÚJO et al., 2014). Os meios de cultivo, geralmente, tendem a
12 impedir a atresia folicular, através da inclusão de diversas substâncias, como:
13 uma fonte de proteína, antibióticos, antimicóticos, selênio, piruvato, glutamina e
14 ocasionalmente um ou mais fatores de crescimento como: fator de crescimento
15 semelhante à insulina (IGF-1), fator de crescimento epidérmico (EGF), activina-
16 A, factor de diferenciação de crescimento- 9 (GDF-9), e fator de crescimento de
17 fibroblastos (FGF-2), hormônios, como: insulina, hormônio folículo estimulante
18 (FSH), hormônio de crescimento, hormônio estimulante da tiroide (TSH) e
19 tiroxina e/ou esteroides (tal como o estradiol, testosterona ou androstenediona
20 (RODRIGUES et al., 2010; ANDRADE et al., 2012; LEITÃO et al., 2014).

21 A técnica do cultivo *in vitro* é uma biotécnica de alta significância tanto
22 para pesquisa básica como para a reprodução animal. A contribuição para a
23 pesquisa consiste na elucidação dos mecanismos presentes na fase pré-antral
24 da foliculogênese (LIMA; SANTOS, 2010; SÁNCHEZ; SMITZ, 2012).

1 Assim, várias investigações no âmbito da MOIFOPA contribuíram para o
2 cultivo *in vitro* mostrando que durante o controle do desenvolvimento folicular os
3 hormônios, fatores de crescimento e peptídeos estão envolvidos (RODRIGUES
4 et al., 2010; SÁNCHEZ; SMITZ, 2012), e entre eles pode se destacar: o fator de
5 crescimento epidermal (EGF), o hormônio folículo estimulante, o fator de
6 crescimento e diferenciação 9 (GDF- 9), o kit ligand (KL), as proteínas
7 morfogenéticas ósseas 4, 7 e 15 (BMPs 4, 7 e 15), o fator de crescimento
8 endotélio vascular (VEGF), o fator de crescimento fibroblástico (FGF), o fator de
9 crescimento de queratinócitos (KGF), a ativina e peptídeo intestinal vasoativo
10 (VIP), e os fatores de crescimento semelhantes à insulina 1 e 2 (IGFs 1 e 2)
11 (FIGUEIREDO et al., 2007).

12

13 2.6.2 Importância da Composição do Meio de Cultivo Sobre o Desenvolvimento 14 Folicular *in vitro*

15

16 O principal fator para o sucesso do cultivo *in vitro* é a composição do meio
17 (ANDRADE et al., 2012; ROSSETTO et al., 2013). Na maioria das espécies, o
18 cultivo de FOPA tem sido realizado em meios já previamente definidos após
19 testes experimentais, adicionando substâncias em diversas concentrações no
20 intuito de encontrar o melhor meio para promover o desenvolvimento e manter a
21 viabilidade folicular. Como exemplo, podem-se citar o meio essencial mínimo
22 (MEM; MARTINS et al., 2010), meio Waymouth (BOLAMBA et al., 2002), Meio
23 199 (M199; CASTRO et al., 2014) ou meio McCOY (CASTRO et al., 2014;
24 DULEBA et al., 2001), suplementados com outras substâncias enriquecedoras.
25 O MEM tem sido utilizado no cultivo de folículos ovarianos pré-antrais de várias

1 espécies como bovinos (ANDRADE et al., 2012), caprinos (SILVA et al., 2004),
2 murinos (ZHAO et al., 2001) e equinos (HAAG et al., 2013).

3 A adição de um fator de crescimento ao meio de cultivo pode ser a chave
4 para proteger os folículos do estresse oxidativo durante a ativação e o
5 desenvolvimento *in vitro* (RODRIGUES et al., 2010). Contudo, independente do
6 meio, para que se obtenha sucesso na realização do cultivo a osmolaridade deve
7 estar entre 280 e 310 mOsm/L e o pH deve estar entre 7,2 e 7,4. Ainda assim, a
8 duração do cultivo depende do objetivo experimental, e pode variar de 1 a 36
9 dias, dependendo da espécie (FIGUEREDO et al., 2008; RODRIGUES et al.,
10 2014).

11

12 2.7 FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL (EGF)

13

14 Sabemos que muitos fatores intraovarianos atuam regulando o
15 desenvolvimento folicular no ovário mamífero. O fator de crescimento epidermal
16 (EGF) é considerado um polipeptídeo pertencente a uma grande família
17 composta por diversas substâncias [TGF- α , HB-EGF, anfiregulina (AREG),
18 betacelulina (BTC) e epiregulina (EREG)], que atuam sobre o desenvolvimento
19 folicular e possuem função mitogênica em diferentes tipos celulares (SOFI et al.,
20 2011).

21 Por ser um potente fator mitogênico para células foliculares e luteais, o
22 EGF se destaca entre os demais fatores de crescimento (CELESTINO et al.,
23 2012). Foi inicialmente isolado de glândulas do sub-maxilar de ratos, urina
24 humana e outras fontes (SOFI et al., 2011). O EGF é produzido pelo oócito e
25 pelas células da granulosa e possui papel importante na modulação da

1 foliculogênese ovariana, proporcionando a regulação de diversos processos,
2 incluindo a ativação de folículos primordiais, proliferação de células da
3 granulosa, redução da taxa de atresia e manutenção da viabilidade folicular
4 (CELESTINO et al., 2009; DEMEESTERE et al., 2005; SILVA et al., 2010).

5 Estudos realizados com EGF mostraram que, ao ser adicionado ao meio
6 de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais, ele induz o aumento do
7 diâmetro dos folículos em bovinos (GUTIERREZ et al., 2000), reduz os níveis de
8 atresia, promove o desenvolvimento de folículos primordiais e mantém a
9 viabilidade, por até 6 dias de cultivo, em ovinos (HEMAMALINI et al., 2003). Mao
10 et al. (2004), em estudos realizados com suínos, observaram que a adição de
11 EGF ao meio de cultivo, na concentração de 10 ng/mL, inibiu a apoptose das
12 células da granulosa e levou a um aumento da formação de antro folicular.

13 Quando adicionado ao cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais
14 caprinos, na concentração de 50 ng/mL, o EGF estimulou a viabilidade oocitária
15 (ZHOU; ZHANG, 2005) e, na concentração de 100 ng/mL, beneficiou o
16 crescimento de oócitos de folículos primários (SILVA et al., 2004) e promoveu a
17 ativação de folículos primordiais e a manutenção da viabilidade folicular por até
18 6 dias de cultivo, em ovinos (ANDRADE et al., 2005).

19 Em estudos realizados com caprinos, foi demonstrado que, quando
20 adicionado EGF (1 e 10 ng/mL) ao meio de cultivo, por 7 dias, manteve a
21 viabilidade dos folículos ovarianos, bem como, atuou como um potente fator
22 regulador da fisiologia ovariana, proporcionando a regulação de diversos
23 processos, principalmente, a ativação folicular (CELESTINO et al., 2009;
24 CELESTINO et al., 2011).

1 Em equinos, ainda não há trabalhos que relatem os benefícios e/ou
2 malefícios causados pela adição do EGF ao meio de cultivo *in vitro* de folículos
3 ovarianos pré-antrais. No entanto, como citado anteriormente, o uso deste fator
4 de crescimento adicionado ao meio de cultivo *in vitro* já foi testado com sucesso
5 em outras espécies.

1 REFERÊNCIAS

2

3 ABIR, R.; NITKE, S.; BEM-HAROUSH, A.; FISCH, B. In vitro maturation of human
4 primordial ovarian follicles: clinical significance, progress in mammals, and
5 methods for growth evaluation. **Histology and Histopathology**, v. 26, p. 887-
6 898, 2006

7

8 AERTS, J. M. J.; BOLS, P. E. J. Ovarian follicular dynamics: A review with
9 emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle
10 development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 1, p. 171-179,
11 2010.

12

13 ALVES, A. M.; CHAVES, R. N.; ROCHA, R. M.; LIMA, L. F.; ANDRADE, P. M.;
14 LOPES, C. A.; SOUZA, C. E.; MOURA, A. A.; CAMPELLO, C. C.; BÁO, S. N.;
15 SMITZ, J.; FIGUEIREDO, J. R. Dynamic medium containing growth
16 differentiation factor-9 and FSH maintains survival and promotes in vitro growth
17 of caprine preantral follicles after long-term in vitro culture. **Reproduction, Fertility
18 and Development**, v. 25, n. 6, p. 955-965, 2013.

19

20 ANDRADE, E. R.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A.; OLIVEIRA, J. A.;
21 BRACARENSE, A. P. F. R. L.; FIGUEIREDO, J. R.; TONIOLLI R. Interactions of
22 índole acetic acid with EGF and FSH in the culture of ovine preantral follicles.
23 **Teriogenology**, v. 64, n. 5, p. 1104-1113, 2005.

- 1 ANDRADE, E. R.; VAN DEN HURK, R.; LISBOA, L. A.; HERTEL, M. F.; MELO
2 STERZA, F. A.; MORENO, K.; BRACARENSE, A. P. F. R. L.; LANDIM-
3 ALVARENGA, F. C.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A. Effects of ascorbic acid on
4 *in vitro* culture of bovine preantral Follicles. **Zygote**, v. 20, n. 4, p. 379-388, 2012.
5
- 6 ARAÚJO, V. R.; GASTAL, M. O.; FIGUEIREDO, J. R.; GASTAL, E. L. In vitro
7 culture of bovine preantral follicles: a review. **Reproductive Biology and**
8 **Endocrinology**, v. 78, p. 1-14, 2014.
9
- 10 BECKERS, J. F.; DRION, P. V.; FIGUEIREDO, J. R.; GOFFIN, L.; PIROTTIN, D.;
11 ECTORS, F. J. The ovarian follicle in cow: in vivo growth and in vitro culture.
12 **Reproduction in Domestic Animals**, v. 31, p. 543-548, 1996.
13
- 14 BOLAMBA, D.; FLOYD, A. A.; MCGLONE, J. J.; LEE, V. H. Epidermal growth
15 factor enhances expression of connexin 43 protein in cultured porcine preantral
16 follicles. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 1, p. 154-60, 2002.
17
- 18 BRISTOL-GOULD, S.; WOODRUFF, T. K. Folliculogenesis in the domestic cat
19 (*Felis catus*). **Theriogenology**, v. 66, n. 1, p. 5-13, 2006.
20
- 21 BRITO, I. R.; SILVA, C. M. G.; DUARTE, A. B. G.; LIMA, I. M. T.; RODRIGUES,
22 G. Q.; ROSSETTO, R.; SALES, A. D.; LOBO, C. H.; BERNUCI, M. P.; ROSA-E-
23 SILVA, A. C. J. S.; CAMPELLO, C. C.; XU, M.; FIGUEIREDO, J. R. Alginate
24 hydrogel matrix stiffness influences the *in vitro* development of caprine preantral

- 1 follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v. 81, n. 7, p. 636-645,
2 2014.
- 3
- 4 BYSKOV, A. G. S. Cell kinetics studies of follicular atresia in the mouse ovary.
5 **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 37, n. 2, p. 277-285, 1974.
- 6
- 7 CARROL, J.; WHITTINGHAM, D. G.; WOOD, M. J.; TELFER, E.; GOSDEN, R.
8 G. Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary
9 follicles. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 90, p. 321-327, 1990.
- 10
- 11 CASTRO, S. V.; RODRIGUES, A .P. R.; CARVALHO, A. A.; SILVA, C. M. G.;
12 CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R.; SANTOS, F. W. Fresh and vitrified
13 bovine preantral follicles have different nutritional requirements during *in vitro*
14 culture. **Cell and Tissue Banking**, v. 15, n. 4, p. 591-601, 2014.
- 15
- 16 CELESTINO, J. J. H.; BRUNO, J. B.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H.;
17 SARAIVA, M. V.; CHAVES, R. N.; MARTINS, F. S.; LIMA, L. F.; NAME, K. P.;
18 CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Recombinant
19 epidermal growth factor maintains follicular ultrastructure and promotes the
20 transition to primary follicles in caprine ovarian tissue cultured in vitro.
21 **Reproductive Sciences**, v. 16, n. 3, p. 239-246, 2009.
- 22
- 23 CELESTINO, J. J.; BRUNO, J. B.; SARAIVA, M. V.; ROCHA, R. M.; BRITO, I. R.;
24 DUARTE, A. B.; ARAÚJO, V. R.; SILVA, C. M.; MATOS, M. H.; CAMPELLO, C.
25 C.; SILVA, J. R.; FIGUEIREDO, J. R. Steady-state level of epidermal growth

1 factor (EGF) mRNA and effect of EGF on in vitro culture of caprine preantral
2 follicles. **Cell and Tissue Research**, v. 344, n. 3, p. 539-550, 2011.

3

4 CELESTINO, J. J. H.; SILVA, C. M. G.; CASTRO, S. V.; FIGUEIREDO, J. R.

5 Fator de crescimento epidermal como mediador de sobrevivência e
6 desenvolvimento folicular. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n.
7 3, p. 148-157, 2012.

8

9 CHOWDHURY, I.; THOMAS, K.; THOMPSON, W. E. Prohibitin (PHB) roles in
10 granulosa cell physiology: Review. **Cell and Tissue Research**, v. 363, n. 1, p. 1-
11 19-29, 2016.

12

13 DEMEESTERE, I.; CENTNER, J.; GERVY, C.; ENGLERT, Y.; DELBAERE, A.
14 Impact of various endocrine and paracrine factors on in vitro culture of preantral
15 follicles in rodents. **Reproduction**, v. 130, n. 2, p. 147-156, 2005.

16

17 DRIANCOURT, M. A. Follicular dynamics in sheep and cattle. **Theriogenology**,
18 v. 35, n. 1, p. 55-79, 1991.

19

20 DULEBA, A. J.; PEHLIVAN, T.; CARBONE, R.; SPACZYNSKI, R. Z. Activin
21 stimulates proliferation of rat ovarian thecal-interstitial cells. **Biology of**
22 **Reproduction**, v. 65, n. 3, p. 704-709, 2001.

23

24 ERICKSON, B. H. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary.
25 *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 11, n. 1, p. 97-105, 1966.

- 1 ERICKSON, G. F. An analysis of follicle development and ovum maturation.
2 **Seminars in Reproduction Endocrinology**, v. 4, p. 233-254, 1986.
- 3
- 4 EVANS, T. J.; CONSTANTINESCU, G. M.; GANJAN, V. K. Clinical reproductive
5 anatomy and physiology of the mare. *In*: YOUNGQUIST, R. S.; THRELFALL, W.
6 R. **Current Therapy in Large Animal Theriogenology**, p. 47-67, 2007.
- 7
- 8 FIGUEIREDO, J. R.; CELESTINO, J. J. H.; RODRIGUES, A. P. R.; SILVA, J. R.
9 V. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e
10 produção in vitro de embriões em larga escala. **Revista Brasileira de**
11 **Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 31, n. 2, p. 143-152, 2007.
- 12
- 13 FIGUEIREDO, J. R.; HULSHOF, S. C. J.; VAN DEN HURK, R.; NUSGENS, B.;
14 BEVERS, M. M.; ECTORS, F. J.; BECKERS, J. F. Preservation of oocyte and
15 granulosa cell morphology in bovine preantral follicles cultured in vitro.
16 **Theriogenology**, v. 41, p. 1333-1346, 1994.
- 17
- 18 FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; SILVA, J. R. V.
19 Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. *In*:
20 GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas**
21 **aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, p. 227-327, 2008.
- 22
- 23 FIGUEIREDO, J. R.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R. Estado atual da
24 biotécnica de manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais
25 (MOIFOPA). **Ciência Animal**, v. 9, n. 1, p. 11-25, 1999.

- 1 FIGUEIREDO, R. A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L.; SOLE, J. M. P. Ovarian
2 follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v. 47,
3 p. 1489-1505, 1997.
- 4
- 5 FORTUNE, J. E. Ovarian follicular growth and development in mammals.
6 **Biology of Reproduction**, v. 50, n. 2, p. 225-232, 1994.
- 7
- 8 FRITZ, M. A.; SPEROFF, L. Clinical gynecologic endocrinology and infertility, 8th
9 edn. Wolters Kluwer, **Lippincott Williams & Wilki**, 2010.
- 10
- 11 GONDOS, B.; BHIRALEUS, P.; HOBEL, C. J. Ultrastructural observations on
12 germ cells in human fetal ovaries. **American Journal of Obstetrics &**
13 **Gynecology**, v. 110, n. 5, p. 644–652, 1971.
- 14
- 15 GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos**. 1st ed. Cambridge:
16 CAB International: Raven Press, 1994.
- 17
- 18 GUPTA, P. S. P.; RAMESH, H. S.; MANJUNATHA, B. M.; NANDI, S.;
19 RAVINDRA, J. P. Pruduction of buffalo embryos using oocytes from *in vitro* grown
20 preantral follicles. **Zygote**, v. 16, n. 1, p. 57-63, 2008.
- 21
- 22 GUTIERREZ, C. G.; RALPH, J. H.; TELFER, E. E.; WILMUT, I.; WEBB, R.
23 Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in
24 vitro. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 5, p. 1322-1328, 2000.

- 1 HAAG, K. T.; MAGALHÃES-PADILHA, D. M.; FONSECA, G. R.; WISCHRAL, A.;
2 GASTAL, M. O.; KING, S. S.; JONES, K. L.; FIGUEIREDO, J. R.; GASTAL, E. L.
3 *In vitro* culture of equine preantral follicles obtained via the Biopsy Pick-Up
4 method. **Theriogenology**, v. 79, n. 6, p. 911-917, 2013.
- 5
- 6 HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Foliculogênese, maturação ovocitária e ovulação.
7 In: HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**, p. 69-82, 2004.
- 8
- 9 HATZIRODOS, N.; HUMMITZSCH, K.; IRVING-RODGERS, H. F.; HARLAND,
10 M. L.; MORRIS, S. E.; RODGERS, R. J. Transcriptome profiling of granulosa cells
11 from bovine ovarian follicles during atresia. **BMC Genomics**, v.15, p. 1-26, 2014.
- 12
- 13 HEMAMALINI, N. C.; RAO, B. S.; TAMILMANI, G.; AMARNATH, D.; VAGDEVI,
14 R.; NAIDU, K. S.; REDDY, K. K.; RAO, V. H. Influence of transforming growth
15 factor- α , insulinlike growth factor-II, epidermal growth factor or follicle stimulating
16 hormone on in vitro development of preantral follicles in sheep. **Small Ruminant**
17 **Research**, v. 50, n. 1-2, p. 11-22, 2003.
- 18
- 19 HENDERSON, K. M.; MC NATTY, K. P.; SMITH, P.; GIBB, M.; O'KEEFFE, L. E.;
20 LUN, S.; HEATH, D. A.; PRISK, M. D. Influence of follicular health on the
21 steroidogenic and morphological characteristics of bovine granulosa cells in vitro.
22 **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 79, n. 1, p. 185-193, 1987.

- 1 HUGHES M. H.; GOROSPE W. C. Biochemical identification of apoptosis
2 (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism
3 underlying follicular atresia. **Endocrinology**, v. 129, n. 5, p. 2415-2422, 1991.
4
- 5 HULSHOF, S. C. J.; FIGUEIREDO, J. R.; BEKERS, J. F.; BEVERS, M. M.; VAN
6 DEN HURK, R. Isolation and Characterization of preantral follicles from foetal
7 bovine ovaries. **Veterinary Quarterly**, v. 16, n. 2, p. 78-80, 1994.
8
- 9 HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation
10 and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 47, n. 1, p. 23-32, 1997.
11
- 12 JOHNSON, A. L. Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian
13 follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3-4, p. 185-201, 2003.
14
- 15 KIESS, W.; GALLAHER, B. Hormonal control of programmed cell
16 death/apoptosis. **European Journal of Endocrinology**, v. 138, n. 5, p. 482-491,
17 1998.
18
- 19 KUAN, N. K.; PASSARO, E. JR. Apoptosis: programmed cell death. **Archives of**
20 **Surgery**, v. 133, n. 7, p. 773-775, 1998.
21
- 22 LEITÃO, C. C. F.; COSTA, J. J. N.; BRITO, I. R.; MAGALHÃES-PADILHA, D. M.;
23 ALMEIDA, A. P.; FIGUEIREDO, J. R.; VAN DEN HURK, R.; SILVA, J. R. V.
24 Effects of GDF-9 and FSH on mRNA Expression for FSH-R, GDF-9 and BMPs in

1 in vitro cultured goat preantral follicles. **Brazilian Archives of Biology and**
2 **Technology**, v. 57, n. 2, p. 200-208, 2014.

3

4 LIMA, G. L.; SANTOS, E. A. A. Aplicação das biotécnicas de MOIFOPA,
5 transgênese e clonagem na reprodução de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**,
6 4 Supl: S36–S42, 2010.

7

8 LUCCI, C. M.; AMORIM, C. A.; RODRIGUES, A. P.; FIGUEIREDO, J. R.; BÃO,
9 S. N.; SILVA, J. R.; GONÇALVES, P. B. Study of preantral follicles population *in*
10 *situ* and after mechanical isolation form caprine ovaries at different reproductive
11 stages. **Animal Reproduction Science**, v. 56, n. 3-4, p. 223-236, 1999.

12

13 LUNARDON, N. T.; SILVA-SANTOS, K. C.; JUSTINO, R. C.; DESSUNTI, G. T.;
14 SENEDA, M. M.; MARTINS, M. I. Population estimate of the preantral follicles
15 and frequency of multiocyte follicles in prepubertal and adult bitches.
16 **Theriogeneology**, v. 83, n. 6, p. 1015-1020, 2015.

17

18 LUSSIER, J. G.; MATTON, P.; DUFOUR, J. J. Growth rates follicles in the ovary
19 of the cow. **Reproduction and Fertility**, v. 81, n. 2, p. 301-307, 1987.

20

21 MAGALHÃES, D. M.; DUARTE, A. B. G.; ARAÚJO, V. R.; BRITO, I. R.; SOARES,
22 T. G.; LIMA, I. M. T.; LOPES, C. A. P.; CAMPELLO, C. C.; RODRIGUES, A. P.
23 R.; FIGUEIREDO, J. R. In vitro production of a caprine embryo from a preantral
24 follicle cultured in media supplemented with growth hormone. **Theriogenology**,
25 v. 75, n. 1, p. 182-188, 2011.

- 1 MAGOFFIN, D.; KUMAR, A.; YILDIZ, B.; AZZIZ R. Endocrinology of the Ovary.
2 In: MELMED, S.; CONN, P. M. **Endocrinology: Basic and Clinical Principle**,
3 2.ed. Totowa: Humana Press, p. 391-403, 2005.
4
- 5 MAO, J.; SMITH, M. F.; RUCKER, E. B.; WU, G. M.; MCCAULEY, T. C.;
6 CANTLEY, T. C.; PRATHER, R. S.; DIDION, B. A.; DAY, B. N. Effect of epidermal
7 growth factor and insulin like growth factor 1 on porcine preantral follicular growth,
8 antrum formation, and stimulation of granulosa cell proliferation and suppression
9 of apoptosis in vitro. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 7, p. 1967-1975, 2004.
10
- 11 MARTINS, F. S.; CELESTINO, J. J.; SARAIVA, M. V.; CHAVES, R. N.;
12 ROSSETTO, R.; SILVA, C. M.; LIMA-VERDE, I. B.; LOPES, C. A.; CAMPELLO,
13 C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Interaction between growth differentiation factor 9,
14 insulinlike growth factor I and growth hormone on the *in vitro* development and
15 survival of goat preantral follicles. **Brazilian Journal of Medical and Biological**
16 **Research**, v. 43, n. 8, p. 728-736, 2010.
17
- 18 MATSUDA, F.; INOUE, N.; MANABE, N.; OHKURA, S. Follicular growth and
19 atresia in mammalian ovaries: Regulation by survival and death of granulosa
20 cells, review. **Journal of Reproduction and Development**, v. 58, n. 1, p. 44-50,
21 2012.
22
- 23 MCGEE, E. A.; HSUEH, A. J. W. Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian
24 Follicles. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 2, p. 200–214, 2008.

- 1 MORITA Y.; TILLY J. L. Oocyte apoptosis: like sand through an hourglass.
2 **Developmental Biology**, v. 213, n. 1, p. 1-17, 1999.
- 3
- 4 NASCIMENTO, A. A.; PINHEIRO, N. L.; SALES, A.; VIANA, J. H. M. Correlação
5 morfométrica do ovário de fêmeas bovinas em diferentes estádios reprodutivos.
6 **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, n. 2, p.
7 126-132, 2003.
- 8
- 9 NÓBREGA JUNIOR, J. E.; GONÇALVES, P. B. D.; PEREIRA, G. R.;
10 FIGUEIREDO, J. R. Participação da esfingosina 1-fosfato e do fator inibidor de
11 leucemia no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais de cabras. **Revista**
12 **Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, n. 2, p. 75-79, 2014.
- 13
- 14 RODRIGUES, G. Q.; LIMA, I. M. T.; CHAVES, R. N.; ROSSETTO, R.; COSTA,
15 S. L.; CASTRO, S. V.; BARROS, V. R. P.; MATOS, M. H. T.; LOPES, C. A. P.;
16 BÃO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Transforming growth factor-
17 β (TGF- β) maintains follicular ultrastructure and stimulates preantral follicle
18 growth in caprine ovarian tissue cultured *in vitro*. **Arquivo Brasileiro de**
19 **Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, n. 2, p. 411-416, 2014.
- 20
- 21 RODRIGUES, G. Q.; SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; BRUNO, J. B.; PINTO,
22 L. C.; LOPES, C. A. P.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Efeito de
23 diferentes concentrações de hormônio folículo-estimulante recombinante sobre
24 o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos e ovinos isolados.
25 **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 4, n. 3, p. 144-152, 2010.

- 1 ROSSETTO, R.; SARAIVA, M. V.; SANTOS, R. R.; SILVA, C. M.; FAUSTINO, L.
2 R.; CHAVES, R. N.; BRITO, I. R.; RODRIGUES, G. Q.; LIMA, I. M.; DONATO,
3 M. A.; PEIXOTO, C. A.; FIGUEIREDO, J. R. Effect of medium composition on the
4 *in vitro* culture of bovine pre-antral follicles: morphology and viability do not
5 guarantee functionality. **Zygote**, v. 21, n. 2, p. 125-128, 2013.
6
7 ROTHCHILD, I. The yolkless egg and the evolution of eutherian viviparity.
8 **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 2, p. 337–357, 2003.
9
10 RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca Anatomica**, v. 24, p. 77-
11 92, 1983.
12
13 SÁNCHEZ, F.; SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Biochimica et**
14 **Biophysica Acta**, v. 1822, p. 1896–1912, 2012.
15
16 SARAIVA, M. V. A.; MATOS, M. H. T.; FAUSTINO, L. R.; CELESTINO, J. J. H.;
17 SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Pituitary hormones and their role in
18 folliculogenesis. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, p. 206-221,
19 2010.
20
21 SAUMANDE J. La Folliculogénèse Chez les Ruminants. **Recueil de Médecine**
22 **Vétérinaire**, v. 167, n. 3-4, p. 205-218, 1991.
23
24 SAUMANDE J. Ovogenèse et folliculogénèse. **Recueil de Médecine**
25 **Vétérinaire**, v. 157, p. 29-38, 1981.

- 1 SCARAMUZZI, R. J.; BAIRD, D. T.; CAMPBELL, B. K.; DRIANCOURT, M. A.;
2 DUPONT, J.; FORTUNE, J. E.; GILCHRIST, R. B.; MARTIN, G. B.; MCNATTY,
3 K. P.; MCNEILLY, A. S.; MONGET, P.; MONNIAUX, D.; VIÑALES, C.; WEBB,
4 R. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in
5 ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n. 3, p. 444-467,
6 2011.
- 7
- 8 SENEDA, M. M.; GODMANN, M.; MURPHY, B. D.; KIMMINS, S.; BORDIGNON,
9 V. Developmental regulation of histone H3 methylation at lysine 1 in the porcine
10 ovary. **Reproduction Research**, v. 135, p. 829-838, 2008.
- 11
- 12 SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; CELESTINO, J. J. H.; RODRIGUES, A. P.
13 R.; FIGUEIREDO, J. R. Família fator de crescimento epidermal e seu papel na
14 função ovariana e desenvolvimento embrionário. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.
15 4, n. 4, p. 215-226, 2010.
- 16
- 17 SILVA, G. M.; ROSSETTO, R.; CHAVES, R. N.; DUARTE, A. B.; ARAÚJO, V.
18 R.; FELTRIN, C.; BERNUCI, M. P.; ANSELMO-FRANCI, J.; XU, M.;
19 WOODRUFF, T. K.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. *In vitro* development
20 of secondary follicles from pre-pubertal and adult goats cultured in two-
21 dimensional or three-dimensional systems. **Zygote**, v. 23, n. 4, p. 475-484, 2015.
- 22
- 23 SILVA, J. R. V. Growth factors in goat ovaries and the role of ativina-A in the
24 development of early-staged follicles. **Phd Thesis. Utrecht University, Faculty**
25 **of Veterinary Medicine**, 142p, 2005.

- 1 SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; MATOS, M. H. T.; SANTOS, R. R.;
- 2 PESSOA, C.; MORAES, M. O.; FIGUEIREDO, J. R. Influences of FSH and EGF
- 3 on primordial follicles during *in vitro* culture of caprine ovarian cortical tissue.
- 4 **Theriogenology**, v. 61, n. 9, p. 1691-1704, 2004.
- 5
- 6 SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; FIGUEIREDO, J. R. Ovarian follicle
- 7 development in vitro and oocyte competence: advances and challenges for farm
- 8 animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 55, p. 123-135, 2016.
- 9
- 10 SILVA-SANTOS, K. C.; SANTOS, G. M.; SILOTO, L. S.; HERTEL, M. F.;
- 11 ANDRADE, E. R.; RUBIN, M. I.; STURION, L.; MELO-STERZA, F. A.; SENEDA,
- 12 M. M. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus*
- 13 *indicus* and *Bos taurus taurus* females. **Theriogenology**, v. 76, n. 6, p. 1051-
- 14 1057, 2011.
- 15
- 16 SOFI, K. A.; KHAN, M. Z.; ISLAM, R.; LONE, F. A. Effect of cysteamine and
- 17 epidermal growth factor supplementation on the in vitro maturation rate of ovine
- 18 oocytes. **Small Ruminant Research**, v. 96, n. 2-3, p. 191-194, 2011.
- 19
- 20 TILLY J. L. Apoptosis and ovarian function. **Reviews of Reproduction**, v. 1, p.
- 21 162-172, 1996.
- 22
- 23 UYAR, A.; TORREALDAY, S.; SELI, E. Cumulus and granulosa cell markers of
- 24 oocyte and embryo quality. **Fertility and Sterility**, v. 99, n. 4, p. 979–997, 2013.

- 1 VARGHESE, A. C.; DU PLESSIS, S. S.; FALCONE, T.; AGARWAL, A.
2 Cryopreservation/transplantation of ovarian tissue and in vitro maturation of
3 follicles and oocytes: Challenges for fertility preservation. **Reproductive Biology**
4 **and Endocrinology**, v. 6, n. 47, p. 1-10, 2008.
- 5
- 6 ZHAO, J.; TAVENE, M. A.; VAN DER WEIJDEN, G. C.; BEVERS, M. M.; VAN
7 DEN HURK, R. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulates the development of
8 cultured rat pre-antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v.
9 58, n. 3, p. 287-296, 2001.
- 10
- 11 ZHOU, H.; ZHANG, Y. Effect of growth factors on *in vitro* development of caprine
12 preantral follicle oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 90, n. 3-4, p. 265-
13 272, 2005.

3. HIPÓTESE

1

2

3 O Fator de Crescimento Epidermal (EGF) contribui para o
4 desenvolvimento dos folículos ovarianos pré-antrais (FOPA) bovinos, bem como
5 mantém a integridade folicular, após 5 ou 10 dias de cultivo *in vitro* em gel de
6 agarose (sistema bidimensional).

4. OBJETIVOS

1

2

4.1 OBJETIVO GERAL

4

5 Avaliar o efeito da adição do Fator de Crescimento Epidermal (EGF) no
6 desenvolvimento de folículos pré-antrais de fêmeas *Bos taurus indicus*.

7

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

9

10 - Comparar o efeito das diferentes concentrações de EGF (50, 100 ou 200
11 ng/mL) no desenvolvimento de folículos ovarianos pré-antrais;

12

13 - Comparar o desenvolvimento e a integridade folicular, após 5 ou 10 dias
14 da adição de diferentes concentrações de EGF;

15

16 - Avaliar o desenvolvimento folicular, no sistema bidimensional de cultivo
17 *in vitro*, tendo como parâmetros o crescimento e integridade dos folículos
18 ovarianos pré-antrais bovinos por meio de análise histológica.

5. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

Efeito do Fator de Crescimento Epidermal no desenvolvimento de folículos pré-antrais de fêmeas *Bos taurus indicus* cultivados *in vitro*

RESUMO

O Fator de Crescimento Epidermal (EGF) é considerado um potente fator mitogênico para as células foliculares. Produzido pelo oócito e pelas células da granulosa, o EGF possui um papel importante na modulação da foliculogênese ovariana. O objetivo do presente trabalho foi testar a adição de diferentes concentrações de EGF ao meio de cultivo *in vitro*, por 5 ou 10 dias, sobre o desenvolvimento de folículos pré-antrais inclusos em fragmentos ovarianos bovinos. Ovários (n=10) de fêmeas *Bos taurus indicus* (n=5) foram coletados em abatedouro local. Fragmentos (n=9) do córtex ovariano foram obtidos de cada animal. Um fragmento foi imediatamente fixado (grupo controle; Dia 0), o restante foi colocado em MEM® (Gibco BRL, Rockville, MD, USA; osmolaridade 300 mOsm/L, pH 7,2) suplementado a 20° C, permanecendo por 1 hora. Os outros fragmentos foram cultivados *in vitro* durante 5 (D5) ou 10 dias (D10) em MEM⁺ ou MEM⁺ acrescido de diferentes concentrações de EGF (50, 100 ou 200 ng/mL), caracterizando os seguintes grupos: controle (D0); MEM⁺ (D5); MEM + 50 ng/mL de EGF (D5); MEM + 100 ng/mL de EGF (D5); MEM + 200 ng/mL de EGF (D5); MEM⁺ (D10); MEM + 50 ng/mL de EGF (D10); MEM + 100 ng/mL de EGF (D10); MEM + 200 ng/mL de EGF (D10). Os folículos pré-antrais foram avaliados por microscopia óptica e classificados de acordo com a fase de desenvolvimento (primordial ou em desenvolvimento) e a viabilidade (íntegro ou degenerado). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Neste experimento, foram avaliados 2203 folículos contidos em 720 cortes histológicos, totalizando 240 lâminas e 45 fragmentos ovarianos. O tratamento controle não cultivado (D0) continha predominantemente folículos pré-antrais nos estágios primordial (82,8%), alguns primários e, raramente, folículos secundários (17,2%). Houve um aumento no número de folículos em desenvolvimento quando adicionado 100 ng/mL de EGF ao meio de cultivo, por 10 dias (48,4%), quando comparado com o tratamento controle (17,2%). Desta maneira, concluímos que a adição de 100 ng/mL de EGF, por 10 dias, ao meio de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais bovinos foi eficiente em promover o desenvolvimento e manter a integridade folicular.

Palavras-chave: *Bos taurus indicus*; Cultivo *in vitro*; EGF; Folículos ovarianos pré-antrais.

1 5.1 INTRODUÇÃO

2

3 A técnica do cultivo *in vitro* é uma biotécnica de alta significância tanto
4 para pesquisa básica como para a reprodução animal. A contribuição para a
5 pesquisa consiste na elucidação dos mecanismos presentes na fase pré-antral
6 da foliculogênese (LIMA; SANTOS, 2010; SÁNCHEZ; SMITZ, 2012). O cultivo *in*
7 *vitro* de folículos ovarianos pré-antrais propõe investigações quanto aos fatores
8 relacionados ao desenvolvimento, à manutenção da viabilidade folicular e à
9 atresia.

10 Diversas substâncias são adicionadas ao meio de cultivo *in vitro* com a
11 intenção de auxiliar o crescimento folicular, manter a viabilidade folicular e inibir
12 a atresia. Entre elas podem-se destacar: o fator de crescimento epidermal (EGF),
13 o hormônio folículo estimulante (FSH), o fator de crescimento e diferenciação 9
14 (GDF- 9), o kit ligand (KL), as proteínas morfogenéticas ósseas 4, 7 e 15 (BMPs
15 4, 7 e 15), o fator de crescimento endotélio vascular (VEGF), o fator de
16 crescimento fibroblástico (FGF), o fator de crescimento de queratinócitos (KGF),
17 a ativina e peptídeo intestinal vasoativo (VIP), e os fatores de crescimento
18 semelhantes à insulina 1 e 2 (IGFs 1 e 2) (FIGUEIREDO et al., 2007).

19 Sabemos ainda que muitos fatores intraovarianos atuam regulando o
20 desenvolvimento folicular no ovário mamífero. O EGF é considerado um
21 polipeptídeo pertencente a uma grande família composta por diversas
22 substâncias [TGF- α , HB-EGF, anfiregulina (AREG), betacelulina (BTC) e
23 epiregulina (EREG)], que atuam sobre o desenvolvimento folicular e possuem
24 função mitogênica em diferentes tipos celulares (SOFI et al., 2011).

1 Em estudos anteriores foi demonstrado efeito positivo do EGF sobre a
2 sobrevivência e crescimento folicular na espécie caprina e ovina (ANDRADE et
3 al., 2005; CELESTINO et al., 2011; SILVA et al., 2010). Este fator de crescimento
4 exerce papel importante na modulação da foliculogênese ovariana,
5 proporcionando a regulação de diversos processos, incluindo a ativação de
6 folículos primordiais, proliferação de células da granulosa, redução da taxa de
7 atresia e manutenção da viabilidade folicular (CELESTINO et al., 2009;
8 DEMEESTERE et al., 2005; SILVA et al., 2010). Em cultivo *in vitro* isolado de 28
9 dias, realizado com bovinos, o EGF promoveu o aumento do diâmetro folicular
10 (GUTIERREZ et al., 2000), e, em suínos, inibiu a apoptose das células da
11 granulosa e levou à formação do antro folicular (MAO et al., 2004). Na espécie
12 caprina, atuou como importante regulador da fisiologia ovariana, proporcionando
13 a regulação de diversos processos, incluindo a ativação folicular (CELESTINO
14 et al., 2011). Contudo, não há estudos que incluem o EGF no cultivo *in vitro*, em
15 gel de agarose, de folículos pré-antrais, na espécie bovina.

16 Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da adição do
17 Fator de Crescimento Epidermal (EGF) no desenvolvimento de folículos pré-
18 antrais de fêmeas *Bos taurus indicus* cultivados *in vitro*.

19

20 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

21

22 5.2.1 Obtenção dos Ovários

23

24 Ovários (n=10) de fêmeas adultas *Bos taurus indicus* (n=5) cíclicas e com
25 escore de condição corporal variando de 2,5 a 3,5, em uma escala de 0 a 5

1 (AYRES et al., 2009), foram coletados em abatedouro local. Os ovários foram
2 lavados em dois banhos de solução fisiológica 0,9%, seguidos de um banho de
3 álcool 70%. Depois, foram fragmentados ainda no abatedouro, e transportados
4 para o laboratório em meio essencial mínimo (MEM®, Gibco BRL, Rockville, MD,
5 USA; osmolaridade 300 mOsm/L, pH 7,2), suplementado com 200 mg/mL de
6 penicilina e 200 mg/mL de estreptomicina, à temperatura de 20°C, por
7 aproximadamente 30 minutos.

8

9 *5.2.2 Protocolo Experimental*

10

11 Ainda no abatedouro, cada par de ovário foi fragmentado para que se
12 evitasse a degeneração. Foram retirados o tecido circundante e os ligamentos
13 dos ovários e evitando o ovário que possuía grandes folículos antrais e corpo
14 lúteo, foram obtidos fragmentos (n=45), do córtex do ovário, de
15 aproximadamente 3x3x1 mm. De cada réplica, um fragmento (n=5) foi
16 selecionado aleatoriamente e imediatamente fixado em Bouin (tratamento
17 controle não cultivado, D0). Os fragmentos remanescentes (n=40) do córtex
18 ovariano foram cultivados individualmente em alíquotas de 700 µL de MEM+
19 acrescido de sua respectiva concentração de EGF (50, 100 ou 200 ng/mL), sobre
20 gel de agarose, em placas de cultura de 24 poços, em estufa a 38,5°C, numa
21 atmosfera de 5 % de CO₂ em ar e umidade saturada. O meio base do cultivo era
22 constituído de meio essencial mínimo (MEM®, Gibco BRL, Rockville, MD, USA;
23 osmolaridade 300 mOsm/L, pH 7,2) suplementado (MEM+) com ITS (insulina
24 6,25 mg/mL, transferrina 6,25 mg/mL e selênio 6,25 ng/mL), 0,23 mM de
25 piruvato, 2 mM glutamina, 2 mM de hipoxantina, 1,25 mg/mL de albumina sérica

1 bovina (BSA; Gibco BRL, Rockville, MD, USA), 20 UI/mL de penicilina e 200
2 mg/mL de estreptomicina. Para cada concentração de EGF, fragmentos do
3 córtex ovariano (n=9) de cada animal (n=5) foram cultivados por 5 (D5) ou 10
4 (D10) dias (Figura 1). A cada dois dias, o meio de cultivo era totalmente
5 substituído por meio novo. O período de cultivo utilizado foi baseado em estudos
6 realizados com outras espécies (ANDRADE et al., 2005; CELESTINO et al.,
7 2009).

8

9 *5.2.3 Histologia Clássica*

10

11 Para a análise da morfologia dos folículos ovarianos os fragmentos do
12 córtex ovariano (n=45), controle não cultivado ou cultivados durante 5 ou 10 dias
13 de cultivo, foram fixados por imersão em Bouin durante 24 horas e mantidos em
14 álcool 70%. Após a fixação, os tecidos foram desidratados numa série graduada
15 de concentrações crescentes de etanol, clarificados e diafanizados em xilol,
16 embebidos em parafina e incluídos em blocos de parafina para cortes
17 histológicos. Subsequentemente, para montagem de lâminas para microscopia,
18 cada bloco foi seccionado a 5 µm de espessura com intervalo de 10 secções,
19 em micrótomo rotativo (Leica®, Wetzlar-Alemanha). As lâminas foram coradas
20 com Ácido Periódico de Schiff (PAS) e contracoradas com Hematoxilina. Antes
21 da coloração, as lâminas de tecido foram desparafinadas com xilol e, em
22 seguida, reidratadas utilizando etanol a 70%. Depois disso, permaneceram por
23 5 minutos em Ácido Periódico (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e durante 10 minutos
24 no reagente de Schiff.

1 5.2.4 Classificação Folicular

2

3 Todas as secções foram examinadas usando microscopia óptica
4 (objetivas de 10 e 40x). Os folículos pré-antrais foram classificados em primordial
5 (contendo uma camada de células somáticas, conhecidas como células da
6 granulosa, planas ou achatadas ao redor do oócito), ou em desenvolvimento:
7 primário (uma única camada de células da granulosa cuboides em torno do
8 oócito), ou secundário (duas ou mais camadas de células granulosas cuboides).
9 Para avaliar o crescimento folicular, foi realizada a quantificação dos folículos
10 nas diferentes fases do desenvolvimento (primordiais, primários e secundários)
11 no controle e, após o cultivo *in vitro*, nos diferentes tratamentos. Os folículos
12 também foram classificados de acordo com sua integridade em: íntegros,
13 quando o oócito apresentasse núcleo não picnótico e cercado por células da
14 granulosa organizadas em camadas; ou degenerado, oócito retraído com núcleo
15 picnótico e cercado por células da granulosa desorganizadas.

16 Duzentos e cinquenta folículos foram avaliados por tratamento e duração
17 do cultivo. Ao avaliar as taxas de crescimento folicular, apenas folículos íntegros
18 foram considerados, e as porcentagens de folículos primordiais, primários e
19 secundários foram calculados no D0 (tratamento controle), D5 e D10. Para evitar
20 a recontagem, os folículos pré-antrais foram contados apenas na secção onde o
21 núcleo do oócito foi observado.

1 5.2.5 Análise Estatística

2

3 Neste experimento, foram avaliados 2203 folículos (Figura 2) contidos em
4 720 cortes histológicos de 240 lâminas e 45 fragmentos ovarianos, que foram
5 obtidos a partir de 5 fêmeas bovinas (*Bos taurus indicus*). Os dados foram
6 submetidos aos testes de normalidade de resíduos (Shapiro-Wilk) e
7 homogeneidade de variância (Bartlett). A média de folículos pré-antrais em
8 desenvolvimento obtidos nos tratamentos controle e nos tratamentos com
9 diferentes concentrações de EGF cultivados por 5 ou 10 dias, respectivamente,
10 foram submetidos ao teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Dentro do mesmo tratamento, a
11 média de folículos pré-antrais íntegros em desenvolvimento das amostras
12 cultivadas por 5 ou 10 dias, respectivamente, foram analisados pelo Teste T-
13 Student. Todas as análises foram realizadas com o software Action 3.0.2
14 (Campinas, SP, Brasil) e os valores considerados significativos quando $p \leq 0,05$.

15

16 5.3 RESULTADOS

17

18 As porcentagens de folículos primordiais e em desenvolvimento (primários
19 e secundários), íntegros e degenerados, de tecido cortical ovariano cultivado *in*
20 *vitro*, após 5 ou 10 dias, estão mostrados na Tabela 1.

21

22 Com o prolongamento do tempo de cultivo, o EGF na concentração de
23 100 ng/mL, permitiu que maior quantidade de folículos estivesse em
24 desenvolvimento aos 10 dias de cultivo (121; 48,4%), em relação ao controle não
25 cultivado (43; 17,2 %), enquanto que, aos 5 dias de cultivo, apenas 25,2%
(63/250) dos folículos estavam em desenvolvimento.

1 Com relação à integridade folicular, com o uso de 100 ng/mL de EGF,
2 houve um aumento da proporção de folículos íntegros em desenvolvimento,
3 após 10 dias de cultivo (64; 25,6%), comparado com 5 dias de cultivo (25; 10,0%
4 - Tabela 2).

5

6 5.4 DISCUSSÃO

7

8 No presente estudo, foi possível observar uma modificação na proporção
9 de folículos em desenvolvimento, sugerindo a ocorrência de ativação folicular
10 durante o cultivo *in vitro* de fêmeas *Bos taurus indicus*. A concentração de 100
11 ng/mL de EGF foi a que apresentou melhores condições para o desenvolvimento
12 folicular e manutenção da integridade dos folículos, considerando o período de
13 dez dias de cultivo.

14 Com a adição do EGF ao meio de cultivo *in vitro*, de folículos ovarianos
15 pré-antrais bovinos, foi possível observar um aumento na porcentagem média
16 de folículos em desenvolvimento de cinco dias para dez dias de cultivo. O
17 desenvolvimento de folículos pré-antrais *in vivo* ocorre com folículos primordiais
18 presentes na reserva ovariana. Estes folículos são ativados e iniciam as divisões
19 celulares originando folículos primários e posteriormente folículos secundários.
20 Este último é caracterizado pela transformação no formato das células da
21 granulosa de achatadas para cuboides e aumento no número de camadas de
22 células envolvendo o oócito (EPPIG; Ó'BRIEN, 1996; SENEDA; SILVA, 2009).

23 Observamos que os folículos pré-antrais, de fêmeas *Bos taurus indicus*,
24 foram sensíveis ao EGF em cultivo *in situ*, durante 10 dias, assim como relatado
25 após 28 dias de cultivo isolado, em bovinos (GUTIERREZ et al., 2000), ou

1 mesmo que o acréscimo de EGF em associação não é eficiente no cultivo *in vitro*
2 de folículos ovarianos pré-antrais de cabras (SILVA et al., 2004), nossos
3 resultados sugerem uma ação positiva do EGF no cultivo *in vitro* de folículos pré-
4 antrais, tal como relatado por Morbeck et al. (1993) em suínos, uma vez que a
5 adição desse fator de crescimento promoveu a ativação folicular e a proliferação
6 das células da granulosa.

7 Outros trabalhos também demonstraram a importância do EGF no
8 desenvolvimento folicular, associado a outros fatores de crescimento. Andrade
9 e colaboradores (2005) ao estudarem ovinos, observaram que a adição de EGF,
10 em associação com o hormônio folículo estimulante (FSH), ao meio de cultivo *in*
11 *vitro*, por 2 ou 6 dias, a uma concentração de 100 ng/mL, promoveu a ativação
12 dos folículos, a proliferação de células da granulosa e adicionalmente a
13 manutenção da viabilidade folicular, corroborando com os nossos resultados.
14 Toyoda et al. (2007) afirmaram que o EGF atua na promoção do
15 desenvolvimento de diferentes tipos celulares, e já está bem estabelecido, em
16 estudos realizados por Van Den Hurk et al. (2000) que o EGF atua como fator
17 de sobrevivência, tanto *in vivo* como *in vitro*.

18 Considerando somente o período de dez dias de cultivo, a concentração
19 de 100 ng/mL de EGF apresentou uma melhor taxa de folículos em
20 desenvolvimento e íntegros, enquanto, as demais concentrações de EGF (MEM,
21 50 ou 200 ng/mL) testadas neste trabalho apresentaram resultados
22 estatisticamente semelhantes. Desta forma, constatamos que com a utilização
23 da concentração de 100 ng/mL, até dez dias de cultivo *in vitro*, foi possível obter
24 efeitos benéficos do EGF, pois em comparação com o controle não cultivado foi

1 o grupo em que houve uma maior proporção de folículos primários e
2 secundários.

3 Levando em consideração o tipo e o tempo de cultivo, bem como a
4 espécie estudada, ainda não foi avaliado a ação exercida pelo EGF em cultivo *in*
5 *vitro* realizado de fragmentos ovarianos, por até 10 dias, em fêmeas *Bos taurus*
6 *indicus*. Outros estudos, realizados com bovinos, avaliaram a ação do EGF no
7 desenvolvimento folicular de fêmeas da raça Holandesa (GUTIERREZ et al.,
8 2000), o que pode ser um diferencial do nosso estudo.

9 Foi observado neste experimento que a adição de EGF age no
10 desenvolvimento de folículos primários e secundários. Essa ação tem sido
11 observada por outros autores, os quais mencionaram a atividade do EGF na
12 modulação da foliculogênese, pela atividade mitogênica em células foliculares e
13 luteais (CELESTINO et al., 2009; SILVA et al., 2010). Mas apesar dos avanços
14 quanto aos efeitos benéficos dos fatores de crescimento, é importante considerar
15 a ação dos demais constituintes do meio de cultivo, os quais podem exercer ação
16 sinérgica com o EGF. Diversos substratos são utilizados na suplementação do
17 meio de cultivo, como o piruvato, a hipoxantina, a glutamina, insulina-
18 transferrina-selênio (ITS), a albumina sérica bovina (BSA) e outros. Os meios
19 utilizados para o cultivo *in vitro* são compostos ricos em oxigênio, nutrientes e
20 outros elementos presentes no córtex ovariano (ROSSETO et al., 2012) e todo
21 este conjunto precisa ser considerado para uma correta compreensão da
22 fisiologia folicular.

23 Contudo, é essencial a utilização de meios de cultivo suplementados com
24 substâncias que promovam uma ação sinérgica ao crescimento folicular, neste
25 caso, acrescido de 100 ng/mL de EGF conforme este estudo. Indicamos ainda

1 que a partir de dez dias de cultivo possivelmente seja necessário aumentar a
2 concentração de EGF acrescentada ao meio de cultivo.

3

4 5.5 CONCLUSÃO

5

6 Pode-se concluir que a adição de 100 ng/mL de EGF, por 10 dias, no
7 sistema bidimensional de cultivo *in vitro*, em gel de agarose, de folículos pré-
8 antrais de fêmeas *Bos taurus indicus* promoveu o desenvolvimento e manteve a
9 integridade folicular.

1 REFERÊNCIAS

2

3 ANDRADE, E. R.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A.; OLIVEIRA, J. A.;
4 BRACARENSE, A. P. F. R. L.; FIGUEIREDO, J. R.; TONIOLLI R. Interactions of
5 índole acetic acid with EGF and FSH in the culture of ovine preantral follicles.
6 **Teriogenology**, v. 64, n. 5, p. 1104-1113, 2005.

7

8 AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; DEMÉTRIO, C. G.
9 B.; LIMA, C. G.; BARUSELLI, P. S. Validation of body condition score as a
10 predictor of subcutaneous fat in Nelore (*Bos indicus*) cows. **Livestock Science**,
11 v. 123, n. 2-3, p. 175-179, 2009.

12

13 CELESTINO, J. J. H.; BRUNO, J. B.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H.;
14 SARAIVA, M. V.; CHAVES, R. N.; MARTINS, F. S.; LIMA, L. F.; NAME, K. P.;
15 CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Recombinant
16 Epidermal Growth Factor Maintains Follicular Ultrastructure and Promotes
17 the Transition to Primary Follicles in Caprine Ovarian Tissue Cultured In Vitro.
18 **Reproductive Sciences**, v. 16, n. 3, p. 239-246, 2009.

19

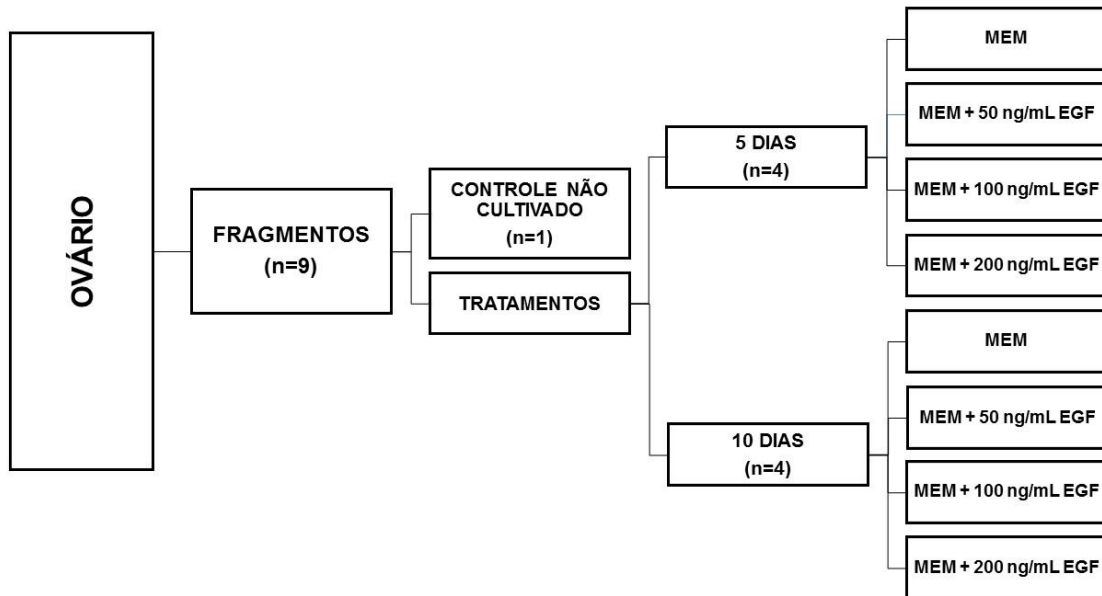
20 CELESTINO, J. J. H.; BRUNO, J. B.; SARAIVA, M. V.; ROCHA, R. M.; BRITO, I.
21 R.; DUARTE, A. B.; ARAÚJO, V. R.; SILVA, C. M. G.; MATOS, M. H.;
22 CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R.; FIGUEIREDO, J. R. Steady-state level of
23 epidermal growth factor (EGF) mRNA and effect of EGF on in vitro culture of
24 caprine preantral follicles. **Cell and Tissue Research**, v. 344, n. 3, p. 539-550,
25 2011.

- 1 DEMEESTERE, I.; CENTNER, J.; GERVY, C.; ENGLERT, Y.; DELBAERE, A.
2 Impact of various endocrine and paracrine factors on in vitro culture of preantral
3 follicles in rodents. **Reproduction**, v. 130, n. 2, p. 147-156, 2005.
4
- 5 EPPIG, J. J.; O'BRIEN, M. J. Development in vitro of mouse oocytes from
6 primordial follicles. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 197-207, 1996
7
- 8 FIGUEIREDO, J. R.; CELESTINO, J. J. H.; RODRIGUES, A. P. R.; SILVA, J. R.
9 V. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e
10 produção in vitro de embriões em larga escala. **Revista Brasileira de**
11 **Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 143-152, 2007.
12
- 13 GUTIERREZ, C. G.; RALPH, J. H.; TELFER, E. E.; WILMUT, I.; WEBB, R.
14 Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in
15 vitro. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 5, p. 1322-1328, 2000.
16
- 17 LIMA, G. L.; SANTOS, E. A. A. Aplicação das biotécnicas de MOIFOPA,
18 transgênese e clonagem na reprodução de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**,
19 4 Supl: S36–S42, 2010.
20
- 21 MAO, J.; SMITH, M. F.; RUCKER, E. B.; WU, G. M.; MCCAULEY, T. C.;
22 CANTLEY, T. C.; PRATHER, R. S.; DIDION, B. A.; DAY, B. N. Effect of epidermal
23 growth factor and insulin like growth factor 1 on porcine preantral follicular growth,
24 antrum formation, and stimulation of granulosa cell proliferation and suppression
25 of apoptosis in vitro. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 7, p. 1967-1975, 2004.

- 1 MORBECK, D. E.; FLOWERS, W. L.; BRITT, J. H. Response of porcine
2 granulosa cells isolated from primary and secondary follicles to FSH, 8-bromo-
3 cAMP and epidermal growth factor in vitro. **Journal of Reproduction and**
4 **Fertility**, v. 99, n. 2, p. 577-584, 1993.
- 5
- 6 ROSSETTO, R.; SARAIVA, M. V. A.; SANTOS, R. R.; SILVA, C. M. G.;
7 FAUSTINO, L. R.; CHAVES, R. N.; BRITO, I. R.; RODRIGUES, G. Q.; LIMA, I.
8 M. T.; DONATO, M. A. M.; PEIXOTO, C. A.; FIGUEIREDO, J. R. Effect of medium
9 composition on the in vitro culture of bovine preantral follicles: morphology and
10 viability do not guarantee functionality. **Zygote**, v. 21, p. 125-128, 2012.
- 11
- 12 SÁNCHEZ, F.; SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Biochimica et**
13 **Biophysica Acta**, v. 1822, p. 1896–1912, 2012.
- 14
- 15 SENEDA, M. M.; SILVA, K. C. F. Epigenética e neo-oogênese: novos conceitos
16 em foliculogênese. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 3, p.
17 111-117, 2009.
- 18
- 19 SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; CELESTINO, J. J. H.; RODRIGUES, A. P.
20 R.; FIGUEIREDO, J. R. Família fator de crescimento epidermal e seu papel na
21 função ovariana e desenvolvimento embrionário. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.
22 4, n. 4, p. 215-226, 2010.
- 23
- 24 SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; MATOS, M. H. T.; SANTOS, R. R.;
25 PESSOA, C.; MORAES, M. O.; FIGUEIREDO, J. R. Influences of FSH and EGF

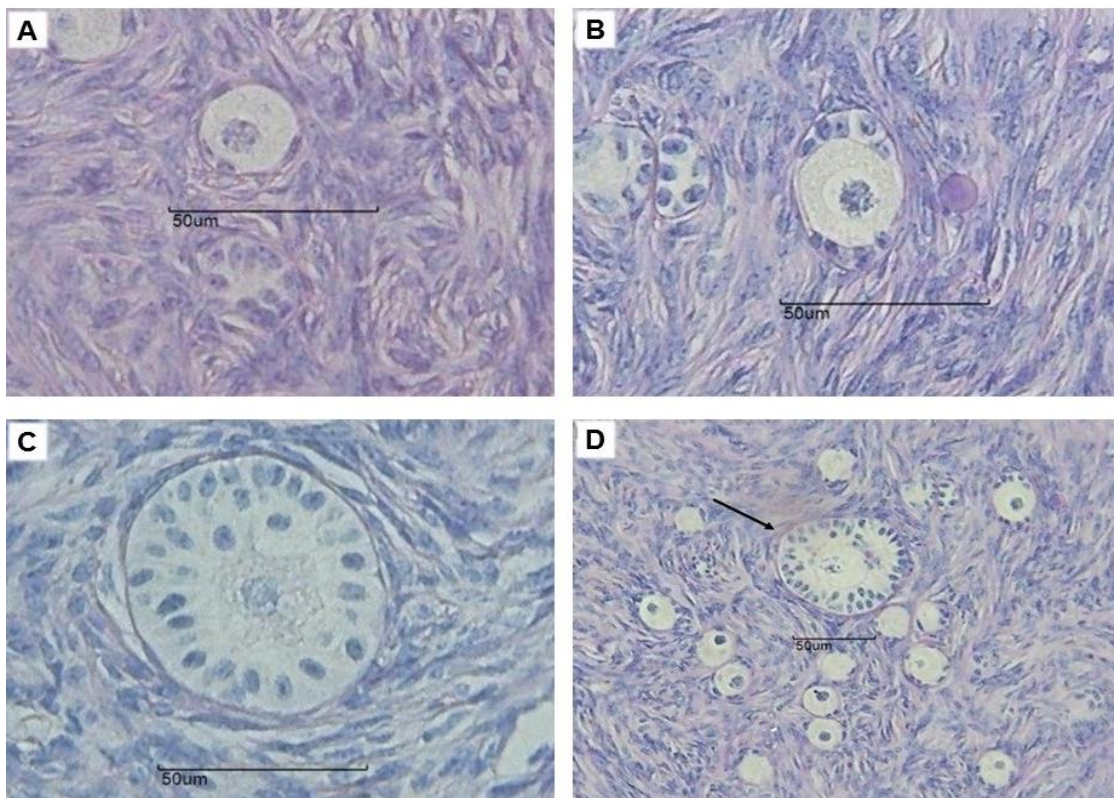
- 1 on primordial follicles during in vitro culture of caprine ovarian cortical tissue.
2 **Theriogenology**, v. 61, n. 9, p. 1691-1704, 2004.
- 3
- 4 SOFI, K. A.; KHAN, M. Z.; ISLAM, R.; LONE, F. A. Effect of cysteamine and
5 epidermal growth factor supplementation on the in vitro maturation rate of ovine
6 oocytes. **Small Ruminant Research**, v. 96, n. 2-3, p. 191-194, 2011.
- 7
- 8 TOYODA, T.; NAKAMURA, K.; YAMADA, K.; THANSEEM, I.; ANITHA, A.;
9 SUDA, S.; TSUJII, M.; IWAYAMA, Y.; HATTORI, E.; TOYOTA, T.; MIYACHI, T.;
10 IWATA, Y.; SUZUKI, K.; MATSUZAKI, H.; KAWAI, M.; SEKINE, Y.; TSUCHIYA,
11 K.; SUGIHARA, G-I.; OUCHI, Y.; SUGIYAMA, T.; TAKEI, N.; YOSHIKAWA, T.;
12 MORI, N. SNP analyses of growth factor genes EGF, TGF- β 1, and HGF reveal
13 haplotypic association of EGF with autism. **Biochemical and Biophysical**
14 **Research Communications**, v. 360, n. 4, p. 715-720, 2007.
- 15
- 16 VAN DEN HURK, R.; ABIR, R.; TELFER, E. E.; BEVERS, M. M. Preantral and
17 antral follicles as possible source for fertilizable oocytes in human and bovine.
18 **Human Reproduction Update**, v. 2, p. 457-474, 2000.

- 1 **Figura 1** – Esquema representativo da distribuição dos grupos para cultivo *in vitro*, com adição do Fator de Crescimento Epidermal (EGF), na espécie bovina.
- 2



3

- 1 **Figura 2** - Fotomicrografia de cortes histológicos de ovário *Bos taurus indicus*
2 cultivado *in vitro* por 5 ou 10 dias. Coloração de PAS e Hematoxilina (100 e
3 400X). **A** – Folículo Primordial; **B** – Folículo Primário (com uma camada completa
4 de células da granulosa envolvendo o oócito); **C** –Folículo Primário (com uma
5 camada completa e início de uma segunda camada de células da granulosa
6 envolvendo o oócito); **D** – Folículo Secundário (com duas camadas completas
7 de células da granulosa envolvendo o oócito; seta).



- 1 **Tabela 1** - Efeito da suplementação com Fator de Crescimento Epidermal (50,
 2 100 ou 200 ng/mL) sobre a porcentagem média de folículos pré-antrais totais
 3 (íntegros e degenerados; primordiais e em desenvolvimento) em fragmentos
 4 ovarianos *Bos taurus indicus*, cultivados por 5 ou 10 dias.

GRUPOS	FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS TOTAIS			
	Primordiais % (n/N)		Desenvolvimento % (n/N)	
CONTROLE (D0)	82,8 (207/250)		17,2 (43/250) ^A	
Tempo de Cultivo	5 dias	10 dias	5 dias	10 dias
MEM	75,2 (188/250)	67,6 (169/250)	24,8 (62/250)	32,4 (81/250)
EGF 50	70,8 (177/250)	65,9 (164/250)	29,2 (73/250)	34,4 (86/250)
EGF100	74,8 (187/250)	51,6 (129/250)	25,2 (63/250)	48,4 (121/250) ^B
EGF 200	80,0 (200/250)	70,8 (177/250)	20,0 (50/250)	29,2 (73/250)

5 (A, B, C) diferem a 5% de significância (Controle, MEM, EGF 50, EGF 100 e EGF 200) em 10 dias de cultivo.

- 1 **Tabela 2** – Efeito da suplementação com Fator de Crescimento Epidermal (50,
 2 100 ou 200 ng/mL) sobre a porcentagem média de folículos pré-antrais íntegros
 3 (primordiais e em desenvolvimento - primários e secundários) em fragmentos
 4 ovarianos *Bos taurus indicus*, cultivados por 5 ou 10 dias.

GRUPOS	FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS ÍNTEGROS			
	Primordiais % (n/N)		Desenvolvimento % (n/N)	
CONTROLE (D0)	72,4 (181/250)		27,6 (69/250)	
Tempo de Cultivo	5 dias	10 dias	5 dias	10 dias
MEM	44,8 (112/250)	38,0 (95/250)	14,0 (35/250)	17,2 (43/250)
EGF 50	37,6 (94/250)	37,6 (94/250)	12,8 (32/250)	20,0 (50/250)
EGF100	46,8 (117/250)	21,6 (54/250)	10,0 (25/250) ^A	25,6 (64/250) ^B
EGF 200	52,4 (131/250)	33,2 (83/250)	11,6 (29/250)	18,0 (45/250)

- 5 (A, B, C) diferem a 5% de significância entre a proporção de folículos pré-antrais íntegros em desenvolvimento (D5 versus
 6 D10).

6. CONCLUSÕES

1

2

3 A adição de 100 ng/mL de EGF no desenvolvimento de folículos pré-
4 antrais de fêmeas *Bos taurus indicus*, por 10 dias no sistema bidimensional de
5 cultivo *in vitro* em gel de agarose, promoveu o desenvolvimento e manteve a
6 integridade folicular.

7

8 Com base nos estudos realizados, torna-se evidente a grande importância
9 do Fator de Crescimento Epidermal (EGF) para a foliculogênese ovariana, uma
10 vez que o EGF exerce papel importante na regulação de diversos processos,
11 incluindo a ativação de folículos primordiais, proliferação de células da
12 granulosa, redução da taxa de atresia e manutenção da viabilidade folicular.
13 Porém, ainda são necessários mais estudos para aprimorar a técnica de cultivo
14 *in vitro* para que no futuro próximo essa técnica possa ser utilizada com sucesso
em larga escala.