



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

CAMILA BIZARRO DA SILVA

**MÉTODOS DE CULTIVO E CRIOPRESERVAÇÃO DO
TECIDO OVARIANO BOVINO**

Londrina
2019

CAMILA BIZARRO DA SILVA

**MÉTODOS DE CULTIVO E CRIOPRESERVAÇÃO DO
TECIDO OVARIANO BOVINO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina
como requisito parcial para a obtenção do título de
Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda

Londrina
2019

Silva, Camila Bizarro.

MÉTODOS DE CULTIVO E CRIOPRESERVAÇÃO DO TECIDO OVARIANO BOVINO /
Camila Bizarro Silva. - Londrina, 2019.
105 f. : il.

Orientador: Marcelo Marcondes Seneda.

Tese (Doutorado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de
Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2019.

Inclui bibliografia.

1. Reprodução assistida - Tese. 2. Cultivo in vitro - Tese. 3. Vitrificação - Tese. 4.
Folículos pré-antrais - Tese. I. Seneda, Marcelo Marcondes. II. Universidade Estadual de
Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.
III. Título.

CAMILA BIZARRO DA SILVA

**MÉTODOS DE CULTIVO E CRIOPRESERVAÇÃO DO TECIDO
OVARIANO BOVINO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina
como requisito parcial para a obtenção do título de
Doutor.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^ª. Dr^ª. Evelyn Rabelo Andrade
Universidade Federal de Rondônia – UNIR

Prof^ª. Dr^ª. Wanessa Blaschi
Universidade Estadual do Norte do Paraná –UENP

Prof^ª. Dr^ª. Fernanda da Cruz Landim
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Prof. Dr. Mateus Jose Sudano
Universidade Federal do ABC – UFABC

Londrina, 25 de fevereiro de 2019.

DEDICATÓRIA

À Deus,
A minha mãe, Luzia Bizarro,
e irmã Jéssica Bizarro da Silva.

Em especial aos meus avôs, Antonio Bizarro e José Roque da Silva.
(*in memoriam*)

Com amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **DEUS** pelo dom da vida e sua presença em todos os momentos de minha vida, sendo felizes ou tristes, fáceis ou difíceis.

Agradeço a minha **mãe**, Luzia Bizarro, amor incondicional, pelo carinho, apoio, fé e dedicação. Por estar ao meu lado e fazer o impossível para me ver feliz! Gostaria de dizer que me orgulho por ser sua filha e te considero um exemplo de vida e determinação durante toda a minha caminhada. Agradeço a minha **irmã**, Jessica Bizarro, por todas as conversas e risadas que tivemos durante esses anos, claro que sempre com briguinhas, mas são coisas de irmãs né! Amo muito vocês!

Agradeço eternamente meus **avôs** maternos e paternos, Antonio Bizarro (*in memoriam*) e Joana M. Bizarro, e, José Roque da Silva (*in memoriam*) e Aparecida Castanho da Silva, por sempre acreditarem em mim e permitirem que meus sonhos de menina se tornassem realidade. “Pra você guardei o amor que nunca soube dar. O amor que tive e vi sem me deixar. Sentir sem conseguir provar. Sem entregar e repartir” Nando Reis (Pra Você Guardei o Amor). Agradeço em especial meu primo Jobson Ramos Bizarro (*in memoriam*) por ser uma pessoa impensável em minha vida, responsável por me ensinar a amar os animais, e decidir na escolha da Medicina Veterinária como profissão. Agradeço ao meu **pai**, Saul S. S. da Silva, meus tios e tias, especialmente minha tia Maria Bizarro dos Santos por rezar e pedir por mim todas as vezes em que estava desanimada, aos meus primos e primas e todos meus outros familiares pelo apoio, incentivo e amizade; e a duas pessoas que são como se fossem da minha família Eva e Julia por sempre torcerem por mim!!!

Agradeço ao meu **orientador** Marcelo Marcondes Seneda, por ter me proporcionado a chance de realização do Doutorado, por sua dedicação, integridade e determinação dignas de serem seguidas como exemplo. Principalmente por ter acreditado no meu potencial, tantas vezes esquecido por mim. Além de orientador-professor se tornou um grande amigo, pelo qual irei cultivar por muito e muito tempo. Sempre pelos conselhos e lições de vida, principalmente nos momentos mais difíceis dessa jornada. Tenho a certeza que me tornei uma pessoa muito melhor em virtude dos seus exemplos. Meu muito obrigado de coração!

À Capes, pela bolsa de estudos concedida durante a execução deste trabalho, bem como a Profa. Dra. Ana Paula Frederico R. L. Bracarense, coordenadora do Programa de Pós-graduação em Ciência Animal da UEL, pela preocupação com os alunos e estímulo a

nossa formação profissional. À querida Helenice, secretária do programa de Pós-graduação em Ciência Animal, pela amizade e por sempre nos orientar com os processos e atividades do programa. E a todo o corpo docente do programa associado ao Programa de Pós-Graduação. Obrigada!

Aos membros da banca de qualificação (Profa. Dra. Ana Paula Frederico Rodrigues Loureiro Bracarense, Profa. Dra. Evelyn Rabelo Andrade e Profa. Dra. Roberta Garbelini Gomes Zanin) agradeço enormemente pelas importantes sugestões e contribuições. Aos membros da banca de defesa (Profa. Dra. Evelyn Rabelo Andrade, Dra. Wanessa Blaschi, Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim e Prof. Dr. Mateus Jose Sudano) agradeço pelo aceite em participarem deste momento importante em minha carreira profissional, dedicando tempo e conhecimento para contribuir com este trabalho.

A todos os colegas, pós-graduandos e estagiários do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (REPROA), que se tornaram minha segunda família. Agradeço pelo apoio, conversas, risadas e bons momentos vividos durante esses 6 anos de pós-graduação, sem vocês esse trabalho não teria sido concluído. Em especial a Livia Lisboa, Suellen González, Camila Rosa, Andressa Lindquist, Isabela Búfalo, Larrisa Bergamo, Camila Bortolieiro, Amanda Zangirolamo e Marcela Cerezzetti pela amizade e carinho.

As minhas amigas inseparáveis que mesmo estando longe me acompanham sempre e sempre durante todo este tempo, Belyza, Pammy, Cris Luxo, Aline (Siri), Beti, Ana Paula e Cinthia. Amo muito todos meus amigos de Curitiba!!!

Registro aqui a minha gratidão a todos que estiveram presentes em minha vida durante a jornada de realização deste trabalho e que contribuíram direta ou indiretamente para que essa etapa fosse concluída.

Meu mais sincero obrigada!

SILVA, Camila Bizarro. **Métodos de cultivo e criopreservação do tecido ovariano bovino**. 2019. 102 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

RESUMO

Um grande número de biotecnologias têm sido desenvolvidas para preservação da fertilidade humana e animal, principalmente referente ao crescimento e preservação folicular. Deste modo, os avanços nas biotécnicas de cultivo *in vitro* e criopreservação de folículos pré-antrais são fundamentais para investigação da foliculogênese e no aporte do tratamento de doenças reprodutivas. O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma estratégia viável de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais e um protocolo eficiente de criopreservação de tecido ovariano de fêmeas bovinas para incrementar a eficiência reprodutiva, através da: I) Avaliação do efeito de diferentes métodos de cultivo *in vitro* e II) Determinação da melhor concentração de dimetilsulfóxido (DMSO) ao protocolo de vitrificação do tecido ovariano de bovinos. No experimento I, os fragmentos foram cultivados *in vitro* e distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: i) cultivo padrão, diretamente em placa de cultivo (2D), ii) cultivo suporte, sobre uma monocamada de gel de agarose (2D); iii) cultivo imerso, sobre gel de agarose imerso no meio (2D) e; iv) cultivo Millicell-Biopore (3D). Os dados foram submetidos aos testes de ANOVA ($p \leq 0,05$). Foram avaliados 1330 folículos pré-antrais na análise morfológica. Os fragmentos cultivados sobre o suporte de gel de agarose apresentaram uma maior proporção de folículos íntegros (75,3%; 113/150) em comparação aos demais grupos ($p < 0,05$) aos seis dias de cultivo, enquanto aos quatorze dias, os cultivos padrão, suporte e imerso possibilitaram um maior percentual de folículos morfológicamente íntegros: 54,7% (82/150), 58% (87/150) e 54,7% (82/150), respectivamente, quando em comparação ao cultivo Millicell (35,3%; 53/150; $p > 0,05$). Os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e capacidade antioxidante das amostras cultivadas pelos quatro métodos apresentaram redução dos níveis de ânion superóxido e da capacidade antioxidante quando comparadas ao grupo controle não cultivado. Para o experimento II o córtex ovariano foi fragmentado e dividido em um tratamento controle (não vitrificado) e três grupos vitrificados: I) 1M de DMSO; II) 1,5M de DMSO e III) 3M de DMSO. Os fragmentos ovarianos ficaram vitrificados durante 7 dias e posteriormente analisados por histologia, presença de espécie reativas de oxigênio e reativação e crescimento folicular (cultivo *in vitro*). Imediatamente após a vitrificação/aquecimento, os fragmentos ovarianos criopreservados em 1M, 1,5M e 3M de DMSO mostraram porcentagens semelhantes ($p > 0,05$) de folículos íntegros. Entretanto, apenas a concentração de 3M de DMSO diferiu do controle não vitrificado (33,9% e 81,3%, respectivamente; $p < 0,05$). A análise de radicais livres e a capacidade antioxidante demonstrou a concentração de 3M de DMSO apresentou maior concentração de EROs quando comparada a demais concentrações de DMSO ($p < 0,05$). Após o cultivo *in vitro* dos fragmentos vitrificados/aquecidos a concentração de 1M de DMSO apresentou maiores porcentagens de folículos morfológicamente íntegros que as demais concentrações (47,7%; $p < 0,05$). Em conclusão, o cultivo suporte proporcionou a manutenção da integridade morfológica, maiores diâmetros e capacidade antioxidante dos folículos pré-antrais. Ainda, podemos sugerir que os folículos pré-antrais bovinos podem ser criopreservados *in situ* com maior eficiência em 1M de DMSO.

Palavras-chave: Reprodução assistida. Cultivo *in vitro*. Vitrificação. Folículos pré-antrais. Bovinos.

SILVA, Camila Bizarro. **Methods of culture and cryopreservation of bovine ovarian tissue**. 2019. 102 p. Thesis (Doctor's Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2019.

ABSTRACT

A large number of biotechnologies have been developed for the preservation of human and animal fertility, mainly referring to follicular growth and preservation. Thus, advances in *in vitro* culture biotechnics and cryopreservation of preantral follicles are fundamental for the investigation of folliculogenesis and for the treatment of reproductive diseases. The objective of this work was to develop a viable strategy of *in vitro* culture of preantral follicles and an efficient protocol of cryopreservation of ovarian tissue of bovine females to increase the reproductive efficiency, through: I) Evaluation of the effect of different methods of culture *in vitro* and II) Determination of the best concentration of dimethylsulfoxide (DMSO) to the protocol of vitrification of bovine ovarian tissue. In experiment I, the fragments were cultured *in vitro* and randomly distributed into four groups: i) standard culture, directly on culture plate (2D), ii) support culture, on an agarose gel (2D) monolayer; iii) immersed culture on agarose gel immersed in the medium (2D); iv) Millicell-Biopore culture (3D). Data were submitted to ANOVA tests ($p \leq 0.05$). Preantral follicles 1330 were evaluated in the morphological analysis. The fragments cultured on the agarose gel support showed a higher proportion of intact follicles (75.3%; 113/150) compared to the other groups ($p < 0.05$) at the six days of culture, whereas at fourteen days, (87/150), and 54.7% (82/150), respectively, when compared to the Millicell culture (35.3%, 53/150; $p > 0.05$). The levels of reactive oxygen species (ROS) and antioxidant capacity of the samples cultured by the four methods showed a reduction of superoxide anion levels and antioxidant capacity when compared to the non - cultivated control group. For experiment II the ovarian cortex was fragmented and divided into a control treatment (not vitrified) and three vitrified groups: I) 1M DMSO; II) 1.5M DMSO and III) 3M DMSO. The ovarian fragments were vitrified for 7 days and later analyzed by histology, presence of reactive oxygen species and reactivation and follicular growth (*in vitro* culture). Immediately after vitrification/warming, cryopreserved ovarian fragments in 1M, 1.5M and 3M DMSO showed similar percentages ($p > 0.05$) of whole follicles. However, only the concentration of 3M DMSO differed from the non-vitrified control (33.9% and 81.3%, respectively, $p < 0.05$). The analysis of free radicals and the antioxidant capacity demonstrated the concentration of 3M DMSO presented higher concentration of ROS when compared to other concentrations of DMSO ($p < 0.05$). After *in vitro* culture of the vitrified/warming fragments the concentration of 1M DMSO presented higher percentages of morphologically intact follicles than the other contractions (47.7%; $p < 0.05$). In conclusion, the support culture provided the maintenance of the morphological integrity, larger diameters and antioxidant capacity of the preantral follicles. Furthermore, we can suggest that bovine preantral follicles can be cryopreserved *in situ* with greater efficiency in 1M DMSO.

Key words: Assisted reproduction. *In vitro* culture. Vitrification. Preantral follicles. Bovine.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1** – Esquema representativo do ovário e suas estruturas fundamentais 23
- Figura 2** – Representação esquemática da formação das células germinativas primordiais (CGP) e oogênese 24
- Figura 3** – Esquema ilustrativo da origem dos folículos primordiais a partir das células germinativas presentes nos ovários..... 25
- Figura 4** – Representação do desenvolvimento dos folículos ovarianos de acordo com caracterização folicular. 1. Oogônias. 2. Folículo Primordial. 3. Folículo Primário. 4. Folículo Secundário. 5. Folículo Terciário. 6. Folículo Pré-ovulatório. a: Formação folicular. b: Ativação. c: Crescimento folicular. d: Crescimento folicular. e: Dominância folicular 26
- Figura 5** – Alterações celulares em folículos ovarianos pré-antrais que ocorrem durante o desenvolvimento folicular..... 28
- Figura 6** – Fases de transição das células da granulosa durante o crescimento folicular 32
- Figura 7** – Representação esquemática dos sistemas de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais. (A) Cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais envoltos em tecido ovariano (*in situ*). (B) Cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais isolados. (C) Cultivo *in vitro* no sistema Bidimensional. (D) Cultivo *in vitro* no sistema Tridimensional..... 36

ARTIGO A

- Figura 1** – Protocolo experimental utilizado para cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais bovinos em meio controle (MEM+) em diferentes métodos de cultivo (cultivo padrão, cultivo sobre o suporte de gel de agarose, cultivo com gel de agarose sobre a placa e cultivo Millicell-Biopore)..... 64

- Figura 2** – Fotomicrografia histológica da morfologia dos folículos pré-antrais bovinos (*Bos indicus*). (A) Folículo primordial íntegro; (B) Folículo primário íntegro (seta); (C) Folículo secundário íntegro; (D) Folículo primordial degenerado. Ácido periódico de Schiff (PAS) e Hematoxilina, 40X e 100X. 70
- Figura 3** – Porcentagem de folículos pré-antrais (primordiais íntegros, em desenvolvimento íntegros, primordiais degenerados e em desenvolvimento degenerado) em tecido ovariano não cultivado (controle, dia 0) e após cultivo in vitro com diferentes métodos de cultivo folicular (cultivo padrão, cultivo sobre o suporte de gel de agarose, cultivo com gel de agarose imerso no meio e cultivo Millicell-Biopore) por 6 dias 71
- Figura 4** – Porcentagem de folículos pré-antrais (primordiais íntegros, em desenvolvimento íntegros, primordiais degenerados e em desenvolvimento degenerado) em tecido ovariano não cultivado (controle, dia 0) e após cultivo in vitro com diferentes métodos de cultivo folicular (cultivo padrão, cultivo sobre o suporte de gel de agarose, cultivo com gel de agarose imerso no meio e cultivo Millicell-Biopore) por 14 dias 72
- Figura 5** – Porcentagem de folículos pré-antrais (primordiais, primários + secundários) íntegros em tecido ovariano não cultivado (controle, dia 0) e após cultivo in vitro com diferentes métodos de cultivo folicular (cultivo padrão, cultivo sobre o suporte de gel de agarose, cultivo com gel de agarose imerso no meio e cultivo Millicell-Biopore) por 6 ou 14 dias 73
- Figura 6** – Porcentagem de folículos íntegros em estágio de desenvolvimento (primários + secundários) de fêmeas *Bos indicus* em tecido ovariano não cultivado (controle, dia 0) e após cultivo in vitro com diferentes métodos de cultivo folicular (cultivo padrão, cultivo sobre o suporte de gel de agarose, cultivo com gel de agarose imerso no meio e cultivo Millicell-Biopore) por 6 ou 14 dias 74

- Figura 7** – Diâmetro médio folicular em micrômetros (μm) de folículos pré-antrais bovinos cultivados por 6 ou 14 dias com diferentes métodos de cultivo in vitro (cultivo padrão, cultivo sobre o suporte de gel de agarose, cultivo com gel de agarose imerso no meio e cultivo Millicell-Biopore). 75
- Figura 8** – Média do diâmetro oocitário em micrômetros (μm) de folículos pré-antrais bovinos cultivados por 6 ou 14 dias com diferentes métodos de cultivo in vitro (cultivo padrão, cultivo sobre o suporte de gel de agarose, cultivo com gel de agarose imerso no meio e cultivo Millicell-Biopore) 76
- Figura 9** – Fotomicrografia da proliferação celular por quantificação de NOR dos folículos pré-antrais bovinos (*Bos indicus*). A: Folículo primordial com marcação NOR. B: Células da granulosa com marcação positiva (seta preta) AgNOR. 40 e 100X..... 77
- Figura 10** – Efeitos dos diferentes métodos de cultivo (cultivo padrão, cultivo sobre o suporte de gel de agarose, cultivo com gel de agarose imerso no meio e cultivo Millicell-Biopore) no estresse oxidativo durante o cultivo de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano. (A) A capacidade de eliminação de radicais livres (ensaio ABTS) e (B) o poder antioxidante redutor férrico (ensaio FRAP) foram comparados com uma curva Trolox. A produção de ânion superóxido (C), quantificação de glutathiona (D) e a peroxidação lipídica (E) foram determinadas pelos testes NBT, GSH e TBARS, respectivamente 79
- Figura 11** – Efeitos dos diferentes métodos de cultivo (cultivo padrão, cultivo sobre o suporte de gel de agarose, cultivo com gel de agarose imerso no meio e cultivo Millicell-Biopore) no estresse oxidativo durante o cultivo de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano. (A) A capacidade de eliminação de radicais livres (ensaio ABTS) e (B) o poder antioxidante redutor férrico (ensaio FRAP) foram comparados com uma curva Trolox. A produção de ânion superóxido (C), quantificação de glutathiona (D) e a peroxidação lipídica (E) foram determinadas pelos testes NBT, GSH e TBARS, respectivamente 80

ARTIGO B

Figura 1 –	Protocolo experimental utilizado para criopreservação do tecido ovariano de bovinos	89
Figura 2 –	Folículos pré-antrais degenerados e íntegros (%) em fragmentos ovarianos não vitrificados (controle) ou criopreservados a diferentes concentrações de DMSO (1M, 1,5M e 3M) em fragmentos ovarianos após o teste de toxicidade como determinado pela avaliação histológica.....	94
Figura 3 –	Porcentagem de folículos pré-antrais de bovinos degenerados Grau 1, 2 e 3 na concentração de 1M, 1,5M e 3M de DMSO após o teste de toxicidade.....	95
Figura 4 –	Ilustração histológica da morfologia dos folículos pré-antrais vitrificados. A: Folículo primordial íntegro; B: Folículo primário íntegro; C Folículo secundário íntegro; D: Folículos primordiais degenerados (vacúolos citoplasmáticos); E: Folículos primordiais degenerados (desorganização das células da granulosa); F: Folículo primordial degenerado (retração nuclear). Ácido periódico - Schiff (PAS) e hematoxilina, 100X.....	96
Figura 5 –	Porcentagem de folículos primordiais e em desenvolvimento em tecido ovariano fresco (controle) e após vitrificação com diferentes concentrações (1M, 1,5M e 3M) de DMSO	97
Figura 6 –	Porcentagem de folículos íntegros e degenerados em tecido ovariano fresco (controle, dia 0) e após vitrificação com diferentes concentrações de dimetilsulfóxido (DMSO)	98
Figura 7 –	Média do diâmetro folicular e oocitário em micrômetros (μm) de folículos pré-antrais bovinos vitrificados com diferentes concentrações de dimetilsulfóxido (1M, 1,5M e 3M de DMSO).....	99
Figura 8 –	Porcentagem de folículos pré-antrais em desenvolvimento folicular classificados em primordiais e desenvolvimento (primários + secundários) em tecido ovariano não cultivado (controle) e após cultivo in vitro após a vitrificação com diferentes concentrações de DMSO (1M, 1,5M e 3M) por 10 dias	100

Figura 9 – Efeitos das concentrações de 1M, 1,5M e 3M de DMSO no estresse oxidativo sobre o tecido ovariano vitrificado. (A) A capacidade de eliminação de radicais livres (ensaio ABTS) e (B) o poder antioxidante redutor férrico (ensaio FRAP) foram comparados com uma curva Trolox. A produção de ânion superóxido (C) e a peroxidação lipídica (D) foram determinadas pelos testes NBT e TBARS, respectivamente..... 102

LISTA DE TABELAS

ARTIGO A

- Tabela 1** – Análise qualitativa das células da granulosa de folículos pré-antrais marcada (marrom-corada) com AgNOR (proteínas argirofílicas relacionadas com regiões organizadoras de nucléolos) presente no controle ou cultivados pelos diferentes métodos de cultivo (cultivo padrão, cultivo sobre o suporte de gel de agarose, cultivo com gel de agarose imerso no meio e cultivo Millicell-Biopore) – % (n/t)..... 77

ARTIGO B

- Tabela 1** – Porcentagem de folículos pré-antrais morfologicamente íntegros e degenerados não cultivados (controle) e cultivados *in vitro* após a vitrificação com diferentes concentrações de DMSO (1M, 1,5M e 3M)..... 99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP	Agente Crioprotetores
ATP	Adenosina Trifosfato
BMPs 15	Proteínas morfogenéticas ósseas 15
BMPs 4	Proteínas morfogenéticas ósseas 4
BMPs 7	Proteínas morfogenéticas ósseas 7
DMSO	Dimetilsulfóxido
EG	Etilenoglicol
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
FGF 2	Fator de crescimento de fibroblastos
FOPA	Folículos ovarianos pré-antrais
FSH	Hormônio folículo estimulante
GDF 9	Fator de diferenciação de crescimento- 9
GLI	Glicerol
IGF 1	Fator de crescimento semelhante à insulina 1
IGF 2	Fator de crescimento semelhante à insulina 2
ITS	Insulina transferrina e selênio
K	Potássio
KGF	Fator de crescimento de queratinócitos
KL	Kit ligand
MEM	Meio Essencial Mínimo
mg	Miligrama
mL	Mililitros
Mm	Milimol
MOIFOPA	Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais
Na	Sódio
ng	Nanogramas
°C	Graus Celsius
PAS	Ácido periódico de Schiff
PBS	Solução tampão fosfato salino
PIV	Produção de embriões <i>in vitro</i>

PROH	1,2-propanodiol
TSH	Hôrmonio estimulante da tireoide
VEGF	Fator de crescimento endotélio vascular
VIP	Peptídeo intestinal vasoativo
µg	Micrograma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	MORFOLOGIA OVARIANA EM MAMÍFEROS.....	22
2.2	OOGÊNESE	23
2.3	FOLICULOGÊNESE	25
2.4	CLASSIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS FOLÍCULOS OVARIANOS	26
2.4.1	Folículos Pré-antrais	27
2.4.1.1	Folículos primordiais	28
2.4.1.2	Folículos primários	29
2.4.1.3	Folículos secundários.....	29
2.4.2	Folículos Antrais.....	29
2.5	POPULAÇÃO FOLICULAR	30
2.6	CRESCIMENTO E ATIVAÇÃO FOLICULAR.....	31
2.7	ATRESIA FOLICULAR.....	32
2.8	BIOTECNOLOGIAS UTILIZADAS NO AUXÍLIO DA COMPREENSÃO E ESTUDO DA FOLICULOGÊNESE	34
2.9	CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS.....	36
3.0	CRIOPRESERVAÇÃO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS INCLUSOS EM TECIDO OVARIANO	40
3.0.1	Agentes Crioprotetores	42
3.1	IMPORTÂNCIA DO CULTIVO <i>IN VITRO</i> E CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO DE OVÁRIOS SOBRE A PRESERVAÇÃO DA FERTILIDADE	44
	REFERÊNCIAS	47
3	OBJETIVOS	58
3.1	OBJETIVO GERAL	58
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICO	58

4	ARTIGO A – EFEITOS DE DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> SOBRE O CRESCIMENTO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIIS DE OVÁRIOS BOVINOS..... 59 INTRODUÇÃO..... 61 MATERIAL E MÉTODOS 62 <i>Obtenção e transporte dos ovários.....</i> 62 <i>Cultivo in vitro de folículos pré-antrais e protocolo experimental</i> 63 <i>Preparação do Gel de Agarose.....</i> 64 <i>Processamento histológico</i> 65 <i>Análise da morfologia e crescimento folicular.....</i> 70 <i>Morfometria dos folículos pré-antrais cultivados in vitro.....</i> 74 <i>Avaliação da proliferação de células da granulosa (AgNOR).....</i> 76 <i>Análise de espécie reativa de oxigênio (EROs).....</i> 77 <i>Análise estatística</i> 68 RESULTADOS 81 DISCUSSÃO..... 73
5	ARTIGO B – AVALIAÇÃO DA CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO OVARIANO BOVINO POR ANÁLISE DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO, TOXICIDADE, MORFOMETRIA E MORFOLOGIA..... 85 INTRODUÇÃO..... 87 MATERIAL E MÉTODOS 88 <i>Obtenção e transporte dos ovários.....</i> 88 <i>Teste de toxicidade.....</i> 88 <i>Vitrificação do tecido ovariano</i> 89 <i>Aquecimento.....</i> 90 <i>Cultivo de folículos pré-antrais após aquecimento</i> 90 <i>Processamento histológico</i> 91 <i>Análise da morfologia e crescimento folicular.....</i> 91 <i>Morfometria dos folículos pré-antrais cultivados in vitro.....</i> 92 <i>Análise de espécie reativa de oxigênio (EROs).....</i> 92 <i>Análise estatística</i> 93 RESULTADOS 70

	DISCUSSÃO	103
	REFERÊNCIAS	106
6	CONCLUSÕES	113
	APÊNDICES	114
	APÊNDICE A – Produção acadêmica desenvolvida durante o doutorado.....	115

1 INTRODUÇÃO

A reprodução animal incide diretamente na eficiência e rentabilidade econômica de um rebanho, sendo considerada um dos fatores de maior importância para os sistemas de produção. Conseqüentemente, o desenvolvimento e a utilização de biotecnologias são indispensáveis para o aumento da eficiência reprodutiva, do melhoramento genético, da produção de alimentos e geração de riquezas (Figueiredo et al., 2011). Nas últimas décadas várias foram as biotécnicas associadas à reprodução animal que apresentaram um grande potencial para a geração de genética, especialmente, ao que se referem aos avanços da reprodução assistida. O termo reprodução assistida incorpora uma ampla gama de tecnologias que são usadas para aumentar a probabilidade de obter uma gestação após a coleta e o manuseio direto de oócitos, espermatozoides e/ou embriões resultantes da produção *in vitro* (Kaser et al., 2019).

A base das biotécnicas reprodutivas é a fecundação *in vitro* e a transferência de embriões, no entanto outras biotecnologias podem ser inseridas neste contexto, tais como a clonagem, a transgenia animal e a manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA). Esta última apresenta como princípio o isolamento, o desenvolvimento *in vitro* e/ou preservação de folículos ovarianos na fase pré-antral (Figueiredo et al., 2018). Até o momento, a espécie murina alcançou os resultados mais promissores com a utilização desta técnica ao obter nascimento de produtos vivos (O'Brien et al., 2003).

Apesar dos avanços conquistados e do acréscimo de pesquisas referentes às biotecnologias, a fisiologia ovariana ainda não está totalmente esclarecida (Leitão et al., 2014), o que a torna um assunto intensamente estudado pela sua importância na pesquisa fundamental, no incremento da produção zootécnica com fins comerciais e como modelo para diversas áreas da Medicina Humana. Neste contexto, a utilização da MOIFOPA, possibilitaria desvendar alguns paradigmas que envolvem o início da foliculogênese, os quais abrangem os folículos ovarianos localizados na fase de quiescência, ativação e crescimento inicial até a liberação de oócitos (Figueiredo et al., 2008; Figueiredo et al., 2018). Além da possibilidade de contribuir para os avanços na reprodução assistida de humanos, nos aspectos de preservação da fertilidade em pacientes destinadas ao tratamento de infertilidade ou enfermidades como o câncer (Figueiredo; Lima, 2017).

Assim, o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais pode propiciar novas investigações quanto as diferentes substâncias associadas ao desenvolvimento folicular, além

de permitir o aumento do potencial reprodutivo devido a diminuição da atresia folicular ocorrida *in vivo*. Do mesmo modo, o estabelecimento de um método para o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais seria a chave para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na regulação do início da foliculogênese e no controle do desenvolvimento dos folículos ovarianos. Não obstante, a criopreservação de folículos pré-antrais se tornou importante estratégia para a preservação do material genético, principalmente, como alternativa para a estocagem de grande número de oócitos imaturos de um único animal (Figueiredo et al., 2018).

Diante do exposto, torna-se essencial o desenvolvimento de um sistema eficiente de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos capaz de permitir o desenvolvimento e a maturação completa dos oócitos inclusos em folículos pré-antrais. Outro ponto fundamental é o estabelecimento de uma estratégia de criopreservação de fragmentos ovarianos como alternativa para obtenção de folículos viáveis e preservação da fertilidade. Após uma breve revisão de literatura, apresentaremos neste trabalho um sistema de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais e a vitrificação de folículos inclusos em tecido ovariano capazes de promover um modelo viável para reprodução assistida animal e humana.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MORFOLOGIA OVARIANA EM MAMÍFEROS

O ovário dos mamíferos exerce funções essenciais para o sistema reprodutivo de uma fêmea, sendo responsável por: 1) produção e secreção de hormônios, os quais são responsáveis pelo desenvolvimento folicular, manutenção do trato reprodutivo, ciclo estral e outras funções hormonais (Hirshfield, 1991; Araújo et al., 2014) e; 2) produção, diferenciação e liberação de um oócito maduro para fecundação (Mcgee; Hsueh, 2000). O formato do ovário varia de acordo com a espécie animal e o estágio do ciclo estral. Nos ruminantes, especificamente nos bovinos, os ovários apresentam formato ovalado/elíptico com peso entre 10 a 20 g na idade adulta. O comprimento pode variar de 3,0 a 4,5 cm e a largura de 1,5 a 2,0 cm (Hafez; Hafez 2004).

Os ovários são constituídos por duas regiões, classificadas em córtex e medula ovariana, e está circunscrito por epitélio germinativo ou superficial que está apoiado sob uma membrana basal (Silva, 2005). Estes diferentes tipos celulares encontrados no córtex ovariano, podemos citar as células da granulosa que se caracterizam em células do cúmulo ou murais, enquanto, as células da teca se diferenciam em camada interna e externa (Erickson; Shimasaki, 2003). Além disso, o córtex ovariano localizado na porção mais externa representa a região funcional do ovário. A região cortical é composta por folículos ovarianos e corpos lúteos (*corpus albicans* e corpos hemorrágicos; Figura 1) em vários estágios de desenvolvimento ou atresia, assim como, por tecidos conectivos (colágeno – do tipo I e III, fibras reticulares e fibroblasto; Silva, 2005).

A região medular, na maioria das espécies, está localizada mais internamente e apresenta um arranjo irregular de tecido nervoso, vascular (sanguíneo e linfático), tecido fibroblástico e conjuntivo, o qual se comunica com o ovário através do hilo (Figura 1; Silva, 2005). Sua função consiste na sustentação e nutrição do ovário (Hafez; Hafez 2004). Durante a vida reprodutiva de uma fêmea a funcionabilidade do ovário é influenciada pela interação exata entre os fatores endócrinos, autócrinos e parácrinos, que juntos, atuam no processo de desenvolvimento folicular e oocitário, conhecido como foliculogênese e oogênese, respectivamente (Atwood; Meethal, 2016; Monniaux et al., 2018).

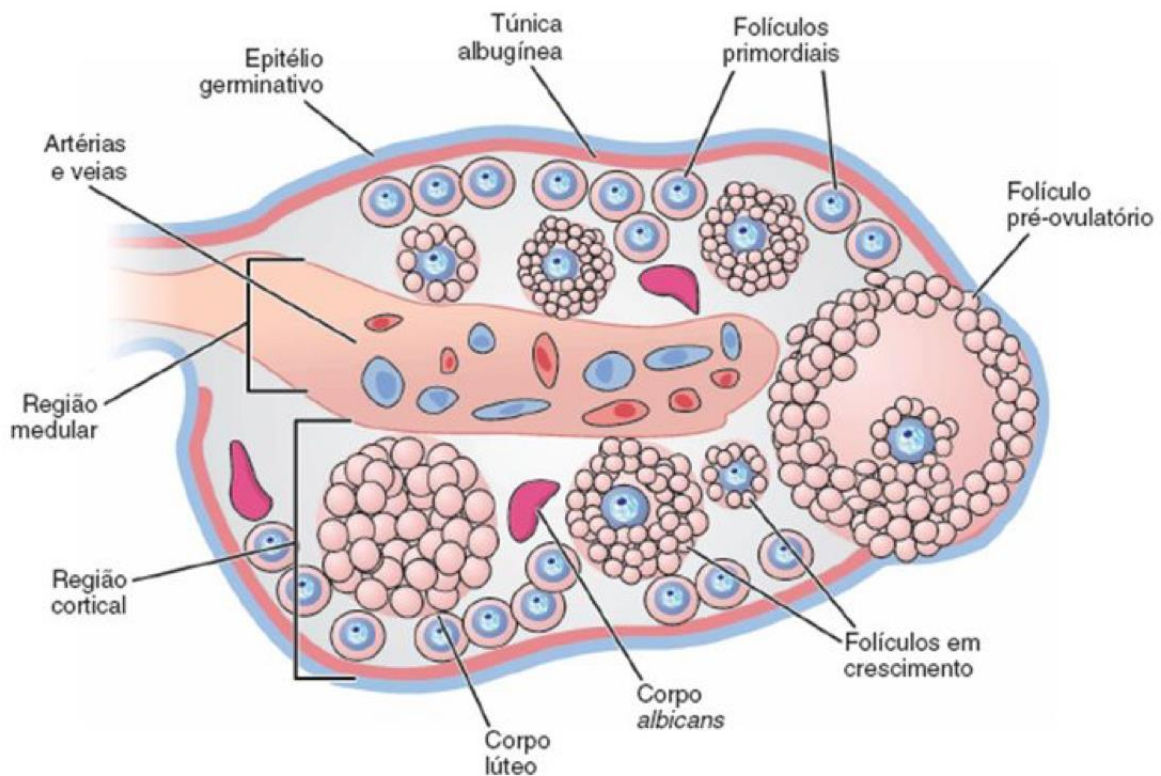


Figura 1 - Esquema representativo do ovário e suas estruturas fundamentais

Fonte: <https://slideplayer.com.br/slide/1670121/>

2.2 OOGÊNESE

A oogênese consiste na formação e modificação das células germinativas primordiais até alcançar o estágio de formação do oócito haploide (Figura 2; Rüsse, 1983; Hannon; Curry, 2018). Este processo ocorre ainda durante a vida fetal juntamente com a foliculogênese e, apenas alguns dos oócitos presentes no *pool* de reserva conseguirão atingir o processo de desenvolvimento até a fecundação (Wassarman 1988; Bessa; Dode, 2013). Sabe-se que as fêmeas nascem com um estoque de oócitos pré-estabelecido (Saumande, 1991; Figueiredo et al., 2008).

Na vida uterina, durante a fase de embrião, as células germinativas primordiais, localizadas no saco vitelínico, deslocam-se para as gônadas em desenvolvimento para se transformarem em oogônias, com remanejamento das organelas citoplasmáticas, proliferação celular acentuada e a perda das características de motilidade (Sadeu et al., 2006; Bessa; Dode, 2013).

Após as múltiplas divisões mitóticas das células germinativas primordiais originam-se dois tipos diferentes de células. A primeira linhagem de células germinativas tem

por início imediato sucessivas divisões mitóticas originando as células nomeadas de oogônias (Hannon; Curry, 2018). Enquanto que a segunda, permanece em interfase e darão origem às novas células germinativas que posteriormente se diferenciarão em oócitos (Hirshfield, 1991).

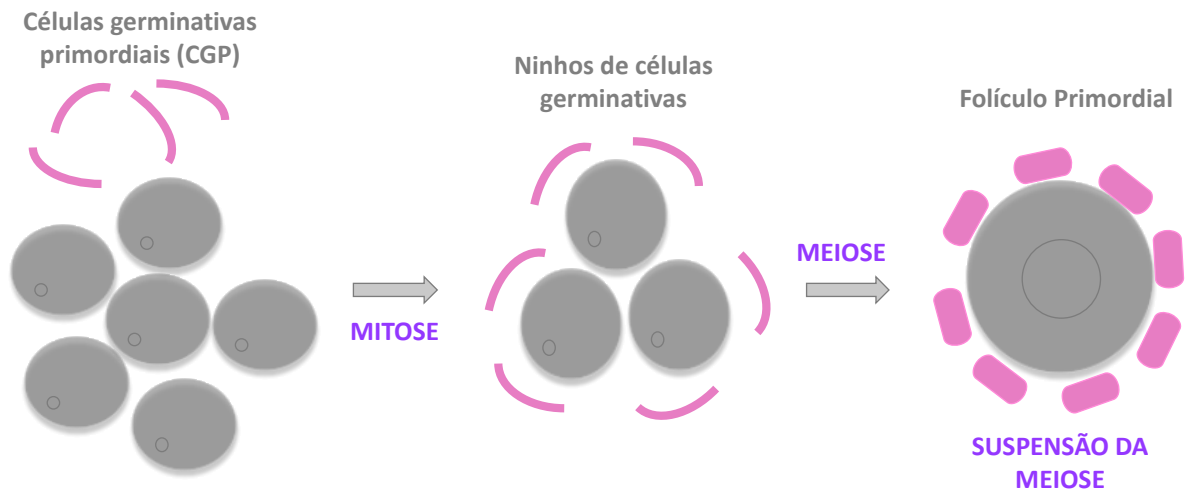


Figura 2 - Representação esquemática da formação das células germinativas primordiais (CGP) e oogênese

Fonte: Adaptado de Sánchez, Smitz (2012).

Como continuação do processo de oogênese, as células que se encontram em estágio de primeira divisão meiótica apresentam interrupção dessa divisão e a constituição de oócitos primários, que persistem neste estágio até a puberdade (Hirshfield, 1991). Ao atingir a puberdade, ocorrem estímulos que determinam o momento da ovulação, isso é possível pelo pico do hormônio luteinizante (LH) e declínio das concentrações do hormônio folículo estimulante (FSH); neste momento, os oócitos retomam a meiose do estágio de prófase I (Gordon, 1994). Posteriormente, acontece o rompimento da vesícula germinativa, na qual sucedem as seguintes etapas, metáfase I, anáfase I e telófase I, com a extrusão do primeiro corpúsculo polar e o desenvolvimento do oócito secundário (Betteridge et al., 1989).

Subsequentemente, inicia-se a segunda divisão meiótica, na qual o núcleo do oócito se desenvolve até atingir o estágio de metáfase II. Este é o momento da segunda interrupção da meiose (Gordon, 1994). O oócito continua neste estágio até a chegada do espermatozoide para a fecundação. Caso haja a fecundação, o oócito prossegue a meiose (Betteridge et al., 1989) e finaliza a oogênese com a extrusão do segundo corpúsculo polar, culminando com a formação do oócito haploide fecundado (Gordon, 1994; Moore; Persaud 1994).

2.3 FOLICULOGÊNESE

Mesmo com os inúmeros estudos e o desenvolvimento de diversas técnicas reprodutivas, as informações existentes sobre o processo de foliculogênese, principalmente relacionados aos folículos pré-antrais, aos mecanismos de maturação e a atresia folicular ainda são pouco compreendidos (Figueiredo et al., 2008; Silva-Santos et al., 2014). O início da foliculogênese na maioria das espécies ocorre no decorrer da vida fetal, com a formação da reserva de folículos primordiais quiescentes, os quais são fisiologicamente estimulados a um crescimento sequencial e coordenados tanto pelo eixo hipotalâmico/hipofisário quanto pelos ovários (Monniaux et al., 2018). Este processo de crescimento é ajustado pela presença de hormônios esteroides sintetizados pelos ovários, por fatores de crescimento e pela atividade das gonadotrofinas produzidas pelos próprios folículos (Lima-Verde et al., 2011).

O processo da foliculogênese é definido como a formação, o desenvolvimento e a maturação folicular. Inicia-se com a formação do folículo primordial e culmina no último estágio de desenvolvimento, com o folículo no ápice da maturação, também denominado como folículo dominante ou pré-ovulatório (Figueiredo et al., 2008; Rossetto et al., 2011; Rossetto et al., 2013). A formação dos folículos primordiais ocorre no momento em que os oócitos são individualizados pela separação dos cordões das células germinativas (Figura 3; Bristol-Gould; Woodruff, 2006; Bessa; Dode, 2013).

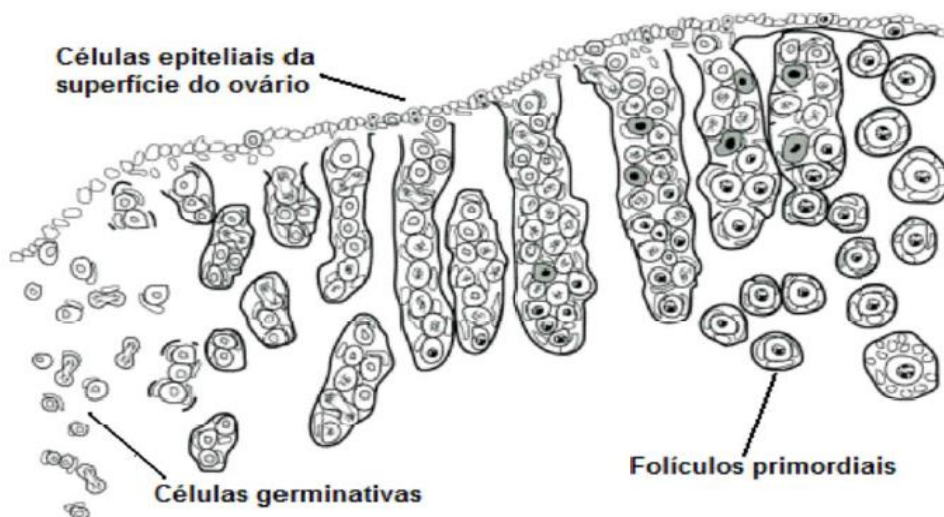


Figura 3 - Esquema ilustrativo da origem dos folículos primordiais a partir das células germinativas presentes nos ovários

Fonte: Adaptado de Juengel et al. (2002).

Por padrão, os folículos primordiais quiescentes selecionados para se desenvolverem durante o processo de recrutamento inicial se tornam folículos primários. Esses folículos primários continuam a se desenvolver para se tornarem folículos secundários e então terciários com o surgimento de uma cavidade para posteriormente atingirem o ápice do desenvolvimento até folículo antral pré-ovulatório (Hannon; Curry, 2018).

2.4 CLASSIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS FOLÍCULOS OVARIANOS

O folículo é a unidade morfológica e funcional responsável por proporcionar um ambiente apropriado para manutenção e viabilidade, além do crescimento e maturação do oócito para o processo de ovulação (Figueiredo et al., 2008; Lima; Santos, 2010; Rossetto et al., 2013).

A população de folículos presente nos ovários é muito heterogênea (Saraiva et al., 2011). A composição do folículo ovariano consiste num oócito circundado por células somáticas (granulosa e tecais). Assim, os folículos podem ser classificados em relação aos aspectos morfológicos e grau de evolução em: 1) folículos pré-antrais ou não cavitários e 2) folículos antrais ou cavitários (Figueiredo et al., 2007). Os folículos ovarianos pré-antrais são classificados como primordiais, primários e secundários; e os folículos antrais compreendem os folículos terciários e pré-ovulatórios (Figura 4; Hulshof et al., 1994; Figueiredo et al., 2008; Lima-Verde et al., 2011).

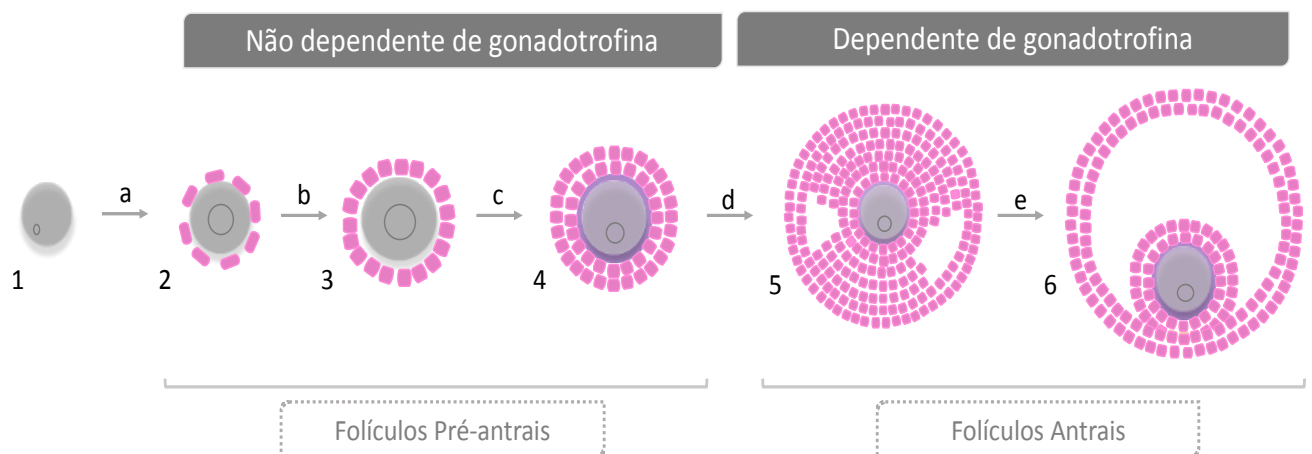


Figura 4 - Representação do desenvolvimento dos folículos ovarianos de acordo com caracterização folicular. 1. Oogônias. 2. Folículo Primordial. 3. Folículo Primário. 4. Folículo Secundário. 5. Folículo Terciário. 6. Folículo Pré-ovulatório. a: Formação folicular. b: Ativação. c: Crescimento folicular. d: Crescimento folicular. e: Dominância folicular

Fonte: Adaptado de Lisboa et al., 2015.

Ainda é possível classificar os folículos pré-antrais de acordo com o grau de viabilidade, em folículos íntegros com a lâmina basal, vesícula germinativa e nucléolos intactos, e oócito com menos de três vacúolos citoplasmáticos; e em folículos atrésicos ou degenerados, com o oócito com mais de três vacúolos citoplasmáticos e começo da descondensação da cromatina, ou em estágios mais avançados, com oócito com o nucléolo e o citoplasma em fragmentação e condensação da cromatina elevada, ou ainda com o oócito completamente fragmentado ou ausente (Butler, 1970; Wandji et al., 1996; Salomon et al., 2018).

Durante a foliculogênese, a morfologia folicular é alterada, visto que o oócito cresce e as células da granulosa circundantes se multiplicam e se diferenciam (Bristol-Gould; Woodruff, 2006; Lima-Verde et al., 2011). Durante a fase fetal, alguns folículos primordiais são ativados, crescem e se diferenciam em folículos primários, secundários ou terciários, enquanto que apenas alguns folículos atingirão o estágio de folículo pré-ovulatório na vida pós-natal sob o efeito de hormônios (Fortune, 1994; Monniaux et al., 2018).

2.4.1 Folículos Pré-antrais

Os folículos pré-antrais são classificados em primordiais, primários e secundários, de acordo com o formato, tamanho e o número de camadas das células da granulosa que envolve o oócito imaturo (Bessa; Dode, 2013). Assim, o desenvolvimento folicular pré-antral precoce está relacionado ao aumento do volume e mudanças no formato das células da granulosa, enquanto que no estágio tardio ocorre o aumento do diâmetro oocitário, bem como, a proliferação das células da granulosa (Figueiredo et al., 1994). O crescimento folicular destes folículos apresentam pelo menos duas camadas de células da granulosa e células da teca ao redor da membrana basal (Figura 5; Barnett et al., 2006).

No estágio de folículos pré-antrais, as células da granulosa dos folículos apresentam uma extensiva rede de junções do tipo gap, os quais são canais membranários que possibilitam a passagem de íons inorgânicos, nutrientes, pequenos metabólicos e os mensageiros para o interior das células (Kidder; Mhawi, 2002). Por fim, os folículos secundários apresentam como característica o surgimento da zona pelúcida, formada por glicoproteínas que circundam o oócito (Rankin et al., 2001).

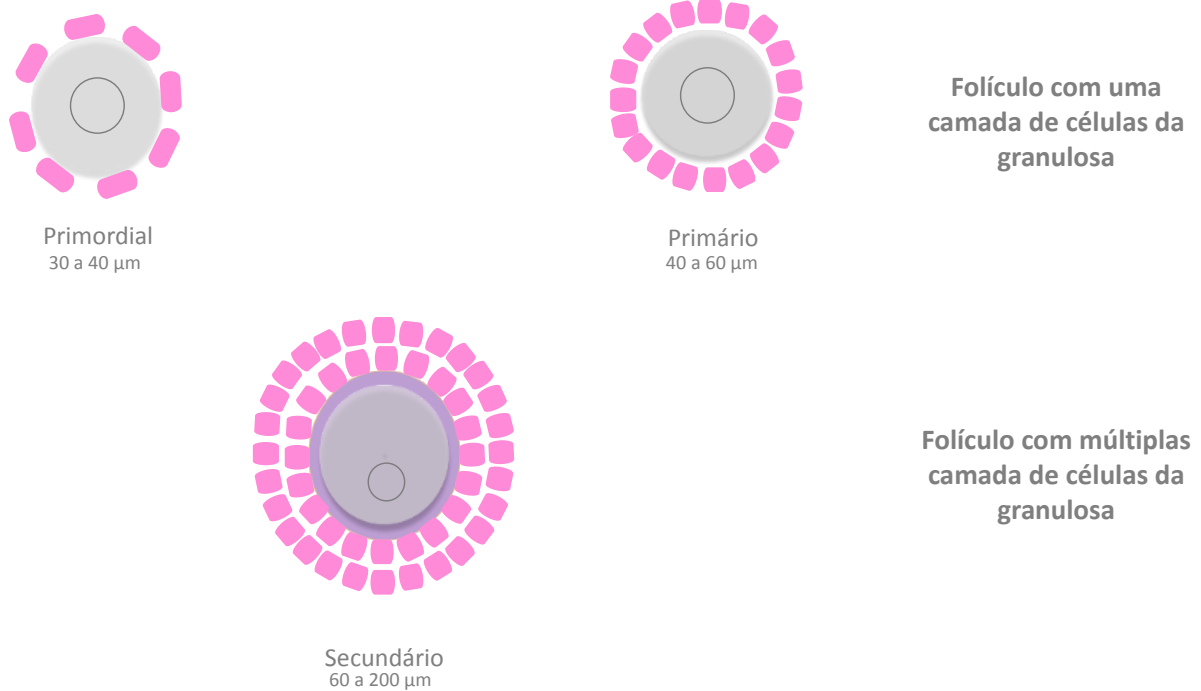


Figura 5 - Alterações celulares em folículos ovarianos pré-antrais que ocorrem durante o desenvolvimento folicular

Fonte: Adaptado de Silva-Buttkus et al. (2008).

2.4.1.1 Folículos Primordiais

Os folículos ovarianos primordiais representam o estágio inicial do desenvolvimento folicular localizados no *pool* de reserva. Durante esta fase alguns folículos serão ativados e iniciarão o processo de crescimento e diferenciação (Telfer et al., 2008). Cada folículo é composto por um oócito rodeado por uma camada de quatro a oito células da granulosa achatada (Hulshof et al., 1994; Fair et al., 1997a). Em bovinos, o diâmetro folicular no estágio primordial pode variar de 30 a 40 μm , com um oócito entre 20 a 25 μm (Beckers et al., 1996).

Nos folículos primordiais, o núcleo do oócito permanece numa posição central evidenciando o nucléolo. Já as organelas estão distribuídas uniformemente pelo citoplasma ou aproximadas ao núcleo. A organela mais evidente e predominantemente redonda é a mitocôndria, enquanto, o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático liso são estruturas pouco desenvolvidas e distribuídas desuniformemente pelo citoplasma (Lucci et al., 2001).

2.4.1.2 Folículos Primários

A atividade proliferativa das células da granulosa dos folículos primários culmina na formação de uma camada de células cuboides ao redor do oócito. Desse modo os folículos primários apresentam um oócito rodeado por uma camada de 11 a 12 células da granulosa em formato cuboide, o diâmetro folicular pode variar de 40 a 70 μm . Os folículos primordiais e primários podem ser facilmente diferenciados pelas alterações morfológicas das células da granulosa (Hulshof et al., 1994).

Os folículos primários são caracterizados por um oócito esférico, mitocôndrias por todo o ooplasma com prevalência do formato arredondado, entretanto, algumas já se mostravam alongadas com cristas transversais. As gotas de lipídeos, complexos de Golgi e retículos endoplasmáticos eram mais frequentes e se localizam mais próximos à membrana nuclear (Basso; Esper, 2002).

2.4.1.3 Folículos Secundários

Por sua vez, quando os folículos atingem o estágio de duas ou mais camadas das células da granulosa cuboidais, são então denominados de folículos secundários. Em bovinos, os folículos secundários apresentam diâmetro de 60 a 200 μm (Beckers et al., 1996). No decorrer do crescimento do folículo secundário as fibras de tecido conectivo se posicionam paralelamente à membrana basal para formar a camada tecal.

Nos folículos secundários o núcleo do oócito está disposto em uma posição excêntrica, diferente dos folículos primordiais posicionados na região central. Assim, o núcleo do oócito estará situado entre a zona pelúcida e o centro do oócito; as organelas também se deslocam para a periferia do folículo (Hyttel et al., 1997). A zona pelúcida é composta por pequenos microvilos e está localizada entre o oócito e as células da granulosa. Com o desenvolvimento folicular o espessamento da zona pelúcida torna-se visível (Lucci et al., 2001; Rossetto et al., 2011).

2.4.2 Folículos Antrais

Os folículos denominados antrais são caracterizados pela organização das células da granulosa em diversas camadas com a formação de uma cavidade repleta de fluido folicular, denominado de antro (Bessa; Dode, 2013). O líquido folicular que compõe esta

cavidade possui água, proteínas séricas, eletrólitos e altas concentrações de hormônios esteroides secretados pelas células da granulosa (Barnett et al., 2006).

Dentro da categoria dos folículos antrais estão presentes os folículos terciários e pré-ovulatórios. Como mencionado, a principal característica dos folículos antrais consiste no surgimento do antro folicular. Os folículos terciários são constituídos de um oócito circundado pela zona pelúcida, uma pequena cavidade antral e várias camadas de células tecais (Gordon, 1994). São caracterizados pela presença de muitas microvilosidades dentro da zona pelúcida, bem como grande quantidade de mitocôndrias arredondadas e alongadas e partículas lipídicas (Fair et al., 1997b), enquanto, os folículos pré-ovulatório representam o estágio final do desenvolvimento folicular. Neste caso, há o predomínio de mitocôndrias arredondadas, além disso, é possível visualizar mitocôndrias encapuzadas, caracterizado como o crescimento completo do oócito em bovinos (Hyttel et al., 1997).

2.5 POPULAÇÃO FOLICULAR

Estima-se que a população folicular seja variável entre as espécies. Na espécie bovina, a população folicular ao nascimento está em torno de 235.000 de folículos por ovário (Erickson, 1966; Silva-Santos et al., 2011), enquanto que nos caprinos e ovinos este número pode variar entre 37.646 (Lucci et al., 1999) e 160.000 (Driancourt et al., 1991) folículos, respectivamente.

Tendo em vista essa variação quanto à população folicular, existem diferentes fatores que podem influenciar diretamente o número de folículos presentes no ovário, como variação individual, raça (*Bos indicus* - Nelore e *Bos taurus* - Aberdeen Angus; Silva-Santos et al., 2011; 2014), idade (Rüsse, 1983), genética (Erickson, 1966), níveis hormonais (Peters, 1976), estado nutricional (Scaramuzzi et al., 1993; Szlachta; Tischner, 2008) e reprodutivo (Silva-Santos et al., 2014).

A população folicular dos ovários é composta por mais de 90% de folículos pré-antrais, e está localizada no córtex ovariano (Tassel; Kennedy, 1980). A população de folículos primordiais, presentes no *pool*, representa aqueles em quiescência, os quais estão diretamente relacionados com a renovação contínua dos folículos antrais no ovário (Guibault et al., 1986). Ainda, a população de folículos antrais é altamente variável entre os indivíduos, todavia, mantém-se alta repetibilidade individual (Burns et al., 2005; Ireland et al., 2008). A variação entre a população antral nos indivíduos adultos é altamente expressiva, e está

relacionada positivamente com os índices de fertilidade e a função ovariana (Ireland et al., 2009).

Ao deixarem a fase de quiescência, os folículos sofrem um processo sequencial de crescimento regulado pela presença de hormônios e fatores de crescimento. Ao iniciar o processo de foliculogênese o objetivo é a liberação de um oócito maduro, pronto para a fecundação (Rossetto et al., 2011). Assim, essa reserva representativa dos folículos existente nos ovários, conhecido como *pool* de folículos pré-antrais, pode significar um material genético destinado para a manipulação, preservação das espécies e até para o tratamento de infertilidade (Picton, 2001).

2.6 CRESCIMENTO E ATIVAÇÃO FOLICULAR

O crescimento folicular tem como início a ativação dos folículos primordiais pela passagem dos folículos encontrados no *pool* de reserva ou folículos quiescentes para o *pool* de crescimento (Rüsse, 1983). No momento em que o folículo deixar a reserva, crescerá até ovular ou sofrerá atresia folicular (Mayer et al., 2004; Lima-Verde et al., 2011).

O primeiro sinal de ativação folicular é marcado pela proliferação das células da granulosa (Figura 6). As células da granulosa dos folículos primordiais em crescimento gradualmente adquirem o formato cuboide, tornando-se folículos em estágio de transição, caracterizados pela presença de ambos os formatos das células da granulosa, achatadas e cuboides, e, subsequentemente, formando os folículos primários, com a presença de uma camada de células da granulosa cuboides em torno do oócito (Gougeon; Busso, 2000; Silva-Buttkus et al., 2008).

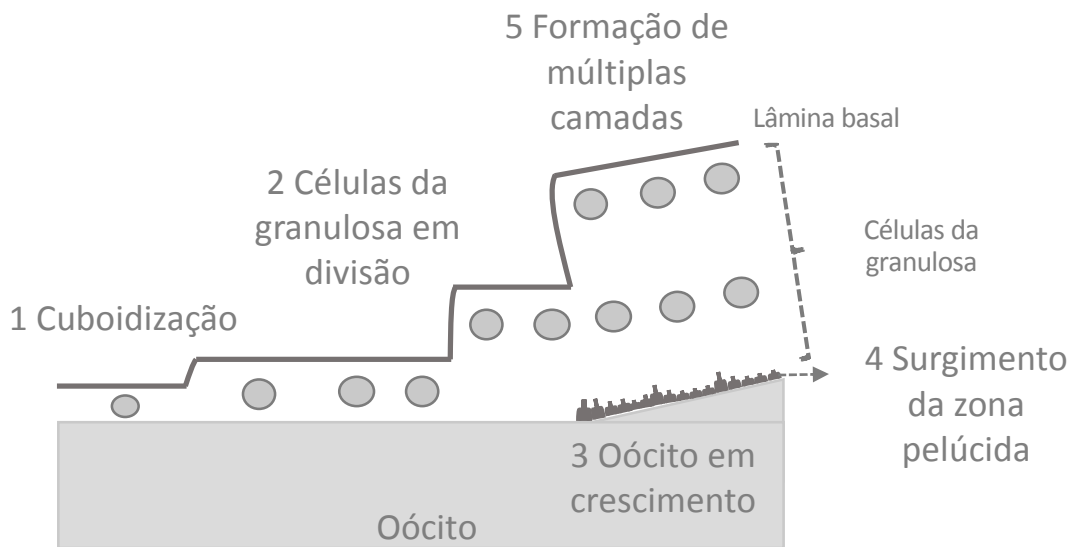


Figura 6 – Fases de transição das células da granulosa durante o crescimento folicular

Fonte: Adaptado de Silva-Buttkus et al. (2008)

As alterações que ocorrem durante o crescimento dos folículos consistem na mudança do formato das células da granulosa, além do aumento considerável do volume citoplasmático e nuclear do oócito (Hirshfield, 1991, Silva-Buttkus et al., 2008). Os mecanismos e fatores responsáveis pela ativação dos folículos no estágio primordial, bem como aqueles envolvidos na variação do período durante o início do crescimento folicular ainda são desconhecidos (Rajabi et al., 2018).

2.7 ATRESIA FOLICULAR

Os folículos ovarianos que chegam ao estágio ovulatório são poucos, em consequência do processo de atresia. Estima-se que aproximadamente 99,9% dos folículos ovarianos sofrem degeneração ou apoptose durante o desenvolvimento, denominado atresia folicular. Com isso, considera-se o ovário um órgão de baixa produtividade (Johnson, 2003).

A atresia folicular pode ser influenciada por diferentes fatores, tais como, idade, ciclo reprodutivo, lactação, gestação, hormônios, nutrição e isquemia (Ingram, 1962; Mcgee; Horne, 2018). No início do processo de degeneração, pode ser possível a ausência de sinais de degeneração dos oócitos e a viabilidade de algumas células da granulosa em folículos atrésicos, o qual possibilita a recuperação dos folículos e sugerem a retomada da ovulação (Hirshfield, 1991). Embora seja um fenômeno natural, independente da fase que ocorra, o processo de atresia encurta de maneira significativa o número de oócitos viáveis durante a vida reprodutiva do animal (Mcgee et al., 2018).

A atresia ocorre por duas vias, a via degenerativa (Rodrigues et al., 2010) e/ou pela via apoptótica (Figueiredo et al., 1995; Mcgee; Horne, 2018). Uma das principais causas da morte celular por degeneração é a isquemia (Farber, 1982). Isto ocorre pela diminuição da síntese de ATP que afeta o funcionamento da bomba Na^+/K^+ localizada na membrana celular. Com a evolução do processo degenerativo e/ou morte celular é identificada histologicamente (Barros et al., 2001).

Durante a década de 80, a atresia foi postulada por um processo de morte celular programada caracterizada por apoptose (Tsafiri; Braw, 1984). Após alguns estudos, evidências demonstraram que a apoptose celular consiste no principal mecanismo bioquímico responsável pela atresia (Markström et al., 2002). A principal modificação ressaltada na atresia é a condensação da cromatina do núcleo (Silva-Buttkus et al., 2008). Muitas características morfológicas decorrentes da apoptose são observadas em oócitos e células da granulosa. Nos folículos pré-antrais, as primeiras alterações que indicam atresia acontecem no oócito, como a retração da cromatina nuclear e a fragmentação oocitária (Morita; Tilly, 1999). As alterações das células da granulosa presentes nestes folículos são encontradas raramente. Ao se desenvolver, o oócito do folículo se encontra altamente resistente, no qual alterações indicativas de atresia são primeiramente observadas nas células da granulosa (Silva-Buttkus et al., 2008).

O processo de apoptose folicular é dependente de uma regulação conjunta de diferentes fatores autócrinos, endócrinos e parácrinos. Ainda, pelo balanço entre os fatores que possibilitam a sobrevivência ou aqueles que induzem a apoptose o folículo ovariano será direcionado a um destes destinos, continuar o desenvolvimento ou sofrer atresia (Hsu; Hsueh, 2000). Os métodos importantes na identificação da qualidade folicular consistem nas técnicas de histologia clássica e microscopia eletrônica de transmissão. Na análise da histologia clássica, as alterações que indicam atresia dos folículos pré-antrais ocorrem primeiramente no oócito, pela picnose nuclear como primeiro sinal de degeneração (Wood; Montali, 1997). Nas características ultraestruturais, os oócitos inclusos em folículos primordiais degenerados têm um aumento progressivo de vacúolos citoplasmáticos e retração oocitária, eventos que antecedem as alterações nas células da granulosa. Além disso, as células da granulosa tornam-se túrgidas e diminuem o número de organelas do citoplasma (Tassel; Kennedy, 1980), enquanto que nos folículos antrais, as alterações são a picnose nuclear e a vacuolização citoplasmática que acontecem primeiramente nas células da granulosa (Hay et al., 1976). Posteriormente, ocorre o surgimento de degeneração nas células tecais (O'shea et al., 1978) e, por fim, no oócito (Hay et al., 1976; Mcgee; Horne, 2018).

2.8 BIOTECNOLOGIAS UTILIZADAS NO AUXÍLIO DA COMPREENSÃO E ESTUDO DA FOLICULOGÊNESE

Para uma expansão sólida de todo o universo tecnológico vinculado à reprodução, a base fundamental de toda a fisiologia feminina é a foliculogênese. Por esta razão, o interesse sobre o tema tem aumentado consideravelmente nos últimos anos (Andrade et al., 2012; Bizarro-Silva et al., 2018). Somando-se aos aspectos dinâmicos da aplicação de tais biotécnicas, o estudo da foliculogênese apresenta-se em momento extremamente importante, principalmente para as bases para a aplicação de técnicas destinada a reprodução assistida (Vieira, 2012; Andrade et al., 2012). Atualmente, o crescimento produtivo da pecuária tem requerido novos conhecimentos técnicos e científicos para desenvolvimento de novas tecnologias. Avanços tecnológicos dirigidos aos diversos segmentos repercutem no aumento da produção animal, sendo que as biotecnologias reprodutivas têm uma atuação específica na obtenção de animais de qualidade elevada em um maior número de descendentes (Lima; Santos, 2010).

As biotecnologias da reprodução surgiram em razão aos conhecimentos dos mecanismos envolvidos no controle da fisiologia reprodutiva, desde os níveis molecular, celular e endócrino (Neves et al., 2010). O progresso da biotecnologia iniciou-se quando Watson e Crick estudaram o modelo de dupla hélice do DNA em 1953 (Vieira, 2012). A utilização de biotécnicas aplicadas com sucesso na reprodução animal consiste de tecnologias como, inseminação artificial, fecundação *in vitro* e a transferência de embriões (Sánchez; Smitz, 2012). Outras tecnologias reprodutivas também são passíveis de serem aplicadas em grande escala como a clonagem e a manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA, Lima; Santos, 2010).

Ao considerar que uma mínima parcela dos folículos se desenvolve até o processo de ovulação, foi desenvolvida uma biotécnica de manipulação oocitária, conhecida como MOIFOPA, a qual pretende recuperar os oócitos inclusos nos folículos e os cultivá-los *in vitro* até sua maturação completa. (Eppig; O'brien, 1996; Lima; Santos, 2010). Esta técnica, apresenta como base o isolamento ou resgate de folículos pré-antrais a partir de ovários; a conservação para estocagem por curto (resfriamento) ou por longo período (congelamento); e o cultivo folicular com a finalidade de desenvolver o crescimento, maturação e fecundação *in vitro* dos oócitos previamente inclusos em folículo pré-antrais (Figueiredo et al., 2007; Lima; Santos, 2010).

Com o objetivo de ampliar o conhecimento sobre a foliculogênese, o cultivo de folículos ovarianos *in vitro* e a criopreservação do tecido ovariano destaca-se como uma biotécnica extremamente útil para esclarecer vários aspectos pouco compreendidos da gônada feminina. Apresentando-se como modelo experimental bastante eficiente, o estudo dos folículos pré-antrais pode ser a chave para a melhor compreensão dos muitos desafios atuais, quanto à ativação e o controle do desenvolvimento dos folículos ovarianos (Anckaert et al., 2013). Portanto, a aplicação da MOIFOPA para a produção *in vitro* proporcionaria a utilização de oócitos maduros de animais com alto valor agregado, e ainda, aqueles em processo de extinção, em grande escala. Ainda, contribuiria para a padronização das biotecnologias como fertilização *in vitro*, transgenia e a clonagem através da utilização de oócitos obtidos por esta biotecnologia (Figueiredo et al., 2008; Lima; Santos, 2010; Lisboa et al., 2015).

2.9 CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAI

Vários sistemas de cultivo foram desenvolvidos nas últimas duas décadas, e os resultados variam de acordo com o tipo de meio, método de cultivo e principalmente da espécie estudada (Fortune, 1994). Entretanto, até o momento, não foi possível identificar em ruminantes um sistema de cultivo de folículos ovarianos eficiente em promover o desenvolvimento completo dos folículos pré-antrais (Figueiredo et al., 2008; Lisboa et al., 2015). Os sistemas de cultivo rotineiramente adotados (Figura 7) são o cultivo de folículos pré-antrais inclusos no próprio tecido ovariano (cultivo *in vitro in situ*) ou na forma isolada (cultivo *in vitro* isolado; Hartshorne, 1997). Além disso, esses dois tipos de cultivo podem ser combinados, realizando primeiramente os procedimentos do cultivo *in situ*, para obtenção de um maior número de folículos pré-antrais em desenvolvimento, e posteriormente, os folículos seriam isolados e cultivados *in vitro* até a completa maturação (Telfer et al., 2008; Araújo et al., 2014).

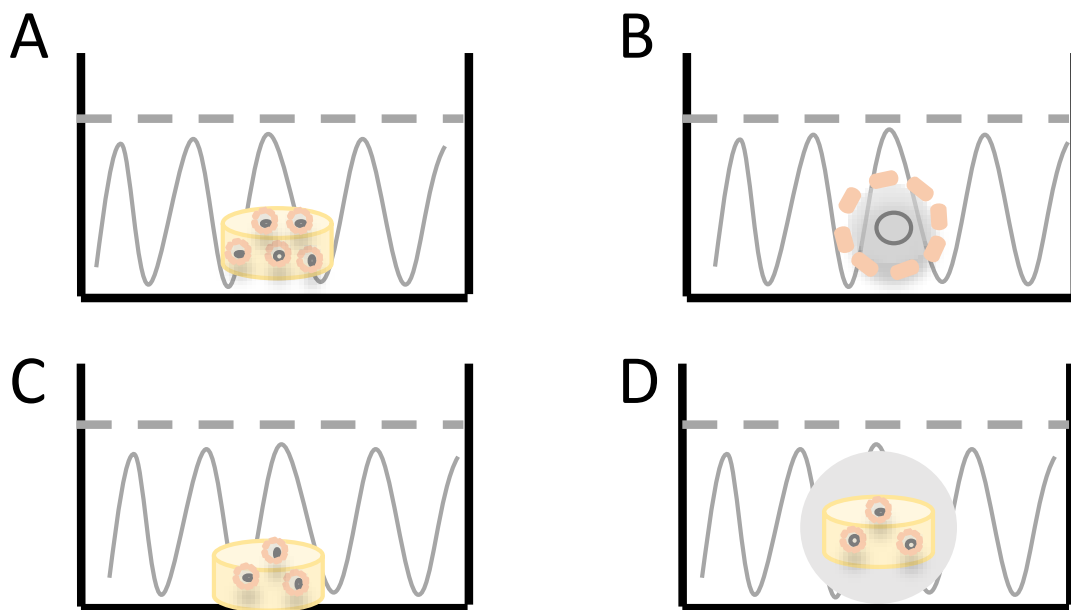


Figura 7 – Representação esquemática dos sistemas de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais. (A) Cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais envoltos em tecido ovariano (*in situ*). (B) Cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais isolados. (C) Cultivo *in vitro* no sistema Bidimensional. (D) Cultivo *in vitro* no sistema Tridimensional.

Fonte: Adaptado de Lisboa et al., 2015.

Sistemas de cultivo *in situ* (fragmentos do córtex ovariano) apresentam a vantagem de manter o contato celular possibilitando a interação intercelular entre folículos e células adjacentes (células estromais/tecas e células da granulosa), que podem influenciar seu crescimento. Também, proporcionam a integridade tridimensional dos folículos por evitar a exposição prolongada das células ao ambiente externo (Abir et al., 2006; Green; Shikanov, 2016). Além de ser um método fácil para cultivar os folículos, o sistema *in situ* parece facilitar a ativação espontânea de folículos primordiais além de permitir o cultivo de um grande número de folículos pré-antrais (Braw-Tal; Yossefi, 1997; Araújo et al., 2014).

Enquanto que o sistema de cultivo isolado necessita de métodos para isolar os folículos presentes no córtex ovariano. Os métodos desenvolvidos para o isolamento dos folículos ovarianos são o isolamento mecânico e/ou enzimático (Figueiredo et al., 2008; Figueiredo et al., 2018). Embora os folículos pré-antrais nos estágios primordiais e primários possam ser facilmente isolados em ovários bovinos usando métodos mecânicos ou enzimáticos, na maioria das vezes folículos secundários pequenos (diâmetro $\leq 150 \mu\text{m}$) e grandes (diâmetro $> 150 \mu\text{m}$) apresentam predileção para este sistema de cultura *in vitro* (Rossetto et al., 2013). Após o isolamento, os folículos podem ser cultivados, na sua forma intacta, para estudos sob a interferência *in vitro* de fatores de crescimento e hormônios, sendo possível o monitoramento individual durante interação com as células foliculares e a avaliação do desenvolvimento (Silva, 2005; Figueiredo et al., 2007).

Além disso, os folículos pré-antrais podem ser cultivados em um sistema bidimensional (2D) ou tridimensional (3D; Figura 7). No primeiro, os folículos são colocados diretamente sob a placa de cultivo ou uma monocamada de células somáticas (Hirao, 2012), enquanto que o segundo consiste no sistema em que os folículos são totalmente inclusos em uma matriz extracelular (colágeno ou ágar) ou em insertos (Millicell) que permitem que as células cultivadas possam acessar o meio tridimensionalmente. O crescimento, estrutura e função celular imitam mais de perto o que ocorre *in vivo*, sendo capaz de manter a arquitetura original do folículo ovariano (Figueiredo et al., 2018).

De acordo com registros, o primeiro estudo de folículos pré-antrais isolados ocorreu em 1964 em animais de laboratório (camundongo), enquanto Figueiredo et al. (1993) utilizaram a técnica de isolamento em bovinos em 1990. Os estudos empregaram metodologias enzimáticas e mecânicas na década de 60 e 90, respectivamente (Figueiredo et al., 2008). Existem diversos estudos recentes realizados com finalidade de originar *in vitro* o crescimento de folículos pré-antrais *in situ* ou isolado em diferentes espécies (ratas: Sadr et al., 2015; suínos: Nunes et al., 2018; bovinos: Bizarro-Silva et al., 2018; ovinos: Lins et al.,

2017; caprinos: Ferreira et al., 2018; felinos: Vilela et al., 2016, equinos: Max et al., 2018 e humanos: Roy; Albee, 2000).

O desenvolvimento de condições *in vitro* para promover o desempenho folicular e o estudo da foliculogênese pode ser essencial para diminuir a atresia folicular geralmente ocorrida *in vivo* (Alves et al., 2013; Araújo et al., 2014). Assim, com o intuito de incrementar os sistemas de cultivo propôs-se a utilização de um sistema de cultivo bidimensional com uma monocamada de gel de ágar (suporte; Sato et al., 2011) como estrutura física semelhante ao ovário. Este sistema de cultivo em monocamada é capaz de diminuir as perdas durante as manipulações e a integridade folicular é mantida (Costa et al., 2001) tendo assim um diferencial quando comparado ao sistema de cultivo *in vitro* tradicional e tridimensional, sem o uso da monocamada de gel de ágar.

Outro fator essencial para a obtenção de sucesso durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais é a composição do meio. É conhecido que os folículos podem ser influenciados em potencial pelos fatores de crescimento produzidos pelas células do estroma e por outros folículos, ou fatores produzidos dentro dos próprios folículos, fatores de crescimento e hormônios (Fortune, 1994). Em um estudo pioneiro utilizando folículos ovarianos pré-antrais utilizou-se um meio de cultivo base, chamado de controle (MEM+), com a adição de piruvato (0,23 mM), glutamina (2 mM), hipoxantina, suplementado com antibióticos, tais como penicilina - 20 UI/mL e estreptomicina - 200 µg/mL e ITS (insulina - 6,25 µg/mL, transferrina - 6,25 ng/mL e selênio - 6,25 ng/mL), significativamente aumentou a porcentagem de folículos morfológicamente normais de 29,4% (meio controle) para 78,0% (meio tratado; Figueiredo et al., 1994). Logo, a composição do meio de cultivo com a ausência de hipoxantina e outros substratos energéticos, como glutamina e piruvato, mostraram que a sobrevivência dos folículos pré-antrais de bovinos foi reduzida (Figueiredo et al., 1994). Deste modo, o tipo de meio utilizado no cultivo *in vitro* possui grande influência na sobrevivência e no crescimento folicular. O Meio Essencial Mínimo (MEM) é utilizado tanto para o cultivo de tecido ovariano bovino quanto de folículos pré-antrais isolados (Silva et al., 2004; Matos et al., 2007; Rossetto et al., 2013). No entanto, quando os folículos ovarianos são cultivados *in vitro*, são expostos a grande estresse oxidativo em consequência à exposição à luz, às elevadas concentrações de oxigênio e às concentrações variáveis de substratos metabólicos. A adição de um antioxidante ao meio de cultivo pode ser a chave para proteger os folículos do estresse oxidativo durante a ativação e o desenvolvimento *in vitro* (Rodrigues et al., 2010).

Assim, várias investigações no âmbito MOIFOPA contribuíram para o cultivo *in vitro* mostrando que durante o controle do desenvolvimento folicular os hormônios, fatores de crescimento e peptídeos estão envolvidos (Rodrigues et al., 2010; Sánchez; Smitz, 2012). Além disso, os meios de cultivo geralmente tendem a minimizar a atresia folicular, através de diversas substâncias, como: fonte de proteína; antibióticos; antimicóticos; insulina, transferrina e selênio (ITS); piruvato, glutamina e ocasionalmente um ou mais fatores de crescimento. Entre esses podem-se destacar: o hormônio de crescimento (GH), o fator de crescimento epidermal (EGF), o hormônio folículo estimulante (FSH), o fator de crescimento e diferenciação-9 (GDF- 9), o kit ligand (KL), as proteínas morfogenéticas ósseas 4, 7 e 15 (BMPs 4, 7 e 15), o fator de crescimento endotélio vascular (VEGF), o fator de crescimento fibroblástico (FGF), o fator de crescimento de queratinócitos (KGF), hormônio estimulante da tireoide (TSH), a ativina-A e peptídeo intestinal vasoativo (VIP), os fatores de crescimento semelhantes à insulina 1 e 2 (IGFs 1 e 2) e tiroxina e/ou esteroides, tal como o estradiol, testosterona ou androstenediona Figueiredo et al., 2007; Rodrigues et al., 2010; Andrade et al., 2012; Leitão et al., 2014; Fernandez et al., 2016 Figueiredo et al., 2017).

Vários componentes endócrinos, autócrinos e parácrinos podem estimular a inervação ou a neovascularização dos pequenos folículos, o que possibilita a chegada de nutrientes, citocinas, hormônios e outras substâncias *in vivo* (Fortune; Yang; Muruvi, 2011; Monniaux et al., 2018). Ao que tudo indica, a presença destas substâncias é necessária para o crescimento e sobrevivência folicular. Entretanto, os fatores que atuam no desenvolvimento de FOPA em ruminantes ainda são incompreendidos em sua totalidade (Figueiredo et al., 2007; Araújo et al., 2014).

Buscando identificar os fatores que controlam a foliculogênese, assim como, promovem o crescimento e a maturação oocitária junto à multiplicação e diferenciação das células da granulosa têm se desenvolvido diferentes técnicas de cultivo. Devido a pequena dimensão de ovários de camundongas foi possível o cultivo do órgão na íntegra, o que serviu para o estudo inicial da foliculogênese em pequenos mamíferos (Fortune, 1994; Figueiredo et al., 2007). O sucesso da ativação de folículos primordiais *in vitro* permitiu a utilização deste modelo por diversos grupos de pesquisadores. Entretanto, em animais de médio e grande porte, não é possível a utilização desta técnica em consequência ao dimensionamento dos ovários, sendo necessário utilizar fragmentos do tecido ovariano (Figueiredo et al., 2007; Leitão et al., 2014). Assim, a técnica de cultivo se realiza com a utilização de pequenos fragmentos do córtex ovariano, ricos em folículos primordiais, tem sido estratégia para o

estudo do crescimento e ativação dos folículos primários em bovinos (Braw-Tal; Yossefi, 1997; Figueiredo et al., 2007).

Wandji et al. (1996), evidenciaram altas taxas (94%) de sobrevivência e início do crescimento *in vitro* de folículos primordiais bovinos em meio de cultivo sem adição de soro fetal bovino e utilização de fragmentos do córtex ovariano de fetos. No cultivo *in vitro* o tipo de meio usado exerce grande influência na taxa de sobrevivência e no crescimento de folículos em mamíferos (Andrade et al., 2012). Neste modelo de cultivo *in vitro* foi possível observar um grande número de folículos pré-antrais evoluídos para o estágio de folículo primário, mantendo-se viável por 20 dias de cultivo, entretanto, poucos atingiram o estágio de folículo secundário (Figueiredo et al., 2008).

3.0 CRIOPRESERVAÇÃO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS INCLUSOS EM TECIDO OVARIANO

Devido a algumas dificuldades vinculadas ao cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais isolados ou até *in situ*, o congelamento de fragmentos ovarianos possibilitaria a conservação até que os protocolos empregados para o cultivo fossem desenvolvidos (Figueiredo et al., 2007).

A criopreservação consiste na conservação celular em temperaturas muito baixas, possibilitando a estocagem por tempo indeterminado (Rubinsky, 2003). O tecido permanece preservado em temperatura criogênica (-196°C – temperatura do nitrogênio líquido) devido a inexistência de energia térmica suficiente para que ocorram as reações químicas e processos biológicos (Sheikhi et al., 2011). Diversos são os tecidos e células que podem ser criopreservados, incluindo células germinativas femininas e masculinas (oócitos e espermatozoides). A criopreservação tornou-se prática comum na conservação de embriões, oócitos e espermatozoides. As células teciduais são extremamente sensíveis a baixas temperaturas, deste modo, para que não ocorram danos as células criopreservadas é necessário a utilização de compostos (crioprotetores) a fim de proteger as células ao resfriamento criogênico e posteriormente ao aquecimento. Os agentes crioprotetores variam de acordo com o tipo celular, tecidual e até com a espécie animal e o método de criopreservação utilizado (Rodrigues et al., 2014).

Os dois métodos mais comumente usados de criopreservação do tecido ovariano são congelamento lento e vitrificação. A técnica de congelamento lento foi desenvolvida antes da vitrificação. Estes métodos diferem entre si, principalmente, em relação a taxa de redução de temperatura (Castro et al., 2011). Normalmente, o procedimento de

congelamento lento envolve a aplicação de freezers programados, que são dispositivos especiais que permitem a redução gradual da temperatura de acordo com as configurações do programa. Na maioria dos casos, o tecido é resfriado a -140°C e depois colocado em nitrogênio líquido para armazenamento (Newton et al., 1998; Fuller; Paynter, 2004; Hovatta, 2005). O protocolo de congelamento lento envolve a impregnação do tecido ovariano com o agente crioprotetor, seguido de uma redução gradual da temperatura evitando o estresse térmico durante a fase de transição das soluções do estado líquido para o sólido.

Tanto o congelamento lento quanto a vitrificação requerem a exposição do tecido ovariano à uma solução crioprotetora. Na vitrificação há a transferência do estado líquido direto para o estado sólido denominado vítreo (Rodrigues, et al., 2014). A técnica de vitrificação tem demonstrado bons resultados na criopreservação de oócitos e embriões precoces (Edgar; Gook, 2012). A criopreservação com um protocolo de vitrificação requer a aplicação de agentes crioprotetores em altas concentrações, o que pode afetar negativamente as células criopreservadas (Amorim et al., 2011). Além disso, a alta concentração de agentes crioprotetores pode causar choque osmótico nas células (Fahy et al., 1990).

A vitrificação tem como vantagem o resfriamento rápido, o qual evita a formação de cristais de gelo no tecido. O aparecimento de cristais de gelo no interior das células durante a criopreservação tem um efeito prejudicial na sua viabilidade: o gelo tem uma densidade inferior à da água, o que significa que a água congelada ocupa mais volume do que a forma líquida. Cristais de gelo podem prejudicar a membrana celular e, após o descongelamento, uma célula com uma membrana destruída pode morrer (Silva; Guerra, 2011).

A eficácia dos procedimentos de criopreservação e descongelamento pode ser estimada usando diferentes métodos, tais como, histologia clássica, microscopia eletrônica de transmissão, imunohistoquímica, entre outras. A avaliação da condição de um tecido após criopreservação e descongelamento pode ser realizada através de análise histológica, principalmente pela facilidade da técnica. Apesar de alguns avanços com as biotecnologias aplicadas ao tecido ovariano, os estudos na espécie bovina e ovina estão em fase inicial. Além disso, a possibilidade de obter o nascimento de animais a partir de enxertos de tecido ovarianos pode estimular a busca de novos modelos e técnicas que visem a preservação e recuperação da fertilidade animal e/ou humana.

3.0.1 Agentes Crioprotetores (ACPs)

A revolução nos métodos de criopreservação ocorreu pela descoberta da ação crioprotetora do glicerol por Polge et al. (1949) acidentalmente durante as sucessivas tentativas em preservar espermatozoides. Assim foi possível identificar alguns elementos importantes durante a preservação, como, a necessidade de utilização de um agente crioprotetor; o processo pelo qual as células serão expostas ao crioprotetor; e principalmente o modo de congelação e descongelamento (Castro et al., 2011).

Como anteriormente descrito, o sucesso da criopreservação depende dos agentes crioprotetores, sendo necessário identificar o mais eficiente, com sua concentração adequada para que possa ser utilizado para redução de perdas durante os procedimentos de criopreservação. Os agentes crioprotetores são agentes químicos que protegem as células contra formação de cristais de gelo, desidratação, resfriamento e danos causados pela redução extrema de temperatura. No geral, esses agentes podem penetrar com facilidade as membranas das células (intracelulares ou permeáveis), substituindo parcialmente moléculas de água que saíram em virtude da criopreservação, formando ponte de hidrogênio com moléculas de água intracelular remanescentes, atrasando, com isso, a diminuição da temperatura da mistura resultante, prevenindo assim, a cristalização de gelo por reduzir o ponto de congelação (Pereira; Marques, 2008).

A maioria dos protocolos de criopreservação foram realizados na presença de crioprotetor intracelulares como o dimetilsulfóxido (DMSO), 1,2-propanodiol ou propileno glicol (PROH), etilenoglicol ou etanodiol-1,2 ou glicol (EG) e glicerol ou glicerina ou 1,2,3-Propanotriol (GLI), em concentrações variando de 0,5 a 3,0 M (humano: Newton et al, 1996; felinos: Jewgenow et al, 1998; caprinos: Rodrigues et al, 2004; Santos et al, 2008; ovinos: Santos et al, 2007a; bovinos: Celestino et al., 2007). O mecanismo de ação desses crioprotetores tem como base a ligação a estruturas que promovem pontes de hidrogênio com as moléculas de água. Estas ligações mudam a orientação da molécula de água nos cristais de gelo, criando um ambiente menos nocivo para as células. Para a maioria das células, o glicerol é o agente de escolha porque é geralmente menos tóxico do que o DMSO. Como o DMSO é mais penetrante, geralmente é o agente de escolha para as células maiores e mais complexas (Eroglu et al., 2002). Entretanto, a maior capacidade de penetração à membrana celular pode levar à menores taxas de folículos pré-antrais viáveis (Fuku et al., 1992).

Por outro lado, há os crioprotetores que não penetram (extracelulares ou não-permeáveis), permanecendo no meio extracelular para proteger o material biológico com a

retirada de água de dentro da célula causando desidratação e aumento da concentração de ACP intracelular. As membranas celulares também são protegidas pelos ACPs extracelulares, por meio da sua ligação às cabeças dos grupos fosfolipídios, mantendo a estabilidade da membrana; assim como também, aumenta a viscosidade do meio, diminuindo a concentração de eletrólitos durante a criopreservação, evitando riscos osmóticos (Santos et al., 2010).

Os crioprotetores extracelulares mais utilizados na criopreservação são: sacarose, rafinose, trealose. Entretanto, além de seu efeito crioprotetor, estas substâncias também podem ser tóxicas para as células, principalmente durante o período de exposição (Celestino et al, 2007), e todos são amplamente usados como crioprotetores naturais e estabilizadores durante a desidratação e que, complementarmente, sua combinação com outros agentes intracelulares torna o processo menos tóxico e mais eficaz. Sendo a sacarose o crioprotetor mais empregado na criopreservação de tecido ovariano (Brito et al., 2014).

3.1 IMPORTÂNCIA DO CULTIVO *IN VITRO* E CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO DE OVÁRIOS SOBRE A FERTILIDADE

Na reprodução humana muitas mulheres sofrem de doenças que interferem direta ou indiretamente sobre a fertilidade. Todavia, a preservação da fertilidade feminina é um dos problemas mais comuns abordados pelas tecnologias de reprodução assistida. Doenças cujo tratamento envolvem métodos agressivos de terapia ou citotóxicos, tais como radioterapia e quimioterapia influenciam negativamente a saúde dos gametas e seus progenitores (Filatov et al., 2016).

O cultivo *in vitro* de tecido ovariano não é uma técnica amplamente utilizada na prática clínica devido aos métodos de desenvolvimento folicular estarem longe de ser perfeitos. Embora seja uma técnica muito promissora, ainda não existe uma padronização entre os protocolos existentes para a obtenção efetiva de oócitos capazes de serem fertilizados *in vitro*. Os ovários apresentam um grande número de folículos primordiais na região cortical, sendo assim, são obtidos fragmentos de tecido ovariano por dissecação do córtex e subsequente cultivados *in vitro*. Esta abordagem permite apoiar o crescimento de um maior número de folículos primordiais (Telfer et al., 2008).

Atualmente, os estudos sobre a técnica de cultivo são dedicados à sobrevivência folicular e reconstrução da estrutura cortico-medular ovariana. Durante a foliculogênese, os folículos em crescimento *in vivo* migram do córtex ovariano, mais rígido e próximo da superfície, para a medula ovariana (Xu et al., 2013). Logo, no decorrer deste processo ocorre a redução do estresse mecânico das células foliculares, por estarem localizadas em um ambiente mais interno. Deste modo, a reconstrução da estrutura ovariana cortico-medular *in vitro* pode ser realizada usando matrizes extracelulares combinados; por exemplo, um hidrogel de alginato de fibrina (Shikanov et al., 2009, 2011; Jin et al., 2010) ou gel de agarose.

Assim, o desenvolvimento de um modelo viável para investigação da foliculogênese resultaria em grande aporte de subsídios para a prospecção científica das biotécnicas reprodutivas nas ciências biomédicas. Em mulheres com falha ovariana prematura, por exemplo, a criopreservação aliada ao cultivo eficiente representaria um modelo para estudos e testes de possíveis aplicações a determinadas enfermidades. Da mesma forma, métodos de transplantes e auto-transplantes de ovário poderiam ser desenvolvidas a partir desta técnica. Testes de efeitos de fármacos nos oócitos humanos, como quimioterápicos, também poderiam ser efetuados de forma simples e segura (Rodrigues et al.,

2014). A otimização dos sistemas de cultivo *in vitro* de folículos possibilitaria ainda grandes avanços nas áreas de manipulação de folículos e criopreservação de fragmentos e folículos ovarianos, contribuindo imensamente para tratamentos de infertilidade humana. A padronização desta biotécnica em animais mostra-se bastante estratégica, por questões operacionais - disponibilidade de ovários - e por aspectos éticos e morais.

A preservação da fertilidade pode oferecer melhores perspectivas para concepção futura em casos cujo potencial reprodutivo está ameaçado. Nestas circunstâncias a criopreservação e o armazenamento de gametas ou embriões em baixas temperaturas são potencialmente levadas em consideração. Os avanços na tecnologia, em particular a aplicação da vitrificação e o transplante do tecido ovariano, melhoraram significativamente os resultados da criopreservação de oócitos maduros. Nos casos em que a criopreservação de oócitos maduros não é viável, o córtex ovariano contendo folículos primordiais pode ser criopreservado. Até o momento, mais de 100 nascimentos foram relatados após o enxerto de tecido ovariano armazenado. Sendo assim, a criopreservação do tecido ovariano é agora uma abordagem estabelecida para preservar a fertilidade futura de mulheres jovens (Gook; Edgar, 2018).

No entanto, a preservação da fertilidade engloba uma série de abordagens clínicas e tecnologias de laboratório, muitas das quais ainda são consideradas experimentais. Ou seja, para uma maior chance de preservar a fertilidade de pacientes com câncer, seria necessário a estimulação ovariana (superovulação), a coleta de oócitos supranumerários e a fertilização *in vitro* (FIV) para obtenção de embriões viáveis ou ainda procedimentos para o desenvolvimento de folículos precoces. O tecido ovariano está sendo cada vez mais coletado de pacientes com câncer e criopreservado para preservação da fertilidade (Wang et al., 2016).

Uma opção alternativa de preservação da fertilidade para o transplante autólogo de tecido ovariano é cultivar e amadurecer oócitos *in vitro*. Embora oócitos imaturos possam ser recuperados de folículos antrais e maturados *in vitro* (MIV), tem sido proposto que uma abordagem alternativa para obter uma população homogênea de oócitos de boa qualidade consistiria em sistemas de cultivo *in vitro* que suportam ativação de folículos primordiais em tecidos corticais, isolamento e cultivo de folículos pré-antrais, seguida de coleta de oócitos, MIV e FIV (Telfer; Zelinski, 2013).

Tendo em vista os aspectos anteriormente mencionados, estas biotécnicas apresentam uma alta significância tanto para pesquisa básica e fundamental como para a reprodução animal e humana. A contribuição para a pesquisa consiste na elucidação dos mecanismos presentes na fase pré-antral da foliculogênese. Os folículos ovarianos pré-antrais

isolados do ambiente natural, com interferências endócrinas, nutricionais e sanitárias semelhante ao organismo, com a presença de substâncias conhecidas (matriz extracelular, hormônios, fatores de crescimento, aminoácidos, carboidratos, etc.) poderão ser utilizados para cultivos *in vitro*. Nesses casos, a aplicação de tecnologias de criopreservação de tecido ovariano ou a técnica de cultivo *in vitro* de tecido ovariano parece ser uma ótima estratégia para a preservação da foliculogênese e fertilidade feminina.

REFERÊNCIAS

- ABIR, R.; NITKE, S.; BEM-HAROUSH, A.; FISCH, B. In vitro maturation of human primordial ovarian follicles: clinical significance, progress in mammals, and methods for growth evaluation. **Histology and Histopathology**, v.26, p.887–898, 2006.
- ALVES, A.M.; CHAVES, R.N.; ROCHA, R.M.; LIMA, L.F.; ANDRADE, P.M.; LOPES, C.A.; SOUZA, C.E.; MOURA, A.A.; CAMPELLO, C.C.; BÁO, S.N.; SMITZ, J.; FIGUEIREDO, J.R. Dynamic medium containing growth differentiation factor-9 and FSH maintains survival and promotes in vitro growth of caprine preantral follicles after long-term in vitro culture. **Reproduction, fertility, and development**, v.25, ed.6, p.955–965, 2013.
- AMORIM, C.A.; DAVID, A.; LANGENDONCKT, A.V.; DOLMANS, M.M.; DONNEZ, J. Vitrification of human ovarian tissue: effect of different solutions and procedures. **Fertility and Sterility**, v.95, n.3, p.1094–1097, 2011.
- ANCKAERT, E.; DE RYCKE, M.; SMITZ, J. Culture of oocytes and risk of imprinting defects. **Human Reproduction Update**, v.19, p.52–66, 2013.
- ANDRADE, E.R.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A.A.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; FIGUEIREDO, J.R. Interactions of indole acetic acid with EGF and FSH in the culture of ovine preantral follicles. **Theriogenology**, v.64, p.1104–1113, 2012.
- ARAÚJO, V.R.; GASTAL, M.O.; FIGUEIREDO, J.R.; GASTAL, E.L. In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.12, n. 78, p.1–14, 2014.
- ATWOOD, C.S., MEETHAL, S.V. The spatiotemporal hormonal orchestration of human folliculogenesis, early embryogenesis and blastocyst implantation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.430, p 33–48, 2016.
- BARNETT, K.R.; SCHILLING, C.; GREENFELD, C.R.; TOMIC, D.; FLAWS, J.A. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. **Human Reproduction**, v.13, p. 1–19, 2006.
- BARROS, L.F.; HERMOSILLA, T.; CASTRO, J. Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.130, p. 401–409, 2001.
- BASSO, A. C.; ESPER, C. R. Isolamento e caracterização ultraestrutural de folículos pré-antrais de vacas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.39, p.311-331, 2002.
- BECKERS, J.F.; DRION, P.; FIGUEIREDO, J.R.; GODDIN, L.; PIROTTIN, D.; ECTORS, F. The ovarian follicle in cow: in vivo growth and in vitro culture. **Reproduction in Domestic Animals**, v.31, p. 543–548, 1996.
- BESSA IR, DODE MAN. Ovogênese e modificações epigenéticas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.37, ed.3, p. 241–248, 2013.

BETTERIDGE, K.J.; SMITH, C.; STUBBINGS, R.B.; XU, K.P.; KING, W.A. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes in vitro. **Journal of reproduction and fertility**, v.38, p.87–98, 1989.

BRAW-TAL, R.; YOSSEFI, S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. **Reproduction, Fertility and Development**, v.109, p.165–171, 1997.

BRISTOL-GOULD, S.; WOODRUFF, T.K. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). **Theriogenology**, v.66, p. 5–13, 2006.

BRITO, D.C.; BRITO, A.B.; SCALERCIO, S.R.; PERCÁRIO, S.; MIRANDA, M.S.; ROCHA, R.M.; DINIZ, J.A.; OSKAM, I.C.; VAN DEN HURK, R.; PARIS, M.C.; DOMINGUES, S.F.; SANTOS, R.R. Vitamin E-analog Trolox prevents endoplasmic reticulum stress in frozen- thawed ovarian tissue of capuchin monkey (*Sapajus apella*). **Cell Tissue Research**, v.355, n.2, p.471–480, 2014.

BURNS, D.S.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; IRELAND, J.L.H.; KNIGHT, P.G.; IRELAND, J.J. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. **Biology of Reproduction**, v.73, p.53–62, 2005.

BUTLER, H.W. Ultrastructural studies on mitochondrial swelling. **The Biochemical journal**, v.118, ed. 5, p. 883–886, 1970.

CASTRO, S.V.; CARVALHO, A.A.; SILVA, C.M.G.; FAUSTINO, L.R.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Intracellular Cryoprotectant Agents: Characteristics and Use of Ovarian Tissue and Oocyte Cryopreservation. *Acta Scientiae Veterinariae*. 39(2): 957. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39, n.2, p.957, 2011.

CELESTINO, J.J.H.; SANTOS, R.R.; MATOS, M.H.T.; COSTA, S.H.F.; SILVA, J.R.V.; MARTINS, F.S.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Preservation of bovine preantral follicles in 0.9% saline solution or TCM 199. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p.591–599, 2007.

COSTA, L. F. S.; GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; CARÁMBULA, S. F.; NEVES, J. P.; MONTAGNER, M. M. Desenvolvimento de folículos pré-antrais bovinos in vitro em monocamada de células ovarianas. **Revista do Centro de Ciências Rurais**, v.31, p.323-27, 2001.

DRIANCOURT, M.A.; WEBB, R.; FRY, R.C. Does follicular dominance occur in ewe? **Reproduction, Fertility and Development**, v.93, p.63–70, 1991.

EDGAR, D.H.; GOOK, D.A. A critical appraisal of cryopreservation (slow cooling versus vitrification). of human oocytes and embryos. **Human Reproduction Update**, v.18, p.536–554, 2012.

EPPIG, J.J.; O'BRIEN, M.J. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. **Biology of Reproduction**, v.54, p.197–207, 1996.

EPPIG, J.J.; SCHROEDER, A.C. Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization in vitro. **Biology of Reproduction**, v.41, p.268–276, 1989.

ERICKSON, B.H. Development and Senescence of the Postnatal Bovine Ovary. **Journal of Animal Science**, v.25, p.800–805, 1966.

ERICKSON, G.F.; SHIMASAKI S. The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.5, p.1–9, 2003.

EROGLU, A.; TONER, M.; TOTH, T.L. Beneficial effect of microinjected trehalose on the cryosurvival of human oocytes. **Fertility and Sterility**, v.77, n.1, p.152–158, 2002.

FAHY, G.; LILLEY, T.H.; LINSDELL, H.; DOUGLAS, M.S.; MERYMAN, H.T. Cryoprotectant toxicity and cryoprotectant toxicity reduction: in search of molecular mechanisms. **Cryobiology**, v.3, p.247–268, 1990.

FAIR, T.; HULSHOF, C. J.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. **Anatomy and embryology**, v.195, p. 327–336, 1997a.

FAIR, T.; HULSHOF, S.C., HYTTEL, P.; GREVE, T.; BOLAND, M. Nucleus ultrastructure and transcriptional activity of bovine oocytes in preantral and early antral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v.46, p. 817–832, 1997b.

FARBER, J.L. Membrane injury and calcium homeostasis in the pathogenesis of coagulative necrosis. **Laboratory Investigation**, v.47, p.114–123, 1982.

FERNANDEZ, T.; PALOMINO, J.; PARRAGUEZ, V.H.; PERALTA, O.A.; DE LOS REYES, M. Differential expression of GDF-9 and BMP- 15 during follicular development in canine ovaries evaluated by Flow Cytometry. **Animal Reproduction Science**, v.167, p. 59–67, 2016.

FIGUEIREDO, J.R.; CELESTINO, J.J.H.; FAUSTINO, L.R.; RODRIGUES, A.P.R. *In vitro* culture of caprine preantral follicles: Advances, limitations and prospects. **Small Ruminant Research**, v. 98, 192–195, 2011.

FIGUEIREDO, J.R.; HULSHOF, S.C.; VAN DEN HURK, R.; NUSGENS, B.; BEVERS, M.M.; ECTORS, F.J.; BECKERS, J.F. Preservation of oocyte and granulosa cell morphology in bovine preantral follicles cultured in vitro. **Theriogenology**, v.41, p.1333–1346, 1994,

FIGUEIREDO, J.R.; HULSHOF, S.C.J.; BECKERS, J.F. Nova Biotecnologia: Isolamento, Caracterização e Cultura de Folículos Ovarianos Pré-Antrais em Bovinos. **Simpósio Nacional de Biotecnologia da Reprodução de mamíferos Domésticos**. UECE, Curso de Mestrado em Produção e Reprodução de Pequenos Ruminantes, p.01–11, 1995.

FIGUEIREDO, J.R.; HULSHOF, S.C.J.; VAN DEN HURK, R.; ECTORS, F.J.; FONTES, R.S.; NUSGENS, B.; BEVERS, M.M.; BECKERS, J.F. Development of a combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. **Theriogenology**, v. 40, p.789–799, 1993.

FIGUEIREDO, J.R.; LIMA, L.F. Tecnologia do ovário artificial: aplicações, estado da arte, limitações e perspectivas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.41, n.1, p.248–253, 2017

FIGUEIREDO, J.R.; LIMA, L.F.; SILVA, VIANA, J.R.; SANTOS, R.R. Control of growth and development of preantral follicle: insights from in vitro culture. **Animal Reproduction**, v. 15, p. 648–659, 2018.

FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; SILVA, J.R.V. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. In: GONÇALVES P.B.D., FIGUEIREDO J.R., FREITAS V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. ed. 2. São Paulo: Roca, 2008, p.303–327.

FILATOV, M.A.; KHRAMOVA, Y.V.; KISELEVA, M.V.; MALINOVA, I.V.; KOMAROVA, E.V.; SEMENOVA, M.L. Female fertility preservation strategies: cryopreservation and ovarian tissue in vitro culture, current state of the art and future perspectives. **Zygote**, v. 24, n.5, p.1–19, 2016.

FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 225–232, 1994.

FORTUNE, J.E.; CUSHMAN, R.A.; WAHL, C.M.; KITO, S. The Primordial to Primary Follicle Transition. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.163, p.53–60, 2000.

FORTUNE, J.E.; KITO, S.; WANDJI, S.A.; SRSEN, V. Activation of bovine and baboon primordial follicles in vitro. **Theriogenology**, v.49, p.441–449, 1998.

FORTUNE, J.E.; YANG, M.Y.; MURUVI, W. In vitro and in vivo regulation of follicular formation and activation in cattle. **Reproduction, fertility, and development**, v.23, p.15–22, 2011.

FUKU, E.; KOJIMA, T.; SHIOYA, Y.; MARCUS, G.J.; DOWNEY, B.R. In vitro fertilization and development of frozen thawed bovine oocytes. **Cryobiology**, v.29, p.485–492, 1992.

FULLER, B.; PAYNTER, S. Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine. **Reproductive BioMedicine Online**, v.9, p.680–869, 2004.

GOOK, D.A.; EDGAR, D.H. Cryopreservation of female reproductive potential. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 31, 2018. *In Press*

GORDON, I. Prenatal development of the bovine ovary. In: GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos**. Raven Press, 1994, p. 4349.

GOUGEON, A.; BUSSO, D. Morphologic and functional determinants of primordial and primary follicles in the monkey ovary. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.163, p.33–41, 2000.

GREEN, L.J.; SHIKANOV, A. In vitro culture methods of preantral follicles. **Theriogenology**, v.86, n.1, p.229–238, 2016.

GUIBAULT, L.A.; DUFOURT, J.J.; THATCHER, W.W.; DROST, M.; HAIBEL, G.K. Ovarian follicular development during early pregnancy in cattle. **Reproduction, Fertility and Development**, v.73, p.127–135, 1986.

- HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. Foliculogênese, maturação ovocitária e ovulação. In: HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. Manole, 2004. p. 69–82.
- HANNON, P.R.; CURRY, T.E. Folliculogenesis. In: SKINNER, M.K. **Encyclopedia of Reproduction**. ed. 2. Amesterdã: Elsevier, 2018, p.72–79.
- HARTSHORNE, G.M. In vitro culture of ovarian follicles. **Reviews of Reproduction**, v.2, p.94–104, 1997.
- HAY, M.F.; CRAN, D.G.; MOOR, R.M. Structural Changes Occurring During Atresia in Sheep Ovarian Follicles. **Cell and Tissue Research**, v.169, p. 515–529, 1976.
- HIRAO, Y. Isolation of ovarian components essential for growth and development of mammalian oocytes in vitro. **Journal of Reproduction and Development**, v.58, p.167–74, 2012.
- HIRSHFIELD, A. N. Development of follicles in the mammalian ovary. **International Review of Cytology**, v.124, p. 43–101, 1991.
- HOVATTA, O. Methods for cryopreservation of human ovarian tissue. **RBM Online**, v.10, p.729–734, 2005.
- HSU, S.Y.; HSUEH, A.J. Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: An ovarian paradigm. *Physiol Rev*, 2000, 80: 593–614.
- HULSHOF, S.C.J.; FIGUEIREDO, J.R.; BEKERS, J.F.; BEVERS, M.M., VAN DEN HURK, R. Isolation and Characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **The Veterinary quarterly**, v.2, ed.16, p.78–80, 1994.
- HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in catle. **Theriogenology**, v.47, p. 23–32, 1997.
- INGRAM, D.L. Atresia. In: Zuckerman S. (Ed.), **The Ovary**. Academic Press, 1962. p. 247–273.
- IRELAND, J.J.; ZIELAK, A.E.; JIMENEZ-KRASSEL, F.; FOLGER, J.; BETTEGOWDA, A.; SCHEETZ, D.; WALSH, S.; MOSSA, F.; KNIGHT, P.G.; SMITH, G.W.; LONERGAN, P.; EVANS, A.C.O. Variation in the ovarian reserve is linked to alterations in intrafollicular estradiol production and ovarian biomarkers of follicular differentiation and oocyte quality in cattle. **Biology of Reproduction**, v.80, p. 954–964, 2009.
- IRELAND, J.L.H.; SCHEETZ, D.; JIMENEZ-KRASSE, F.; THEMME, A.P.N.; WARD, F.; LONERGAN, P.; SMITH, G.W.; PEREZ, G.I.; EVANS, A.C.O.; IRELAND, J.J. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. **Biology of Reproduction**, v. 79, p.1219–1225, 2008.
- JEWGENOW, K.; PENFOLD, L.M.; MEYER, H.H.; WILDT, D.E. Viability of small preantral ovarian follicles from domestic cats after cryoprotectant exposure and cryopreservation. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.112, p.39–47, 1998.
- JIN, S.Y.; LEI, L.; SHIKANOV, A.; SHEA, L.D.; WOODRUFF, T.K. A novel two-step strategy for in vitro culture of early-stage ovarian follicles in the mouse. **Fertility and Sterility**, v.93, p.2633–2639, 2010.

JOHNSON, A.L. Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.185–201, 2003.

JUENGEL, J.L.; HUDSON, N.L.; HEATH, D.A.; SMITH, P.; READER, K.L.; LAWRENCE, S.B.; O'CONNELL, A.R.; LAITINEN, M.P.; CRANFIELD, M.; GROOME, N.P.; RITVOS, O.; MCNATTY, K.P. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. **Biology of Reproduction**, v.676, p.1777–1789, 2002.

KASER, D.J.; GINSBURG, E.S.; CARRELL, D.T.; RACOWSKY, C. Assisted Reproduction. In: Strauss, J.F.; Barbieri, R.L.; Gargiulo, A.R. **Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology**. ed. 8. Amesterdã: Elsevier, 2019, p.779–882.

KIDDER, G.M.; MHAWI, A.A. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. **Reproduction**, v.123, p. 613, 2002.

LEITÃO, C.C.F.; COSTA, J.J.N.; BRITO, I.R.; MAGALHÃES-PADILHA, D.M.; ALMEIDA, A.P.; FIGUEIREDO, J.R.; VAN DEN HURK, R. SILVA, J.R.V. Effects of GDF-9 and FSH on mRNA Expression for FSH-R, GDF-9 and BMPs in *in vitro* cultured goat preantral follicles. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.57, ed.2, p.200–208, 2014.

LIMA-VERDE, I.B.; ROSSETTO, R.; FIGUEIREDO, J.R. Influência dos hormônios esteroides na foliculogênese. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, ed.4, p.472–482, 2011.

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

LISBOA, L.A.; SILVA, C.B.; GONZÁLEZ, S.M.; BÚFALO, I.; SENEDA, M.M. *In vitro* culture of preantral follicles. In: SENEDA, M.M.; SILVA-SANTOS, K.C. MARINHO, L.S.R. **Biotechnology of Animal Reproduction**. ed. 1. Hauppauge, New York : Nova Science Publisher's, 2015, p.272–292.

LUCCI, C.M.; AMORIM, C.A.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R.; BÁO, S.N.; SILVA, J.R.V.; GONÇALVES, P.B.D. Study of preantral follicle population in situ and after mechanical isolation from caprine ovaries at different reproductive stages. **Animal Reproduction Science**, v.56, p. 223–236, 1999.

LUCCI, C.M.; SILVA, R.V.; CARVALHO, C.A.; FIGUEIREDO, R.; BÁO, N. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. **Small Ruminant Research**, v. 41, p. 61–69, 2001.

MARKSTRÖM, E.; SVENSSON, E.C.; SHAO, R.; SVANBERG, B.; BILLIG, H. Survival factors regulating ovarian apoptosis: dependence on follicle differentiation. **Reproduction**, v.123, p.23–30, 2002.

MATOS MHT, SILVA JRV, RODRIGUES APR, FIGUEIREDO JR. Técnicas para avaliação da qualidade de folicúlos ovarianos pré-antrais cultivados *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, ed.4, p.433–442, 2007.

MAYER, L.P.; DEVINE, P.J.; DYER, C.A.; HOYER, P.B. The follicle-deplete mouse ovary produces androgen. **Biology of Reproduction**, v.71, p.130–138, 2004.

MCGEE, E.A.; HORNE, J. Follicle Atresia. In: SKINNER, M.K. **Encyclopedia of Reproduction**. ed. 2. Amsterdã: Elsevier, 2018, p.87–91.

MCGEE, E.A.; HSUEH, A.J. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. **Endocrine review**, v.21, ed.2, p.200–214, 2000.

MCNATTY, K.P.; MCNEILLY, A.S.; TSONIS, C.G. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. **Reproduction, Fertility and Development**, v.5, p.459–478, 1993.

MONNIAUX, D.; CADORET, V.; CLÉMENT, F.; DALBIES-TRAN, R.; ELIS, S.; FABRE, S.; MAILLARD, V.; MONGET, P.; UZBEKOVA, S. Folliculogenesis. In: HUHTANIEM, I. **Encyclopedia of Endocrine Diseases**. ed. 2. Amsterdã: Elsevier, 2019, p.377–398.

MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V. Início do desenvolvimento humano. In MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N. **Embriologia Clínica**, Guanabara: Koogan, 1994, p.13–38.

MORITA, Y.; TILLY, J.L. Oocyte apoptosis: Like sand through an hourglass. **Developmental Biology**, v.213, p.1–17, 1999.

NEVES, J.P.; MIRANDA, K.L.; TORTORELLA, R.D. Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.39, p.414–421, 2010.

NEWTON, H.; AUBARD, Y.; RUTHERFORD, A.; SHARMA, V.; GOSDEN, R. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. **Human Reproduction**, v.11, p.1487–1491, 1996.

NEWTON, H.; FISHER, J.; ARNOLD, J.R.P.; PEGG, D.E.; FADDY, M.J.; GOSDEN R.G. Permeation of human ovarian tissue with cryoprotective agents in preparation for cryopreservation. **Human Reproduction**, v.13, p.376–380, 1998.

O'BRIEN, M.J.; PENDOLA, J.K.; EPPIG, J.J. A revised protocol for in vitro development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. **Biology of Reproduction**, v. 68, 2003, p. 1682–1686.

O'SHEA, J.D.; HAY, M.F.; CRAN, D.G. Ultrastructural changes in the theca interna during follicular atresia in sheep. **Reproduction, Fertility and Development**, v.54, p. 183–187, 1978.

PEREIRA, R.M.; MARQUES, C.C. Animal oocyte and embryo cryopreservation. **Cell Tissue Bank**, v.9, p.267–277, 2008.

PESSOA, A. F.; ROCHA, R. M.; BRITO, I. R.; SILVA, G. M.; CHAVES, R. N.; MAGALHÃES-PADILHA, D. M.; CAMPELLO, C. C.; RODRIGUES, A. P.; NUNES-PINHEIRO, D. C.; FIGUEIREDO, J. R. Effect of morphological integrity, period, and type of culture system on the in vitro development of isolated caprine preantral follicles. **Theriogenology**, v.82, p.312–7, 2014.

PETERS, H. The development and maturation of the ovary. **Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique**, v.16, ed.3, p.271–278, 1976.

PICTON, H.M. Activation of follicle development: The primordial follicle. **Theriogenology**, v. 55, p.1193–1210, 2001.

POLGE, C.; SMITH, A.V.; PARKES, A.S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v.164, p.666, 1949.

RAJABI, Z.; KHOKHAR, Z.; YAZDEKHASTI, H. The growth of preantral follicles and the impact of different supplementations and circumstances: A review study with focus on bovine and human preantral follicles. **Cellular Reprogramming**, v.20, p.1-14, 2018.

RANKIN, T.L.; O'BRIEN, M.; LEE, E.; WIGGLESWORTH, K.; EPPIG, J.; DEAN, J. Defective zonae pellucidae in Zp2-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development. **Development**, v. 128, p. 1119–1126, 2001.

RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; COSTA, S.H.; MATOS, M.H.; SANTOS, R.R.; LUCCI, C.M.; BÃO, S.N.; OHASHI, O.M.; FIGUEIREDO, J.R. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol. **Animal Reproduction Science**, v.84, p.211–227, 2004.

RODRIGUES, A.P.R.; CASTRO, S.V.; LUNARDI, F.O.; FIGUEIREDO, J.R. Advances in ovarian tissue cryopreservation in goats and sheep. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.8, Supl. 2, p. 284-291, 2014.

RODRIGUES, G.Q.; SILVA, C.M.G.; FAUSTINO, L.R.; BRUNO, J.B.; PINTO, L.C.; LOPES, C.A.P.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R. Efeito de diferentes concentrações de hormônio foliculo-estimulante recombinante sobre o desenvolvimento *in vitro* de foliculos pré-antrais caprinos e ovinos isolados. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.4, ed.3, p.144–152, 2010.

ROSSETTO, R.; LIMA, I.M.T.; SARAIVA, M.V.A.; LIMA-VERDE, E.T.S.; FIGUEIREDO, J.R. Avanços no isolamento e sistemas de cultivo de foliculos pré-antrais. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.5, ed.1, p.15–23, 2011.

ROSSETTO, R.; SANTOS, R.R.; SILVA, G.M.; DUARTE, A.B.G.; SILVA, C.M.G.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R. Comparative study on the *in vitro* development of caprine and bovine preantral follicles. **Small Ruminant Research**, v.113, p.167–170, 2013.

ROY, S.K.; ALBEE, L. Requirement for follicle-stimulating hormone action in the formation of primordial follicles during perinatal ovarian development in the hamster. **Endocrinology**, v.141, p.4449–4456, 2000.

RUBINSKY, B. Principles of low temperature cell preservation. **Heart Failure Reviews**, v.8, p.277-284, 2003.

RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca Anatomica**, v. 24, p.77–92, 1983.

SADEU JC, CORTVRINDT R, RON-EL R, KASTERTEIN E, SMITZ J. Morphological and ultrastructural evaluation of cultured froze-thawed human fetal ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, v.85, ed.1, p.1130–1141, 2006.

SADR, S.Z.; EBRAHIMI, B.; SHAHHOSEINI, M.; FATEHI, R.; FAVAEDI, R. Mouse preantral follicle development in two-dimensional and three-dimensional culture systems after ovarian tissue vitrification. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v.194, p.206–211, 2015.

SALOMON, A.K.; LEON, K.; CAMPBELL, M.M.; YOUNG, K.A. Folliculogenic factors in photoregressed ovaries: Differences in mRNA expression in early compared to late follicle development. **General and Comparative Endocrinology**, v.260 p.90–99, 2018.

SÁNCHEZ, F.; SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1822, p.1896–1912, 2012.

SANTOS, R.R.; AMORIM, C.; CECCONI, S.; FASSBENDER, M.; IMHOF, M.; LORNAGE, J.; PARIS, M.; SCHOENFELDT, V.; MARTINEZ-MADRID, B. Cryopreservation of ovarian tissue: An emerging technology for female germline preservation of endangered species and breeds. **Animal Reproduction Science**, v.122, n.3-4, p.151–163, 2010.

SANTOS, R.R.; CELESTINO, J.J.H.; LOPES, C.A.P.; MELO, M.A.P.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Criopreservação de foliculos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, n.1, p.9–15, 2008.

SANTOS, R.R.; THARASANIT, T.; VAN HAEFTEN, T.; FIGUEIREDO, J.R.; SILVA, J.R.; VAN DEN HURK, R. Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. **Cell Tissue Research**, v.327, p.167–176, 2007a.

SARAIVA, M.V.A.; CELESTINO, J.J.H.; ARAÚJO, V.R.; CHAVES, R.N.; ALMEIDA, A.P.; LIMA-VERDE, I.B.; DUARTE, A.B.G.; SILVA, G.M.; MARTINS, F.S.; BRUNO, J.B.; MATOS, M.H.T.; CAMPELLO, C.C.; SILVA, J.R.V.; FIGUEIREDO, J.R. Expression of follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) in goat ovarian follicles and the impact of sequential culture medium on *in vitro* development of caprine preantral follicles. **Zygote**, v.19, n.3, p.205–14, 2011.

SATO, T.; KATAGIRI, K.; GOHBARA, A.; INOUE, K.; OGONUKI, N.; OGURA, A.; KUBOTA, Y.; OGAWA, T. In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. **Nature**, v.471, n.7339, p.504–507, 2011b.

SAUMANDE, J. La folliculogénese chez les ruminants. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, v. 167, n.3-4, 205–218, 1991.

SCARAMUZZI, R.J.; ADAMS, N.R.; BAIRD, D.T.; CAMPBELL, B.K.; DOWNING, J.A.; FINDLAY, J.K.; HENDERSON, K.M.; MARTIN, G.B.; SZLACHTA, M.; TISCHNER, M. Distribution, morphology and ultrastructure of preantral follicles in the ovary of the mare. **Havemeyer Foundation Monograph Series**, v.5, p. 33–35, 2008.

SHEIKHI, M.; HULTENBY, K.; NIKLASSON, B.; LUNDQVIST, M.; HOVATTA O. Clinical grade vitrification of human ovarian tissue: an ultrastructural analysis of follicles and stroma in vitrified tissue. **Human Reproduction**, v.26, n.3, p.594–603, 2011.

SHIKANOV, A.; XU, M.; WOODRUFF, T.K.; SHEA, L.D. A method for ovarian follicle encapsulation and culture in a proteolytically degradable 3 dimensional system. **Journal of Visualized Experiments**, v.15, p.2695, 2011.

SHIKANOV, A.; XU, M.; WOODRUFF, T.K.; SHEA, L.D. Interpenetrating fibrin-alginate matrices for in vitro ovarian follicle development. **Biomaterials**, v.30, p.5476–5485, 2009.

SILVA-BUTTKUS, P.; JAYASOORIYA, G.S.; MORA, J.M.; MOBBERLEY, M.; RYDER, T.A.; BAITHU, M.; STARK, J.; FRANKS, S.; HARDY, K. Effect of cell shape and packing density on granulosa cell proliferation and formation of multiple layers during early follicle development in the ovary. **Journal of Cell Science**, v.121, p.3890–3900, 2008.

SILVA-SANTOS, K.C.; SANTOS, G.M.; SILOTO, L.S.; HERTEL, M.F.; ANDRADE, E.R.; RUBIN, M.I.; STURION, L.; MELO-STERZA, F.A.; SENEDA, M.M. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. **Theriogenology**, v.76, p.1051–1057, 2011.

SILVA-SANTOS, K.C.; SANTOS, G.M.S.; KOETZ JUNIOR, C.; MOROTTI, F.; SILOTO, L.S.; MARCANTONIO, T.N.; URBANO, M.R.; OLIVEIRA, R. L.; LIMA, D. C. M.; SENEDA, M.M. Antral follicle populations and embryo production - in vitro and in vivo - of *Bos indicus-taurus* donors from weaning to yearling ages. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, p. 228-232, 2014.

SILVA, J.R.; VAN DEN HURK, R.; DE MATOS, M.H.; DOS SANTOS, R.R.; PESSOA, C.; DE MORAES, M.O.; DE FIGUEIREDO, J.R. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during in vitro culture of caprine ovarian cortical tissue. **Theriogenology**, v.61, p.1691–1704, 2004.

SILVA, J.R.V. Growth factors in goat ovaries and the role of activin-A in the development of early-staged follicles. **Phd Thesis**. Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine, 2005, 142p.

TASSEL, R.; KENNEDY, J.P. Early follicular development and atretic changes in ovary of the Lamb-fine struture and histochemistry. **Australian Journal of Biological Sciences**, v.33, p.675–678, 1980.

TELFER, E. E.; ZELINSKI, M. B. Ovarian follicle culture: advances and challenges for human and nonhuman primates. **Fertility and Sterility**, v.99, n.6, p.1523–1533, 2013.

TELFER, E.E.; MCLAUGHLIN, M.; DING, C.; JOO THONG, K. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. **Human Reproduction**, v.23, ed.5, p. 1151–1158, 2008

TSAFIRI, A.; BRAW, R.H. Experimental approaches to atresia in mammals. **Biology of Reproduction**, v.6, p.226–265, 1984.

VIEIRA, R.J. Biotécnicas aplicadas à Reprodução Bovina: Generalidades. **Ciência Animal Brasileira**, v.22, ed.1, p. 55–65, 2012.

WANDJI, S.A. ; EPPIG, J.J. ; FORTUNE, J.E. FSH and Growth Factor Affect the Growth and Endocrine Function in vitro of Granulosa Cells of Bovine Preantral Follicles. **Theriogenology**, v. 45, p.817–832, 1996.

WANG, X.; GOOK, D.A.; WALTERS, K.A.; ANAZODO, A.; LEDGER, W.L.; GILCHRIST, R.B. Improving fertility preservation for girls and women by coupling oocyte in vitro maturation with existing strategies. **Womens Health (Lond)**, v.12, p.275–278, 2016.

WASSARMAN, P.M. The mammalian ovum. In: KNOBIL, E.; NEILL, J. **The Physiology of Reproduction**, Raven Press, 1988, p.69–101.

WILLIAMS, G.L. Suckling as regulator of postpartum rebreeding in cattle: a review. **Journal of Animal Science**, v.68, p.831–852, 1990.

WOOD, T.C.; MONTALI, R.J.; WILDT, D.E. Follicle-oocyte atresia and temporal taphonomy in cold-stored domestic cat ovaries. **Molecular Reproduction and Development**, v.46, p.190–200, 1997.

XU, J.; LAWSON, M.S.; YEOMAN, R.R.; MOLSKNESS, T.A.; TING, A.Y.; STOUFFER, R.L.; ZELINSKI, M.B. Fibrin promotes development and function of macaque primary follicles during encapsulated three-dimensional culture. **Human Reproduction**, v.28, p.2187–2200, 2013.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma estratégia viável para cultivo *in vitro* e criopreservação de folículos pré-antrais na espécie bovina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Verificar o efeito de diferentes métodos de cultivo *in vitro* (padrão; fragmento sobre o suporte de agarose; fragmento sobre a agarose imerso no meio; e Milli-Cell) de folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano sobre o crescimento e desenvolvimento folicular;

Avaliar a morfologia, morfometria, viabilidade e indução da diferenciação das células da granulosa de folículos ovarianos a partir de fragmentos ovarianos cultivados *in vitro* por histologia clássica;

Caracterizar a atividade proliferativa e o estresse oxidativos causados nos folículos *in situ* cultivados nos diferentes métodos investigados pela técnica AgNOR (coloração da região organizadoras nucleolares argirofílicas) e análise de EROs, respectivamente;

Estabelecer a melhor concentração ao meio-base do agente crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO; 1M, 1,5M e 3M) no método de criopreservação por vitrificação para o tecido ovariano de fêmeas;

Investigar o efeito tóxico *in situ* após a exposição ao DMSO pelo teste de toxicidade;

Avaliar a retomada do desenvolvimento folicular e a influência do cultivo *in vitro* após o procedimento de criopreservação ao tecido ovariano;

Avaliar a morfologia, morfometria, viabilidade e o estresse oxidativo de folículos ovarianos a partir de fragmentos ovarianos vitrificados, por histologia clássica e EROs, respectivamente.

4 ARTIGO A

EFEITOS DE DIFERENTES SISTEMAS DE CULTIVO *IN VITRO* SOBRE O CRESCIMENTO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS DE OVÁRIOS BOVINOS

EFFECTS OF DIFFERENT *IN VITRO* CULTIVATION SYSTEMS ON THE GROWTH OF PREANTRAL FOLLICLES OF BOVINE OVARIES

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência de sistemas bidimensional e tridimensional para cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais na espécie bovina. Ovários (n=10) foram coletados de abatedouro local, a partir de vacas *Bos indicus* (n=5) cíclicas. Após a obtenção, os ovários foram processados e divididos em fragmentos (n=9); um fragmento por animal foi imediatamente fixado em Bouin (controle; D0) e os demais fragmentos distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: i) cultivo padrão, diretamente em placa de cultivo (2D), ii) cultivo suporte, sobre uma monocamada de gel (2D); iii) cultivo imerso, sobre gel de agarose imerso no meio (2D); e iv) cultivo Millicell-Biopore (3D). Os métodos de cultivo foram testados por seis (D6) ou quatorze (D14) dias. A cada dois dias os meios de cultivo eram substituídos totalmente por alíquotas frescas em temperatura e luminosidade controlada. Para a análise da integridade e grau de desenvolvimento (crescimento e proliferação das células da granulosa) dos folículos utilizou-se a histologia clássica e coloração da região organizadora de nucléolos (AgNOR), respectivamente. A morfometria dos folículos e oócitos e os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) também foram avaliados. Os dados foram submetidos aos testes de ANOVA ($p \leq 0,05$). Ao total, 1330 folículos pré-antrais foram identificados na análise morfológica. Após seis dias de cultivo, os fragmentos cultivados sobre o suporte de gel de agarose apresentaram uma maior proporção de folículos íntegros (75,3%; 113/150) em comparação aos demais grupos 58,7% (88/150) para o cultivo padrão; 62,6% (94/150) para cultivo imerso; 54% (81/150) para o cultivo Millicell ($p < 0,05$). Quanto à porcentagem de folículos em desenvolvimento em D6, não houve diferenças entre os métodos de cultivo testados ($p < 0,05$). Após quatorze dias de cultivo, os cultivos padrão, suporte de gel de agarose e imerso possibilitaram um maior percentual de folículos morfológicamente íntegros: 54,7% (82/150), 58% (87/150) e 54,7% (82/150), respectivamente, quando em comparação ao cultivo Millicell (35,3%; 53/150). Para a taxa de desenvolvimento em D14 os tratamentos também não diferiram entre si ($p > 0,05$). A avaliação morfométrica aos seis dias de cultivo apresentou resultados análogos entre os quatro grupos ($p > 0,05$). Para análise morfométrica aos quatorze dias, os folículos cultivados sobre suporte de agarose apresentaram maior diâmetro médio em relação aos demais tratamentos ($p < 0,05$). Os níveis de EROs e capacidade antioxidante das amostras cultivadas pelos quatro métodos apresentaram redução dos níveis de ânion superóxido e da capacidade antioxidante quando comparadas ao grupo controle. No D6 observou-se que método de cultivo imerso apresentou maiores níveis de ânion superóxido quando comparado aos demais (média±EPM= 5,37±0,1 no cultivo padrão; 5,06±0,2 no cultivo suporte; 6,64±0,5 no cultivo imerso e 4,69±0,1 OD/mg proteína no cultivo Millicell). Em D14 o mesmo foi observado para o método de cultivo imerso, com níveis maiores de ânion superóxido quando comparado ao método padrão (6,42±0,7 e 4,61±0,2 OD/mg proteína, respectivamente). Por outro lado, não foi observado diferença significativa na capacidade antioxidante entre os métodos de cultivo em D6. Em D14 observou-se que o método imerso apresentou menor capacidade antioxidante quando comparado aos métodos padrão, suporte de gel e Millicell (70,8; 85,1; 47,7 e 86,4 Equivalente de Trolox/mg proteína, respectivamente). Em conclusão, este estudo demonstra os benefícios do cultivo de folículos

pré-antrais sobre o suporte de gel de agarose em relação aos demais métodos de acordo com as avaliações morfológicas, morfométricas e de espécies reativas de oxigênio.

Palavras-chave: Cultivo 2D. Cultivo 3D. *in situ*. AgNOR. EROs.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the efficiency of two-dimensional and three-dimensional systems for *in vitro* culture of preantral follicles in the bovine species. Ovaries (n = 10) were collected from local slaughterhouse from *Bos indicus* (n = 5) cyclical cows. After obtaining, the ovaries were processed and divided into fragments (n = 9); one fragment per animal was immediately fixed in Bouin (control; D0) and the other fragments randomly distributed in four groups: i) standard culture, directly on the culture plate (2D), ii) support culture, on a 2D gel monolayer); iii) immersed culture on agarose gel immersed in the medium (2D); and iv) Millicell-Biopore cultivation (3D). Culture methods were tested for six (D6) or fourteen (D14) days. Every two days the culture media were completely replaced by fresh aliquots at controlled temperature and luminosity. For the analysis of the integrity and degree of development (growth and proliferation of granulosa cells) of the follicles the classical histology and coloration of the nucleolus organizing region (AgNOR), respectively, were used. The follicle and oocyte morphometry and the levels of reactive oxygen species (ROS) were also evaluated. Data were submitted to ANOVA tests ($p \leq 0.05$). A total of 1330 preantral follicles were identified in the morphological analysis. After six days of culture, fragments grown on the agarose gel support showed a higher proportion of intact follicles (75.3%; 113/150) compared to the other groups 58.7% (88/150) for culture pattern; 62.6% (94/150) for immersed culture; 54% (81/150) for the Millicell culture ($p < 0.05$). As for the percentage of developing follicles in D6, there were no differences between the culture methods tested ($p < 0.05$). After fourteen days of culture, the standard cultures, agarose gel, and immersion support provided a higher percentage of morphologically complete follicles: 54.7% (82/150), 58% (87/150) and 54.7% (82/150), respectively, when compared to the Millicell crop (35.3%, 53/150). For the rate of development in D14, the treatments also did not differ among themselves ($p > 0.05$). Morphometric evaluation at six days of culture presented similar results among the four groups ($p > 0.05$). For morphological analysis at fourteen days, follicles cultured on agarose support presented a larger mean diameter in relation to the other treatments ($p < 0.05$). The levels of ROS and antioxidant capacity of the samples cultured by the four methods showed a reduction of superoxide anion levels and antioxidant capacity when compared to the control group. In D6 it was observed that immersed culture presented higher levels of superoxide anion when compared to the others (mean \pm SEM = 5.37 ± 0.1 in the standard culture, 5.06 ± 0.2 in the support culture, 6.64 ± 0.5 in immersed culture and 4.69 ± 0.1 OD/mg protein in Millicell culture). In D14 the same was observed for the immersed culture method, with higher levels of superoxide anion when compared to the standard method (6.42 ± 0.7 and 4.61 ± 0.2 OD/mg protein, respectively). On the other hand, no significant difference was observed in the antioxidant capacity between the cultivation methods in D6. In D14 it was observed that the immersed method had lower antioxidant capacity when compared to the standard methods, gel support and Millicell (70.8; 85.1; 47.7 and 86.4 Trolox equivalents/mg protein, respectively). In conclusion, this study demonstrates the benefits of a culture of preantral follicles on the support of agarose gel in relation to the other methods according to the morphological, morphometric and reactive oxygen species evaluations.

Key words: 2D Culture. 3D Culture. *in situ*. AgNOR. ROS.

Introdução

Ao decorrer das últimas décadas, folículos pré-antrais foram considerados fontes de um grande número de oócitos disponíveis para a manipulação e produção de embriões *in vitro*, além de serem amplamente aplicados na reprodução animal (Gupta; Nandi, 2012; Silva et al., 2016). Recentemente, a utilização de folículos pré-antrais tornou-se uma importante estratégia para reprodução assistida humana, principalmente no auxílio de pacientes com dificuldade de fertilidade, risco de insuficiência ovariana prematura ou devido a doenças não malignas e até em casos de anormalidades genéticas (Frydman; Grynberg, 2016).

Investigações detalhadas sobre os mecanismos do desenvolvimento folicular têm sido restringidas pela ausência de um sistema de cultivo preciso que possibilite o crescimento folicular apropriado. A foliculogênese *in vivo* é um processo complexo que envolve uma série de etapas sequenciais nas quais folículos pré-antrais são ativados para iniciar o crescimento e desenvolverem-se até a fase de ovulação ou atresia (99,9%). Tal fato tem estimulado o interesse por um sistema de cultivo *in vitro* que possa manter o crescimento folicular de todos os estágios de desenvolvimento e evitar a perda de folículos *in vivo* (Xu et al., 2011; Haag et al., 2013; Araújo et al., 2014).

Sabe-se que o cultivo de folículos *in vitro* pode ser realizado em sistemas de cultivo bidimensional (2D) e tridimensional (3D). No sistema bidimensional o folículo encontra-se em contato direto com o substrato, enquanto, no tridimensional o folículo está circundado pelo substrato (Figueiredo et al., 2008; Rossetto et al., 2011; Figueiredo et al., 2018). Sistemas bidimensionais foram investigados por muitos anos como método tradicional de cultivo folicular (Gore-Langton; Daniel, 1990; Cortvrindt; Smitz; Van Steirteghem, 1996; West; Shea; Woodruff, 2007; Bizarro-Silva et al., 2018), enquanto, sistemas de cultivo 3D são métodos relativamente novos. Sistemas tridimensionais de cultivo mimetizam o estroma do tecido ovariano e, portanto, assemelham-se às condições sob as quais os folículos se desenvolvem *in vivo* (Eppig; Schroeder, 1989; Belli et al., 2012). Todos os passos iniciais para o cultivo de fragmentos teciduais (*in situ*) não resultaram manutenção celular conforme o desejado, devido a ineficiência dos métodos e meios de cultivos (Sadr et al., 2015; Green; Shikanov, 2016). Assim, buscou-se desenvolver um método de cultivo bidimensional com um suporte de gel de ágar que permitisse a interface entre gás – meio – células e proporcionasse as mesmas condições de um sistema tridimensional (Sato et al., 2011).

Neste contexto, embora estejam estabelecidos e aceitos vários modelos animais como alternativas para a investigação em reprodução humana, o acesso restrito a gametas humanos e as implicações éticas retardam o avanço nesse campo (Kim et al., 2010). Tendo em vista essa limitação, o uso de espécimes bovinas deve ser levado em consideração. Várias são as semelhanças fisiológicas entre bovinos e humanos quando comparados a outras espécies; por exemplo, a duração da foliculogênese e ovulação única, assim como, o conteúdo lipídico dos oócitos, o metabolismo embrionário (Leese, 2012) e similaridade genética. Trabalhar com modelos *in vitro* de bovinos é simplificado pelo fácil acesso a ovários de abatedouros e aos protocolos bem estabelecidos para algumas biotecnologias reprodutivas (Langbeen et al., 2015).

Assim, o objetivo do presente estudo foi comparar sistemas de cultivo *in vitro* bidimensionais e tridimensionais e estabelecer um método eficiente para o desenvolvimento de folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano, avaliando a integridade dos folículos, crescimento e desenvolvimento folicular e resposta ao estresse oxidativo, contribuindo para o aperfeiçoamento da técnica e sua aplicação futura em folículos ovarianos de outras espécies.

Material e Métodos

A menos que indicado de outra forma no decorrer do estudo os produtos químicos utilizados neste estudo foram adquiridos a partir de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Obtenção e transporte dos ovários

Os ovários (n=10) foram colhidos de abatedouro local, a partir de 5 fêmeas novilhas *Bos indicus* (Raça Nelore) apresentando atividade ovariana, a julgar pela presença do corpo lúteo e pequenos folículos antrais, e em boa condição corporal (escore corporal 2,5 a 3,5; escala de 0 a 5). Após a recuperação, os ovários foram lavados em etanol 70% por 10 segundos e solução tampão fosfato salino (PBS; Embriolife®, Vitrocell, Brasil), fragmentados e transportados em temperatura controlada para o laboratório (4°C; aproximadamente 30 km por 45 min). Para o transporte dos fragmentos utilizou-se meio essencial mínimo (MEM; Gibco BRL, Rockville, MD, USA; osmolaridade 300 mOsm/L, pH 7,2) suplementado de 100 µg/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina.

Cultivo in vitro de folículos pré-antrais e protocolo experimental

Cada animal (n=5) teve o par de ovários processado cuidadosamente, o tecido circundante e os ligamentos foram previamente retirados. As regiões em que continham grandes folículos antrais e corpos lúteos foram evitadas e/ou removidas. Posteriormente, o córtex do ovário foi dividido com auxílio de um punch dermatológico estéril descartável (5 mm; Kolplast, São Paulo, Brasil) em fragmentos (n=9) de aproximadamente 5x5x1 mm. Para cada animal, um fragmento foi selecionado aleatoriamente e imediatamente fixado em Bouin (tratamento controle não-cultivado, D0). Os fragmentos remanescentes do córtex ovariano foram cultivados individualmente, por 6 (D6) ou 14 (D14) dias, em alíquotas de 1 mL de meio de cultivo em placas de cultivo de 24 poços em estufa a 38,5°C, numa atmosfera de 5 % de CO₂ em ar e umidade saturada. O meio de cultivo controle constituía de MEM suplementado (MEM+) com ITS (insulina 6,25 µg/mL, transferrina 6,25 µg/mL, e selênio 6,25 µg/mL), 0,23 mM de piruvato, 2 mM glutamina, 2 mM hipoxantina, 1,25 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA Gibco BRL, Rockville, MD, USA), 20 UI/mL de penicilina e 200 mg/mL de estreptomicina, este meio foi determinado MEM+. Para as condições experimentais, os fragmentos foram distribuídos em quatro grupos: i) cultivo padrão, diretamente em placa de cultivo (2D), ii) cultivo suporte, sobre uma monocamada de gel (2D); iii) cultivo imerso, sobre gel de agarose (revestindo a placa) imerso no meio (3D); e iv) cultivo Millicell-Biopore (Merck, Darmstadt, Germany; 3D; Figura 1). A cada intervalo de dois dias o meio de cultivo era substituído por meio fresco em temperatura (38,5°C) e luminosidade controlada. O período de cultivo utilizado foi baseado em estudos publicados sobre o curso em tempo de ativação de folículos primordiais em outras espécies (Braw-Tal; Yossefi, 1997; Fortune et al., 1998; Figueiredo et al., 2018).

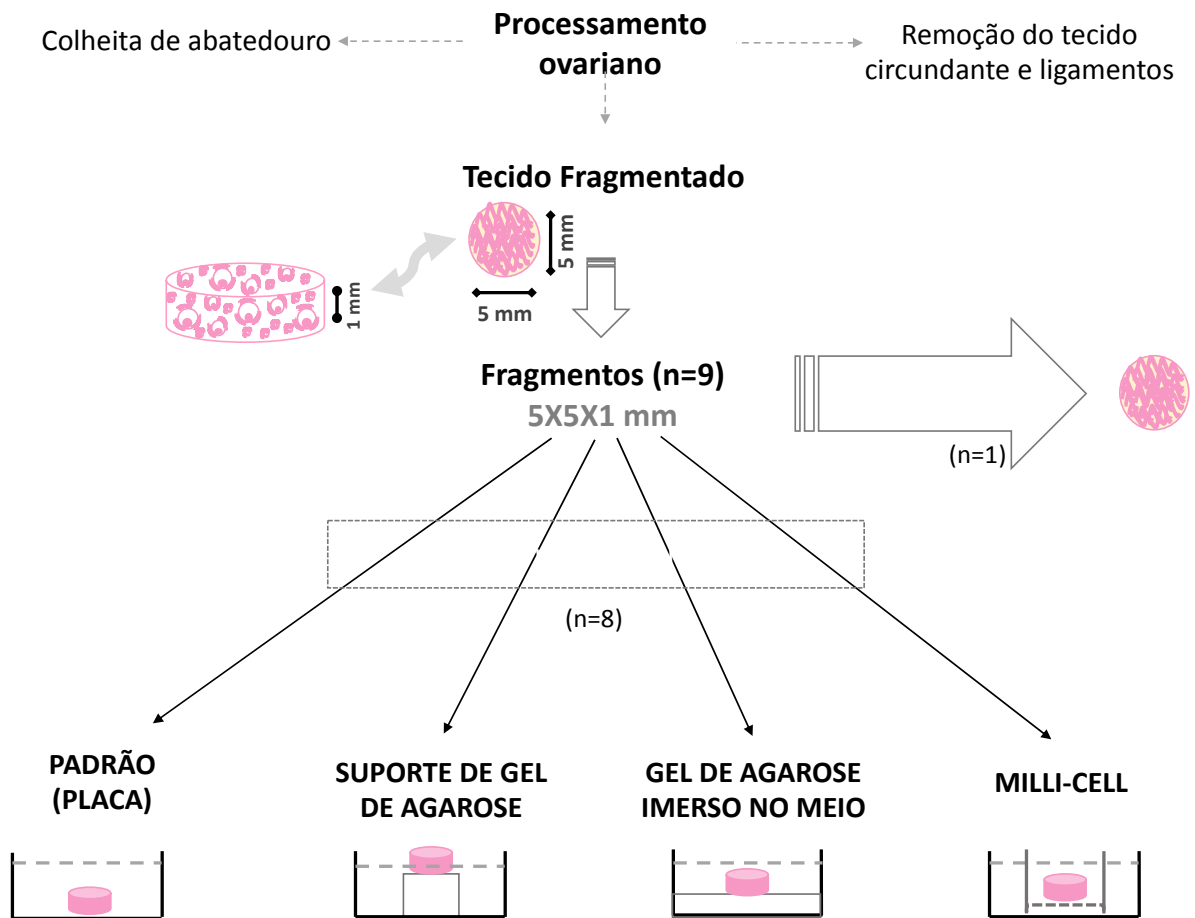


Figura 1. Protocolo experimental utilizado para cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais bovinos em meio controle (MEM+) em diferentes métodos de cultivo (cultivo padrão, cultivo sobre o suporte de gel de agarose, cultivo com gel de agarose sobre a placa e cultivo Millicell-Biopore)

Preparação do Gel de Agarose

A solução utilizada para a formação de gel foi preparada por dissolução de Agarose (Agarose Molecular Biology Grade; Kasvi, Brasil) em água deionizada estéril (MilliQ) para obtenção de uma solução a 1,5% de Agarose (p/v). Após a obtenção do gel, os suportes foram confeccionados com dimensões de 1 cm³ (Silva et al., 2017) ou a placa de cultivo revestida com 1 mL por poço para obtenção de uma estrutura uniforme, para os tratamentos com o suporte e imerso, respectivamente. O gel foi trocado completamente no oitavo dia (D8) de cultivo.

Processamento histológico

Para a análise histológica da morfologia ovariana e dos folículos ovarianos, os fragmentos do controle (não cultivado) e cultivados durante 6 ou 14 dias, foram fixados por imersão em Bouin durante 24h e mantidos em álcool 70%. Após a fixação, os tecidos foram desidratados numa série graduada de soluções crescente de etanol, clarificados e diafanizados em xilol, embebidos em parafina e incluídos em blocos para cortes histológicos. Subsequentemente, cada peça foi seccionada a 5 µm com intervalo de 5 secções do tecido em micrótomo rotativo (Leica®, Wetzlar-Alemanha) para montagem de lâminas para microscopia. As lâminas foram coradas com Ácido Periódico de Schiff (PAS) e Hematoxilina. Para a coloração de PAS e Hematoxilina, resumidamente as lâminas de tecido foram inicialmente desparafinadas com xileno e em seguida, reidratadas utilizando etanol a 70% antes de serem coradas com ácido periódico (Sigma, St. Louis, MO, EUA) durante 5 min e o reagente de Schiff durante 10 min, e contracoradas com hematoxilina.

Análise da integridade e desenvolvimento folicular

Todas as secções foram examinadas usando microscopia óptica (10x e 40x; Nikon, Tokyo, Japan). Os folículos pré-antrais foram classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento folicular, em: (1) primordial (contendo uma camada de células somáticas, conhecidas como células da granulosa, planas ou achatadas ao redor do oócito), ou em desenvolvimento, como: (2) primário (uma única camada de células da granulosa cubóides em torno do oócito), ou (3) secundário (duas ou mais camadas de células granulosas cúbicas). Para avaliar a ativação e crescimento folicular foi realizada a quantificação dos folículos nas diferentes fases do desenvolvimento (primordiais, primários e secundários) no controle e após o cultivo *in vitro* nos diferentes tratamentos (Andrade et al., 2012).

Também foi realizada a classificação de acordo com a integridade segundo as seguintes variáveis morfológicas: (I) integridade das células oócito e granulosa; (II) presença ou ausência de corpos picnóticos; (III) retração ooplásmica; (IV) organização de células da granulosa; e (V) presença de membrana basal não ondulada, firmemente aderida às células da granulosa. Com base nestes critérios os folículos foram considerados morfolologicamente íntegros, quando o oócito apresentasse morfolologicamente íntegro não picnótico e cercado por células da granulosa organizadas em camadas discretas; ou

degenerado, o oócito encolhido com um núcleo picnótico e/ou cercado por células da granulosa desorganizadas isoladas a partir da membrana basal (Búfalo et al., 2016).

Ao avaliar as taxas de crescimento e ativação folicular, apenas os folículos íntegros foram considerados, e as porcentagens de folículos primordiais e em desenvolvimento (primários e secundários) foram calculados após 0 (tratamento controle), 6 ou 14 dias de cultivo nos diferentes grupos. Para evitar a recontagem, os folículos pré-antrais foram contados apenas na secção em que o núcleo do oócito fora observado.

Morfometria dos folículos pré-antrais cultivados in vitro

Para a análise dos diâmetros dos folículos e oócitos cultivados, foram observados cinco folículos pré-antrais morfológicamente íntegros por tratamento e as imagens capturadas. Foram avaliados 270 folículos pré-antrais, incluindo os tratamentos não cultivados (n=30) e cultivados por 6 dias (n=120) e 14 dias (n=120). As lâminas foram examinadas em um microscópio Leica® (DMSL, Leica Microsystems, Alemanha) e as imagens capturadas por uma câmera digital MOTICAM 2500 (5.0 MPixel) e analisadas no programa Motic Images Plus 2.0 ML. As medidas dos folículos e oócitos foram realizadas conforme as citadas por Silva-Buttkus et al. (2008), sendo que o diâmetro oocitário e folicular foi calculado a partir da média aritmética de duas medidas perpendiculares.

Avaliação da proliferação de células da granulosa (AgNOR)

Para estimar o índice de proliferação celular da granulosa dos folículos pré-antrais presentes no controle não cultivado e cultivados *in vitro* por 6 ou 14 dias, foi realizada a coloração de AgNOR para quantificar o número de regiões organizadoras nucleolares argirofílicas (NOR) que apresentam afinidade de prata (Ag), por núcleo de células da granulosa. Resumidamente, as lâminas coradas com AgNOR foram inicialmente obtidas através do mesmo procedimento do processamento histológico. As amostras foram desparafinizadas e desidratadas, posteriormente incubadas por 15 min em Triton X 0,5%, em seguida por 10 min em solução de AgNOR, à temperatura de 37°C. As soluções utilizadas foram (A) AgNOR 0,5 ou 1 g/mL em água desionizada e (B) gelatina 1 ou 2% em água desionizada contendo 1% de ácido fórmico. A solução de coloração foi uma mistura de A (2V) e B (1V). Em cada caso, as reações foram interrompidas enxaguando várias vezes em água desionizada.

Para quantificação ao menos 5 folículos foram avaliados em cada tratamento. Considerou-se o aspecto de todas as células da granulosa dos folículos visualizados. Para marcação positiva (marrom-corada), foram considerados aqueles que a célula da granulosa apresentavam ao menos uma marcação de NOR. As lâminas foram visualizadas sob um microscópio de luz (40x e 1000x), e a NOR de todos os núcleos de células da granulosa visíveis nos diferentes tratamentos foram contabilizados.

Análise de espécie reativa de oxigênio (EROs)

Os níveis de EROs foram determinados em amostras de tecido ovariano não cultivado e cultivados *in vitro* por 6 ou 14 dias utilizando ensaios cinético-colorimétricos para determinação da peroxidação lipídica (TBARS) e produção de ânion superóxido (NBT). A capacidade da amostra em resistir aos danos oxidativos foi determinada pela habilidade da redução do ferro (FRAP), a habilidade de neutralização de radicais livres (ABTS) e dos níveis de glutatona reduzida (GSH), posteriormente descritos e adaptados conforme Pinho-Ribeiro et al. (2016). As amostras de tecido ovariano bovino cultivadas nos diferentes métodos foram coletadas e mantidas a -80°C por pelo menos 48h.

Ensaio da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre (ABTS) e do poder antioxidante pela redução férrica (FRAP)

A capacidade das amostras para resistir ao dano oxidativo foi determinada pela sua eliminação de radicais livres (ensaio ABTS [ácido 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina 6-sulfônico]) e propriedades de redução férrica (ensaio FRAP). Os testes foram adaptados para um formato de microplaca de 96 poços, as amostras do tecido ovariano foram recolhidas 3 h após estímulo com LPS e homogeneizado em tampão KCl gelado a 1,15% (500µL). A absorvância dos ensaios ABTS e FRAP foi medida a 730 e 595 nm (Multiskan GO Thermo Scientific), respectivamente, e os resultados foram equacionados contra uma curva Trolox padrão (0,02-20 nmol).

Quantificação de glutathiona (GSH)

As amostras foram homogeneizadas com 200 μ l de EDTA 0,02 M. O homogenato foi misturado com 25 μ L de ácido tricloroacético a 50% e homogeneizado três vezes durante 15 min. A mistura foi centrifugada (15 min x 1500 g x 4). O sobrenadante foi adicionado a 200 μ l de tampão TRIS 0,2 M, pH 8,2 e 10 μ L de 0,01 M DTNB. Após 5 min, a absorvância foi medida a 412 nm contra um branco reagente sem sobrenadante. Uma curva padrão foi realizada com GSH padrão. Os resultados são expressos em nmol GSH por mg de proteína.

Ensaio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação lipídica foi medida pelo ensaio TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances). Amostras do tecido ovariano foram recolhidas 3h após a injeção i.pl. estímulo com LPS e homogeneizado em tampão KCl gelado a 1,15% (500 μ L). Os níveis de malondialdeído (MDA), um produto intermediário de peroxidação lipídica, foram determinados em amostras pela diferença entre a absorvância em 535 e 572 nm (Multiskan GO, Thermo Scientific). Os resultados são relatados como nmol de MDA por mg de proteína.

Produção de ânion superóxido (NBT)

A mensuração de produção de ânion superóxido em homogenatos de tecidos em 1,15% de tampão KCl (500 μ L) foi realizada utilizando o ensaio de nitroazul de tetrazólio (NBT) adaptado a uma microplaca. A redução do NBT foi medida a 600 nm (Multiskan GO, Thermo Scientific). Os resultados são apresentados como DO por mg de proteína.

Análise estatística

Todas as análises foram realizadas pelo software Action 3.1 versão do R 3.0.2 (Campinas, SP, Brasil). Os dados foram inicialmente submetidos aos testes de normalidade de resíduos (Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variância (Bartlett). O número médio de folículos pré-antrais morfologicamente íntegros e degenerados, de folículos primordiais e em desenvolvimento obtidos nos tratamentos controle e nos diferentes métodos de cultivo *in vitro* por seis ou quatorze dias, respectivamente, foram submetidos à ANOVA e

teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Para comparação dentro do mesmo método de cultivo por seis ou quatorze dias, os dados foram analisados através do Teste T-Student. A morfometria dos folículos (diâmetro médio dos folículos e oócitos) foram submetidos a análise de Kruskal-Wallis. Para os ensaios de estresse oxidativo os dados foram submetidos à ANOVA seguido pelo teste de Tukey foi realizado para cada método e tempo de cultivo. Os valores foram considerados estatisticamente significantes quando $p \leq 0,05$.

Resultados

Análise da morfologia e crescimento folicular

Foram avaliados 1330 folículos pré-antrais, sendo 326 (24,5%) primordiais e 1004 em desenvolvimento (75,5%; Figura 2). Em geral, após o início do cultivo, a proporção de folículos primordiais foi reduzida entre os diferentes tratamentos; portanto, houve um aumento na porcentagem de folículos em desenvolvimento. A porcentagem de folículos íntegros e degenerados de acordo com o estágio de desenvolvimento estão representados na figura 3 (6 dias) e 4 (14 dias).

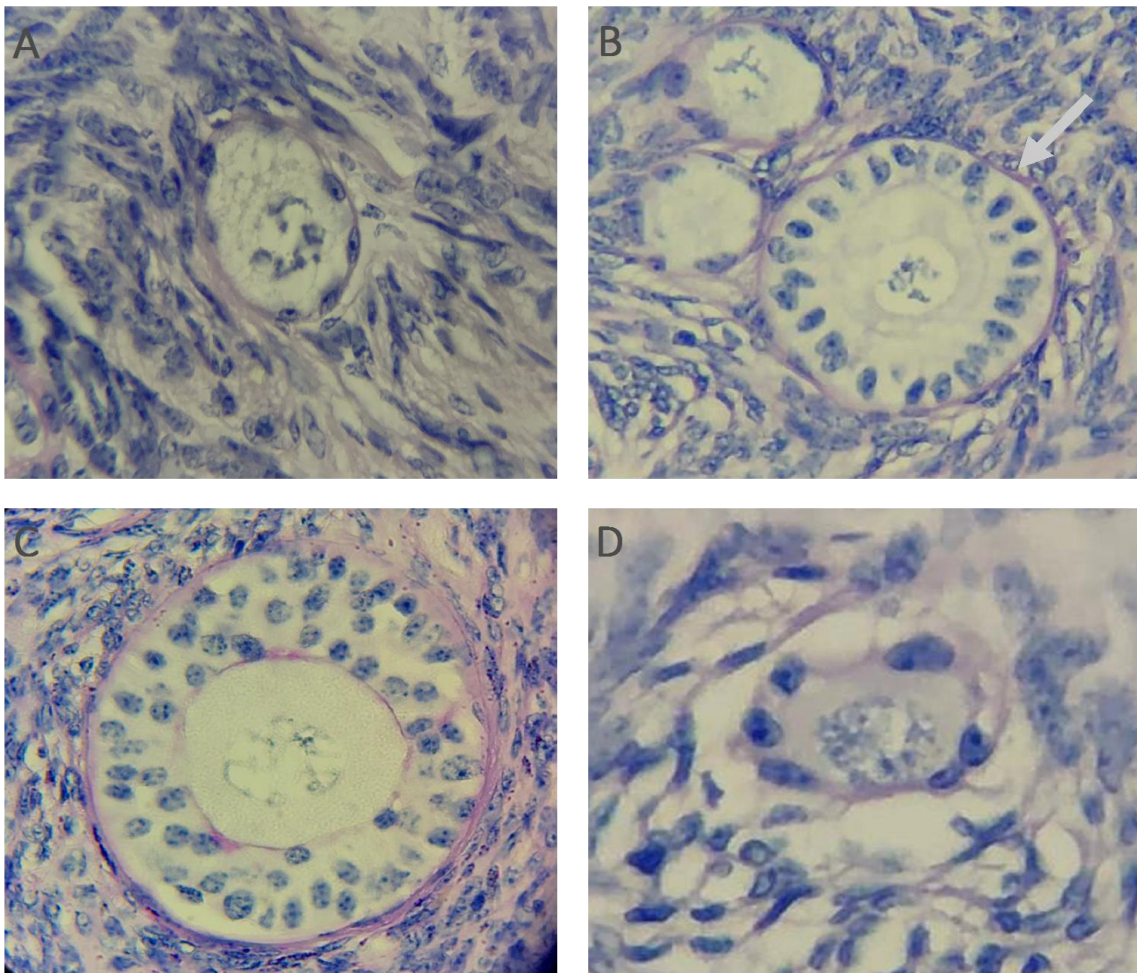


Figura 2. Fotomicrografia histológica da morfologia dos folículos pré-antrais bovinos (*Bos indicus*). (A) Folículo primordial íntegro; (B) Folículo primário íntegro (seta); (C) Folículo secundário íntegro; (D) Folículo primordial degenerado. Ácido periódico de Schiff (PAS) e Hematoxilina, 40X e 100X.

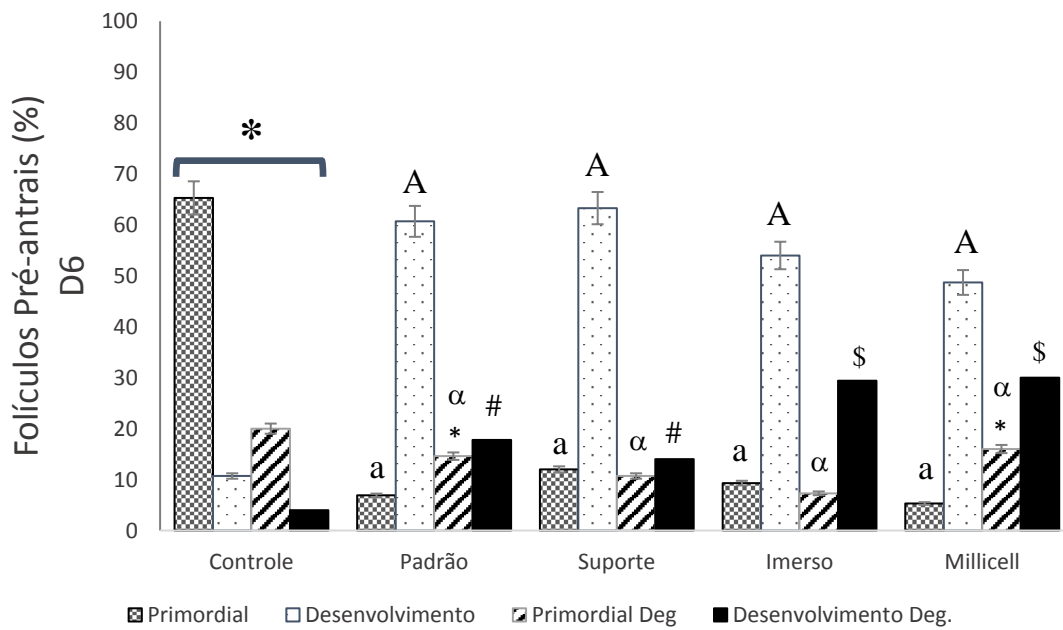


Figura 3. Porcentagem de folículos pré-antrais (primordiais íntegros, em desenvolvimento íntegros, primordiais degenerados e em desenvolvimento degenerado) em tecido ovariano não cultivado (controle, dia 0) e após cultivo *in vitro* com diferentes métodos de cultivo folicular (cultivo padrão, cultivo sobre o suporte de gel de agarose, cultivo com gel de agarose imerso no meio e cultivo Millicell-Biopore) por 6 dias

Valores seguidos de letras minúsculas (a, b) diferem estatisticamente entre tratamentos ($p < 0,05$).

Valores seguidos de letras maiúsculas (A, B) diferem estatisticamente entre tratamentos ($p < 0,05$).

Valores seguidos de letras minúsculas (α , β) diferem estatisticamente entre tratamentos ($p < 0,05$).

Valores seguidos de letras minúsculas (#, \$) diferem estatisticamente entre si ($p < 0,05$).

* Comparado com o controle

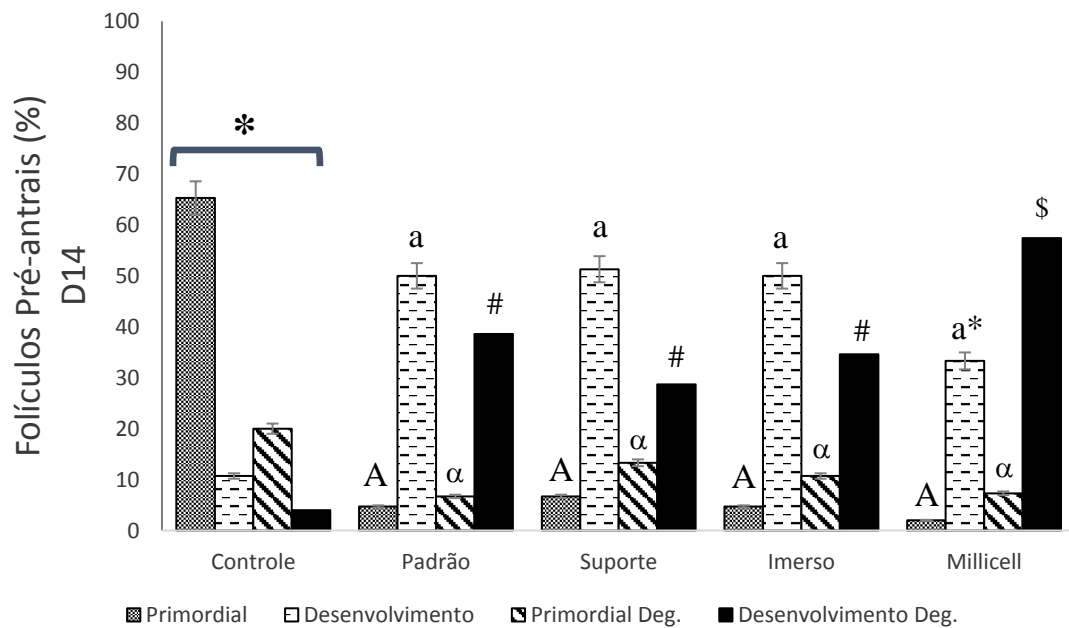


Figura 4. Porcentagem de folículos pré-antrais (primordiais íntegros, em desenvolvimento íntegros, primordiais degenerados e em desenvolvimento degenerado) em tecido ovariano não cultivado (controle, dia 0) e após cultivo *in vitro* com diferentes métodos de cultivo folicular (cultivo padrão, cultivo sobre o suporte de gel de agarose, cultivo com gel de agarose imerso no meio e cultivo Millicell-Biopore) por 14 dias

Valores seguidos de letras minúsculas (a, b) diferem estatisticamente entre tratamentos ($p < 0,05$).
 Valores seguidos de letras maiúsculas (A, B) diferem estatisticamente entre tratamentos ($p < 0,05$).
 Valores seguidos de letras minúsculas (α , β) diferem estatisticamente entre tratamentos ($p < 0,05$).
 Valores seguidos de letras minúsculas (#, \$) diferem estatisticamente entre tratamentos ($p < 0,05$).
 * Comparado com o controle

Os efeitos dos diferentes sistemas de cultivo sobre a percentagem de folículos morfologicamente íntegros estão ilustrados na figura 5. Após seis dias de cultivo, os fragmentos cultivados sobre o suporte de gel de agarose apresentaram uma maior proporção de folículos íntegros (75,3%; 113/150) em comparação aos demais grupos, 58,7% (88/150) para o cultivo padrão; 62,6% (94/150) para cultivo com gel de agarose imerso no meio; 54% (81/150) para o cultivo Millicell ($p < 0,05$). Aos quatorze dias de cultivo, os métodos de cultivo não apresentaram diferença significativa para as taxas de integridade dos folículos ($p > 0,05$).

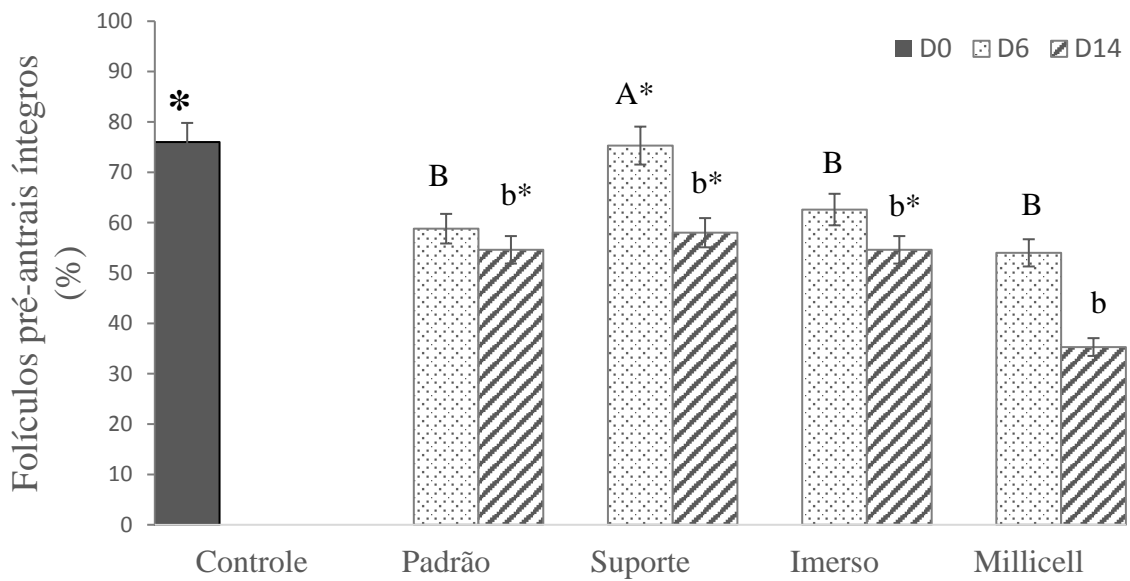


Figura 5. Porcentagem de folículos pré-antrais (primordiais, primários + secundários) íntegros em tecido ovariano não cultivado (controle, dia 0) e após cultivo *in vitro* com diferentes métodos de cultivo folicular (cultivo padrão, cultivo sobre o suporte de gel de agarose, cultivo com gel de agarose imerso no meio e cultivo Millicell-Biopore) por 6 ou 14 dias

Valores seguidos de letras maiúsculas (A, B) diferem estatisticamente entre tratamentos ($p < 0,05$).

Valores seguidos de letras minúsculas (a, b) diferem estatisticamente entre tratamentos ($p < 0,05$).

* Comparado com o controle

Quanto à porcentagem de folículos em desenvolvimento em D6, não houve diferenças entre os métodos de cultivo testados ($p < 0,05$; Figura 6). Aos quatorze dias de cultivo, os cultivos padrão, sobre o suporte de gel de agarose e gel de agarose imerso no meio possibilitaram um maior percentual de folículos morfologicamente íntegros em desenvolvimento: 54,7% (82/150), 58% (87/150) e 54,7% (82/150), respectivamente, quando em comparação ao cultivo Millicell (35,3%; 53/150). Para a taxa de desenvolvimento em D14 os tratamentos não diferiram entre si ($p > 0,05$; Figura 6).

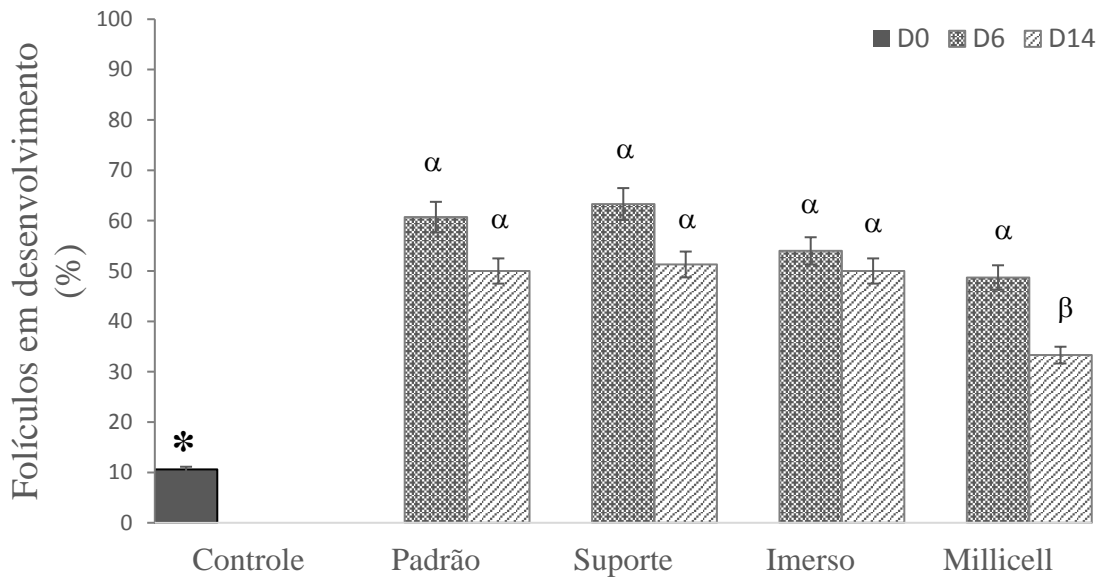


Figura 6. Porcentagem de folículos íntegros em estágio de desenvolvimento (primários + secundários) de fêmeas *Bos indicus* em tecido ovariano não cultivado (controle, dia 0) e após cultivo *in vitro* com diferentes métodos de cultivo folicular (cultivo padrão, cultivo sobre o suporte de gel de agarose, cultivo com gel de agarose imerso no meio e cultivo Millicell-Biopore) por 6 ou 14 dias

Valores seguidos de letras (α , β) diferem estatisticamente os dias de cultivo (D6 entre D14) dentro de um mesmo tratamento ($p < 0,05$).

* Comparado com o controle

Morfometria dos folículos pré-antrais cultivados in vitro

Para a análise morfométrica dos folículos pré-antrais, as dimensões do folículo e do oócito foram medidas em tecido cultivado nos diferentes métodos de cultivo *in vitro*. O diâmetro médio dos folículos e oócitos observados nos dias 6 ou 14 dias de cultivo podem ser encontrados na figura 7 e 8, respectivamente.

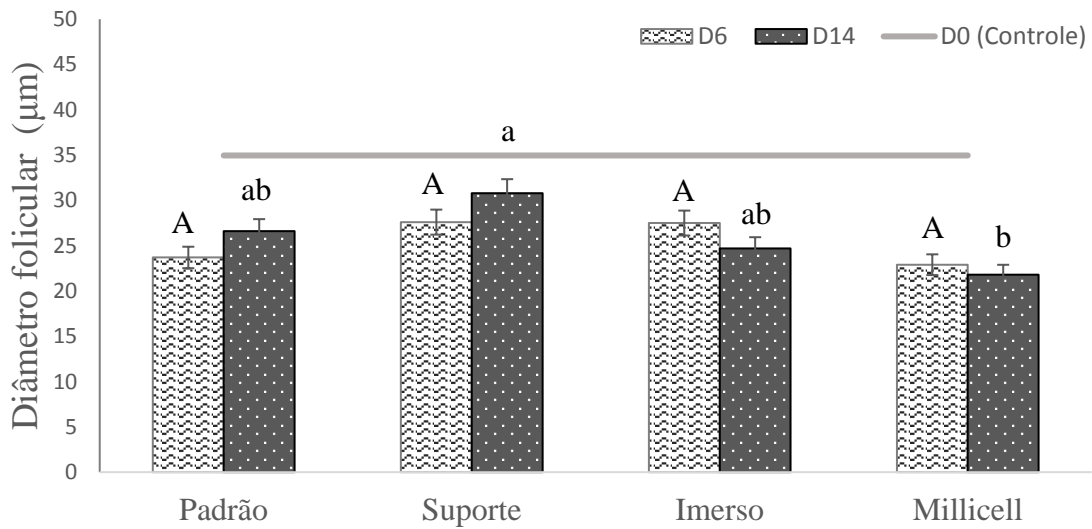


Figura 7. Diâmetro médio folicular em micrômetros (μm) de folículos pré-antrais bovinos cultivados por 6 ou 14 dias com diferentes métodos de cultivo *in vitro* (cultivo padrão, cultivo sobre o suporte de gel de agarose, cultivo com gel de agarose imerso no meio e cultivo Millicell-Biopore)

Valores seguidos de letras maiúsculas (A, B) diferem estatisticamente ($p < 0,05$).
Valores seguidos de letras minúsculas (a, b) diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

O diâmetro médio dos folículos pré-antrais do controle não cultivado foi de $34,9 \pm 5,5 \mu\text{m}$. Após o cultivo *in vitro* por 6 dias, o diâmetro médio dos folículos pré-antrais (primordiais, primários e secundários) apresentou resultados análogos entre os quatro grupos (cultivo padrão: $23,7 \pm 4,0 \mu\text{m}$, cultivo suporte: $27,6 \pm 5,9 \mu\text{m}$, cultivo imerso: $27,5 \pm 4,9 \mu\text{m}$ e cultivo Millicell $22,9 \pm 4,4 \mu\text{m}$; $p > 0,05$). No entanto, após quatorze dias, os folículos cultivados sobre o suporte de agarose apresentaram maior diâmetro médio em relação aos Millicell (cultivo suporte: $30,8 \pm 10,4 \mu\text{m}$, cultivo padrão: $26,6 \pm 7,4 \mu\text{m}$, cultivo imerso: $24,7 \pm 5,1 \mu\text{m}$ e cultivo Millicell: $21,8 \pm 2,7 \mu\text{m}$; $p < 0,05$). Em relação ao diâmetro dos oócitos presentes nos folículos, em todos os estágios de desenvolvimento, não foi observada diferença significativa ($P > 0,05$).

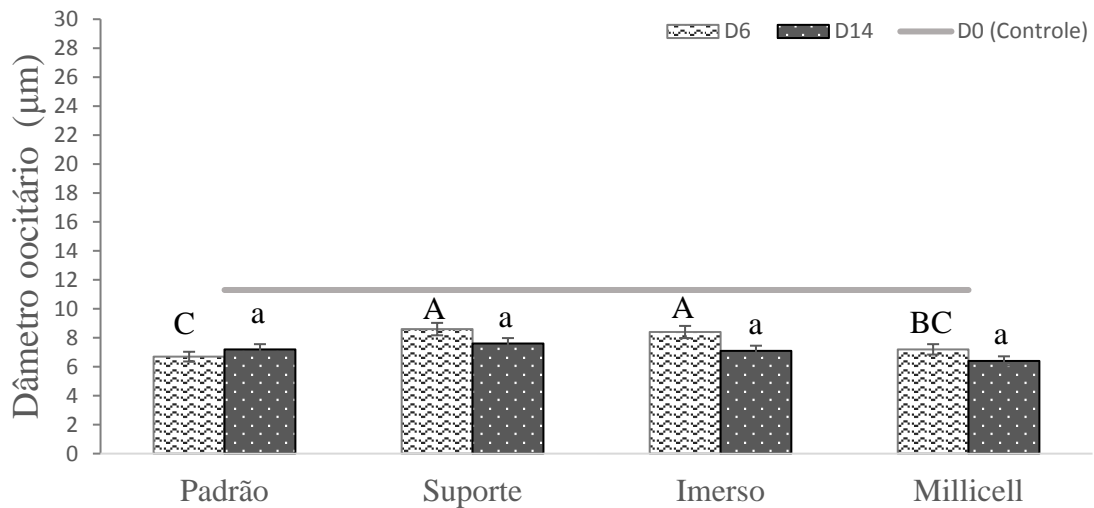


Figura 8. Média do diâmetro oocitário em micrômetros (μm) de folículos pré-antrais bovinos cultivados por 6 ou 14 dias com diferentes métodos de cultivo *in vitro* (cultivo padrão, cultivo sobre o suporte de gel de agarose, cultivo com gel de agarose imerso no meio e cultivo Millicell-Biopore)

Valores seguidos de letras maiúsculas (A, B) diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Valores seguidos de letras minúsculas (a, b) diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Avaliação da proliferação de células da granulosa (AgNOR)

Com base na marcação com NOR, foi realizada a análise qualitativa das células da granulosa de folículos pré-antrais do controle ou cultivados pelos diferentes métodos de cultivo (cultivo padrão, cultivo sobre o suporte de gel de agarose, cultivo com gel de agarose imerso no meio e cultivo Millicell-Biopore; Tabela 1) por 6 ou 14 dias.

Um total de 72 folículos pré-antrais foram analisados pela coloração AgNOR. A avaliação da proliferação celular por quantificação de NOR (Figura 9) revelou um maior número de células da granulosa coradas NOR em relação ao total de células da granulosa de folículos cultivados no método sobre o suporte de gel de agarose aos 6 e 14 dias. Por outro lado, o método de cultivo com gel de agarose imerso no meio não apresentou nenhuma célula da granulosa marcada aos 14 dias de cultivo.

Tabela 1. Análise qualitativa das células da granulosa de folículos pré-antrais marcada (marrom-corada) com AgNOR (proteínas argirofílicas relacionadas com regiões organizadoras de nucléolos) presente no controle ou cultivados pelos diferentes métodos de cultivo (cultivo padrão, cultivo sobre o suporte de gel de agarose, cultivo com gel de agarose imerso no meio e cultivo Millicell-Biopore) – % (n/t)

Controle D0	Período de cultivo	Métodos de Cultivo <i>in vitro</i>			
		Padrão % (n/t)	Suporte % (n/t)	Imerso % (n/t)	MilliCell % (n/t)
35,6 (46/129)	D6	3,52 (3/85)	66,0 (66/100)	26,4 (37/140)	35,0 (7/20)
	D14	10,7 (3/28)	52,3 (11/21)	0	20,0 (6/30)

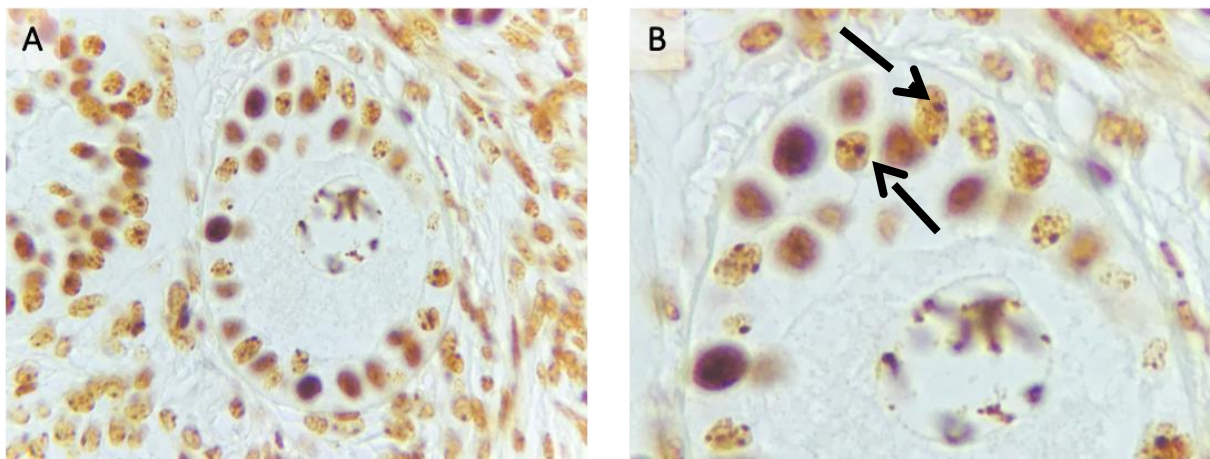


Figura 9. Fotomicrografia da proliferação celular por quantificação de NOR dos folículos pré-antrais bovinos (*Bos indicus*). A: Folículo primordial com marcação NOR. B: Células da granulosa com marcação positiva (seta preta) AgNOR. 40 e 100X

Análise de espécie reativa de oxigênio (EROs)

Após a análise de EROs, observou-se que todas as amostras cultivadas pelos métodos de cultivo padrão, cultivo sobre o suporte de gel de agarose, cultivo com gel de agarose sobre a placa e cultivo Millicell, apresentaram redução dos níveis de ânion superóxido, da capacidade antioxidante e peroxidação lipídica quando comparadas ao grupo controle. Os resultados encontrados pelos ensaios estão representados nas figuras 8 e 9.

Em D6 observou-se que método de cultivo com gel de agarose sobre a placa apresentou maiores níveis de ânion superóxido quando comparado aos demais métodos de

cultivo pelo ensaio colorimétricos do ânion superóxido pela redução do nitroazul tetrazólio (NBT; média \pm EPM = $5,37 \pm 0,1$ no cultivo padrão; $5,06 \pm 0,2$ no cultivo suporte; $6,64 \pm 0,5$ no cultivo imerso e $4,69 \pm 0,1$ OD/mg proteína no cultivo Millicell). Em D14 o mesmo foi observado para o método de cultivo imerso e o cultivo Millicell, com níveis maiores de ânion superóxido quando comparado ao método padrão ($6,42 \pm 0,7$, $6,91 \pm 0,6$ e $4,61 \pm 0,2$ OD/mg proteína, respectivamente). Por outro lado, não foi observado diferença significativa na capacidade antioxidante entre os métodos de cultivo em D6 pelos ensaios de sequestro de cátion 2,2V-azinobis (3-etilbenzotiazolina 6-sulfonato; ABTS) e do poder antioxidante pela redução férrica (FRAP). Em D14 observou-se que o método gel de agarose imerso no meio apresentou menor capacidade antioxidante quando comparado aos métodos padrão, suporte e Millicell (70,85; 85,17; 47,78 e 86,43 Equivalente de Trolox/mg proteína, respectivamente) pelo ensaio de ABTS. Enquanto que para o ensaio de FRAP não houve diferença entre os métodos de cultivo.

De acordo com a mensuração da glutathiona, aos 6 dias, o cultivo padrão e no cultivo sobre o suporte de agarose demonstraram atividade antioxidante pelos níveis de GSH semelhante ao controle ($p > 0,05$). Consequentemente, houve uma redução da atividade nos métodos de cultivo com gel de agarose imerso no meio e Millicell ($p < 0,05$). Em D14, observou-se que todos os métodos de cultivo contribuíram igualmente para a atividade antioxidante da amostra pela quantificação de GSH ($p > 0,05$). Com relação peroxidação lipídica, tanto para 6 dias quanto 14 dias de cultivo, não se observou diferença entre os níveis do ácido tiobarbitúrico (TBARS) dos métodos de cultivo e controle ($p > 0,05$).

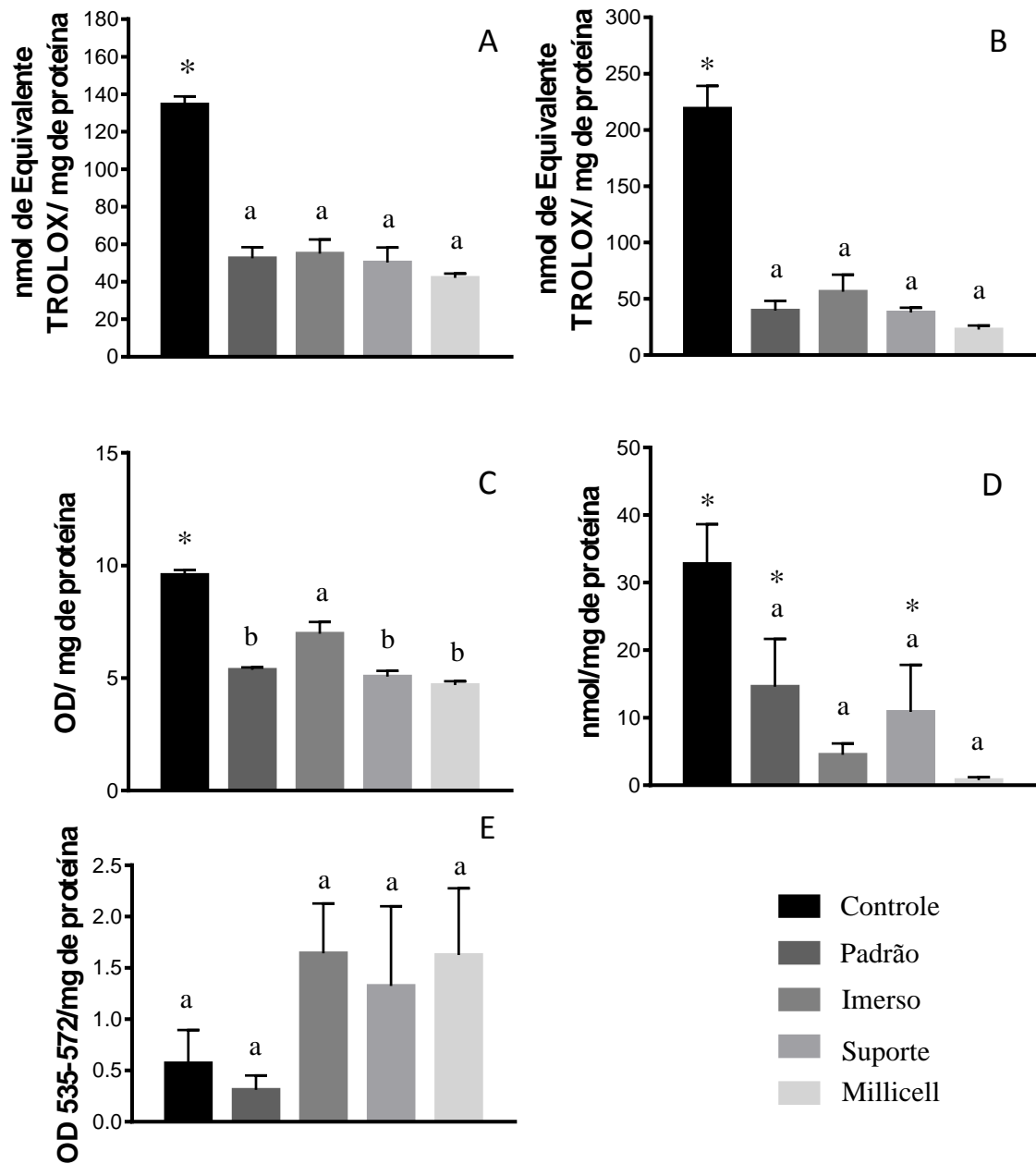


Figura 10. Efeitos dos diferentes métodos de cultivo (cultivo padrão, cultivo sobre o suporte de gel de agarose, cultivo com gel de agarose imerso no meio e cultivo Millicell-Biopore) no estresse oxidativo durante o cultivo de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano. (A) A capacidade de eliminação de radicais livres (ensaio ABTS) e (B) o poder antioxidante redutor férrico (ensaio FRAP) foram comparados com uma curva Trolox. A produção de ânion superóxido (C), quantificação de glutathiona (D) e a peroxidação lipídica (E) foram determinadas pelos testes NBT, GSH e TBARS, respectivamente. As amostras foram coletadas após seis dias de cultivo *in vitro*. Os resultados são médias \pm SEM, (ANOVA seguido pelo teste de Tukey)

Valores seguidos de letras minúsculas (a, b) diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

* Comparado com o controle

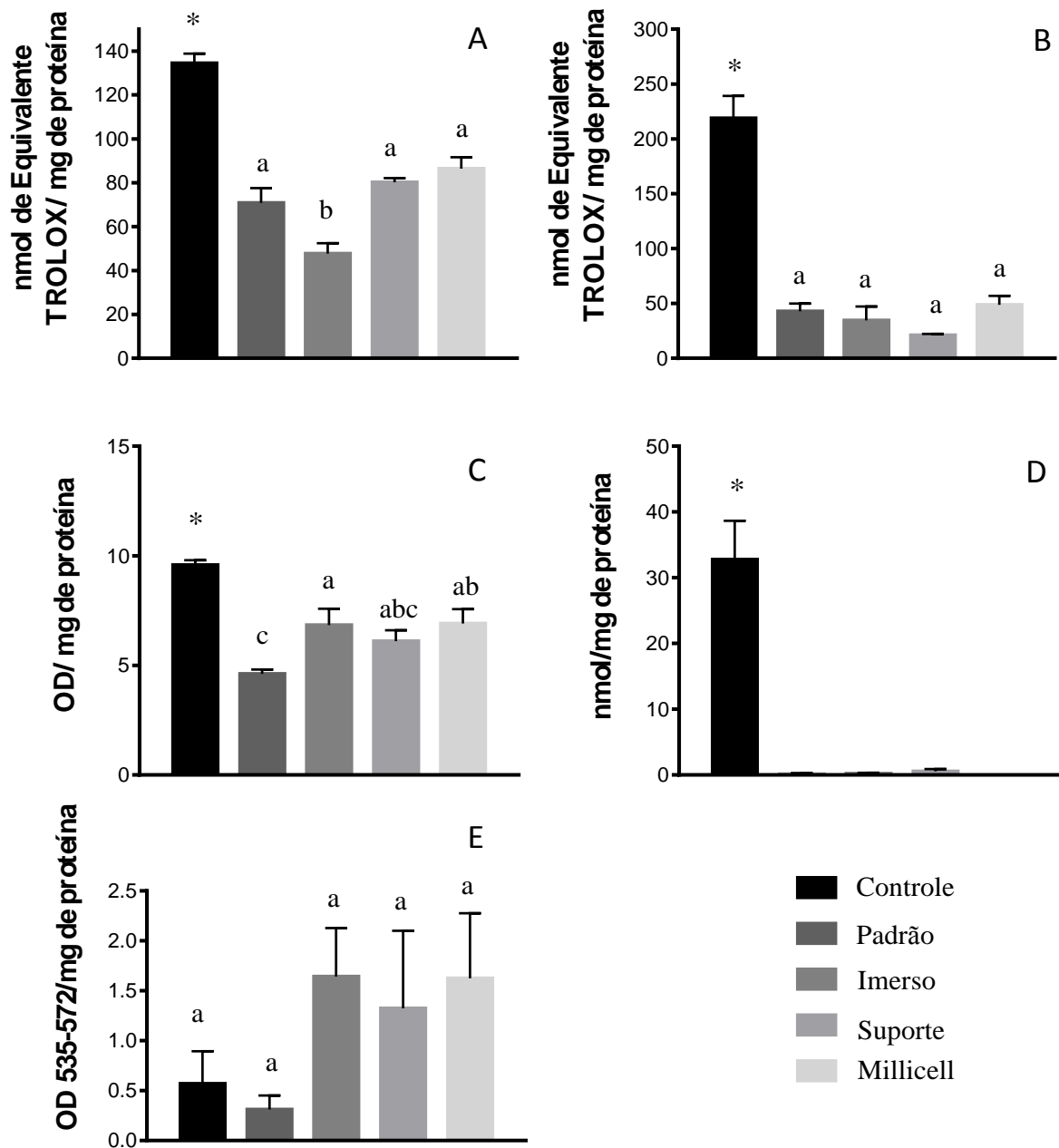


Figura 11. Efeitos dos diferentes métodos de cultivo (cultivo padrão, cultivo sobre o suporte de gel de agarose, cultivo com gel de agarose imerso no meio e cultivo Millicell-Biopore) no estresse oxidativo durante o cultivo de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano. (A) A capacidade de eliminação de radicais livres (ensaio ABTS) e (B) o poder antioxidante redutor férrico (ensaio FRAP) foram comparados com uma curva Trolox. A produção de ânion superóxido (C), quantificação de glutathiona (D) e a peroxidação lipídica (E) foram determinadas pelos testes NBT, GSH e TBARS, respectivamente. As amostras foram coletadas após quatorze dias de cultivo *in vitro*. Os resultados são médias \pm SEM, (ANOVA seguido pelo teste de Tukey)

Valores seguidos de letras minúsculas (a, b) diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

* Comparado com o controle

Discussão

Este é o primeiro estudo que compara o cultivo *in situ* bidimensional e tridimensional com matriz extracelular a base de agarose na preservação morfológica e desenvolvimento de folículos pré-antrais bovinos ao longo de 14 dias.

Aplicamos sistemas 2D e 3D para o cultivo de folículos *in situ* (cultivo de múltiplos folículos), a fim de avaliar a eficiência dos métodos com a presença ou ausência da matriz extracelular. O cultivo *in vitro* sobre o suporte de gel de agarose (2D) apresentou melhores condições para a manutenção da viabilidade e integridade folicular, maiores diâmetros dos folículos e oócitos cultivados, maior proliferação das células da granulosa e capacidade antioxidante durante o cultivo de folículos pré-antrais bovinos por 14 dias. O sistema de cultivo precisa afetar positivamente a sobrevivência, a proliferação, a morfologia folicular, a expressão gênica e a esteroidogênese a fim de mimetizar as diferenças ambientais naturais dos folículos em desenvolvimento *in vitro* (Araújo et al., 2014; Sadr et al., 2015). Vale ressaltar que o cultivo de folículos pré-antrais na condição bidimensional (padrão) está associada a alguns reveses técnicos, além do comprometimento da comunicação parácrina entre células da granulosa e oócito, fixação de células da granulosa à placa de cultivo e subsequentemente a falha na nutrição dos folículos pré-antrais.

A integridade morfológica de folículos pré-antrais foi preservada apenas no cultivo bidimensional sobre o suporte de agarose (73% e 58% de folículos íntegros com 6 ou 14 dias de cultivo, respectivamente) em comparação ao controle não cultivado. Isso possivelmente deve-se a presença da matriz extracelular gelificante formando mecanismos tridimensionais que protegem as estruturas cultivadas de aderirem a parede da placa. Além disso, a concentração da agarose reflete diretamente nos tamanhos da malha (poros) de gel o qual controla a interface entre gás – meio – células possibilitando uma maior ou menor perfusão do meio (Diekjürgen; Grainger, 2017). Em virtude disso, estudo utilizando o gel de agarose no cultivo celular demonstrou que grandes tamanhos de poros de gel combinados à sua estrutura aumentam o crescimento, a migração e a proliferação das células cultivadas (Dillon et al., 1998).

Considerando estas perspectivas, são escassos os estudos que relatam a eficiência de sistemas tridimensionais de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano. Entretanto, estudos com folículos caprinos isolados demonstraram que ao comparar os sistemas bi e tridimensional com gel de alginato a viabilidade destes folículos foi de 45,5% e 67,5%, respectivamente (Pessoa, et al., 2014). Além disso, alguns estudos com cultivo *in vitro*

3D com folículos isolados de roedores identificaram porcentagens de integridade e sobrevivência folicular semelhantes ao presente estudo (70,6% aos 8 dias e 63,3% aos 12 dias de cultivo em hidrogel de alginato – Asgari et al., 2015; 80% aos 12 dias de cultivo com hidrogel de hialuronano – Desai et al., 2012). Nossos melhores resultados foram com o cultivo bidimensional com a presença da matriz extracelular e folículos *in situ*. Cultivos com a espécie caprina e bovina utilizando o sistema 2D de folículos isolados durante 18 dias apresentaram 80,8% e 77,7%, respectivamente (Rossetto et al., 2013). Essas discrepâncias entre os dados apresentados de sobrevivência e integridade folicular, matriz extracelular e também o período de duração utilizados, podem estar relacionadas às diferenças entre as espécies e também aos sistemas e métodos de cultivo dos folículos pré-antrais.

Outro fator importante a ser considerado durante o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos é a composição do meio de cultivo, como as concentrações de minerais, vitaminas, nucleosídeos e aminoácidos. Devido a algumas peculiaridades existentes no desenvolvimento *in vitro*, o meio de cultivo é a primeira fonte de nutrientes em contato com os folículos. Portanto, dentre os meios disponíveis o MEM é considerado o meio de escolha para a cultivo dos folículos pré-antrais, devido à sua capacidade de manter a integridade e o desenvolvimento *in vitro* (Araújo et al., 2014; Jimenez et al., 2016). Assim, neste estudo os dados de desenvolvimento folicular foram similares (acima de 50% de folículos em desenvolvimento) para todos os métodos de cultivo aos seis dias. O mesmo ocorreu para o cultivo por 14 dias, no entanto, o cultivo Millicell-Biopore (3D) se assemelhou ao controle não cultivado. Isto sugere que este método não foi tão eficiente quanto os demais em manter o desenvolvimento folicular nestas condições.

As respostas morfométricas mostraram a redução no tamanho dos folículos e oócitos após cultivo por seis ou quatorze dias. Aos seis dias de cultivo as dimensões médias dos folículos cultivados nos diferentes métodos foram semelhantes, diferentemente para quatorze dias, no qual o cultivo utilizando o inserto (Millicell) apresentou folículos com menores dimensões quando comparados aos demais tratamentos. Além disso, o diâmetro médio dos oócitos dos folículos cultivados aos seis dias teve maiores dimensões nos métodos 2D e 3D com a presença de matriz extracelular, enquanto, aos quatorze dias de cultivo os métodos bi e tridimensional mantiveram o diâmetro do oócito. Resultados distintos foram encontrados para o crescimento folicular em outras espécies, mostrando que caprinos, caninos e para equinos obtiveram um maior diâmetro dos folículos cultivados em relação ao controle (Matos et al., 2007; Serafim et al., 2010 e Aguiar et al., 2016, respectivamente). Estas discrepâncias entre os resultados obtidos no presente estudo podem ser justificadas pela

ausência de um fator de crescimento ou hormônio ao meio de cultivo necessários para o desenvolvimento folicular.

A capacidade de proliferação celular utilizando regiões organizadoras de nucléolo (NORs) como parâmetros em folículos antrais cultivados *in vitro* foi significativamente maior para o cultivo sobre o suporte de gel de agarose. Esta abordagem foi descrita com sucesso em trabalhos que mensuraram as taxas de proliferação celular em diferentes estruturas ovarianas de ratos (Silva et al., 2003) e na avaliação de folículos vitrificados e posteriormente cultivados (Brito et al., 2018); além de ser amplamente utilizado para analisar a atividade de linhagens de células de câncer (Klopffleisch et al., 2011). Acreditamos que a diminuição do número de NORs está relacionada ao próprio método de cultivo, que pode retardar a proliferação das células da granulosa, provavelmente devido à influência ou interrupção no ciclo celular (Choi et al. 2008). É bem conhecido que o crescimento folicular inicia com o desenvolvimento e diferenciação das células foliculares após os estímulos deste folículo (Araújo et al., 2014). As NORs são bolsas de ácido desoxirribonucleico (DNA) responsáveis pela sinalização do ácido ribonucleico ribossômico (rRNA) durante a interfase. Comumente, as proteínas, não-histonas, apresentam um local de ligação ao rRNA e afinidade pela prata; portanto, precipitam formando grãos nucleolares. Logo, são marcados os cromossomos ativos durante o ciclo celular, sendo assim, o número de NORs remete a atividade proliferativa desses folículos (Silva et al., 2003). Consequentemente, células com atividade proliferativa mais intensa exibem um maior número de NOR (Derenzini, 2000), sendo considerado um ótimo marcador (McLaughlin et al., 2014; Brito et al., 2018).

Os radicais livres são produtos naturais durante as interações entre as células, bem como entre tecidos e órgãos, assim, um desequilíbrio entre oxidantes endógenos e antioxidantes pode alterar a homeostase celular. Com isso, a produção de EROs tem sido usada para avaliar o equilíbrio entre a produção e degradação, sendo um indicador de controle oxidativo (Winterbourn, 2014). Nesse estudo, o cultivo sobre o suporte de agarose pareceu manter constante a produção de EROs durante todo o período de cultivo. Em contrapartida, o método com gel de agarose imerso no meio pareceu ser o cultivo com maior produção de EROs. Consequentemente, o aumento na quantidade de EROs produzida por este sistema também foi relacionado com a redução no número de células foliculares ativas marcadas por NORs, uma vez que a análise histológica mostrou uma queda no número de folículos íntegros.

Em conclusão, o método de cultivo com suporte de agarose bidimensional mostrou-se mais eficiente em proporcionar condições favoráveis para o desenvolvimento de

folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano. Tal progresso contribuirá para obtenção de um maior número de folículos e ainda fornecer informações básicas sobre o sistema de desenvolvimento folicular.

5 ARTIGO B

AVALIAÇÃO DA CRIOPRESERVAÇÃO DE TECIDO OVARIANO BOVINO POR ANÁLISE DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO, TOXICIDADE, MORFOMETRIA E MORFOLOGIA

EVALUATION OF CRIOPRESERVATION OF OVARIAN BOVINE TISSUE BY ANALYSIS OF REACTIVE SPECIES OF OXYGEN, TOXICITY, MORPHOMETRY AND MORPHOLOGY

RESUMO

A criopreservação de tecido ovariano com folículos pré-antrais inclusos é uma estratégia viável para preservar a foliculogênese. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito de três diferentes concentrações (1M, 1,5M e 3M) de dimetilsulfóxido (DMSO) na vitrificação do tecido ovariano de bovinos. O córtex ovariano foi fragmentado (6 mm³; n=130) e dividido em um tratamento controle e três grupos vitrificados: i) 1M de DMSO; ii) 1,5M de DMSO e iii) 3M de DMSO. Para vitrificação, os fragmentos foram colocados em criotubos de 2,0 mL e submetidos a solução de equilíbrio, posteriormente, transferidos para solução de vitrificação. Assim, os fragmentos ovarianos foram expostos a 1,8 mL de Meio Essencial Mínimo (MEM) contendo uma das seguintes concentrações de DMSO (1M, 1,5M e 3M) por 15 min a 4°C. Após o equilíbrio os fragmentos foram transferidos a 1,8 mL em MEM com as mesmas concentrações de DMSO, suplementado com sacarose 0,25 M (SAC) e soro fetal bovino a 10% (SFB) por 15 min a 4°C. Folículos de todos os fragmentos foram analisados quanto ao teste de toxicidade e aos aspectos morfológicos, morfométricos, concentração de espécie reativas de oxigênio e cultivados para avaliação da integridade e retorno do desenvolvimento folicular após vitrificação. Os dados foram submetidos aos testes de ANOVA ($p \leq 0,05$). Com base na análise histológica durante o teste de toxicidade todas as concentrações de DMSO apresentaram a percentagem de folículos pré-antrais degenerados superior aos fragmentos antes do processo de criopreservação (controle; $P < 0,05$). A concentração de 3M de DMSO durante o teste de toxicidade teve um efeito prejudicial aos folículos íntegros (34,4%; $P < 0,05$). Após a vitrificação/aquecimento, os fragmentos ovarianos criopreservados em 1M, 1,5M e 3M de DMSO mostraram porcentagens semelhantes de folículos íntegros ($P > 0,05$), entretanto, apenas a concentração de 3M de DMSO diferiu do controle (33,9% e 81,3%, respectivamente; $P < 0,05$). A análise de radicais livres e a capacidade antioxidante demonstrou que a concentração de 3M de DMSO apresentou maior concentração de EROs quando comparada a demais concentrações de DMSO ($P < 0,05$). Após o cultivo *in vitro* dos fragmentos vitrificados/aquecidos a concentração de 1M de DMSO apresentou maiores porcentagens de folículos morfológicamente íntegros em relação as demais concentrações (47,7%; $P < 0,05$). Portanto, podemos sugerir que os folículos pré-antrais bovinos podem ser criopreservados *in situ* com maior eficiência em 1M de DMSO.

Palavras-chave: Vitrificação. DMSO. Cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais. Teste de toxicidade. EROs.

ABSTRACT

Cryopreservation of ovarian tissue with included preantral follicles is a viable tool to preserve folliculogenesis. The objective of this study was to evaluate the effect of three different concentrations (1M, 1.5M, and 3M) of dimethylsulfoxide (DMSO) on vitrification of bovine ovarian tissue. The ovarian cortex was fragmented (6 mm³; n = 130) and divided into one control treatment and three vitrified groups: i) 1M DMSO; ii) 1.5M DMSO and iii) 3M DMSO. For vitrification, the fragments were placed in 2.0 mL cryotubes and submitted to equilibrium solution, and then transferred to a vitrification solution. Thus, the ovarian fragments were exposed to 1.8 mL Minimum Essential Medium (MEM) containing one of the following concentrations of DMSO (1M, 1.5M and 3M) for 15 min at 4°C. After equilibration the fragments were transferred to 1.8 mL in MEM with the same concentrations of DMSO, supplemented with 0.25 M sucrose (SAC) and 10% fetal bovine serum (FBS) for 15 min at 4°C. Follicles of all fragments were analyzed for toxicity test and the morphological, morphometric, quantification reactive oxygen species and cultured for assessment of integrity and return of follicular development after vitrification. The data were crossed to the ANOVA tests ($p \leq 0.05$). Based on the histological analysis during the toxicity test, all DMSO concentrations presented the percentage of degenerate preantral follicles superior to the fragments before the cryopreservation process (control; $P < 0.05$). The 3M DMSO group during the toxicity test had a deleterious effect on intact follicles (34.4%; $P < 0.05$). After vitrification/warming, the cryopreserved ovarian fragments in 1M, 1.5M and 3M DMSO showed similar percentages of intact follicles ($P > 0.05$), however, only the concentration of 3M DMSO differed from control (33.9% and 81.3%, respectively, $P < 0.05$). The analysis of free radicals and antioxidant capacity showed the concentration of 3M of DMSO presented higher concentration of ROS when compared to other concentrations of DMSO ($P < 0.05$). After *in vitro* culture of the vitrified/warming fragments the concentration of 1M DMSO presented higher percentages of morphologically intact follicles than the other concentrations (47.7%; $P < 0.05$). Therefore, we can suggest that bovine preantral follicles can be cryopreserved in situ with greater efficiency using 1M DMSO.

Key words: Vitrification. DMSO. *In vitro* culture of preantral follicles. Toxicity test. ROS.

Introdução

A criopreservação do tecido ovariano tem sido amplamente estudada como forma de conservar a fertilidade feminina. Terapias contra neoplasias, como radioterapia e quimioterapia, podem levar à insuficiência prematura do ovário e à infertilidade devido aos efeitos prejudiciais das substâncias utilizadas (Agarwal; Chang, 2007; Lee et al., 2018). O potencial de preservação da fertilidade antes do tratamento é conveniente para pacientes que serão submetidas a tais tratamentos. Nas últimas décadas, as demandas por preservação da fertilidade cresceram drasticamente (Silber, 2011; Donnez et al., 2013).

Nesse contexto, há uma demanda crescente por estudos que desenvolvam protocolos ótimos para a criopreservação de tecido ovariano em diferentes modelos animais, que possibilitem a manutenção da morfologia celular, assim como, dos componentes da matriz extracelular (Santos et al., 2007a, b; Milenkovic et al., 2011). O tecido ovariano é capaz de ser conservado por métodos de congelamento lento e vitrificação existem controvérsias sobre a seleção do método de criopreservação mais apropriado (Sadr et al., 2015). A formação destrutiva de cristais de gelo e equipamentos caros associados ao congelamento lento tornam a vitrificação um método mais atraente, simples e rápido (Desai et al., 2011; Herraiz et al., 2014). Apesar de o congelamento lento ter sido utilizado com sucesso há vários anos, a técnica apresenta a ameaça de formação de gelo intracelular, responsável pelas alterações na morfologia e na ultraestrutura celular (Wang et al. 2008). Por outro lado, a técnica de vitrificação, sendo um protocolo rápido, não necessita de muitos recursos para ser realizada com sucesso e alcançar bons resultados. Além disso, é capaz de vitrificar o tecido ovariano e evitar a formação de cristais intracelular (Bagchi et al. 2008; Herraiz et al. 2014).

Os desafios no estabelecimento de procedimentos de criopreservação para tecido ovariano de diferentes espécies envolvem a complexidade da estrutura do tecido gonadal e da estrutura celular, bem como a toxicidade celular causada pelo crioprotetor. Os folículos pré-antrais são as melhores alternativas para fins de preservação da fertilidade devido à facilidade de obtenção e isolamento do tecido ovariano. Além disso, estes folículos podem apresentar uma ótima sobrevivência após os procedimentos de congelamento e descongelamento. No entanto, é necessário um maior tempo para o desenvolvimento e crescimento para produzir oócitos competentes (Oktay et a., 1997). Portanto, é importante entender os efeitos da conservação na proliferação e apoptose de células ovarianas em cada espécie para melhorar o sucesso do desenvolvimento folicular e da produção de gametas após cultivo *in vitro* e/ou transplante de tecido ovariano (Gastal et al., 2018).

O objetivo do presente estudo foi comparar os efeitos de três concentrações (1M, 1,5M e 3M) de DMSO durante a vitrificação, a fim de identificar as melhores condições para preservar folículos pré-antrais bovinos, com intuito de contribuir para o aperfeiçoamento da técnica e sua futura aplicação em procedimentos de reprodução assistida.

Material e Métodos

A menos que indicado de outra forma no decorrer do estudo os produtos químicos utilizados neste estudo foram adquiridos a partir de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Obtenção e transporte dos ovários

Os pares de ovários (n=20) foram colhidos de abatedouro local, a partir de 10 fêmeas novilhas *Bos indicus* (Raça Nelore) apresentando boa condição corporal (escore corporal 2,5 a 3,5; escala de 0 a 5). Após a recuperação, os ovários foram lavados em etanol 70% por 10 segundos e solução salina de cloreto de sódio (NaCl; JP Farma, São Paulo, Brasil), processados com auxílio de um punch dermatológico estéril descartável (6 mm; Kolplast, São Paulo, Brasil) em fragmentos (n=130) de aproximadamente 6x6x1 mm; um fragmento foi imediatamente fixado em Bouin (controle fresco) e transportados em temperatura controlada para o laboratório (2°C; aproximadamente 30 km por 45 min; Figura 1). Para o transporte dos fragmentos utilizou-se meio essencial mínimo (MEM; Gibco BRL, Rockville, MD, USA; osmolaridade 300 mOsm/L, pH 7,2) suplementado de 100 µg/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina.

Teste de toxicidade

Testes de toxicidade foram realizados para avaliar os efeitos da exposição dos folículos em fragmentos de tecido ovariano ao dimetilsulfóxido (DMSO) em três concentrações (1M, 1,5M e 3M), sem a criopreservação, sobre a porcentagem de folículos pré-antrais degenerados. Para tanto, os fragmentos ovarianos (n=30) foram expostos por 20 min a 20 °C (período de equilíbrio) em 1,8 mL de meio mínimo essencial (MEM) contendo DMSO a 1M, 1,5M ou 3M. Após o período de equilíbrio, os crioprotetores foram imediatamente removidos do tecido. Resumidamente, os fragmentos foram lavados em MEM

à temperatura ambiente e fixados em Bouin por 24 h e processados para histologia. Cada concentração foi testada em um fragmento ovariano de 10 animais diferentes.

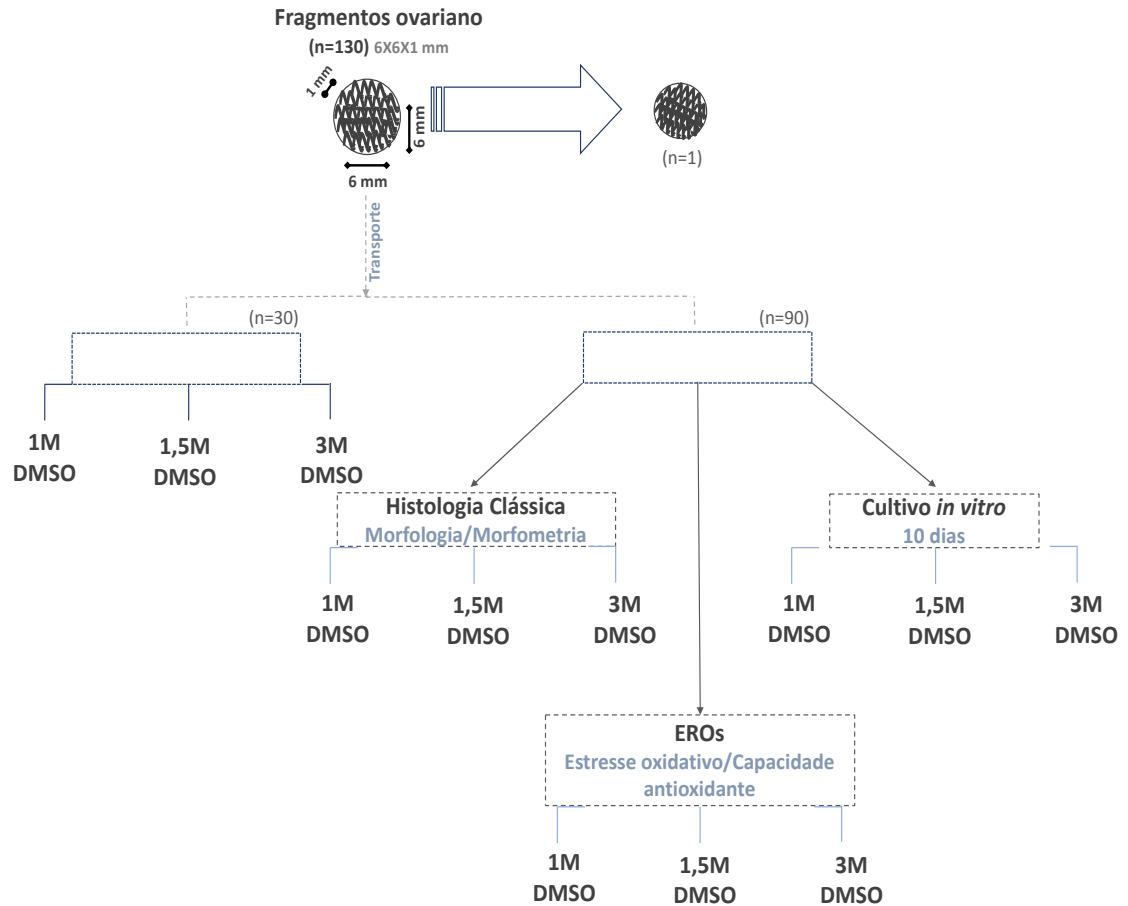


Figura 1. Protocolo experimental utilizado para criopreservação do tecido ovariano de bovinos.

Vitrificação do tecido ovariano

O processo de criopreservação foi adaptado do protocolo experimental relatado por Praxedes et al. (2017). Conforme mencionado, os ovários foram fragmentados com auxílio de um punch dermatológico estéril descartável (6 mm^3) e o córtex do ovário foi fragmentado ($n=90$). Para vitrificação, os fragmentos foram colocados em criotubos de 2,0 mL e submetidos a solução de equilíbrio (SE; passo 1), em condições semelhantes ao teste de toxicidade, posteriormente, transferidos para solução de vitrificação (SV; passo 2).

Brevemente, a solução de equilíbrio consistia em diferentes concentrações de DMSO (1M, 1,5M e 3M) em meio essencial mínimo (MEM). Nas mesmas condições, a

solução de vitrificação consistia em 1M, 1,5M e 3M de DMSO em MEM, suplementado com sacarose 0,25 M (SAC) e soro fetal bovino a 10% (SFB). Os fragmentos ovarianos foram expostos a 1,8 mL de SE por 15 min a 4°C; após o equilíbrio os fragmentos foram transferidos a 1,8 mL de SV por 15 min a 4°C. Em seguida, os fragmentos foram secos (usando uma gaze estéril) e colocados em contato com uma superfície de cubo de metal parcialmente imersa em nitrogênio líquido (N₂) para vitrificação por 30 s. Uma vez vitrificada, a amostra foi armazenada em N₂ líquido(-196°C), em tubos criogênicos durante uma semana (7 dias).

Aquecimento

Após 7 dias as amostras vitrificadas foram reaquecidas. Inicialmente os tubos criogênicos foram expostos ao ar por 30 s em temperatura ambiente e depois mergulhados em banho-maria a 39°C por 3 min. Para remoção do crioprotetor, os fragmentos foram submetidos a três lavagens consecutivas por 5min em MEM suplementado com 10% SFB e concentrações de sacarose decrescentes (0,50, 0,25 e 0M). Finalmente, as amostras de ovário foram alocadas para as análises histológica, morfométrica, cultivo *in vitro* e resposta ao estresse oxidativo.

Cultivo de folículos pré-antrais após aquecimento

Após o aquecimento os fragmentos vitrificados foram cultivados individualmente sobre suporte de gel de agarose em alíquotas de 1 mL de meio de cultivo em placas de cultivo de 24 poços em estufa a 38,5°C, numa atmosfera de 5 % de CO₂ em ar e umidade saturada durante 10 dias. O meio de cultivo controle foi MEM (Sigma M7278, Spruce Street, St. Louis, MO; osmolaridade 300 mOsm/l, pH 7,2) suplementado (MEM+) com ITS (insulina 6,25 µg/mL, transferrina 6,25 µg/mL, e selênio 6,25 µg/mL), 0,23 mM de piruvato, 2 mM glutamina, 2 mM hipoxantina, 1,25 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA Gibco BRL, Rockville, MD, USA), 20 UI/mL de penicilina e 200 mg/mL de estreptomicina, este meio foi determinado MEM+. Para confecção do gel de agarose, a solução utilizada para a formação de gel foi preparada por dissolução de Agarose (Agarose Molecular Biology Grade; Kasvi, Brasil) em água deionizada (MilliQ) estéril para se obtenção de uma solução a 1,5% de Agarose (p/v). Após a obtenção do gel, os suportes foram confeccionados com dimensões de 1 cm³ (Silva, et al., 2017). O gel foi trocado completamente no sexto dia de cultivo. A cada intervalo de dois dias o meio de cultivo foi substituído por meio fresco em

temperatura controlada (38,5°C). O período de cultivo utilizado foi baseado em estudos publicados sobre o curso em tempo de ativação de folículos primordiais da espécie bovina (Yang; Fortune, 2008).

Processamento histológico

Para a análise histológica da morfologia dos folículos ovarianos, os fragmentos do controle (não vitrificado), vitrificados/aquecidos (1M, 1,5M e 3M de DMSO) e cultivados *in vitro* após criopreservação foram fixados por imersão em Bouin durante 24h e mantidos em álcool 70%. Após a fixação, os tecidos foram desidratados numa série graduada de soluções crescente de etanol e diafanizadas em xilol, embebidos em parafina e incluídos em blocos de parafina para cortes histológicos. Subsequentemente, cada peça foi seccionada a 5 µm com intervalo de 5 secções do tecido em micrótomo rotativo (Leica®, Wetzlar-Alemanha) para montagem de lâminas para microscopia. As lâminas foram coradas com Ácido Periódico de Schiff (PAS) e Hematoxilina. Para a coloração de PAS e Hematoxilina, resumidamente as lâminas de tecido foram inicialmente desparafinadas com xileno e em seguida, reidratadas utilizando etanol a 70% antes de serem coradas com ácido periódico durante 5 min e o reagente de Schiff durante 10 min, e contracoradas com hematoxilina.

Análise da morfologia e crescimento folicular

Todas as secções foram examinadas usando microscopia óptica (10x e 40x; Nikon, Tokyo, Japan). Os folículos pré-antrais foram classificados segundo os seguintes variáveis morfológicas: (1) integridade das células da granulosa e oócito ; (2) organização de células da granulosa; (3) retração ooplásmica; (4) presença ou ausência de corpos picnóticos; e (5) presença de membrana basal não ondulada, firmemente aderida às células da granulosa. Com base neste critério, os folículos foram considerados morfológicamente íntegros, quando o oócito apresentasse morfológicamente íntegro com um núcleo não picnótico e cercado por células da granulosa organizadas em camadas discretas; ou folículo degenerado, o oócito estava encolhido com um núcleo picnótica e cercado por células da granulosa desorganizadas isoladas a partir da membrana basal (Búfalo et al., 2016). E de acordo com o desenvolvimento folicular em: (i) primordial (contendo uma camada de células somáticas, conhecidas como células da granulosa, planas ou achatadas ao redor do oócito), ou em desenvolvimento, como: (ii) primário (uma única camada de células da granulosa cubóides em torno do oócito), ou (iii) secundário (duas ou mais camadas de células granulosas cúbicas; Bizarro-Silva et al., 2018).

Para evitar a contagem em duplicidade, os folículos pré-antrais foram contados apenas na secção em que o núcleo do oócito fora observado.

Morfometria dos folículos pré-antrais cultivados in vitro

Para a análise dos diâmetros dos folículos e oócitos vitrificados, foram observados 150 folículos pré-antrais por tratamento e as imagens capturadas. Foram avaliados 150 folículos pré-antrais nos tratamentos vitrificados com 1,0M DMSO (n=50), 1,5M DMSO (n=50) e 3,0M DMSO (n=50). As medidas dos folículos e oócitos foram realizadas conforme as citadas por Silva-Buttkus et al. (2008), sendo que o diâmetro oocitário e folicular foi calculado a partir da média aritmética de duas medidas perpendiculares, através do microscópio Opticam OPT HD 0400s (São Paulo, Brasil).

Análise de espécie reativa de oxigênio (EROs)

Amostras de tecido ovariano criopreservadas foram aquecidas e retirado o crioprotetor para a realização dos ensaios cinético-colorimétricos para determinação dos níveis de peroxidação lipídica (TBARS) e produção de ânion superóxido (NBT). A capacidade da amostra em resistir aos danos oxidativos foi determinada pela habilidade da redução do ferro (FRAP), e a habilidade de neutralização de radicais livres (ABTS), posteriormente descritos e adaptados conforme Pinho-Ribeiro et al (2016).

Ensaio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

A peroxidação lipídica foi medida pelo ensaio TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances). Amostras do tecido ovariano foram recolhidas 3h após a injeção i.pl. estímulo com LPS e homogeneizado em tampão KCl gelado a 1,15% (500 μ L). Os níveis de malondialdeído (MDA), um produto intermediário de peroxidação lipídica, foram determinados em amostras pela diferença entre a absorbância em 535 e 572 nm (Multiskan GO, Thermo Scientific). Os resultados são relatados como nmol de MDA por mg de proteína.

Produção de ânion superóxido

A mensuração de produção de ânion superóxido em homogenatos de tecidos em 1,15% de tampão KCl (500 µL) foi realizada utilizando o ensaio de nitroazul de tetrazólio (NBT) adaptado a uma microplaca. A redução do NBT foi medida a 600 nm (Multiskan GO, Thermo Scientific). Os resultados são apresentados como DO por mg de proteína.

Ensaio da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre e do poder antioxidante pela redução férrica

A capacidade das amostras para resistir ao dano oxidativo foi determinada pela sua eliminação de radicais livres (ensaio ABTS [ácido 2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina 6-sulfônico]) e propriedades de redução férrica (ensaio FRAP). Os testes foram adaptados para um formato de microplaca de 96 poços, as amostras do tecido ovariano foram recolhidas 3 h após estímulo com LPS e homogeneizado em tampão KCl gelado a 1,15% (500µL). A absorvância dos ensaios ABTS e FRAP foi medida a 730 e 595 nm (Multiskan GO Thermo Scientific), respectivamente, e os resultados foram equacionados contra uma curva Trolox padrão (0,02-20 nmol).

Análise estatística

Os dados foram inicialmente submetidos aos testes de normalidade de resíduos (Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variância (Bartlett). Para a análise do teste de toxicidade dos folículos degenerados e dos graus de degeneração, os dados foram submetidos à ANOVA e teste de Tukey. A morfologia e morfometria dos folículos vitrificados foram submetidos a análise de Kruskal Wallis. Para os ensaios de estresse oxidativo os dados foram submetidos à ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas com o pelo software Action 3.1 versão do R 3.0.2 (Campinas, SP, Brasil). Os valores foram considerados estatisticamente significantes quando $p \leq 0,05$.

Resultados

Análise da morfologia de folículos pré-antrais degenerados após teste de toxicidade

A análise histológica do tecido ovariano revelou a presença de todas as categorias foliculares, com predominância de folículo primordiais, além da observação de folículos íntegros e degenerados em fragmentos submetidos ao teste de toxicidade. A porcentagem de folículos pré-antrais degenerados no controle foi de 18,7% (80/428), nos fragmentos submetidos ao teste de toxicidade na concentração de 1M foi de 28,3% (210/741), 1,5M 49,8% (252/506) e 65,7% (349/531) para 3M de DMSO (Figura 2).

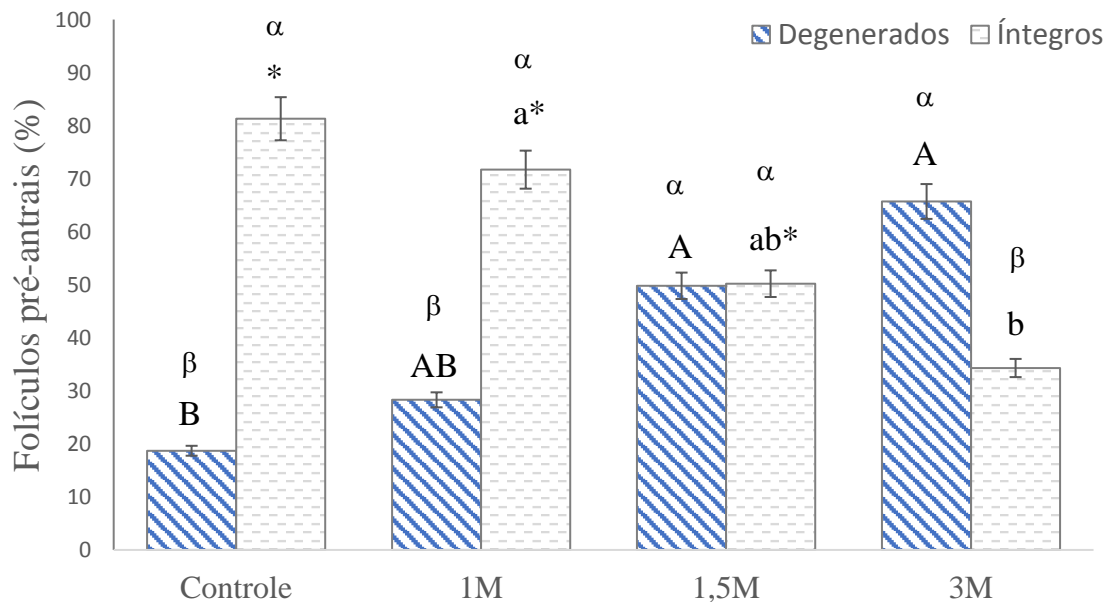


Figura 2. Folículos pré-antrais degenerados e íntegros (%) em fragmentos ovarianos não vitrificados (controle) ou criopreservados a diferentes concentrações de DMSO (1M, 1,5M e 3M) em fragmentos ovarianos após o teste de toxicidade como determinado pela avaliação histológica

Valores seguidos de letras maiúsculas (A, B) diferem estatisticamente entre tratamentos ($P < 0,05$).

Valores seguidos de letras minúsculas (a, b) diferem estatisticamente entre tratamentos ($p < 0,05$).

Valores seguidos de letras (α , β) diferem estatisticamente os folículos degenerados e íntegros de um mesmo tratamento ($p < 0,05$).

* Comparado com o controle

Foram encontrados três graus de degeneração: grau 1 quando as células da granulosa e/ou o citoplasma oocitário foram danificados, grau 2 quando o oócitos apresentava

sinais de degeneração e grau 3 quando ambas as estruturas foram degeneradas. As porcentagens de folículos pré-antrais degenerados de grau 1, 2 e 3 nos fragmentos do teste de toxicidade estão representados na figura 3.

Uma predominância significativa dos folículos degenerados de grau 1 em relação aos do grau 2 e 3 foi observada nos fragmentos vitrificados com 1M, 1,5M e 3M de DMSO ($P < 0,05$). Após o teste de toxicidade, não foi observada diferença significativa entre os folículos degenerados do grau 1 e 2, quando os crioprotetores foram utilizados a 1M e 1,5M e 3M de DMSO ($P > 0,05$). Entretanto, observou-se uma maior porcentagem de folículos degenerados de grau 3 após a exposição dos fragmentos a 3M de DMSO ($P < 0,05$).

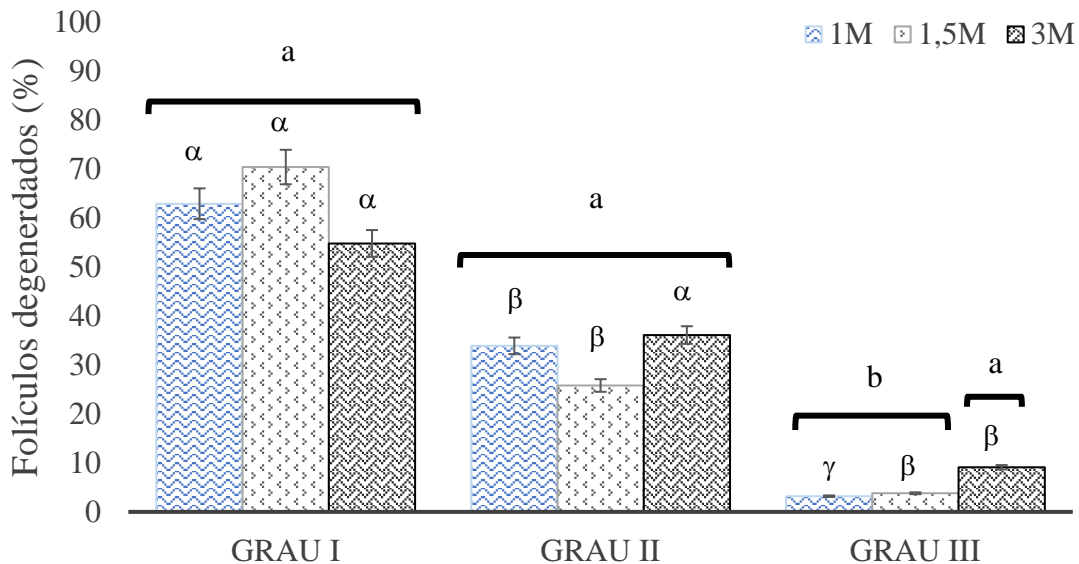


Figura 3. Porcentagem de folículos pré-antrais de bovinos degenerados Grau 1, 2 e 3 na concentração de 1M, 1,5M e 3M de DMSO após o teste de toxicidade

Valores seguidos de letras minúsculas (α , β , γ) diferem estatisticamente entre as concentrações do agente crioprotetor ($p < 0,05$).

Valores seguidos de letras minúsculas (a, b) diferem estatisticamente entre os graus de degeneração ($p < 0,05$).

Ao avaliar as concentrações de crioprotetores, o tratamento com 1M e 1,5M de DMSO resultaram em porcentagens mais altas de folículos do grau 1 do que os demais graus de degeneração (grau 2 e 3; $P < 0,05$). No entanto, na concentração de 3M de DMSO as porcentagens de folículos degenerados foram semelhantes para o grau 1 e 2 ($P > 0,05$) diferindo apenas para o grau 3 ($P < 0,05$).

Análise da morfologia e integridade folicular dos folículos pré-antrais vitrificados

Foram avaliados 1842 folículos pré-antrais, sendo 1086 íntegros e 756 degenerados (Figura 4). Devido ao baixo número de folículos encontrados nas classes de folículos primários e secundários, eles foram agrupados e nomeados como folículos em desenvolvimento para fins de análise estatística descritiva.

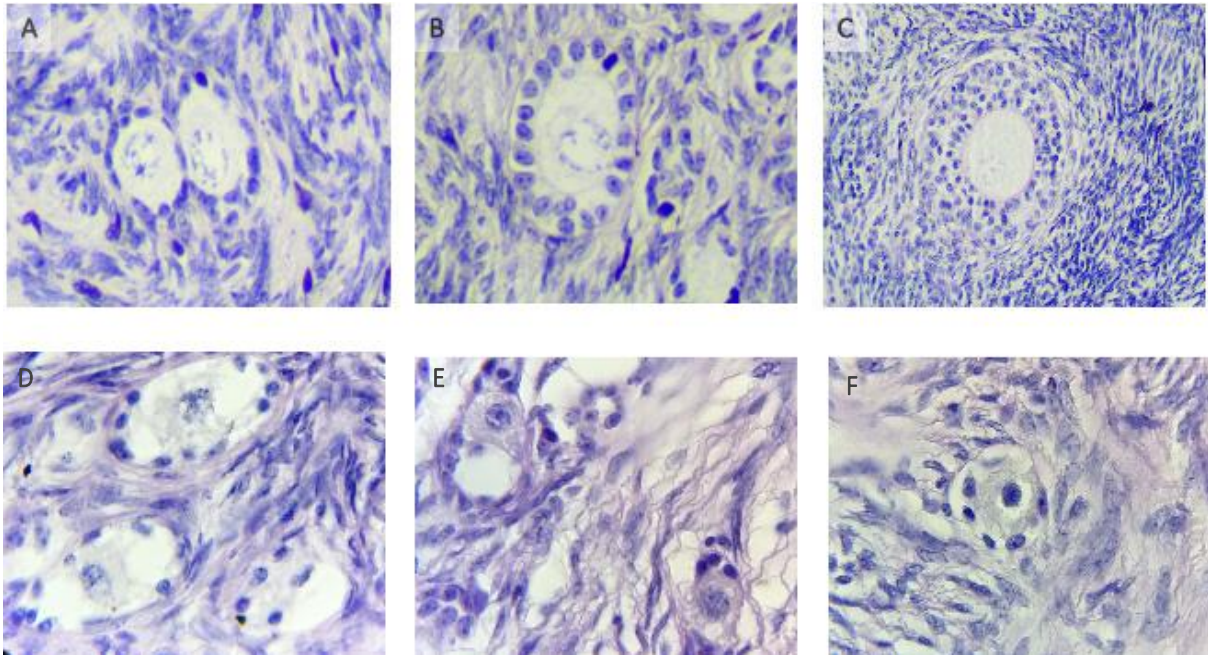


Figura 4. Ilustração histológica da morfologia dos folículos pré-antrais vitrificados. A: Folículo primordial íntegro; B: Folículo primário íntegro; C Folículo secundário íntegro; D: Folículos primordiais degenerados (vacúolos citoplasmáticos); E: Folículos primordiais degenerados (desorganização das células da granulosa); F: Folículo primordial degenerado (retração nuclear). Ácido periódico - Schiff (PAS) e hematoxilina, 100X.

Em geral, após o processo de vitrificação, a proporção de folículos primordiais foi mantida entre os diferentes tratamentos; portanto, a porcentagem dessa classe folicular se aproximou a 90-95% (Figura 5). Ao combinar os dados de todos os tratamentos, a porcentagem de folículos pré-antrais íntegros foi de 81,3% nos fragmentos ovarianos frescos (controle), 57,6% nos fragmentos submetidos ao teste de toxicidade e 51,2% nos fragmentos criopreservados, respectivamente.

A porcentagem de folículos pré-antrais (primordiais e em desenvolvimento) morfologicamente íntegros e degenerados são mostrados na figura 6. Após a vitrificação/aquecimento, os fragmentos ovarianos criopreservados em 1M, 1,5M e 3M de

DMSO mostraram porcentagens semelhantes de folículos íntegros ($P > 0,05$), entretanto, ao compará-los ao controle, apenas a concentração de 3M de DMSO diferiu ($P < 0,05$). Assim, a concentração de 3M de DMSO foi significativamente mais tóxica para os folículos pré-antrais ($P < 0,05$).

Após a criopreservação, a porcentagem de folículos degenerados também não demonstrou diferença entre as concentrações de DMSO (1M, 1,5M e 3M; $P > 0,05$). Entretanto, a concentração de 1M de DMSO resultou em porcentagens de folículos degenerados equivalente estatisticamente ao tecido fresco ($P < 0,05$).

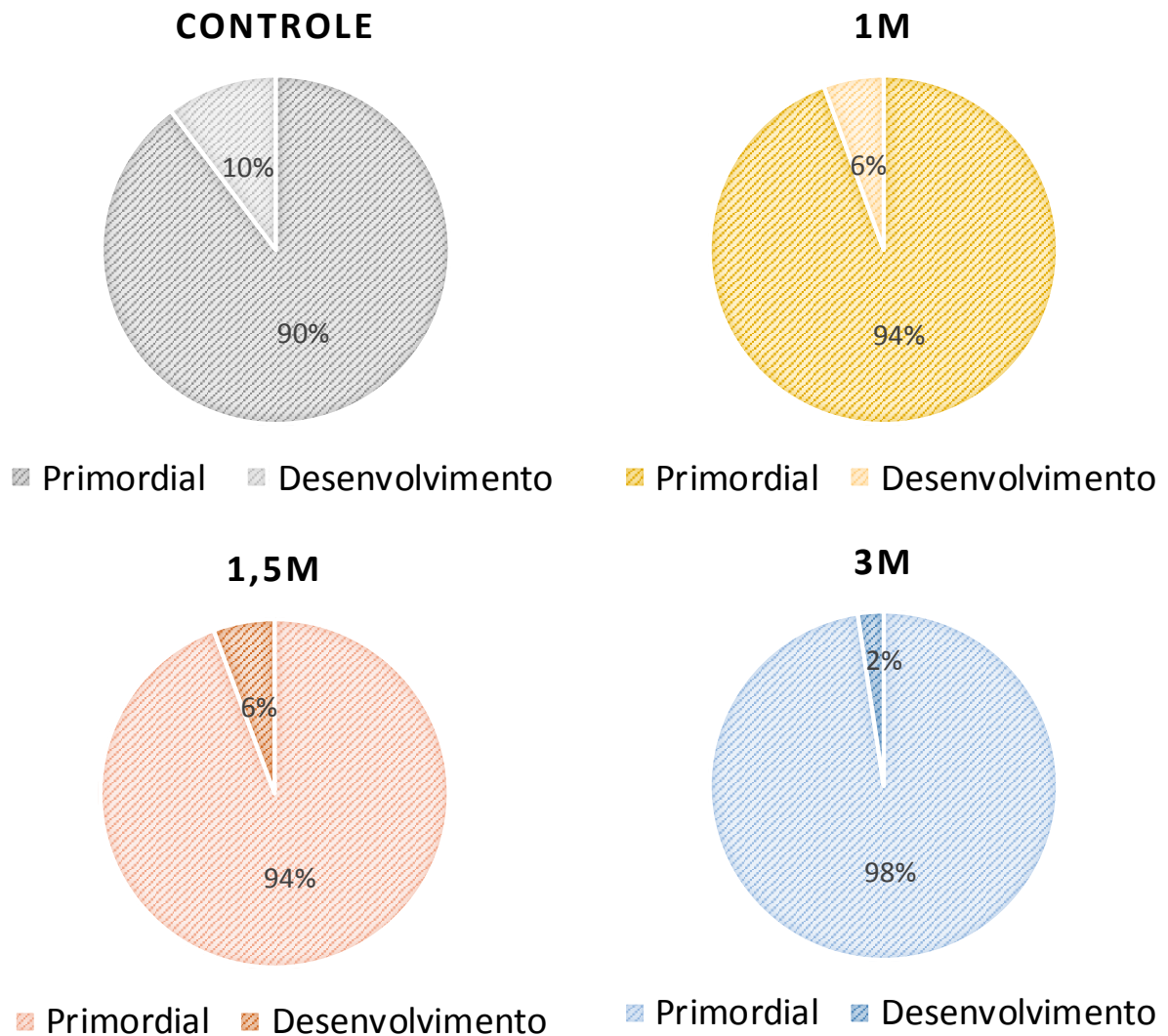


Figura 5. Porcentagem de folículos primordiais e em desenvolvimento em tecido ovariano fresco (controle) e vitrificação/aquecimento com diferentes concentrações (1M, 1,5M e 3M) de DMSO

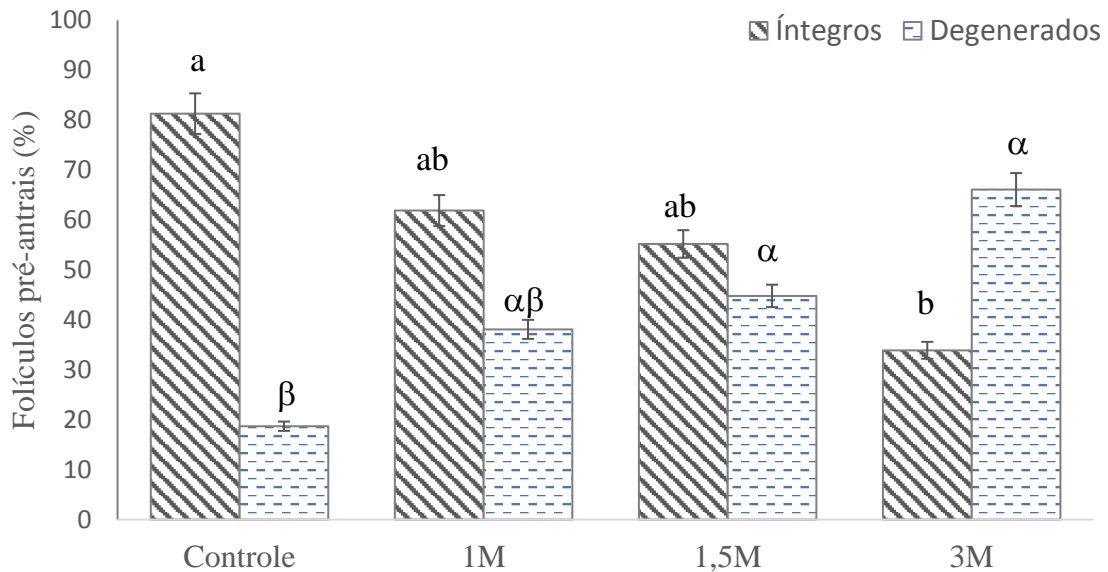


Figura 6. Porcentagem de folículos íntegros e degenerados em tecido ovariano fresco (controle, dia 0) e após vitrificação com diferentes concentrações de dimetilsulfóxido (DMSO)

Valores seguidos de letras minúsculas (a, b) diferem estatisticamente entre os graus de degeneração ($p < 0,05$).

Valores seguidos de letras minúsculas (α , β , γ) diferem estatisticamente entre as concentrações do agente crioprotetor ($p < 0,05$).

Morfometria dos folículos pré-antrais vitrificados

Para a análise morfométrica dos folículos vitrificados, as dimensões do folículo e do oócito foram medidas em tecido ovariano em diferentes concentrações de DMSO. O diâmetro médio dos folículos e oócitos observados podem ser encontrados na Figura 7.

Após a criopreservação, o diâmetro médio dos folículos pré-antrais apresentou resultados semelhantes entre os três grupos vitrificados com DMSO (1M: $32,5 \pm 8,9 \mu\text{m}$, 1,5M: $32,6 \pm 6,1 \mu\text{m}$ e 3M: $32,3 \pm 8,0 \mu\text{m}$; $p > 0,05$). Em relação ao diâmetro dos oócitos presentes nos folículos, não foi observada diferença significativa entre os tratamentos utilizando 1M e 1,5M de DMSO ($8,9 \pm 2,4$ e $9,7 \pm 2,1 \mu\text{m}$, respectivamente, $P > 0,05$). Já, o diâmetro dos oócitos dos folículos identificados na concentração de 3M de DMSO obtiveram dimensões menores ($7,6 \pm 1,7 \mu\text{m}$) estatisticamente quando comparados com as demais concentrações ($P < 0,05$).

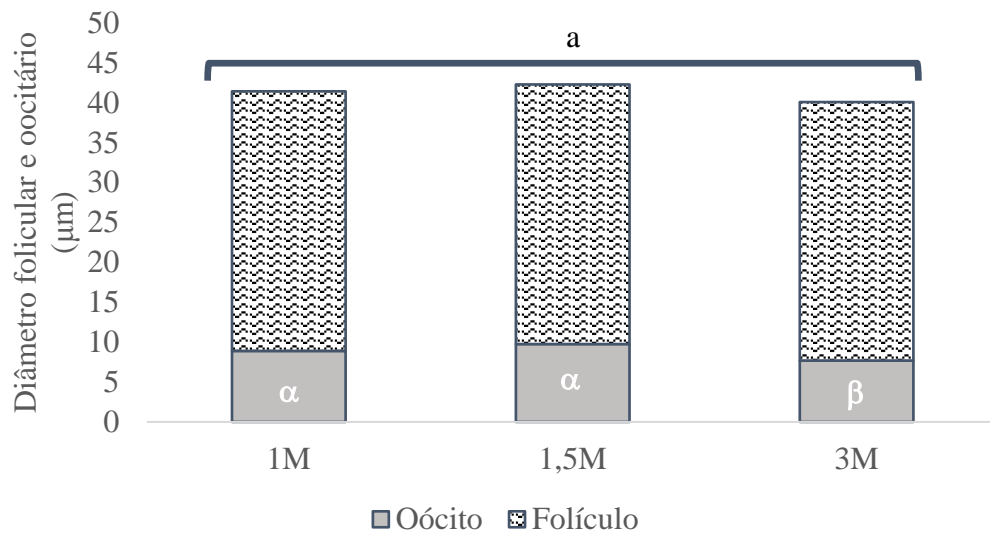


Figura 7. Média do diâmetro folicular e oocitário em micrômetros (μm) de folículos pré-antrais bovinos vitrificados com diferentes concentrações de dimetilsulfóxido (1M, 1,5M e 3M de DMSO)

Valores seguidos de letras minúsculas (a, b) diferem estatisticamente entre o diâmetro do folículo ($p < 0,05$). Valores seguidos de letras (α , β) diferem estatisticamente entre o diâmetro do oócito ($p < 0,05$).

Análise da morfologia de folículos pré-antrais cultivados in vitro

Foram avaliados 930 folículos pré-antrais, sendo 465 primordiais e 465 em desenvolvimento (primário e secundário); e 56% (522/930) de folículos íntegros. Após o início do cultivo foi possível identificar a presença de todas as categorias foliculares, com predominância de folículos primários. A porcentagem de folículos pré-antrais íntegros estão descritos na tabela 1. O controle não cultivado (D0) continha principalmente folículos íntegros (81,3%), assegurando a presença de folículos pré-antrais íntegros das amostras ovarianas.

Tabela 1. Porcentagem de folículos pré-antrais morfologicamente íntegros e degenerados não cultivados (controle) e cultivados *in vitro* após a vitrificação com diferentes concentrações de DMSO (1M, 1,5M e 3M)

Folículos	Controle	1M	1,5M	3M
Íntegros	81,3% ^a (348/428)	47,7% ^a (124/260)	35,7% ^b (41/115)	7,1% ^b (9/127)
Degenerados	18,7% (80/428)	52,3% (136/260)	64,3% (74/115)	92,9% (118/127)

Valores seguidos de letras minúsculas (a, b) diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Os efeitos dos tratamentos (1M, 1,5M e 3M) para vitrificação durante o cultivo *in vitro* não apresentou diferença significativa entre os folículos frescos (controle) e o cultivado por 10 dias após a vitrificação com 1M de DMSO ($p > 0,05$). No entanto, a porcentagem de folículos íntegros vitrificados com 1,5M e 3M assemelharam-se ($p > 0,05$), diferindo da concentração de 1M ($p < 0,05$).

Considerando as categorias foliculares, as porcentagens de folículos primordiais e em desenvolvimento estão representadas na figura 8. Sendo assim, pode-se observar a porcentagem de folículos em desenvolvimento dos fragmentos cultivados *in vitro* sob as condições de vitrificação a 1M e 1,5M de DMSO obtiverem resultados convergentes entre si ($p > 0,05$), quando comparados ao controle. Mas também foram capazes de estimular a ativação de folículos primordiais e o crescimento de folículos ativados. Além disso, as condições de vitrificação com 3M de DMSO pareceram ser prejudiciais ao desenvolvimento folicular durante o cultivo *in vitro*.

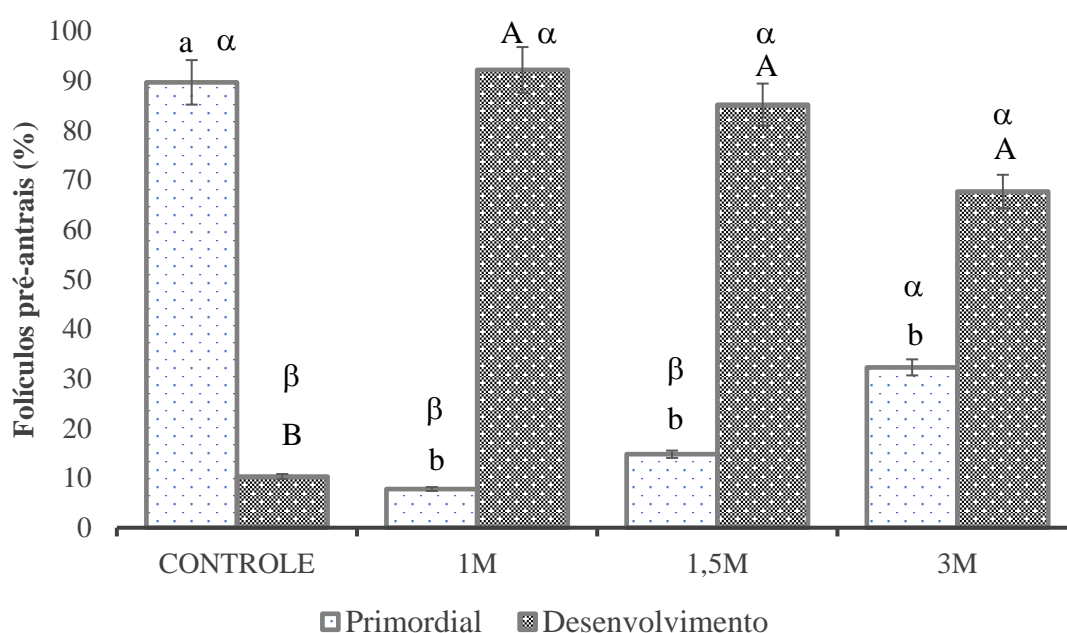


Figura 8. Porcentagem de folículos pré-antrais em desenvolvimento folicular classificados em primordiais e desenvolvimento (primários + secundários) em tecido ovariano não vitrificado (controle) e após cultivo *in vitro* após a vitrificação com diferentes concentrações de DMSO (1M, 1,5M e 3M) por 10 dias

Valores seguidos de letras maiúsculas (A, B) diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Valores seguidos de letras minúsculas (a, b) diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Valores seguidos de letras (α , β) diferem estatisticamente os folículos primordiais e desenvolvimento de um mesmo tratamento ($p < 0,05$).

Análise de espécie reativa de oxigênio (EROs)

As amostras de tecido ovariano vitrificados analisadas para identificação de espécies reativas de oxigênio apresentaram redução dos níveis de ânion superóxido e da capacidade antioxidante na concentração de 1M e 1,5M de DMSO quando comparadas a 3M ($P < 0,05$). Os resultados encontrados pelos ensaios estão representados na figura 9.

Após a vitrificação/aquecimento observou-se que a concentração de 3M de DMSO como solução crioprotetora induziu uma maior quantidade de radicais livres (ABTS; média \pm EPM) comparado as demais concentrações de DMSO (1M: $151,0 \pm 14,8$; 1,5M: $184,3 \pm 17,9$ e 3M: $246,9 \pm 15,3$ nmol de Equivalente TROLOX/mg proteína; $P < 0,05$). O mesmo foi observado no ensaio de poder antioxidante pela redução férrica (FRAP; média \pm EPM), com níveis maiores para a concentração de 3M de DMSO ($190,2 \pm 22,9$ nmol de TROLOX Eq/mg proteína) quando comparada a concentração de 1M ($134,1 \pm 17,0$ nmol de TROLOX Eq/mg proteína; $P < 0,05$). Para o ensaio colorimétricos do ânion superóxido (NBT; média \pm EPM), a concentração de 3M de DMSO apresentou uma maior redução do nitroazul tetrazólio apenas quando comparado a concentração de 1M ($26,2 \pm 5,3$ e $12,0 \pm 2,7$ OD/mg proteína, respectivamente; $P < 0,05$). Por outro lado, não foi observado diferença significativa na peroxidação lipídica (TBARS) entre as concentrações de DMSO ($P > 0,05$).

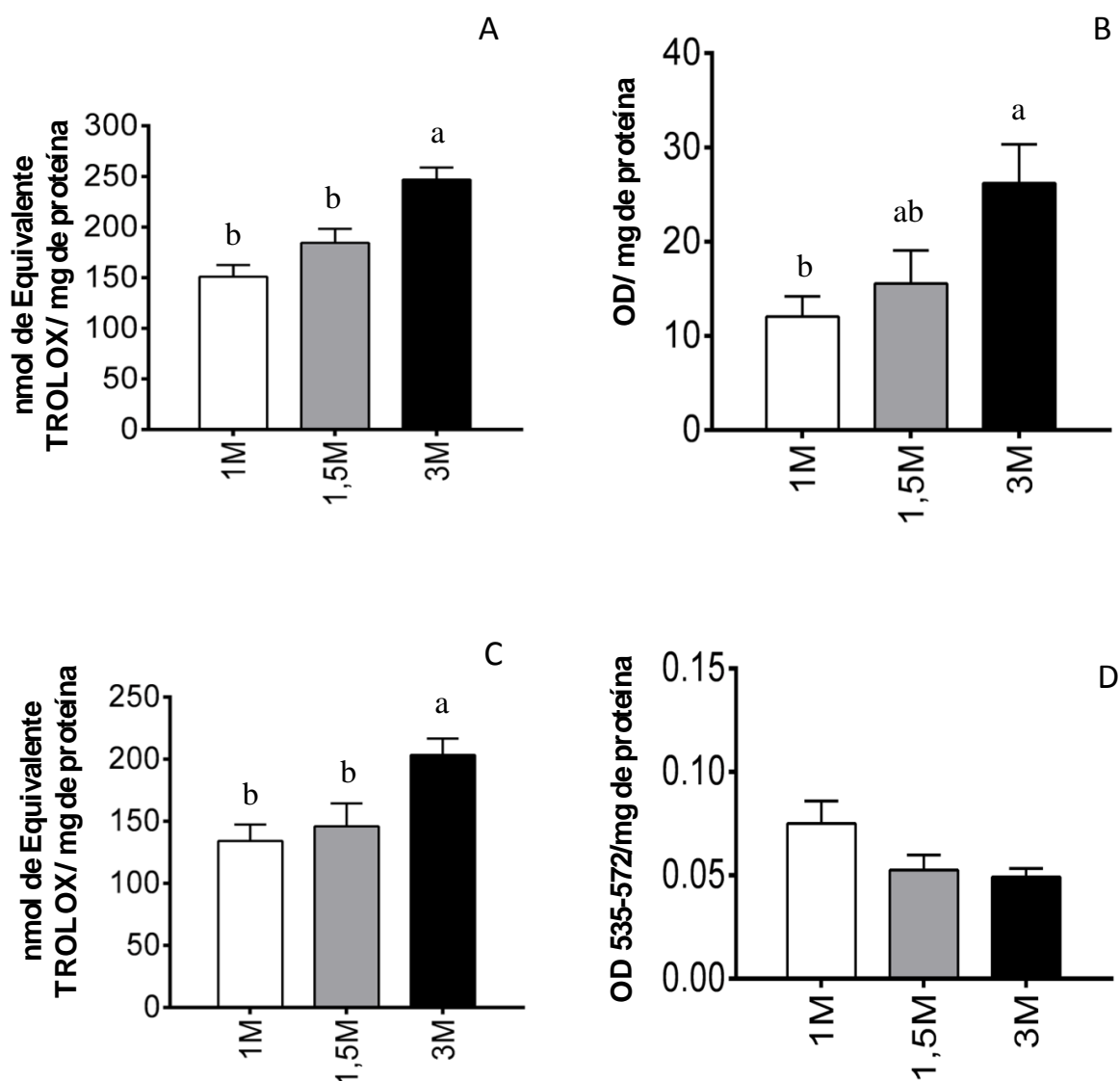


Figura 9. Efeitos das concentrações de 1M, 1,5M e 3M de DMSO no estresse oxidativo sobre o tecido ovariano vitrificado. (A) A capacidade de eliminação de radicais livres (ensaio ABTS) e (B) o poder antioxidante redutor férrico (ensaio FRAP) foram comparados com uma curva Trolox. A produção de ânion superóxido (C) e a peroxidação lipídica (D) foram determinadas pelos testes NBT e TBARS, respectivamente. Os resultados são médias \pm SEM, (ANOVA seguido pelo teste de Tukey).

Valores seguidos de letras minúsculas (a, b) diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Discussão

Este é o primeiro estudo que comparou os efeitos da vitrificação de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano bovino utilizando o DMSO como crioprotetor em três concentrações 1M, 1,5M e 3M. Avaliou-se a toxicidade do crioprotetor sobre o tecido ovariano, a integridade folicular, os aspectos morfológicos e morfométricos, a resposta ao estresse oxidativo e a retomada do desenvolvimento folicular dos folículos pré-antrais após criopreservação.

Com base no teste de toxicidade, as alterações morfológicas decorrente da atresia causada pela exposição ao DMSO foram encontradas principalmente nas células da granulosa e/ou no citoplasma dos oócitos. Diferentemente do encontrado na literatura, na qual as alterações observadas em folículos pré-antrais iniciam com a retração da cromatina nuclear e a fragmentação oocitária (Morita; Tilly, 1999). As concentrações testadas de 1,5 e 3M de DMSO sugeriram um efeito prejudicial sobre os folículos pré-antrais. Ambas as concentrações apresentaram baixa porcentagem de folículos pré-antrais íntegros em fragmentos ovarianos de bovinos. Isso possivelmente ocorre devido ao dano celular causado pela toxicidade química ou ao estresse osmótico, principalmente em altas concentrações, quando o poder de proteção do crioprotetor é reduzido (Rodrigues et al., 2004; Santos et al., 2006). Assim, a interação dos crioprotetores com tecidos *in vivo* ou com biomoléculas podem exercer efeitos tóxicos devido as concentrações inadequadas (Gosden et al. 2002).

A toxicidade aos folículos testados parece mais pronunciada quando se utiliza o DMSO na concentração de 3M (65,7% dos folículos pré-antrais degenerados). Isso pode ser evidenciado pelos sinais de atresia grau 3 identificados nessa concentração de DMSO, sendo a principal característica de degeneração nos folículos a picnose em oócitos e as células da granulosa e/ou o citoplasma folicular danificados pela presença de vacúolos ou retração. Os danos tóxicos causados por esta concentração de DMSO estão de acordo com o relatado em experimento com folículos *in situ* da espécie ovina (54,4%; Santos et al., 2006). Ainda, nossos resultados corroboram com o estudo prévio em que o efeito citotóxico do DMSO em oócitos bovinos foi observado quando usado em concentrações acima de 1,5 M (Lim et al., 1999).

Estudos anteriores avaliaram o nível tóxico de diferentes crioprotetores no processo de vitrificação, tendo sido observado que o etilenoglicol (EG) apresenta maior toxicidade para folículos pré-antrais bovinos quando comparado ao DMSO ou propilenoglicol (PROH; Lucci et al., 2004). Além disso, o mesmo estudo demonstrou que o percentual de folículos morfolologicamente normais foi reduzido de 96,9% (controle) para 49,2% (teste de

toxicidade), e ainda, mantido sem diferença significativa após a criopreservação com DMSO (52,5%; Lucci et al., 2004). Ainda, estudos que avaliaram a genotoxicidade do DMSO o caracterizaram como uma molécula com excelentes propriedades solventes não tóxico, visto que altas concentrações de DMSO não induziram quebras na fita de DNA (Aye et al., 2010; Castro et al., 2011). Contraditoriamente a isto, nosso estudo demonstrou uma maior taxa de degeneração folicular após exposição a 3M de DMSO por 30 min.

A vitrificação do tecido ovariano é uma técnica nova e promissora para o armazenamento de linhagem germinativa. Apesar da otimização dos protocolos de criopreservação, ainda são necessários estudos que esclareçam os processos relacionados a vitrificação devido a estrutura complexa e aos diferentes tipos de células presentes no tecido ovariano (Bagchi; Woods; Critser, 2008). Além dos processos de resfriamento e aquecimento poderem causar danos irreversíveis ao tecido ovariano criopreservado (Campos et al., 2015). Neste estudo com DMSO, após o aquecimento a integridade folicular não foi preservada na concentração de 3M. Ainda a concentração de 1,5M de DMSO apresentar alta porcentagem de folículos degenerados assim como 3M após a vitrificação.

As respostas morfométricas mostraram diminuição no tamanho dos oócitos após a criopreservação com 3M de DMSO. As dimensões médias dos folículos criopreservados em diferentes concentrações de DMSO foram semelhantes. Mensuração dos folículos pré-antrais similares foram encontrados na mesma espécie após o cultivo por 2 dias na presença de FSH (32,9 μm ; Bizarro-Silva et al., 2018). Em relação a radicais livres ou espécies reativas de oxigênio o DMSO mostrou ter um efeito tóxico para a concentração de 3M. As informações sobre a tolerância criogênica e o estresse causados aos folículos pré-antrais sejam folículos isolados ou incorporadas no tecido cortical são escassas (Langbeen et al., 2015).

A produção de espécies reativas de oxigênio no tecido ovariano vitrificado foi evidente para a concentração de 3M de DMSO. Entretanto, as diferentes concentrações de DMOS reduziram os efeitos deletérios da peroxidação lipídica causada pelo estresse oxidativo e pelo processo de criopreservação. Semelhantes resultados foram encontrados na vitrificação de tecido ovariano de fetos bovinos utilizando o resveratrol (Rocha et al., 2018).

A vitrificação pode ser aliada ao cultivo *in vitro* após o aquecimento com a finalidade de verificar a qualidade das células do estroma e dos folículos vitrificados. O cultivo *in situ* em meio MEM+ resulta em melhores condições para o desenvolvimento, preservação da morfologia e integridade dos folículos cultivados (Jimenez et al., 2016). Nossos resultados confirmam os dados sobre a eficácia do meio de cultivo para o

desenvolvimento de folículos pré-antrais após a criopreservação com DMSO (1M e 1,5M). Assim, podemos utilizar a taxa de viabilidade pós aquecimento como indicativo da possível restauração da função reprodutiva. De tal modo, a criopreservação aliada ao cultivo eficiente representaria um bom modelo para estudos e testes de possíveis aplicações na reprodução assistida.

Assim, a criopreservação dos tecidos ovarianos é o principal passo para o estabelecimento de um banco de tecido ovariano ou a preservação do tecido ovariano para pacientes programados para terapias com câncer gonadotóxico, visando à restauração da fertilidade mais tarde. Contudo, a criopreservação do tecido ovariano é mais profícua para pacientes com câncer do que a criopreservação do oócito (Coticchio et al., 2006) e embrião (Ali; Shelton, 1993), pois pode salvar um grande número de folículos (Asgari et al., 2015).

Em conclusão, demonstramos que os ovários bovinos representam um ótimo modelo para as questões inerentes à infertilidade e estudos de aspectos fisiológicos não esclarecidos. Além disso, sugerimos que a vitrificação do tecido ovariano deve utilizar 1M DMSO como crioprotetor para a conservação efetiva de gametas femininos.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, S.K.; CHANG, R.J. Fertility management for women with cancer. **Cancer Treatment and Research**, v.138, p.15–27, 2007.

AGUIAR, F.L.N.; LUNARDI, F.O.; LIMA, L.F.; ROCHA, R.M.P.; BRUNO, J.B.; MAGALHÃES-PADILHA, D.M.; FIGUEIREDO, J.R. FSH supplementation to culture medium is beneficial for activation and survival of preantral follicles enclosed in equine ovarian tissue. **Theriogenology**, v.85, p.1106–1112, 2016.

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

ARAÚJO, V.R.; GASTAL, M.O.; FIGUEIREDO, J.R.; GASTAL, E.L. In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.12, n. 78, p.1–14, 2014.

ASGARI A.F.; VALOJERDI, M.R.; EBRAHIMI, B.; FATEHI, R. Three dimensional in vitro culture of preantral follicles following slow-freezing and vitrification of mouse ovarian tissue. **Cryobiology**, v.71, p.529–536, 2015.

AYE, M.; GIORGIO, C.; MO, M.D.; BOTTA, D.; PERRIN, J.; COURBIERE, B. Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vitrification: dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, p.1905–1912, 2010.

BAGCHI, A.; WOODS, E.J.; CRITSER, J.K. Cryopreservation and vitrification: recent advances in fertility preservation technologies. **Expert Review of Medical Devices**, v.5, n.03, p.359–370, 2008.

BELLI, M.; VIGONE, G.; MERICO, V.; REDI, C.A.; ZUCCOTTI, M.; GARAGNA, S. Towards a 3D culture of mouse ovarian follicles. **The International Journal of Developmental Biology**, v.56, p.931–937, 2012.

BIZARRO-SILVA, C.; SANTOS, M.M.; GEREZ, J.R.; GONZÁLEZ, S.M.; LISBOA, L.A.; SENEDA, M.M. Influence of follicle-stimulating hormone concentrations on the integrity and development of bovine follicles cultured in vitro. **Zygote**, p.1–7, 2018.

BRAW-TAL, R.; YOSSEFI, S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. **Reproduction, Fertility and Development**, v.109, p.165–171, 1997.

BRITO, D.C.C.; DOMINGUES, S.F.S.; RODRIGUES, A.P.R.; MASIDE, C.; LUNARDI, F.O.; WU, X.; FIGUEIREDO, J.R.; PIECZARKA, J.C.; SANTOS, R.R. Cryopreservation of domestic cat (*Felis catus*) ovarian tissue: Comparison of two vitrification methods. **Theriogenology**, v.111, p. 69–77, 2018.

BRITO, D.C.C.; DOMINGUES, S.F.S.; RODRIGUES, A.P.R.; MASIDE, C.; LUNARDI, F.O.; WU, X.; FIGUEIREDO, J.R.; PIECZARKA, J.C.; SANTOS, R.R. Cryopreservation of

domestic cat (*Felis catus*) ovarian tissue: Comparison of two vitrification methods. **Theriogenology**, v.111, p. 69–77, 2018.

BÚFALO, I.; GONZÁLEZ, S.M.; SILVA, C.B.; LINDQUIST, A.G.; BERGAMO, L.Z.; COSTA, C.B.; MARINHO, L.S.R.; SENEDA, M.M. Effect of fixative type and fixation time on the morphology of equine preantral ovarian follicles. **Semina Ciências Agrárias**, v.37, 243–250, 2016.

CAMPOS, J.R.; RODRIGUES, J.K.; BULGARELLI, D.L.; ZELINSKI, M.B. Aspectos laboratoriais da criopreservação de tecido ovariano. In: MARINHO, R.M.; ROSA, E.; SILVA, A.C.J.S.; CAETANO, J.P.J.; RODRIGUES, J.K. **Preservação da fertilidade: uma nova fronteira em medicina reprodutiva e oncologia**. Rio de Janeiro: Medbook; 2015: p.155–160.

CASTRO, S.V.; CARVALHO, A.A.; SILVA, C.M.G.; FAUSTINO, L.R.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Intracellular Cryoprotectant Agents: Characteristics and Use of Ovarian Tissue and Oocyte Cryopreservation. *Acta Scientiae Veterinariae*. 39(2): 957. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39, n.2, p.957, 2011.

CHOI, J.Y.; LEE, B.E.; LEE, E.Y.; YOON, B-K.; BAE, D. S.; AND CHOI, D. S. Cryopreservation of ovarian tissues temporarily suppresses the proliferation of granulosa cells in mouse preantral follicles. **Cryobiology**, v.56, p.36–42, 2008.

CORTVRINDT, R.; SMITZ, J.; VAN STEIRTEGHEM, A. Ovary and ovulation: in-vitro maturation, fertilization and embryo development of immature oocytes from early preantral follicles from prepuberal mice in a simplified culture system. **Human Reproduction**, v.11, n.12, p.2656–2666, 1996.

COTICCHIO, G.; DE SANTIS, L.; ROSSI, G.; BORINI, A.; ALBERTINI, D.; SCARAVELLI, G.; ALECCI, C.; BIANCHI, V.; NOTTOLA, S.; CECCONI, S. Sucrose concentration influences the rate of human oocytes with normal spindle and chromosome configurations after slow-cooling cryopreservation, **Human Reproduction**, v.21, p.1771-1776, 2006.

DESAI, N.; ABDELHAFEZ, F.; ALI, M.Y.; SAYED, E.H.; ABU-ALHASSAN, A.M.; FALCONE, T.; GOLDFARB, J. Mouse ovarian follicle cryopreservation using vitrification or slow programmed cooling: assessment of in vitro development, maturation, ultra-structure and meiotic spindle organization. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v.37, n.1, p.1–12, 2011.

DESAI, N.; ABDELHAFEZ, F.; CALABRO, A.; FALCONE, T. Three dimensional culture of fresh and vitrified mouse pre-antral follicles in a hyaluronan-based hydrogel: a preliminary investigation of a novel biomaterial for in vitro follicle maturation. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.10, n.29, p.1–12, 2012.

DIEKJÜRGEN, D.; GRAINGER, D.W. Polysaccharide matrices used in 3D in vitro cell culture systems. **Biomaterials**, v.141, p.96–115, 2017.

DILLON, G.P.; YU, X.; SRIDHARAN, A.; RANIERI, J.P.; BELLAMKONDA, R.V. The influence of physical structure and charge on neurite extension in a 3D hydrogel scaffold, **Journal of Biomaterials Science, Polymer**, p. 1049–1069, 1998.

DONNEZ, J.; DOLMANS, M.M.; PELLICER, A.; DIAZ-GARCIA, C.; SANCHEZ SERRANO, M.; SCHMIDT, K.T.; ERNST, E.; LUYCKX, V.; ANDERSEN, C.Y. Restoration of ovarian activity and pregnancy after transplantation of cryopreserved ovarian tissue: a review of 60 cases of reimplantation. **Fertility and Sterility**, v.99, p.1503–1513, 2013.

EPPIG, J.J.; SCHROEDER, A.C. Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization in vitro. **Biology of Reproduction**, v.41, n.2, p.268–276, 1989.

FIGUEIREDO, J.R.; LIMA, L.F.; SILVA, VIANA, J.R.; SANTOS, R.R. Control of growth and development of preantral follicle: insights from in vitro culture. **Animal Reproduction**, v. 15, p. 648–659, 2018.

FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; SILVA, J.R.V. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. In: GONÇALVES P.B.D., FIGUEIREDO J.R., FREITAS V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. ed. 2. São Paulo: Roca, 2008, p.303–327.

FORTUNE, J.E.; KITO, S.; WANDJI, S.A.; SRSEN, V. Activation of bovine and baboon primordial follicles in vitro. **Theriogenology**, v.49, p.441–449, 1998.

FRYDMAN, R.; GRYNBERG, M. Introduction: Female fertility preservation: innovations and questions. **Fertility and Sterility**, v.105, n.1, p.4–5, 2016.

GASTAL, G.D.A.; AGUIAR, F.L.N.; RODRIGUES, A.P.R.; SCIMECA, J.M.; APGAR, G.A.; BANZ, W.J.; FEUGANG, J.M.; GASTAL, E.L. Cryopreservation and in vitro culture of white-tailed deer ovarian tissue. **Theriogenology**, v.113, p.253–260, 2018.

GORE-LANGTON, R.; DANIEL, S. Follicle-stimulating hormone and estradiol regulate antrum-like reorganization of granulosa cells in rat preantral follicle cultures. **Biology of Reproduction**, v.43, n.1, p.65–72, 1990.

GOSDEN, R.G.; MULLAN, J.; PICTON, H.M.; YIN, H.; TAN, S.L. Current perspective on primordial follicle cryopreservation and culture for reproductive medicine. **Human Reproduction Update**, v.8, p.105–110, 2002.

GREEN, L.J.; SHIKANOV, A. In vitro culture methods of preantral follicles. **Theriogenology**, v.86, n.1, p.229–238, 2016.

GUPTA, P.S.; NANDI, S. Isolation and culture of preantral follicles for retrieving oocytes for the embryo production: present status in domestic animals. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, p.513–519, 2012.

HAAG, K.T.; MAGALHÃES-PADILHA, D.M.; FONSECA, G.R.; WISCHRAL, A.; GASTAL, M.O.; KING, S.S.; JONES, K.L.; FIGUEIREDO, J.R.; GASTAL, E.L. Equine preantral follicles obtained via the Biopsy Pick-Up method: histological evaluation and validation of a mechanical isolation technique. **Theriogenology**, v.79, p.735–743, 2013.

HERRAIZ, S.; NOVELLA-MAESTRE, E.; RODRIGUEZ, B.; D'IAZ, C.; SÁNCHEZ-SERRANO, M.; MIRABET, V.; PELLICER, A. Improving ovarian tissue cryopreservation

for oncologic patients: slow freezing versus vitrification, effect of different procedures and devices. **Fertility and Sterility**, v.101, p. 775–784, 2014.

JIMENEZ, C.R.; ARAÚJO, V.R.; PENITENTE-FILHO, J.M.; DE AZEVEDO, J.L.; SILVEIRA, R.G.; TORRES, C.A. The base medium affects ultrastructure and survival of bovine preantral follicles cultured in vitro. **Theriogenology**, v.8, n.6, p.1019–1029, 2016.

KIM, A.M.; TINGEN, C.M.; WOODRUFF, T.K. Sex bias in trials and treatment must end. **Nature**, v.465, p.688–689, 2010.

KLOPFLEISCH, R.; KLOSE, P.; GRUBER, A.D. The combined expression pattern of BMP2, LTBP4 and DERL1 discriminates malignant from benign canine mammary tumors. **Veterinary Pathology**, v. 47, p.446–454, 2010.

LANGBEEN, A.; DE PORTE, H.F.; BARTHOLOMEUS, E.; LEROY, J.L.; BOLS, P.E. Bovine in vitro reproduction models can contribute to the development of (female) fertility preservation strategies. **Theriogenology**, v.84, n.4, p.477–489, 2015.

LEE, J.; KIM, E.J.; KONG, H.S.; YOUM, H.W.; KIM, S.K.; LEE, J.R.; SUH, C.S.; KIM, S.H. Establishment of an improved vitrification protocol by combinations of vitrification medium for isolated mouse ovarian follicles. **Theriogenology**, v.121, p.97–103, 2018.

LEESE, H.J. Metabolism of the preimplantation embryo: 40 years on. **Reproduction**, v.143, p.417–427, 2012.

LIM, J.M.; KO, J.J.; HWANG, W.S.; CHUNG, H.M.; NIWA, K. Development of in vitro matured bovine oocytes after cryopreservation with different cryoprotectants. **Theriogenology**, v. 51, p. 1303-1310, 1999.

MATOS MHT, SILVA JRV, RODRIGUES APR, FIGUEIREDO JR. Técnicas para avaliação da qualidade de folículos ovarianos pré-antrais cultivados in vitro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, ed.4, p.433–442, 2007.

MCLAUGHLIN, M.; KINNELL, H.L.; ANDERSON, R.A.; TELFER, E.E. Inhibition of phosphatase and tensin homologue (PTEN) in human ovary in vitro results in increased activation of primordial follicles but compromises development of growing follicles. **Molecular Human Reproduction**, v. 20, p.736–744, 2014.

MILENKOVIC, M.; WALLIN, A.; GHAREMANI, M.; BRÄNNSTRÖM, M. WHOLE sheep ovary cryopreservation: evaluation of a slow freezing protocol with dimethylsulphoxide. **Journal of Assisted Reproduction and Genetic**, v.28, n.1, p.7–14, 2011.

MORITA, Y.; TILLY, J.L. Oocyte apoptosis: Like sand through and hourglass. **Developmental Biology**, v.213, p.1–17, 1999.

OKTAY, K.; NUGENT, D.; NEWTON, H.; SALHA, O.; CHATTERJEE, P.; GOSDEN, R.G. Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, v.67, p.481–486, 1997.

PESSOA, A. F.; ROCHA, R. M.; BRITO, I. R.; SILVA, G. M.; CHAVES, R. N.; MAGALHÃES-PADILHA, D. M.; CAMPELLO, C. C.; RODRIGUES, A. P.; NUNES-

PINHEIRO, D. C.; FIGUEIREDO, J. R. Effect of morphological integrity, period, and type of culture system on the in vitro development of isolated caprine preantral follicles. **Theriogenology**, v.82, p.312-7, 2014.

PINHO-RIBEIRO, F.A.; ZARPELON, A.C.; MIZOKAMI, S.S.; BORGHI, S.M.; BORDIGNON, J.; SILVA, R.L.; CUNHA, T.M.; ALVES-FILHO, J.C.; CUNHA, F.Q.; CASAGRANDE, R.; VERRI, W.A.JR. The citrus flavonone naringenin reduces lipopolysaccharide-induced inflammatory pain and leukocyte recruitment by inhibiting NF- κ B activation. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.33, p.8–14, 2016.

PRAXEDES, É.C.G.; LIMA, G.L.; SILVA, A.M.; APOLINÁRIO, C.A.C.; BEZERRA, J.A.B.; SOUZA, A.L.P.; OLIVEIRA, M.F.; RODRIGUES, A.P.R.; SILVA, A.R. Characterisation and cryopreservation of the ovarian preantral follicle population from Spix's yellow-toothed cavies (*Galea spixii* Wagler, 1831). **Reproduction, Fertility and Development**, v.29, n. 3, p.594-602, 2017.

ROCHA, C.D.; SOARES, M.M.; ANTONINO, D.C.; MELO JÚNIOR, J.; MOHALLEM, R.F.F.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R.; BELETTI, M.E.; JACOMINI, J.O.; ALVES, B.G.; ALVES, K.A. Positive effect of resveratrol against preantral follicles degeneration after ovarian tissue vitrification. **Theriogenology**, v.1, p.244-251, 2018.

RODRIGUES, A.P.; AMORIM, C.A.; COSTA, S.H.; MATOS, M.H.; SANTOS, R.R.; LUCCI, C.M.; BÁO, S.N.; OHASHI, O.M.; FIGUEIREDO, J.R. Cryopreservation of caprine ovarian tissue using dimethylsulphoxide and propanediol. **Animal Reproduction Science**, v.84, p.211–227, 2004.

ROSSETTO, R.; LIMA, I.M.T.; SARAIVA, M.V.A.; LIMA-VERDE, E.T.S.; FIGUEIREDO, J.R. Avanços no isolamento e sistemas de cultivo de folículos pré-antrais. **Revista Acta Veterinaria Brasileira**, v.5, n.1, p.15–23, 2011.

ROSSETTO, R.; SANTOS, R.R.; SILVA, G.M.; DUARTE, A.B.G.; SILVA, C.M.G.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R. Comparative study on the in vitro development of caprine and bovine preantral follicles. **Small Ruminant Research**, v.113, p.167–170, 2013.

SADR, S.Z.; EBRAHIMI, B.; SHAHHOSEINI, M.; FATEHI, R.; FAVAEDI, R. Mouse preantral follicle development in two-dimensional and three-dimensional culture systems after ovarian tissue vitrification. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v.194, p.206–211, 2015.

SANTOS, R.R.; RODRIGUES, A.P.; COSTA, S.H.; SILVA, J.R.; MATOS, M.H.; LUCCI, C.M.; BÁO, S.N.; VAN DEN HURK, R.; FIGUEIREDO, J.R. Histological and ultrastructural analysis of cryopreserved sheep preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v.91, p.249–263, 2006a.

SANTOS, R.R.; THARASANIT, T.; VAN HAEFTEN, T.; FIGUEIREDO, J.R.; SILVA, J.R.; VAN DEN HURK, R. Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. **Cell and Tissue Research**, v.327, p.167–176, 2007a.

SANTOS, R.R.; VAN DEN HURK, R.; RODRIGUES, A.P.; COSTA, S.H.; MARTINS, F.S.; MATOS, M.H.; CELESTINO, J.J.; FIGUEIREDO, J.R. Effect of cryopreservation on

viability, activation and growth of in situ and isolated ovine early-stage follicles. **Animal Reproduction Science**, v.99, p.53–64, 2007b.

SATO, T.; KATAGIRI, K.; GOHBARA, A.; INOUE, K.; OGONUKI, N.; OGURA, A.; KUBOTA, Y.; OGAWA, T. In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes. **Nature**, v.471, n.7339, p.504–507, 2011.

SERAFIM, M.K.; ARAÚJO, V.R.; SILVA, G.M.; DUARTE, A.B.; ALMEIDA, A.P.; CHAVES, R.N.; CAMPELLO, C.C.; LOPES, C.; FIGUEIREDO, J.R.; SILVA, L.D. Canine preantral follicles cultured with various concentrations of follicle-stimulating hormone (FSH). **Theriogenology**, v.74, n.5, p.749–755, 2010.

SHARMA, G.T.; DUBEY, P.K.; MEUR, S.K. Survival and developmental competence of buffalo preantral follicles using three-dimensional collagen gel culture system. **Animal Reproduction Science**, v.114, p.115–124, 2009.

SILBER, S. Ovary cryopreservation and transplantation for fertility preservation. **Mol. Human Reproduction**, v.18, p.59–67, 2011.

SILVA-BUTTKUS, P.; JAYASOORIYA, G.S.; MORA, J.M.; MOBBERLEY, M.; RYDER, T.A.; BAITHU, M.; STARK, J.; FRANKS, S.; HARDY, K. Effect of cell shape and packing density on granulosa cell proliferation and formation of multiple layers during early follicle development in the ovary. **Journal of Cell Science**, v.121, p.3890–3900, 2008.

SILVA, C.B.; BERGAMO, L.Z.; BÚFALO, I.; BONATO, D.V.; SENEDA, M.M. Comparison among different systems of in vitro culture of preantral follicles in cattle. **Proceedings of the 31st Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE)**; Cabo de Santo Agostinho, PE, Brazil, August 17th to 19th, 2017. Abstracts.

SILVA, C.M.; SERAKIDES, R.; NASCIMENTO, E.F.; NUNES, V.A.; RIBEIRO, A.F.C.; OCARINO, N.M. Quantification of the nucleolar organizer regions (NORs) as a parameter to measure proliferation of granulosa cells. **Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v.55, p.113-116, 2003.

SILVA, J.R.; VAN DEN HURK, R.; FIGUEIREDO, J.R. Ovarian follicle development in vitro and oocyte competence: advances and challenges for farm animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v.55, p.123–135, 2016.

WANG, Y.; XIAO, Z.; LI, L., FAN, W., LI, S.W. Novel needle immersed vitrification: a practical and convenient method with potential advantages in mouse and human ovarian tissue cryopreservation. **Human Reproduction**, v.23, p.2256-2265, 2008.

WEST, E.R.; SHEA, L.D.; WOODRUFF, T.K. Engineering the follicle microenvironment. **Seminars in Reproductive Medicine**, v.25, n.4, p.287-299, 2007.

WINTERBOURN, C.C. The challenges of using fluorescent probes to detect and quantify specific reactive oxygen species in living cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1840, p.730–738, 2014.

XU, B.; HUA, J.; ZHANG, Y.; JIANG, X.; ZHANG, H.; MA, T.; ZHENG, W.; SUN, R.; SHEN, W.; SHA, J.; COOKE, H.J.; SHI, Q. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)

regulates primordial follicle assembly by promoting apoptosis of oocytes in fetal and neonatal mouse ovaries. **PLoS One**, v.6, n.1, p.16046, 2011.

6 CONCLUSÕES

- ◇ Folículos pré-antrais bovinos são capazes de manter a sobrevivência e o crescimento *in vitro* até o estágios avançados de desenvolvimento ao meio de cultivo a base de meio essencial mínimo durante 14 dias.
- ◇ O sistema de cultivo com agarose imerso ao meio apresentou maiores níveis de espécies reativas de oxigênio e uma menor capacidade atioxidante. Enquanto, o sistema de cultivo sobre suporte de agarose possibilitou uma maior porcentagem de folículos íntegros e maiores diâmetros foliculares.
- ◇ O cultivo *in situ* através do método com suporte de agarose demonstrou atingir os requisitos necessários para obtenção de um maior número de folículos pré-antrais, fornece informações para elucidação dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento folicular, além de futuramente torna-se uma estratégia importante para a preservação da fertilidade.
- ◇ O DMSO a 1M preserva as características morfológicas e morfométrica de folículos pré-antrais *in situ*, após a vitrificação se comparado com as demais concentrações.
- ◇ Após a criopreservação a concentração de 3M pareceu apresentar um efeito tóxico para os folículos pré-antrais depois do aquecimento e do cultivo *in vitro*.
- ◇ Folículos pré-antrais *in situ*, cultivados em MEM+ por 10 dias após vitrificação demonstraram a possibilidade de retomada do desenvolvimento folicular em concentrações menores de DMSO.

Como perspectivas deste trabalho tem-se a possibilidade de estudos complementares visando à utilização desta biotécnicas sobre o desenvolvimento e a criopreservação *in vitro* de folículos pré-antrais *in situ* em estádios iniciais ou tardios. Além disso, são grandes as possibilidades de se estudar a influência de tais técnicas sobre a expressão gênica durante o desenvolvimento folicular. Para assim, promover um sistema de cultivo capaz de desenvolver folículos primordiais de uma fase inicial até os estágios foliculares em que os oócitos podem ser maturados e fecundados *in vitro*. Também, desenvolver um protocolo eficiente para a criopreservação *in situ* dos folículos pré-antrais bovinos.

No entanto, mais testes devem ser realizados para tais biotecnologias, apresentando distintos métodos e intervalos de tempo e, células de diferentes fontes para um melhor entendimento dos processos envolvidos na foliculogênese e condições para o desempenho reprodutivo.

APÊNDICES

APÊNDICE A
PRODUÇÃO ACADÊMICA DESENVOLVIDA DURANTE O DOUTORADO
(2015-2018)

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. GOMES, R.G.; **SILVA, C.B.**; GONZÁLEZ, S.M.; OLIVEIRA, R.L.; MAX, M.C.; LISBOA, L.A.; BARREIROS, T.R.R.; SANTOS, M.M.; SARAPIÃO, F.D.; GASTAL, E.L.; SENEDA, M.M. Alpha lipoic acid (ALA) effects on developmental competence of equine preantral follicles in short-term culture. THERIOGENOLOGY. v.105, p.169 - 173, 2018.
2. MAX, M.C.; **BIZARRO-SILVA, C.**; BÚFALO, I.; GONZÁLEZ, S.M.; LINDQUIST, A.G.; GOMES, R.G.; BARREIROS, T.R.R.; LISBOA, L.A.; MOROTTI, F.; SENEDA, M.M. In vitro culture supplementation of EGF for improving the survival of equine preantral follicles. IN VITRO CELLULAR & DEVELOPMENTAL BIOLOGY-ANIMAL. v.v., p.1 - 5, 2018.
3. **BIZARRO-SILVA, C.**; SANTOS, M.M.; GEREZ, J.R.; GONZÁLEZ, S.M.; LISBOA, L.A.; SENEDA, M.M. Influence of follicle-stimulating hormone concentrations on the integrity and development of bovine follicles cultured. ZYGOTE. v.26, p.1 - 7, 2018.
4. MARQUES, M.O.; MOROTTI, F.; LORENZETTI, E.; **BIZARRO-SILVA, C.**; SENEDA, M.M. Intensified use of TAI and sexed semen on commercial farms. ANIMAL REPRODUCTION. , v.15, p.197 - 203, 2018.
5. TRALLI NETO, A.N.; OLIVEIRA, C.F.; BRAMBATI, L.B.; MENDES, K.S.; ANDRETA, J.M.B.; **SILVA, CB**; ATIQUE NETO, H.; GONZALEZ, S.M. Repetibilidade da contagem de folículos antrais em vacas mestiças. REVISTA ELETRÔNICA DE PESQUISA DA UNIRP - UNIVERSITAS. v.8, p.48 - 55, 2018.
6. MOROTTI, F.; ZANGIROLAMO, A. F.; SILVA, N. C.; **SILVA, C. B.**; ROSA, C. O.; SENEDA, M. M. Antral follicle count in cattle: advantages, challenges, and controversy. ANIMAL REPRODUCTION. v.14, p.514 - 520, 2017.
7. MACHADO, F.Z.; BERGAMO, L.Z.; **BIZARRO-SILVA, C.**; MOROTTI, F.; SILVA-SANTOS, K.C.; SENEDA, M.M. Cell proliferation in ovarian follicles from Bos taurus indicus females with different antral follicle count. ANIMAL REPRODUCTION. , v.14, p.1307-1311, 2017.
8. GONCALVES, G.R.; MARINO, P.C.; **SILVA, C.B.**; ROSA, C.O.; MASSITEL, J.L.; SCHADE, J.; ROSA, G.S.; APOLONIO, E.V.P.; REGO, J.G.M.; SILVA, T.P. Considerações sobre o uso da Crioterapia como método preventivo da laminite aguda em equinos. Revista Brasileira de Medicina Eqüina. , v.71, p.10 - 13, 2017.
9. OLIVEIRA, R.L.; **SILVA, C.B.**; SILVA, E.O.; GEREZ, J.R.; SANTOS, M.M.; SARAPIÃO, F.D.; SARTORI, L.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; SENEDA, M.M. Proliferative activity of multi-oocyte follicles in sheep ovaries. Small Ruminant Research. , v.146, p.58 - 60, 2017.
10. OLIVEIRA, R.L.; SILVA-SANTOS, K.C.; GONZALEZ, S.M.; **BIZARRO-SILVA, C.**; MACHADO, F.Z.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; SENEDA, M.M. Proliferative activity of oocytes in multi-oocyte follicles of bovine ovary. SEMINA. CIÊNCIAS AGRÁRIAS (ONLINE). v.38, p.3591, 2017.
11. GONZALEZ, SM; **DA SILVA, CB**; LINDQUIST, AG; BUFALO, I; MOROTTI, F; LISBOA, LA; SENEDA, M. Regional distribution and integrity of equine ovarian pre-antral follicles. REPRODUCTION IN DOMESTIC ANIMALS. , v.52, p.836 - 841, 2017.

12. MAX, MC; **SILVA, CB**; GONZÁLEZ, SM; LINDQUIST, AG; BÚFALO, I; GOMES, RG; MOROTTI, F; COSTA, CB; BARREIROS, TRR; LISBOA, LA; SENEDA, MM. The development and integrity of equine pre-antral follicles cultured in vitro with follicle-stimulating hormone (FSH) supplementation. REPRODUCTION IN DOMESTIC ANIMALS. , v.52, p.899 - 904, 2017.

13. BÚFALO, I.; GONZÁLEZ, S.M.; **SILVA, C.B.**; LINDQUIST, A.G.; BERGAMO, L. Z.; COSTA, C.B.; MARINHO, L.S.R.; SENEDA, M.M. Efeito do tipo de fixador e tempo de fixação na morfologia de folicúlos pré-antrais equinos. SEMINA. CIÊNCIAS AGRÁRIAS (ONLINE). , v.37, p.243, 2016.

14. GONZALEZ, S.M.; **SILVA, C.B.**; SILVA-SANTOS, K.C.; SANTIS, G.W.; SENEDA, M.M. Equine antral follicle containing cartilage and bone: ovarian teratoma. REVISTA ACADÊMICA: CIÊNCIAS AGRÁRIAS E AMBIENTAIS (PUCPR. Impresso). v.13, p.39, 2015.

15. GONZÁLEZ, S.M.; GOMES, R.G.; SOUZA, A.K.; **SILVA, C.B.**; SILVA-SANTOS, K.C.; SENEDA, M.M. Evidences of Regular Estrous Cycles in Mules and Successful Use of These Animals as Recipients for Donkey Embryos. JOURNAL OF EQUINE VETERINARY SCIENCE. v.35, p.869 - 872, 2015.

16. GONZALEZ, S. M.; **SILVA, C.B.**; MACHADO, F. Z.; GONCALVES, G. R.; SILVA-SANTOS, K. C.; SENEDA, M. M. Granulosa cells tumor in mules. Revista Acadêmica: Ciências Agrárias e Ambientais (PUCPR. Impresso). v.13, p.89 - 93, 2015.

17. GOMES, R.G.; LISBOA, L.A.; **SILVA, C.B.**; MAX, M.C.; MARINO, P.C.; OLIVEIRA, R.L.; GONZÁLEZ, S.M.; BARREIROS, T.R.R.; MARINHO, L.S.R.; SENEDA, M.M. Improvement of development of equine preantral follicles after 6 days of in vitro culture with ascorbic acid supplementation. THERIOGENOLOGY. v.84, p.750 - 755, 2015.

18. MARQUES, M. O.; MOROTTI, F.; **SILVA, C.B.**; JÚNIOR, M. R.; SILVA, R.C.P.; BARUSELLI, P.S.; SENEDA, M. M. Influence of category-heifers, primiparous and multiparous lactating cows-in a large-scale resynchronization fixed-time artificial insemination program. JOURNAL OF VETERINARY SCIENCE. v.16, p.367 - 371, 2015.

19. GONZÁLEZ, S.M.; **SILVA, C.B.**; LINDQUIST, A.G.; BÚFALO, I.; MACHADO, F.Z.; BUENO, J.V.R.; SCARPIN, L.C.; BERGAMO, L.Z.; SILVA-SANTOS, K.C.; MARINHO, L.S.R.; SENEDA, M. MARCONDES. Recovery of equine oocytes by scraping of the follicular wall with different specifications of needles and morphological analysis of cumulus oophorus. Semina. Ciências Agrárias (Online). , v.36, p.4333 - 4340, 2015.

20. OKANO, W.; KOETZ JUNIOR, C.; BOGADO, A. L. G.; NEGRI FILHO, L. C.; BRONKHORST, D. E.; BORGES, M. H. F.; BARCA JUNIOR, F. A.; DINIZ, M. S.; SANTANA, E. H. W.; **SILVA, C.B.** Relationship between Shape of Teat and Teat Tip and Somatic Cell Count (SCC) in Dairy Cows. Acta Scientiae Veterinariae (Online). , v.43, p.1 - 6, 2015.

Artigos aceitos para publicação

1. **BIZARRO-SILVA, C**; GONZÁLEZ, SUELLEN M.; BÚFALO, I.; LINDQUIST, ANDRESSA GUIDUGLI; SARAPIAO, F. D.; SENEDA, M. M. Interval in the replacement of in vitro culture medium affects the integrity and development of equine preantral follicles. PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA (ONLINE). , 2018.