



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LARISSA ZAMPARONE BERGAMO

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ANTIOXIDANTES NO
CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-
ANTRAIS DE FÊMEAS *BOS TAURUS INDICUS***

Londrina
2021

LARISSA ZAMPARONE BERGAMO

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ANTIOXIDANTES NO
CULTIVO *in vitro* DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-
ANTRAIS DE FÊMEAS *Bos taurus indicus***

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

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda.

Londrina
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

B493e Bergamo, Larissa Zamparone.
Efeito da suplementação com antioxidantes no cultivo in vitro de folículos ovarianos pré-antrais de fêmeas *Bos taurus indicus* / Larissa Zamparone Bergamo. - Londrina, 2021.
107 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, 2021.
Inclui bibliografia.

1. Bovino - Reprodução - Tese. 2. Folículos ovarianos - Tese. 3. Reprodução animal - Tese. I. Seneda, Marcelo Marcondes. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 619

LARISSA ZAMPARONE BERGAMO

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ANTIOXIDANTES NO
CULTIVO *in vitro* DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-
ANTRAIS DE FÊMEAS *Bos taurus indicus***

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

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof^a. Dr^a. Katia Cristina Silva-Santos
Universidade Estadual de Londrina - UEL

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

Prof^a. Dr^a. Fábio Morotti
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 19 de fevereiro de 2021.

Aos meus pais, Wilson e Silvana,
e ao meu irmão, Vitor. De todo meu coração, sou
eternamente grata por sempre me apoiarem e
incentivarem todos os meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Deus!

Agradeço a oportunidade de reparação e evolução espiritual. Pelo privilégio da fé, minha força maior. Que me leva a continuar prosseguindo e não me deixa desistir dos meus sonhos e objetivos, apesar das pedras deixadas no caminho.

Família!

Agradeço por todo apoio, dedicação e carinho daqueles que sempre acreditaram na minha capacidade e principalmente por não medirem esforços em me amparar sempre que necessitei. Por sempre me ensinarem a ser uma pessoa melhor com todo carinho e amor.

Ao meu pai, Wilson, por sempre ser o melhor exemplo de caráter, honestidade e lealdade! À minha mãe, Silvana, aquela pela qual daria minha vida sem pensar duas vezes! Ao meu irmão, Vitor, que indiretamente teve sua parcela de colaboração em toda essa conquista. À minha fiel e eterna companheira, Meg, que há 16 anos me acompanha e que me trouxe um olhar mais afetuoso ao mundo dos cães e me levou a compreender que por trás de uma lambida há sentimentos puros e verdadeiros.

Orientador!

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda, pela imensa confiança, principalmente por depositar em mim suas expectativas e acreditar que eu seria capaz de cumpri-las. Minha eterna gratidão por tudo que vivi nesses 8 anos junto à grande família RepróA! Toda experiência vivida até aqui moldou a pessoa que sou hoje, tanto no âmbito profissional como no pessoal.

Além de todos os ensinamentos profissionais, levo em meu coração os ensinamentos espirituais que o senhor me ensinou. Obrigada por ser além de orientador, ser humano, ser amigo, ser pai! O senhor é LUZ!

Amizade!

Durante todo esse tempo, vivi experiências ímpares. Conheci pessoas excepcionais, que fizeram com que todo o meu trajeto na graduação e principalmente na pós-graduação fosse mais leve e mais humano. Além de serem profissionais brilhantes, que dividiram comigo suas experiências e ensinamentos, dividiram também suas histórias de vida, suas felicidades e tristezas.

São mais que amigos, são irmãos! Gratidão eterna por ter vocês em minha vida, e por tornar essa trajetória mais segura. Nathália Covre, Eduardo Rossignolo, Anne Kemmer, Camila Bizarro, Suellen Gonzalez, Stéfany Camilo, Myrian Hidalgo, Ana Beatriz e Luiz Guilherme, obrigado por sempre tanto!

Agradeço as minhas amigas Nayara Aquino, Larissa Rizzardi, Mariana Soubhia, Flávia Merenciano e meu amigo Flávio Vendramini, pela amizade verdadeira e incentivo durante todos os anos da pós-graduação. Obrigado por sempre estarem ao meu lado segurando a minha mão e me apoiando nas minhas decisões. E a todos os amigos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma não medindo esforços para me ajudar, pessoas essas que estiveram presentes em momentos distintos e me fizeram avançar com firmeza e dedicação.

Banca Examinadora!

Agradeço aos membros da banca examinadora por terem aceitado participar da minha banca de qualificação (Prof. Dr. Fábio Morotti, Profa. Dra. Katia Cristina Silva-Santos e Profa. Dra. Camila Bizarro da Silva) e defesa (Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim, Profa. Dra. Katia Cristina Silva-Santos, Profa. Wanessa Blaschi e Prof. Dr. Fábio Morotti) por dividirem comigo suas ideias e experiências. É uma honra poder contar com a presença de vocês em minha banca! Obrigada pela oportunidade de conviver com profissionais de tão alto gabarito e ética.

Equipe ReproA!

Imensa gratidão a toda equipe do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (ReproA) por todos os experimentos, congressos, simpósios e momentos de confraternização em que tive o prazer de compartilhar. Certamente formamos uma bela família durante todos esses anos de convivência! Meu muito obrigada para os amigos Denis, Marcela, Sofia, Camila Bortoliero, Andressa, Fábio Moraes, Ana Clara, Francieli e Amanda.

Estendo esse agradecimento a todos os estagiários e colaboradores que passaram pelo laboratório durante esse período. Meu mais sincero obrigada a todos vocês, pois a ajuda e parceria de vocês foi e é fundamental para nossa vida na pós-graduação, sem sombra de dúvidas!

UEL | PPG-CA!

Praticamente a minha primeira casa, pois foi onde passei boa parte dos meus dias, Universidade Estadual de Londrina! Gratidão por toda nossa história! Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal por me permitir fazer parte da equipe de pós-graduandos que faz acontecer e sustenta o conceito CAPES 6!

Minha mais sincera gratidão à Helenice, secretária do nosso Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, que sempre esteve à disposição para ajudar, sem medir esforços. Agradeço também a todos os docentes e discentes que me ajudaram e fizeram parte de toda minha trajetória na pós-graduação. Com toda certeza, levarei todos os ensinamentos obtidos durante o doutorado, ao longo de toda minha vida profissional.

CAPES!

Agradeço à CAPES pela bolsa de estudos concedida durante a execução deste trabalho.

“Nada é tão nosso quanto os nossos sonhos!”

Friedrich Nietzsche.

BERGAMO, Larissa Zamparone. **Efeito da suplementação com antioxidantes no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais de fêmeas *Bos taurus indicus***. 2021. 115 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

A adição de antioxidantes no meio de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais bovinos contribui para o adequado desenvolvimento dos folículos, para a manutenção da integridade folicular e do estresse oxidativo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da suplementação com antioxidantes no desenvolvimento e na manutenção da integridade folicular e do estresse oxidativo no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais de fêmeas *Bos taurus indicus*. Para a realização do experimento A (Ácido Ascórbico) e do experimento B (Ácido Alfa Lipóico), ovários (n=20 e n=24, respectivamente) obtidos em abatedouro foram fragmentados e um fragmento, escolhido aleatoriamente de cada par de ovário, foi fixado em Bouin (controle não cultivado; D0). Esses fragmentos foram destinados para análise da morfologia e do crescimento folicular (histologia clássica). Um fragmento, escolhido aleatoriamente de cada par de ovário, foi congelado a -80°C (controle não cultivado; D0), para análise do estresse oxidativo (TBARS, NBT e FRAP). Os demais fragmentos foram cultivados *in vitro* por 6 (D6) ou 12 (D12) dias, em Meio Essencial Mínimo (MEM+) ou MEM+ suplementado com Ácido Ascórbico (50 ou 100 ng/mL) ou Ácido Alfa Lipóico (50, 100 ou 250 ng/mL), com uma matriz extracelular de gel de agarose, em estufa a $38,5^{\circ}\text{C}$, com ar e umidade saturada. A cada dois dias, realizou-se a troca total do meio de cultivo por meio fresco. Diferenças entre as proporções de folículos primordiais e em desenvolvimento (primário e secundário), para cada tratamento (controle não cultivado, controle cultivado e diferentes concentrações de antioxidantes testadas nos diferentes tempos), foram analisadas pelo teste de Qui-quadrado e/ou teste Exato de Fisher. Na ocorrência de um efeito significativo, as proporções foram comparadas por um teste de proporção 2x2 para se estabelecer o *ranking* entre os tratamentos. Os dados das análises de estresse oxidativo foram submetidos à ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. Os valores foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$. No experimento A, a suplementação com 100 ng/mL (33,56%; 49/146; $p < 0,0001$) de Ácido Ascórbico no meio de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais, após 6 dias de cultivo, foi a mais eficiente em promover o desenvolvimento, manter a integridade folicular e os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) estáveis. No experimento B, a suplementação com 100 ng/mL (36,88%; 52/141; $p < 0,0001$) de Ácido Alfa Lipóico, aos 6 dias de cultivo *in vitro* foi a mais eficiente em promover o desenvolvimento, manter a integridade folicular e os níveis de EROs estáveis. Conclui-se que os folículos ovarianos pré-antrais inclusos em fragmentos ovarianos bovinos, provenientes de abatedouro, podem ser cultivados *in vitro* ao longo de 6 dias, com meio suplementado com antioxidantes, o que permite o desenvolvimento e a manutenção da integridade folicular e níveis de espécies reativas de oxigênio estáveis.

Palavras-chave: ácido alfa lipóico; ácido ascórbico; estresse oxidativo; foliculogênese.

BERGAMO, Larissa Zamparone. **Effect of antioxidants supplementation on the *in vitro* culture of preantral ovarian follicles from *Bos taurus indicus* females.** 2021. 115 pp. Thesis (Doctorate in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

The addition of antioxidants in the *in vitro* culture medium of bovine preantral ovarian follicles contributes to the adequate development of the follicles, maintenance of follicular integrity and oxidative stress. Thus, our objective was to evaluate the effect of supplementation with antioxidants on the development and maintenance of follicular integrity and oxidative stress in the *in vitro* culture of preantral ovarian follicles from *Bos taurus indicus* females. For the experiment A (Ascorbic Acid) and experiment B (Alpha Lipoic Acid), ovaries (n=20 and n=24, respectively) obtained from a slaughterhouse were fragmented and a randomly obtained fragment from each pair of ovaries, was fixed in Bouin (non-cultivated control; D0). These fragments were submitted to the analysis of morphology and follicular growth (classical histology). A randomly obtained fragment from each pair of ovaries was frozen at -80° C (non-cultivated control; D0) for analysis of oxidative stress (TBARS, NBT and FRAP). The other fragments were *in vitro* cultured for 6 (D6) or 12 (D12) days, in Minimum Essential Medium (MEM+) or MEM+ supplemented with Ascorbic Acid (50 or 100 ng/mL) or Alpha Lipoic Acid (50, 100 or 250 ng/mL), with an extracellular matrix of agarose gel, in an oven at 38.5° C, with air and saturated humidity. Every two days, 100% of the culture medium was replaced. Differences between the proportions of primordial and developing follicles (primary and secondary), for each treatment (uncultivated control, cultured control and different concentrations of antioxidants tested at different times), were analyzed using the Chi-square test and/or Exact Fisher test. In the event of a significant effect, the proportions were compared using a 2x2 proportion test to establish the ranking between treatments. The oxidative stress analysis data were submitted to ANOVA followed by the Bonferroni test. Values were considered significant when $P \leq 0.05$. In experiment A, supplementation with 100 ng/mL (33.56%; 49/146; $P < 0.0001$) of Ascorbic Acid in the *in vitro* culture medium of preantral ovarian follicles, after 6 days of culture, was the most efficient in promoting development, maintaining integrity follicular and reactive oxygen species (ROS) levels stability. In experiment B, supplementation with 100 ng/mL (36.88%; 52/141; $P < 0.0001$) of Alpha Lipoic Acid, at 6 days of *in vitro* culture, was the most efficient in promoting development, maintaining follicular integrity and ROS levels stability. It is concluded that the preantral ovarian follicles included in bovine ovarian fragments, from slaughterhouse, can be grown *in vitro* over 6 days, with medium supplemented with antioxidants, which allows the development and maintenance of follicular integrity and levels of stable reactive oxygen species.

Keywords: alpha lipoic acid; ascorbic acid; oxidative stress; folliculogenesis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1** – Ilustração do ovário de mamíferos, indicando as regiões cortical e medular, com suas respectivas estruturas 23
- Figura 2** – Esquema representativo da formação do oócito 24
- Figura 3** – Distribuição de fatores de crescimento e hormônios em folículos ovarianos de ruminantes 25
- Figura 4** – Ilustração dos folículos pré-antrais e antrais e seus respectivos folículos conforme o desenvolvimento 26
- Figura 5** – Esquema ilustrativo dos avanços alcançados e dos desafios que ainda precisam ser vencidos para obtenção de oócitos competentes no sistema de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais..... 32
- Figura 6** – Representação esquemática dos sistemas de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais. (A) Cultivo bidimensional isolado (B) Cultivo bidimensional *in situ* (C) Cultivo tridimensional isolado..... 34
- Figura 7** – Comparação dos sistemas de cultivo bidimensional e tridimensional. Folículos primários isolados no dia 0 (D0), dia 4 (D4) e dia 12 (D12)..... 35

ARTIGO A

- Figura 1** – Esquema demonstrativo da obtenção e processamento dos ovários no abatedouro..... 61
- Figura 2** – Esquema demonstrativo da distribuição dos grupos para os cultivos *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais, durante 6 ou 12 dias, para análise da morfologia e do crescimento folicular e para análise do estresse oxidativo, com diferentes concentrações de Ácido Ascórbico (AA) 62
- Figura 3** – Ilustração histológica da morfologia dos folículos ovarianos pré-antrais de fêmeas *Bos taurus indicus* corados com Ácido Periódico de Schiff (PAS) e Hematoxilina. (A) Folículo primordial íntegro; (B) Folículo primário íntegro; (C) Folículo

	secundário íntegro; (D) Folículo primordial degenerado (ooócito retraído e presença de vacúolos citoplasmáticos - setas); (E) Folículo primário degenerado (células da granulosa desorganizadas - seta); (F) Folículo secundário degenerado (oócito retraído e células da granulosa desorganizadas - setas)	63
Figura 4 -	Proporção de folículos ovarianos pré-antrais totais, classificados como íntegros, de fragmentos do córtex ovariano, de fêmeas <i>Bos taurus indicus</i> , cultivados por 6 (D6) ou 12 (D12) dias em Meio Essencial Mínimo (MEM+) suplementado com diferentes concentrações (50 ou 100 ng/mL) de Ácido	67
Figura 5 –	Efeito da suplementação com Ácido Ascórbico (MEM+, 50 ou 100 ng/mL) sobre a capacidade de resistir aos danos oxidativos, através da habilidade da redução do ferro (FRAP), do tecido ovariano após cultivo <i>in vitro</i> de 6 ou 12 dias	69
Figura 6 –	Efeito da suplementação com Ácido Ascórbico (MEM+, 50 ou 100 ng/mL) sobre a produção de ânion superóxido (NBT) após cultivo <i>in vitro</i> de 6 ou 12 dias	70
Figura 7 –	Efeito da suplementação com Ácido Ascórbico (MEM+, 50 ou 100 ng/mL) sobre a peroxidação lipídica (TBARS) após cultivo <i>in vitro</i> de 6 ou 12 dias	70
 ARTIGO B		
Figura 1 –	Esquema demonstrativo da obtenção dos ovários no abatedouro	76
Figura 2 –	Esquema ilustrando os grupos destinados ao cultivo <i>in vitro</i> de folículos ovarianos pré-antrais, com a suplementação de Ácido Alfa Lipóico (ALA), atribuídos para a análise da morfologia e do crescimento folicular tanto quanto para as análises do estresse oxidativo	78
Figura 3 –	Ilustração histológica da morfologia dos folículos ovarianos pré-antrais antrais de fêmeas <i>Bos taurus indicus</i> corados com Ácido Periódico de Schiff (PAS) e Hematoxilina. (A) Folículo primordial íntegro (40x); (B) Folículo primário íntegro (40x); (C) Folículos secundários íntegros (10x); (D) Folículo primordial	

	degenerado (ooócito retraído e células da granulosa desorganizadas - seta; 40x); (E) Folículo primário degenerado (oócito retraído e núcleo picnótico - seta; 40x); (F) Folículo secundário degenerado (oócito retraído e células da granulosa desorganizadas - seta; 40x)	80
Figura 4 –	Proporção de folículos ovarianos pré-antrais totais, classificados como íntegros, de fragmentos do córtex ovariano, de fêmeas <i>Bos taurus indicus</i> cultivados <i>in vitro</i> por 6 (D6) ou 12 (D12) dias em Meio Essencial Mínimo (MEM+) suplementado com diferentes concentrações (50, 100 ou 250 ng/mL) de Ácido Alfa Lipóico (ALA).....	84
Figura 5 –	Efeito da suplementação com Ácido Alfa Lipóico (MEM+, 50, 100 ou 250 ng/mL) sobre a capacidade do tecido ovariano em resistir aos danos oxidativos através da habilidade da redução do ferro (FRAP) após cultivo <i>in vitro</i> de 6 ou 12 dias	86
Figura 6 –	Efeito da suplementação com Ácido Alfa Lipóico (MEM+, 50, 100 ou 250 ng/mL) sobre a produção de ânion superóxido (NBT) após cultivo <i>in vitro</i> de 6 ou 12 dias.....	86
Figura 7 –	Efeito da suplementação com Ácido Alfa Lipóico (MEM+, 50, 100 ou 250 ng/mL) sobre a peroxidação lipídica (TBARS) após cultivo <i>in vitro</i> de 6 ou 12 dias	87

LISTA DE TABELAS

ARTIGO A

- Tabela 1** – Porcentagem de folículos ovarianos pré-antrais íntegros, primordiais e em desenvolvimento, avaliados após o cultivo *in vitro* de fragmentos do córtex ovariano de fêmeas *Bos taurus indicus*, cultivados por 6 (D6) ou 12 (D12) dias com Meio Essencial Mínimo (MEM+) suplementado com diferentes concentrações (50 ou 100 ng/mL) de Ácido Ascórbico (AA) 68

ARTIGO B

- Tabela 1** – Porcentagem de folículos ovarianos pré-antrais íntegros, primordiais e em desenvolvimento, avaliados após o cultivo *in vitro* de fragmentos do córtex ovariano de fêmeas *Bos taurus indicus*, cultivado por 6 (D6) ou 12 (D12) dias com Meio Essencial Mínimo (MEM+) suplementado com diferentes concentrações (50, 100 ou 250 ng/mL) de Ácido Alfa Lipóico (ALA) 85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IATF	Inseminação Artificial em Tempo-Fixo
PIVE	Produção <i>In vitro</i> de Embriões
TE	Transferência de Embriões
MOIFOPA	Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
CGs	Células da Granulosa
CGP	Células Germinativas Primordiais
LH	<i>Luteinizing Hormone</i> - Hormônio Luteinizante
KT	Kit Ligante
E2	Estradiol
FGFb	Fator Básico de Crescimento de Fibroblastos
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
GDF	Fator de Diferenciação de Crescimento
LIF	Fator Inibidor da Leucemia
GH	Hormônio do Crescimento
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
AMH	Hormônio Antimülleriano
BMP	Proteína Morfogenética Óssea
IGF	Fator de Crescimento Semelhante a Insulina
TGF β	Fator de Crescimento Tumoral
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
ZP	Zona Pelúcida
FIV	Fecundação <i>In vitro</i>
TSH	Hormônio Estimulante da Tireoide
MEM ⁺	Meio Essencial Mínimo
AA	Ácido Ascórbico

ALA	Ácido Alfa Lipóico
ECC	Escore de Condição Corporal
FD	Folículo Dominante
CL	Corpo Lúteo
TBARS	<i>Thiobarbituric Acid Reative Substances</i>
NBT	Nitroazul de Tetrazólio
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
PAS	Ácido Periódico de Schiff
BSA	Albumina Sérica Bovina
ITS	Insulina, Transferrina e Selênio
DMSO	Dimetilsulfóxido
MDA	Malondialdeído
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina
TROLOX	Antioxidante (padrão ouro)
OD	<i>Optical Density</i>
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TCA	Ácido Tricloroacético
Eq	Equivalente
rpm	Rotações por minuto
KOH	Hidróxido de Potássio
FeCl	Cloreto de Ferro
KCl	Cloreto de Potássio
Fe	Ferro
Cu	Cobre
pH	Potencial Hidrogênico
CO ₂	Gás Carbônico
UI	Unidade Internacional

%	Porcentagem
L	Litros
mL	Mililitros
μ L	Microlitros
μ g	Microgramas
$^{\circ}$ C	Graus Celsius
nmol	Nanomol
mOsm	Miliosmol
nm	Nanometros
mm	Milímetros
mm ²	Milímetros Quadrado
cm	Centímetros
g	Gramas
μ M	Micromolar
ng	Nanogramas
mg	Miligramas
mM	Milimolar
μ m	Micrometros
cm ³	Centímetros Cúbico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EPM	Erro Padrão da Média

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	MORFOLOGIA OVARIANA	22
2.2	OOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE.....	23
2.3	FOLÍCULOS OVARIANOS.....	25
2.3.1	Folículos Pré-Antrais	26
2.3.1.1	Folículos primordiais	27
2.3.1.2	Folículos primários	27
2.3.1.3	Folículos secundários.....	27
2.3.2	Folículos Antrais.....	28
2.3.2.1	Folículos terciários	28
2.3.2.2	Folículos pré-ovulatórios	28
2.4	POPULAÇÃO FOLICULAR.....	29
2.5	ATRESIA FOLICULAR	29
2.6	MOIFOPA.....	31
2.6.1	Cultivo <i>In vitro</i> de Folículos Ovarianos Pré-Antrais	33
2.7	ESTRESSE OXIDATIVO.....	36
2.7.1	Suplementação do Meio de Cultivo <i>In vitro</i> com Antioxidantes.....	37
2.7.1.1	Ácido Ascórbico.....	37
2.7.1.2	Ácido Alfa Lipóico.....	38
	REFERÊNCIAS.....	39
3	HIPÓTESE	53
4	OBJETIVOS	54
4.1	OBJETIVO GERAL.....	54
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	54
5	ARTIGO A – DESENVOLVIMENTO FOLICULAR, INTEGRIDADE MORFOLÓGICA E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-	

ANTRAIS DE FÊMEAS <i>Bos taurus indicus</i> CULTIVADOS <i>in vitro</i> COM SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO	55
RESUMO	56
ABSTRACT.....	57
INTRODUÇÃO	58
MATERIAL E MÉTODOS.....	59
Obtenção e Processamento dos Ovários	59
Cultivo <i>In vitro</i> de Folículos Ovarianos Pré-Antrais	61
Análise da Morfologia e do Crescimento Folicular	62
Análise do Estresse Oxidativo.....	64
Avaliação da atividade antioxidante pelo ensaio de FRAP	64
Avaliação da peroxidação lipídica pelo ensaio de TBARS	65
Avaliação da produção de ânion superóxido pelo ensaio de NBT	65
Análise Estatística	66
RESULTADOS	66
Análise da Morfologia e do Crescimento Folicular	66
Análise do Estresse Oxidativo.....	68
DISCUSSÃO.....	71
CONCLUSÃO.....	73
REFERÊNCIAS.....	74

6

ARTIGO B – DESENVOLVIMENTO FOLICULAR, INTEGRIDADE MORFOLÓGICA E POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIS DE FÊMEAS <i>Bos taurus indicus</i> CULTIVADOS <i>in vitro</i> COM SUPLEMENTAÇÃO DE ÁCIDO ALFA LIPÓICO	71
RESUMO	72
ABSTRACT.....	73
INTRODUÇÃO	74
MATERIAL E MÉTODOS.....	75
Obtenção e Processamento dos Ovários	75
Cultivo <i>in vitro</i> de Folículos Ovarianos Pré-Antrais	77
Análise da Morfologia e do Crescimento Folicular	78

	Análise do Estresse Oxidativo.....	80
	Avaliação da atividade antioxidante pelo ensaio de FRAP	81
	Avaliação da peroxidação lipídica pelo ensaio de TBARS	81
	Avaliação da produção de ânion superóxido pelo ensaio de NBT	82
	Análise Estatística	82
	RESULTADOS	82
	Análise da Morfologia e do Crescimento Folicular	82
	Análise do Estresse Oxidativo.....	85
	DISCUSSÃO.....	87
	CONCLUSÃO.....	89
	REFERÊNCIAS.....	90
7	CONCLUSÕES GERAIS	95
	APÊNDICES	96
	Produção Científica Desenvolvida Durante o Período de Doutorado (2017-2020)	97

1 1 INTRODUÇÃO

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

A reprodução animal reflete diretamente na eficiência e rentabilidade econômica do rebanho, sendo considerada de grande importância nos sistemas de produção. O desenvolvimento e a utilização de biotécnicas da reprodução animal são indispensáveis para o aumento da eficiência reprodutiva, do melhoramento genético e da produção de alimentos (Figueiredo et al., 2011; Viana et al., 2018; Kaser et al., 2019).

As biotécnicas, como inseminação artificial em tempo-fixo (IATF), produção *in vitro* de embriões (PIVE), transferência de embriões (TE) e manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA) apresentaram crescimento exponencial na última década (De Sá et al., 2020). Estudos relacionados com a MOIFOPA objetivam incrementar a eficiência reprodutiva, sendo a chave para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na foliculogênese e no desenvolvimento dos folículos ovarianos pré-antrais (Andrade et al., 2012; Araújo et al., 2014; De Sá et al., 2020). A MOIFOPA compreende o isolamento e o resgate de folículos ovarianos pré-antrais provenientes de ovários, seguido da conservação através da técnica de resfriamento ou congelamento e cultivo folicular *in vitro*, a fim de promover o crescimento, a maturação e a fecundação *in vitro* (FIV) dos oócitos inclusos nesses folículos, maximizando o potencial reprodutivo das fêmeas e diminuindo a atresia folicular que acontece *in vivo* (Figueiredo et al., 2007).

Estudos referentes à biotécnica da MOIFOPA apresentam resultados satisfatórios em diversas espécies. Oócitos provenientes de folículos ovarianos pré-antrais podem crescer, adquirir competência meiótica, serem fecundados *in vitro* e chegar até o estágio de blastocisto (Hirao et al., 1994; Huanmin; Yong, 2000; Wu; Carrel; Wilcox, 2001; Gupta Ramesh; Manjunatha, 2008; Arunakumari; Shanmugasundaram; Rao, 2010; Magalhães et al., 2010; Saraiva et al., 2010). Recentemente, foi relatada a primeira prenhez em cabras após o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais (De Sá et al., 2020).

O cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais é utilizado para elucidar as diferentes substâncias envolvidas no desenvolvimento folicular. Adicionalmente, para que biotécnicas relacionadas com o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais sejam aplicadas em larga escala, ainda são necessários estudos que avaliem os meios de cultivo e as demais substâncias necessárias para o

1 desenvolvimento folicular, tais como os fatores de crescimento, os antioxidantes e os
2 hormônios (Silva et al., 2017; De Sá et al., 2020).

3 Outro aspecto que pode interferir no sucesso e na aplicabilidade
4 prática da biotécnica de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais é a produção
5 em excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs). Desta forma, a suplementação
6 do meio de cultivo *in vitro* com substâncias antioxidantes como o Ácido Ascórbico e o
7 Ácido Alfa Lipóico objetiva equilibrar a formação de EROs produzidas em maiores
8 quantidades no cultivo *in vitro* quando comparado com o ambiente *in vivo* (Rossetto
9 et al., 2009; Silva et al., 2011; Talebi et al., 2012; Gomes et al., 2015; 2018).
10 Substâncias antioxidantes proporcionam benefícios nos estágios iniciais de
11 desenvolvimento dos folículos ovarianos, diminuindo os danos causados pelos
12 radicais livres, tanto *in vivo* como *in vitro*.

13 O Ácido Ascórbico e o Ácido Alfa Lipóico são substâncias que
14 promovem a diminuição dos níveis de EROs presentes nas células, capazes de
15 prevenir tanto a apoptose espontânea como a induzida por estresse (Wang et al.,
16 2002). Para a espécie bovina, pesquisas envolvendo o cultivo *in vitro* de folículos
17 ovarianos pré-antrais com uma matriz extracelular de gel de agarose, com a finalidade
18 de avaliar o desenvolvimento folicular, a manutenção da integridade folicular e do
19 estresse oxidativo ainda são escassos.

20 Nesse contexto, o principal objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito
21 da suplementação do meio de cultivo *in vitro* com diferentes concentrações de
22 antioxidantes (Ácido Ascórbico e Ácido Alfa Lipóico) com uma matriz extracelular de
23 gel de agarose, de folículos ovarianos pré-antrais de fêmeas *Bos taurus indicus*.

1 2 REVISÃO DE LITERATURA

2

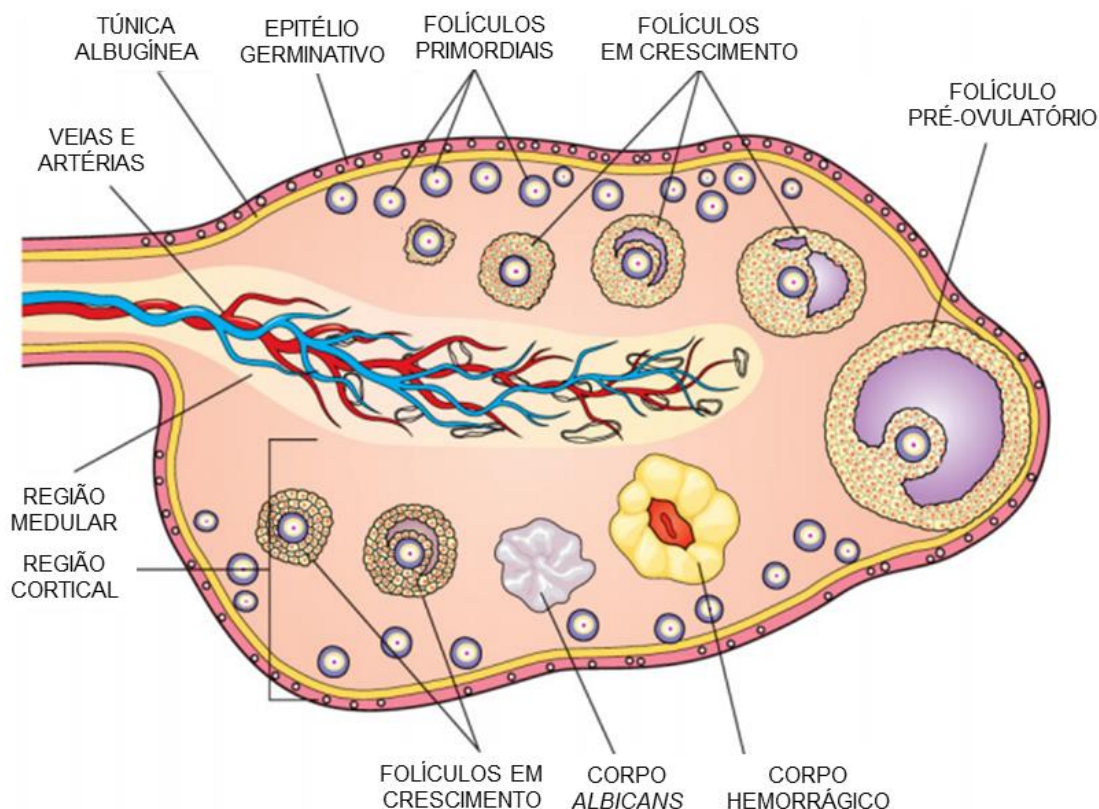
3 2.1 MORFOLOGIA OVARIANA

4

5 Os ovários desempenham funções relevantes para o sistema
6 reprodutivo, no qual a função exócrina (ou gametogênica) exerce a maturação
7 e liberação do oócito para fecundação e a função endócrina (ou
8 esteroidogênica) efetua a síntese e secreção de hormônios e fatores de
9 crescimento (Araújo et al., 2014; Green; Shikanov, 2016). Além disso, ocorre
10 interação entre os fatores endócrinos, autócrinos e parácrinos, atuando
11 associados no processo de desenvolvimento folicular e oocitário durante a vida
12 reprodutiva da fêmea (Atwood; Meethal, 2016; Monniaux et al., 2019).

13 O formato, assim como o tamanho dos ovários, apresenta
14 distinção conforme a espécie animal, raça e estágio do ciclo estral da fêmea.
15 Na espécie bovina, o formato dos ovários assemelha-se a amêndoas, obtendo
16 peso médio de 10-20 g na idade adulta (Hafez; Hafez, 2004), com mensuração
17 de 3,0-4,5 cm e 1,5-2,0 cm, comprimento e largura, respectivamente
18 (Nascimento et al., 2003).

19 O ovário da fêmea bovina distingue-se em duas regiões,
20 denominadas de córtex e medula (Silva, 2005). O córtex, porção mais externa
21 do ovário representa a região funcional onde estão localizados os folículos
22 ovarianos e estruturas luteais, em diferentes estágios de desenvolvimento e/ou
23 atresia (Silva, 2005). Os folículos ovarianos, por sua vez, estão envoltos por
24 células da granulosa (CGs) e células da teca (Erickson; Shimasaki, 2003). A
25 região medular localiza-se mais internamente, na maioria das espécies, e
26 apresenta um arranjo irregular de tecido nervoso, vascular (sanguíneo e
27 linfático), tecido fibroblástico e conjuntivo, no qual se comunica com o ovário
28 através do hilo. Sua principal função visa nutrir e sustentar o ovário (Silva, 2005;
29 Figura 1).



1
2 **Figura 1** – Ilustração do ovário de mamíferos, indicando as regiões cortical e
3 medular, com suas respectivas estruturas.

4 **Fonte:** Adaptado de http://www.coltri.bio.br/repfem_17.pdf

5

6 2.2 OOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE

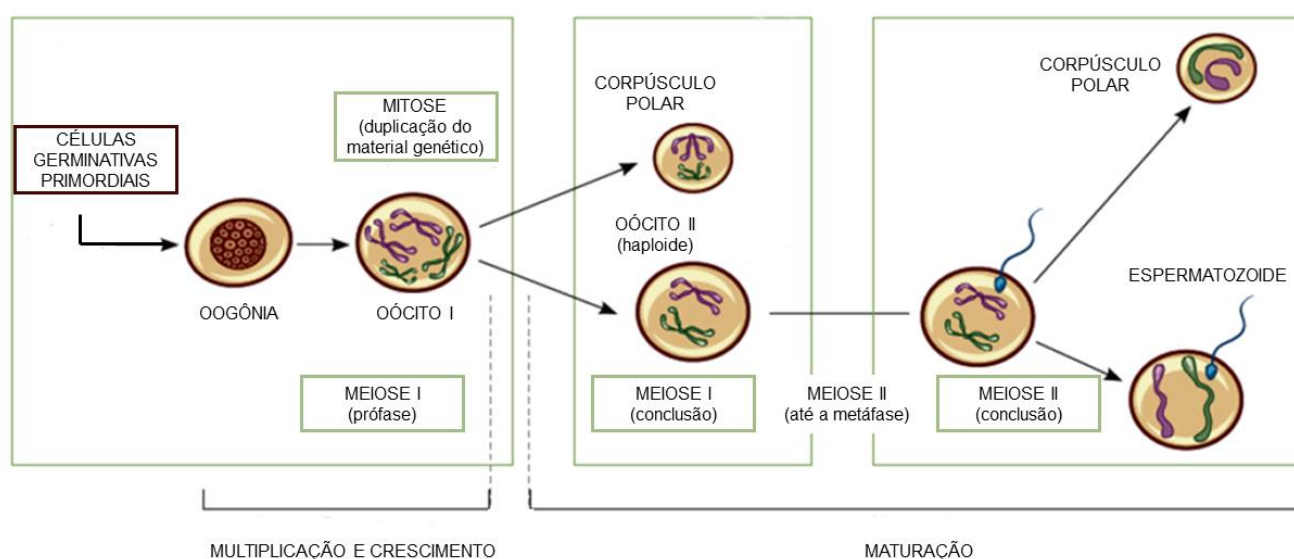
7

8 Para a expansão sólida de mecanismos vinculados à reprodução
9 animal, deve-se considerar a base fundamental da fisiologia da fêmea, a oogênese e
10 a foliculogênese. Tais processos fisiológicos resultam na origem dos oócitos e
11 folículos ovarianos, ainda na vida fetal. Assim, o estoque de oócitos e folículos é finito
12 (Saumande, 1991; Figueiredo et al., 2008).

13 A oogênese compreende o desenvolvimento e diferenciação de
14 células germinativas primordiais (CGP), resultando na formação do oócito (haploide),
15 com término do seu desenvolvimento após a fecundação (Aguiar et al., 2017). Na fase
16 de embrião, ainda na vida uterina, as CGP localizadas no saco vitelínico se deslocam
17 em direção as gônadas em desenvolvimento para se transformarem em oogônias. Em
18 seguida, ocorre a reorganização das organelas citoplasmáticas e proliferação celular
19 (Sadeu et al., 2006; Bessa; Dode, 2013). Após sucessivas divisões mitóticas e a

1 primeira divisão meiótica, as CGP originam os oócitos (Hannon; Curry, 2018). Assim,
 2 na fase púbera das fêmeas, ocorre a liberação de hormônio luteinizante (LH), antes
 3 da ovulação, sinalizando a retomada da meiose. Dessa forma, ocorre o rompimento
 4 da vesícula germinativa, no qual sucedem as etapas de metáfase I, anáfase I e
 5 telófase I, com a liberação do corpúsculo polar e o desenvolvimento de um oócito
 6 secundário (Betteridge et al., 1989; Gordon, 1994). O oócito retomará a meiose
 7 apenas se for fecundado pelo espermatozoide, finalizando a oogênese com a extrusão
 8 do segundo corpúsculo polar (Moore; Persaud 1994; Figura 2).

9



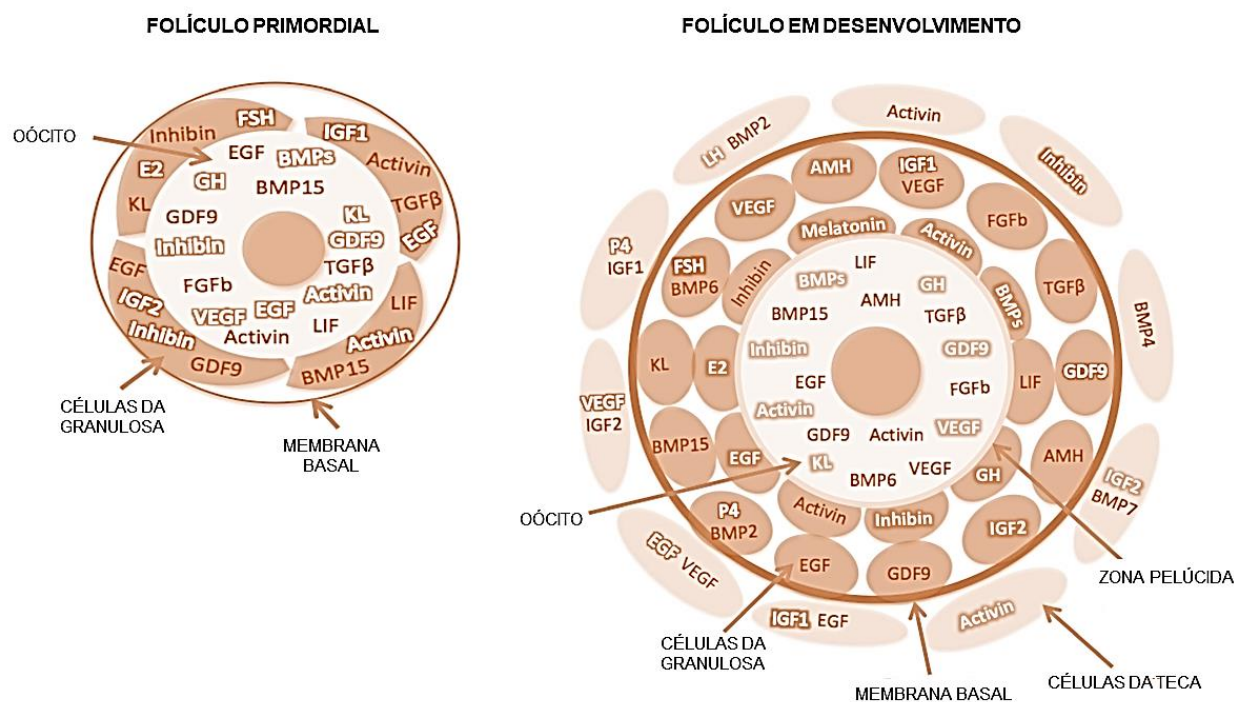
10

11 **Figura 2** – Esquema representativo da formação do oócito.

12 **Fonte:** Adaptado de <http://animanmov.blogspot.com/2014/10/oogenese-foliculos-e-trompas-de-falopio.html>

13

14
 15 A foliculogênese atua no processo de formação, crescimento e
 16 maturação folicular, iniciando com a formação do folículo primordial e término no
 17 estágio de folículo pré-ovulatório (Figueiredo et al., 2008; Rossetto et al., 2011; 2013).
 18 A sinalização para ativação de folículos primordiais, assim como o posterior
 19 crescimento de folículos primários e secundários, vinculam-se a um sistema bastante
 20 complexo, envolvendo a participação de diferentes fatores de crescimento e
 21 hormônios (Figura 3).



1

2 **Figura 3** - Distribuição de fatores de crescimento e hormônios em folículos ovarianos
 3 de ruminantes.

4 **Fonte:** Adaptado de Figueiredo et al., 2018.

5

6 2.3 FOLÍCULOS OVARIANOS

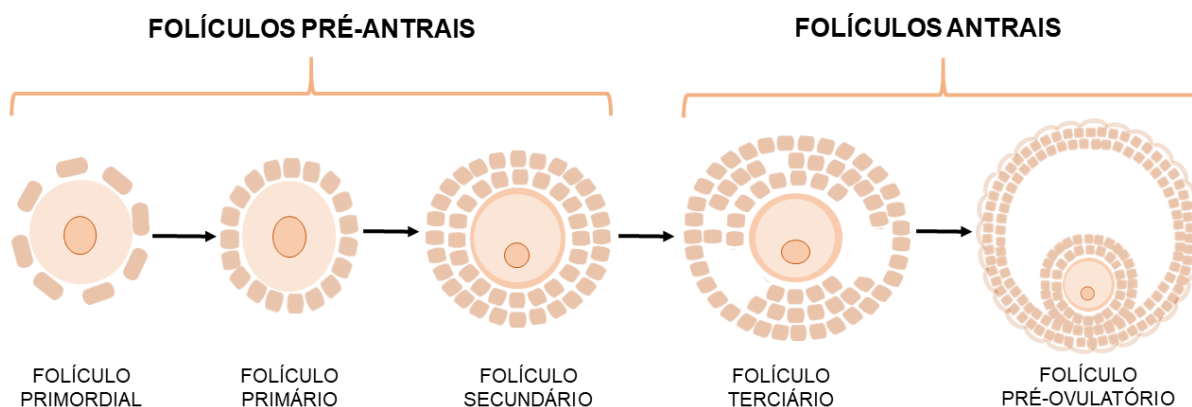
7

8 O folículo ovariano, contendo um oócito no seu interior, refere-se à
 9 unidade morfofuncional dos ovários dos mamíferos. Ainda durante a embriogênese,
 10 ocorre a formação da estrutura do folículo, cujo desenvolvimento é controlado por
 11 fatores endócrinos e parácrinos (Aguiar et al., 2017). Este é circundado por CGs e/ou
 12 tecais, proporcionando um ambiente ideal para o crescimento e maturação do oócito,
 13 permitindo que este esteja maduro no momento da ovulação (Figueiredo et al., 2008;
 14 Aguiar et al., 2017). O desenvolvimento folicular e o crescimento do oócito dependem
 15 de uma comunicação eficiente entre as células somáticas e o oócito, desempenhando
 16 papel essencial no controle da proliferação e diferenciação das CGs durante o
 17 desenvolvimento folicular (Araújo et al., 2014).

18 A população folicular presente nos ovários localiza-se no córtex
 19 ovariano e possui diferentes tipos de folículos. Assim, designam-se em duas classes,
 20 os folículos ovarianos pré-antrais, representantes da fase inicial do desenvolvimento
 21 folicular, classificados em primordiais, primários ou secundários. A segunda classe

1 compõe os folículos ovarianos antrais, nos quais apresentam uma cavidade repleta
 2 de líquido folicular, entre as camadas de CGs, denominada antro. Dessa forma,
 3 classificam-se em folículos terciários e pré-ovulatórios (Matsuda et al., 2012; Lisboa
 4 et al., 2015; Figura 4).

5



6

7 **Figura 4** – Ilustração dos folículos pré-antrais e antrais e seus respectivos folículos
 8 conforme o desenvolvimento.

9 **Fonte:** Adaptado de Lisboa et al., 2015.

10

11 2.3.1 Folículos Pré-Antrais

12

13 São constituídos pelos folículos primordiais, primários e secundários.
 14 Diferem entre si pelo formato das CGs que o envolvem, bem como pelo tamanho e
 15 número de camadas de CGs que circundam o oócito imaturo (Figueiredo et al., 2008;
 16 Bessa; Dode, 2013). Esses folículos compreendem 90 a 95% de toda a população
 17 folicular, dos quais mais de 99% não chegarão até a ovulação, sofrendo atresia. Isso
 18 demonstra um baixo aproveitamento de gametas na fêmea (Erickson, 1986; Matsuda
 19 et al., 2012).

20

21 Os folículos pré-antrais, a partir do estágio de folículo secundário,
 22 apresentam uma zona pelúcida (ZP), formada por glicoproteínas que circundam o
 23 oócito, pelo menos uma camada de CGs e células da teca ao redor da membrana
 24 basal (Rankin et al., 2001; Barnett et al., 2006). Neste estágio, as CGs dos folículos
 25 apresentam uma extensiva rede de junções do tipo *gap*, canais esses que possibilitam
 26 a passagem de íons inorgânicos, nutrientes e pequenos metabólitos (Kidder; Mhawi,
 2002).

1 2.3.1.1 Folículos primordiais

2
3 Os folículos primordiais representam o estágio inicial de
4 desenvolvimento folicular, localizados no *pool* de reserva, a partir do qual os folículos
5 são recrutados (Araújo et al., 2014). Cada folículo é composto por um oócito envolto
6 por uma única camada de quatro a oito CGs, de formato achatado, rodeado por uma
7 membrana basal (Chowdhury et al., 2016). O diâmetro do folículo primordial, bem
8 como do oócito nele contido, medem, respectivamente, 30-40 μm e 20-25 μm de
9 diâmetro (Beckers et al., 1996). Quando a população de folículos primordiais é
10 estabelecida, grupos de folículos saem gradualmente do *pool* de reserva e entram em
11 fase de crescimento após serem ativados.

12

13 2.3.1.2 Folículos primários

14

15 Durante o período de ativação folicular, quando se inicia o
16 crescimento dos folículos ovarianos, o folículo primordial sai do *pool* de reserva e entra
17 no estágio de transição. A ativação folicular é caracterizada por modificações da
18 morfologia das CGs, que passam a ter formato cuboide. Desse modo, os folículos
19 primários apresentam um oócito envolto por uma camada CGs em formato cuboide.
20 Uma vez recrutado, o folículo primordial evolui para folículo primário, dando início ao
21 crescimento dos oócitos (Araújo et al., 2014). O folículo primário possui diâmetro de
22 40-60 μm , contendo um oócito de 30-40 μm . No entanto os folículos primordiais e
23 primários não podem ser diferenciados através das medidas de diâmetro, apenas
24 pelas alterações morfológicas de suas células (Hulshof et al., 1994).

25

26 2.3.1.3 Folículos secundários

27

28 São denominados de folículos secundários aqueles que possuem
29 duas ou mais camadas de CGs de formato cuboide envolvendo o oócito. Há deposição
30 inicial da ZP e formação de grânulos no citoplasma dos oócitos (Araújo et al., 2014).
31 Os folículos secundários caracterizam-se pela presença de um oócito imaturo na
32 região central, podendo atingir 60-200 μm de diâmetro (Beckers et al., 1996).

1 2.3.2 Folículos Antrais

2

3

4 Os folículos terciários e pré-ovulatórios são classificados como antrais
5 por possuírem uma intensa proliferação das CGs e pelo surgimento do antro folicular,
6 repleto de fluido (Figueiredo et al., 2008; Bessa; Dode, 2013). O fluido folicular é
7 composto por água, proteínas séricas, eletrólitos e altas concentrações de hormônios
8 esteroides que são secretados pelas CGs. O tamanho do antro folicular na espécie

9

10 2.3.2.1 Folículos terciários

11

12

13 Os folículos terciários são constituídos por um oócito circundado pela
14 ZP, uma pequena cavidade antral, ainda em formação, uma membrana basal e
15 diversas camadas de células tecais (teca interna e teca externa; Gordon, 1994).
16 Possuem em sua conformação a presença de microvilosidades dentro da ZP e grande
17 quantidade de mitocôndrias de formato arredondado e alongado, bem como diversas
18 partículas lipídicas (Fair et al., 1997).

18

19 2.3.2.2 Folículos pré-ovulatórios

20

21

22 Os folículos pré-ovulatórios representam o estágio final de
23 desenvolvimento folicular antes da ovulação. Há o predomínio de mitocôndrias
24 arredondadas, que caracterizam o completo desenvolvimento do oócito na espécie
25 bovina. Podem ser identificados grânulos na camada cortical e microtúbulos no
26 ooplasma do oócito. Retículo endoplasmático liso e rugoso também podem ser
27 observados em grande quantidade nesse estágio de desenvolvimento folicular (Hytel
28 et al., 1997). O oócito está envolto por células especializadas, inicialmente CGs, que
29 agora são denominadas de células do *cumulus*. A ovulação do oócito juntamente com
as células do *cumulus* ocorre em resposta ao pico de LH (Driancourt et al., 1991).

1 2.4 POPULAÇÃO FOLICULAR

2

3 A população folicular é estabelecida ainda na vida fetal, em primatas
4 e ruminantes, entre a terceira e a sexta semana após a concepção. Essa população
5 é variável entre as espécies, além de ser observada uma variação individual entre os
6 animais da mesma espécie (Betteridge et al., 1989; Silva-Santos et al., 2011).

7 Para bovinos, estima-se que a população folicular ao nascimento está
8 em torno de 235.000 folículos por ovário (Silva-Santos et al., 2011), diferentemente
9 dos caprinos e ovinos que apresentam cerca de 37.646 e 160.000 folículos,
10 respectivamente (Driancourt et al., 1991; Lucci et al., 1999) e das camundongas que
11 apresentam 1.500 folículos (Shaw et al., 2000). A cabra por sua vez, apresenta cerca
12 de 35.000 folículos (Lucci et al., 1999), a mulher aproximadamente 2.000.000 folículos
13 (Erickson, 1986) e há uma variação de 6.164 a 59.283 folículos em cadelas adultas,
14 variando conforme o tamanho do animal (Lunardon et al., 2015). Para a espécie
15 equina, estima-se que a população folicular seja ao redor de 36.000 folículos por
16 ovário (Evans; Constantinescu; Ganjan, 2007).

17 Diversos fatores como a genética, raça, idade, níveis hormonais,
18 estado reprodutivo e estado nutricional podem influenciar diretamente a população
19 folicular entre as espécies (Rüsse, 1983; Scaramuzzi et al., 2011; Silva-Santos et al.,
20 2011). Mas, apesar de ser altamente variável entre os indivíduos, a população folicular
21 possui alta repetibilidade individual e está relacionada positivamente com índices de
22 fertilidade e função ovariana (Burns et al., 2005; Ireland et al., 2008; 2009).

23

24 2.5 ATRESIA FOLICULAR

25

26 Apesar da numerosa população folicular presente nos ovários,
27 estabelecida durante a vida fetal, quase a totalidade de folículos encontrados no *pool*
28 de reserva ovariana, ou seja, 99,9%, não chegam à ovulação. Esses folículos sofrem
29 um processo de morte celular conhecido como atresia folicular, tornando o ovário um
30 órgão de baixa produtividade (Campos-Junior et al., 2012; Hatzirodos et al., 2014). O
31 processo ocorre principalmente por apoptose das CGs, em resposta à privação
32 hormonal, podendo ocorrer por via degenerativa e/ou apoptótica (Matsuda et al.,
33 2012).

1 Fatores como idade, estado reprodutivo, lactação, gestação, níveis
2 hormonais e estado nutricional podem influenciar a atresia folicular (Mcgee; Horne,
3 2018). Estudos relacionados à atresia indicam que é um processo súbito, com a morte
4 das CGs em conjunto (Hirshfield, 1991). Este processo faz com que os folículos
5 ovarianos não apresentem uma prevalência homogênea em todos os estágios de
6 desenvolvimento folicular (Gordon, 1994; Fortune et al., 1998). Apesar de ser um
7 processo fisiológico, independente da fase em que ocorra, a atresia diminui
8 significativamente o número de oócitos em potencial para ovulação durante a vida
9 reprodutiva do animal (Mcgee; Horne, 2018). Diante disso, a atresia tem estimulado o
10 interesse no desenvolvimento de um sistema de cultivo *in vitro* capaz de manter o
11 crescimento folicular e evitar essa perda dos folículos ovarianos (Araújo et al., 2014).

12 O processo de atresia difere entre folículos pré-antrais (primordiais,
13 primários e secundários) e antrais (terciários e pré-ovulatórios). Nos folículos pré-
14 antrais, os primeiros sinais de morte celular ocorrem no oócito, causando retração da
15 cromatina nuclear e fragmentação oocitária, desencadeando um processo de
16 eliminação irreversível dos folículos ovarianos nessa fase de desenvolvimento (Morita;
17 Tilly, 1999; Silva et al., 2002). Além disso, as CGs tornam-se túrgidas e diminuem o
18 número de organelas do citoplasma (Tassel; Kennedy, 1980).

19 Após a formação do antro folicular, ocorre uma alteração na
20 sensibilidade do oócito e das CGs. Inicialmente, ocorre o aparecimento de núcleos
21 picnóticos nas CGs, condensação da cromatina, vacuolização citoplasmática e
22 retração nuclear. Sequencialmente, observa-se a degeneração das células tecais e a
23 presença de corpos apoptóticos na cavidade antral desses folículos (Tilly, 1996;
24 Mcgee; Horne, 2018). Com a progressão da atresia, pode-se observar uma redução
25 no número de camadas das CGs e invasão do folículo por fibroblastos e macrófagos.
26 Após drásticas mudanças nas CGs, o oócito, frequentemente, sofre pseudo
27 maturação, fragmenta-se e, finalmente, é eliminado durante os estágios finais de
28 atresia (Byskov, 1974).

29 A atresia folicular e os fatores que influenciam este processo são
30 amplamente estudados e tem sido demonstrado que muitos hormônios, fatores de
31 crescimento e antioxidantes estão envolvidos no processo de evitar a atresia. A
32 elucidação dos mecanismos que regulam a foliculogênese, incluindo o processo de
33 atresia, é importante para o melhor aproveitamento de folículos pré-antrais no
34 melhoramento da eficiência reprodutiva dos animais de produção.

1 2.6 MOIFOPA

2

3 A Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-
4 Antrais (MOIFOPA) é uma biotécnica da reprodução que vem sendo amplamente
5 estudada. O principal objetivo da técnica é promover o desenvolvimento e a maturação
6 dos oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais, bem como manter sua
7 viabilidade, a fim de se evitar a atresia folicular e possibilitar sua utilização em diversas
8 biotécnicas como a FIV, transgenia e clonagem (Figueiredo et al., 2008; Lima; Santos,
9 2010). A MOIFOPA também contribui para o esclarecimento de mecanismos
10 envolvidos na foliculogênese inicial, visando a multiplicação de animais de alto valor
11 zootécnico ou em risco de extinção.

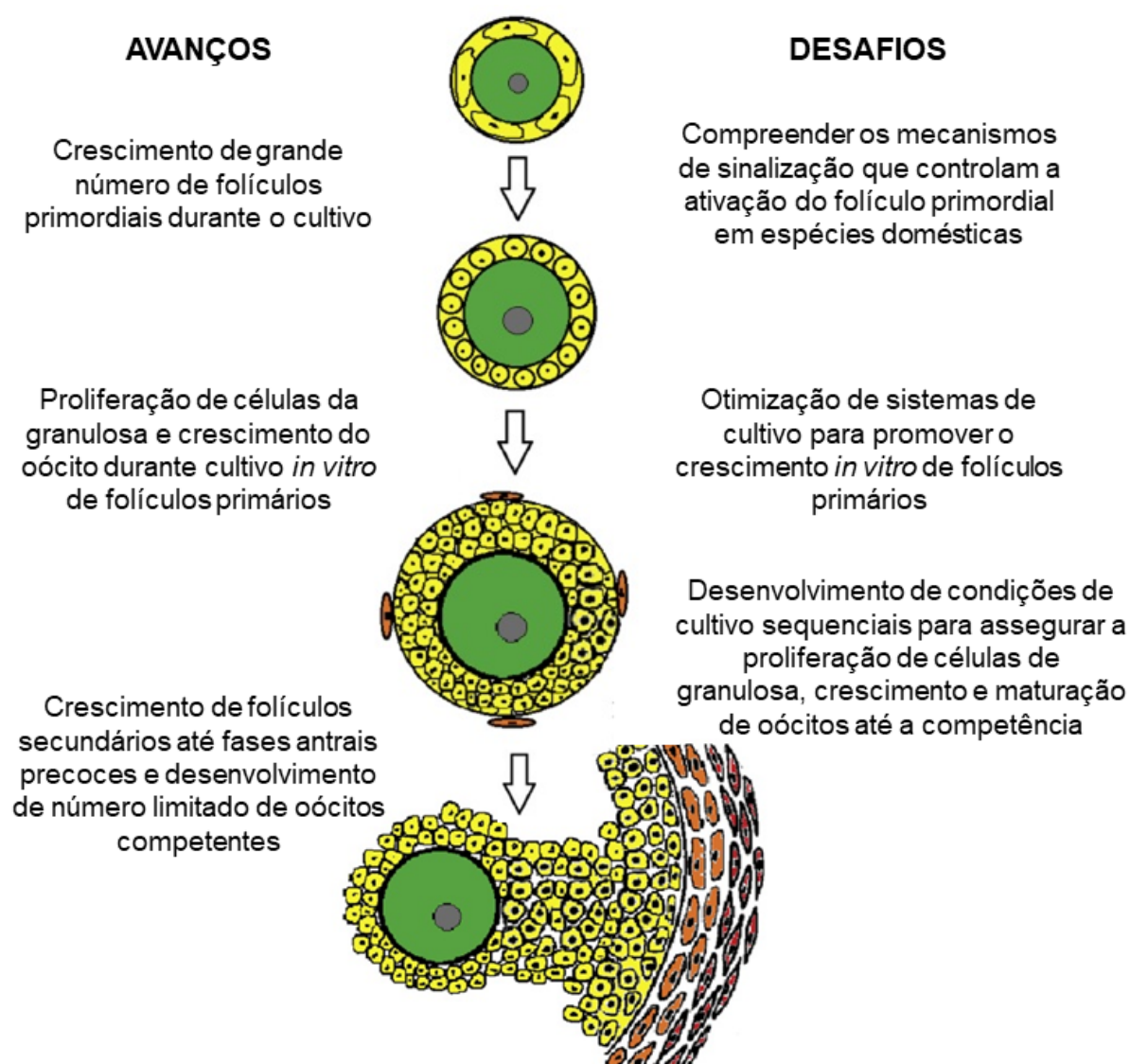
12 A base da técnica consiste na obtenção de folículos pré-antrais de
13 ovários a partir de fragmentos ovarianos ou isolamento folicular para serem cultivados
14 *in vitro* até a completa maturação (Figueiredo et al., 2008). As recentes melhorias nos
15 métodos disponíveis para o estudo da ativação do folículo primordial e o conhecimento
16 dos processos celulares e vias de sinalização envolvidos abriram novas perspectivas.
17 Em espécies domésticas, este é um processo longo e exige a compreensão dos
18 efeitos fisiológicos e farmacológicos. Para muitas espécies, os resultados *in vitro* ainda
19 são limitados, provavelmente devido à falta de harmonia entre crescimento e
20 diferenciação do oócito e das células somáticas que o circundam durante o processo
21 de desenvolvimento do folículo ovariano pré-antral (Silva; Van Den Hurk; Figueiredo,
22 2016).

23 Os primeiros estudos referentes à biotécnica da MOIFOPA datam da
24 década de 80, apresentando resultados satisfatórios em diversas espécies, como por
25 exemplo, em suínos (Hirao et al., 1994; Wu; Carrel; Wilcox, 2001), bubalinos (Gupta
26 Ramesh; Manjunatha, 2008), ovinos (Arunakumari; Shanmugasundaram; Rao, 2010)
27 e caprinos (Huanmin; Yong, 2000; Magalhães et al., 2010; Saraiva et al., 2010). Já foi
28 demonstrado que os oócitos provenientes de folículos ovarianos pré-antrais podem
29 crescer, adquirir competência meiótica, serem fecundados *in vitro* e chegar até o
30 estágio de blastocisto. Para a espécie humana (Roy; Treacy, 1993) e bovina
31 (McCaffery et al., 2000; Rossetto et al., 2013), folículos ovarianos pré-antrais foram
32 isolados e cultivados até a fase de folículo antral. Em ratos relatou-se a produção *in*
33 *vitro* de embriões (Daniel; Armstrong; Gorelangton, 1989) e em camundongos
34 obtiveram o nascimento a partir de folículos ovarianos pré-antrais que foram

1 maturados e fecundados *in vitro* (Eppig; Schroeder, 1989). E mais recentemente, foi
 2 relatada a primeira prenhez em cabras após o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos
 3 pré-antrais (De Sá et al., 2020).

4 Alguns avanços já foram alcançados, mas desafios ainda precisam
 5 ser vencidos para obtenção de oócitos competentes no sistema de cultivo *in vitro* de
 6 folículos ovarianos pré-antrais (Figura 5).

7



8

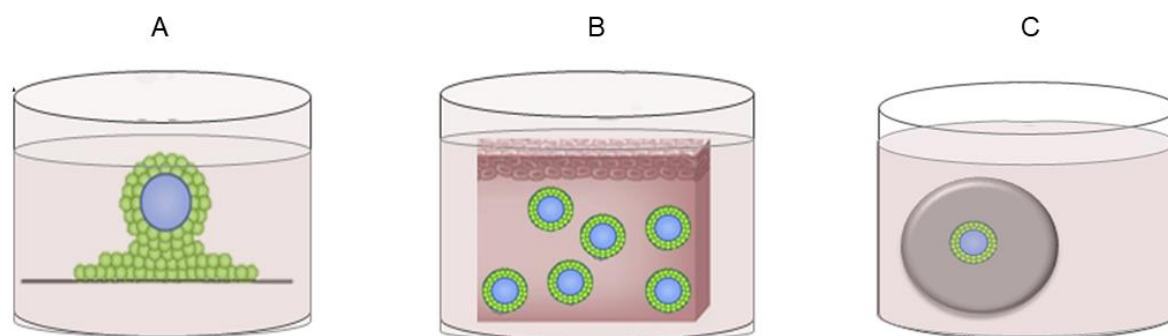
9 **Figura 5** – Esquema ilustrativo dos avanços alcançados e dos desafios que ainda
 10 precisam ser vencidos para obtenção de oócitos competentes no sistema de cultivo *in*
 11 *vitro* de folículos ovarianos pré-antrais.

12 **Fonte:** Adaptado de Silva; Van Den Hurk; Figueiredo, 2016.

1 2.6.1 Cultivo *In vitro* de Folículos Ovarianos Pré-Antrais

2
3 Vários foram os sistemas de cultivo desenvolvidos variando de acordo
4 com a espécie estudada, o tipo de meio e o sistema utilizados (Fortune, 1994). Para
5 que o sistema de cultivo promova um eficiente desenvolvimento dos folículos
6 ovarianos pré-antrais pelo menos três condições básicas devem ser fornecidas pelo
7 modelo “ideal” de cultivo. Entre essas, o sistema de cultivo deve manter a viabilidade
8 dos folículos, preservar sua morfologia pré-existente *in vivo* e proporcionar o
9 crescimento e a maturação folicular. Apesar dos avanços já obtidos, principalmente
10 em animais domésticos, os sistemas de cultivo existentes ainda não atendem
11 completamente todos os requisitos “ideais” de cultivo (Figueiredo et al., 2008; Nóbrega
12 Junior et al., 2014).

13 Os sistemas de cultivo comumente utilizados compreendem o cultivo
14 *in situ*, em que fragmentos do córtex ovariano são obtidos dos ovários, ou ainda, é
15 realizado o cultivo isolado do folículo. O cultivo *in situ* tem o objetivo de avaliar a
16 ativação dos folículos primordiais e posteriormente o crescimento dos folículos
17 primários. Além de trazer vantagens como praticidade, o cultivo *in situ* proporciona a
18 manutenção da integridade dos folículos inclusos nos fragmentos dos ovários e a
19 interação destes com as células do estroma ovariano (Abir et al., 2006; Silva et al.,
20 2015). Já o cultivo de folículos ovarianos pré-antrais isolados utiliza métodos
21 mecânicos e/ou enzimáticos para realizar o isolamento dos folículos. Esse sistema
22 apresenta como vantagem o acompanhamento individual dos folículos durante o
23 período de cultivo, além de favorecer uma maior manutenção do meio para o folículo
24 (Abir et al., 2006; Figura 6).



1

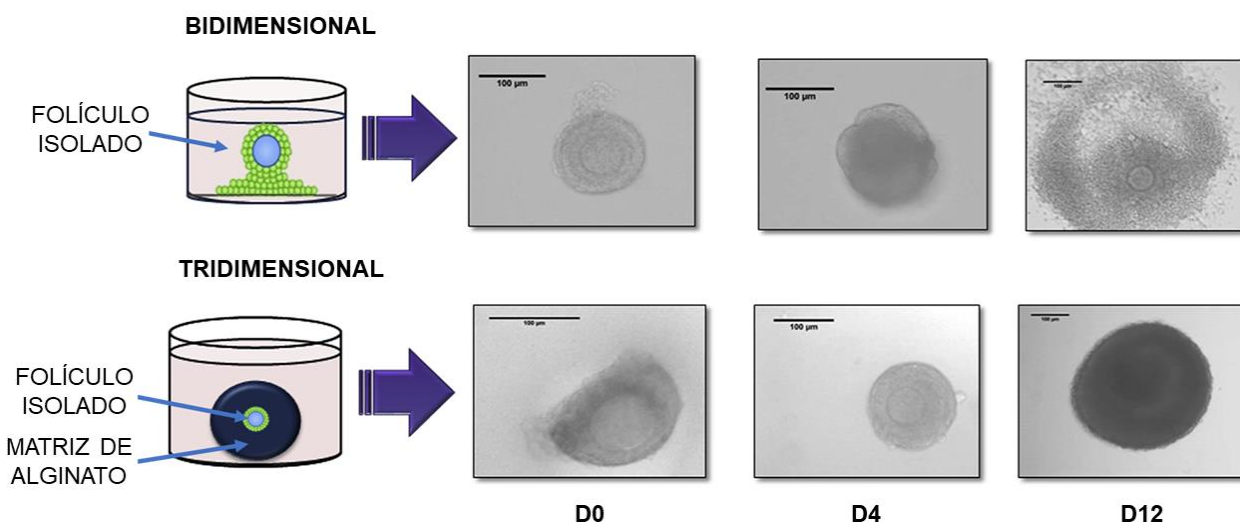
2 **Figura 6** – Representação esquemática dos sistemas de cultivo *in vitro* de folículos
3 ovarianos pré-antrais. (A) Cultivo bidimensional isolado. (B) Cultivo bidimensional *in*
4 *situ*. (C) Cultivo tridimensional isolado.

5 **Fonte:** Adaptado de Green; Shikanov, 2016.

6

7

8 Outro fator que influencia a capacidade do folículo em responder aos
9 diversos estímulos é o substrato com que o folículo mantém contato. No sistema
10 bidimensional, o folículo é cultivado sobre uma placa de cultivo, envolto ou não por
11 ágar, por compostos da matriz extracelular purificados (colágeno do tipo I, fibronectina
12 ou matrigel), ou ainda por uma monocamada de células somáticas (CGs, fibroblastos
13 e outros componentes do tecido ovariano; Figueiredo et al., 2008). No modelo de
14 sistema tridimensional, o folículo é cultivado no interior do substrato, ou seja, o folículo
15 fica completamente envolto pelo substrato utilizado, desta forma, o crescimento do
16 oócito e a proliferação das células da granulosa ocorre de forma radial, iniciando no
17 centro do folículo. Os substratos mais usados, nesse sistema, são: colágeno do tipo I,
18 ágar ou polissacarídeo biocompatível, conhecido como hidrogel de alginato (Brito et
al., 2014; Silva et al., 2015; Figura 7).



1

2 **Figura 7** – Comparação dos sistemas de cultivo bidimensional e tridimensional.

3 Folículos primários isolados no dia 0 (D0), dia 4 (D4) e dia 12 (D12).

4 **Fonte:** Adaptado de Green; Shikanov, 2016.

5

6

7 A composição do meio de cultivo também é fator essencial para
 8 obtenção do sucesso durante o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais, que
 9 geralmente, tendem a impedir a atresia folicular, através da inclusão de diversas
 10 substâncias, como uma fonte de proteína, antibióticos (penicilina e estreptomicina),
 11 selênio, piruvato, glutamina, fatores de crescimento (IGF, EGF, ativina-A, GDF-9 e
 12 FGFb), hormônios (insulina, FSH, GH e TSH) e esteroides (estradiol, testosterona ou
 androstenediona; Rodrigues et al., 2010; Andrade et al., 2012; Leitão et al., 2014).

13 O Meio Essencial Mínimo (MEM⁺) é utilizado tanto para o cultivo de
 14 tecido ovariano quanto de folículos pré-antrais isolados (Silva et al., 2004; Matos et
 15 al., 2007; Rossetto et al., 2013). No entanto, quando os folículos ovarianos são
 16 cultivados *in vitro*, são expostos a grande estresse oxidativo em consequência à
 17 exposição à luz, às elevadas concentrações de oxigênio e às concentrações variáveis
 18 de substratos metabólicos. A adição de antioxidantes ao meio de cultivo pode ser a
 19 chave para proteger os folículos das espécies reativas de oxigênio durante o
 20 desenvolvimento *in vitro* (Gomes et al., 2018).

21

22 A biotécnica do cultivo *in vitro* é de alta importância para a pesquisa
 23 básica, na elucidação dos mecanismos presentes na fase pré-antral da foliculogênese
 24 e para a reprodução animal (Lima; Santos, 2010; Sánchez; Smitz, 2012), assim como
 25 na reprodução humana, uma vez que muitas mulheres sofrem de doenças que
 comprometem direta ou indiretamente a fertilidade. O cultivo *in vitro* de folículos

1 ovarianos pré-antrais ainda não é uma técnica amplamente utilizada na prática devido
2 aos métodos de desenvolvimento folicular estarem longe de ser perfeitos. No entanto,
3 o desenvolvimento de um modelo “ideal” de cultivo folicular para investigar a
4 foliculogênese resultaria em grande aporte de subsídios para a prospecção científica
5 das biotécnicas reprodutivas nas ciências biomédicas.

6

7 2.7 ESTRESSE OXIDATIVO

8

9 O estresse oxidativo é definido como uma excessiva produção de
10 espécies reativas de oxigênio (EROs) ou um desequilíbrio causado entre a produção
11 de EROs e os sistemas de defesa antioxidante (Agarwal et al., 2003). As EROs
12 presentes em excesso no sistema reprodutivo das fêmeas promovem ações
13 deletérias, alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares,
14 formação de produtos citotóxicos, podendo levar à apoptose (Silva et. al., 2011).
15 Esses radicais estão presentes nos ovários, tuba uterina e embriões, e ainda, de forma
16 positiva, estão envolvidos em processos fisiológicos responsáveis pela maturação
17 oocitária, esteroidogênese e nas funções envolvendo o corpo lúteo (Agarwal; Gupta;
18 Sharma, 2005; Andrade et al., 2010).

19 Ao longo do cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais as EROs
20 podem ser geradas pelo metabolismo das células, altas concentrações de oxigênio,
21 luminosidade do ambiente e manipulação dos fragmentos ovarianos *in vitro*,
22 influenciando o metabolismo geral das células. O resultado do excesso de produção
23 de radicais livres leva a um desequilíbrio no qual uma quantidade excessiva de EROs
24 é liberada, levando ao estresse oxidativo (Goto et al., 1992; Combelles; Gupta;
25 Agarwal, 2009; Gomes et al., 2018).

26 O estresse oxidativo pode afetar o desenvolvimento dos oócitos
27 durante a maturação *in vitro* e, o excesso da produção de EROs pelas células da
28 granulosa causa efeitos deletérios sobre a fecundação dos oócitos e o
29 desenvolvimento embrionário futuro (Bedaiwy et al., 2004). Devido à ausência de
30 sofisticados mecanismos de defesa e excessiva produção de EROs durante o cultivo
31 *in vitro* de gametas ou embriões, a suplementação do meio com substâncias
32 antioxidantes passa a ser crucial (Bedaiwy et al., 2004).

2.7.1 Suplementação do Meio de Cultivo *In vitro* com Antioxidantes

O cultivo *in vitro* resulta em maiores concentrações de oxigênio do que o ambiente *in vivo*, levando um aumento das EROs (Luvoni et al., 1996). Apesar da concentração de oxigênio normalmente usada nas estufas de cultivo *in vitro* ser de 20% (mesma concentração presente no ar atmosférico), esta é consideravelmente superior à encontrada na tuba uterina e no útero dos mamíferos (Fischer; Bavister, 1993). Sendo assim, a suplementação do meio de cultivo *in vitro* se torna essencial. Tanto o Ácido Ascórbico como o Ácido Alfa Lipóico são substâncias capazes de promover a diminuição das EROs presentes nas células tanto *in vivo* como *in vitro*.

O potencial reprodutivo dos animais é diretamente influenciado pelos danos causados pelo estresse oxidativo. Os resultados obtidos sobre os benefícios proporcionados pelos antioxidantes sobre o desenvolvimento folicular, são de extrema importância para o direcionamento de trabalhos futuros que viabilizem as técnicas reprodutivas economicamente viáveis (Andrade et al., 2010).

2.7.1.1 Ácido Ascórbico

O Ácido Ascórbico, também denominado vitamina C ou ascorbato, é uma vitamina hidrossolúvel que reduz α -tocoferol, peróxidos e as EROs em superóxido. Possui como uma de suas principais funções a ação antioxidante, reduzindo os níveis de radicais livres presentes nas células. Este antioxidante se acumula nos oócitos, células da granulosa, células luteais e nas células da teca interna. Adicionalmente, é capaz de reduzir os danos causados pelo estresse oxidativo, resultado do desequilíbrio da produção das EROs presente nas células, influenciando positivamente o processo de esteroidogênese (Thomas et al., 2001; Lutsenko et al., 2002). O Ácido Ascórbico também exerce ação benéfica em folículos ovarianos pré-antrais de camundongos, bovinos, equinos e caprinos (Murray et al., 2001; Thomas et al., 2001; Rossetto et al., 2009; Silva et al., 2011; Andrade et al., 2012; Gomes et al., 2015).

Em concentrações fisiológicas, o Ácido Ascórbico contribui para o crescimento folicular nos estágios iniciais de desenvolvimento, atua removendo os radicais livres e protegendo as células foliculares contra os danos causados pelas EROs (Carr; Frei, 1999). Como já descrito por Thomas et al. (2001), em bovinos, o

1 Ácido Ascórbico contribui na redução da apoptose de folículos ovarianos pré-antrais,
2 mantém a sobrevivência e promove o crescimento e ativação de folículos primordiais
3 caprinos (Rossetto et al., 2009). No entanto, a presença de altas concentrações de
4 Ácido Ascórbico pode inibir processos fisiológicos do ovário, culminando com uma
5 degeneração folicular (Murray et al., 2001), devido ao dano oxidativo ao DNA causado
6 pela presença de íons Fe^{2+} e Cu^{2+} , que reagem com peróxido de hidrogênio levando
7 a formação de radicais livres causando danos às células (Li; Schellhorn, 2007).

8

9 2.7.1.2 Ácido Alfa Lipóico

10

11 O Ácido Alfa Lipóico é um composto natural, cofator essencial em
12 complexos multienzimáticos, que catalisa a descarboxilação dos α -cetoácidos no ciclo
13 de Krebs (Silva et al., 2011). Este é um antioxidante conhecido pela sua ação em
14 diversos processos biológicos, atuando diretamente na eliminação das EROs e
15 quelação de metais (Packer; Witt; Tritschler, 1995).

16

17 Diversos benefícios já foram relatados com a suplementação do Ácido
18 Alfa Lipóico em diversas espécies, mas em quantidades excessivas, o Ácido Alfa
19 Lipóico pode ser prejudicial para as células foliculares. Talebi et al. (2012) observaram
20 que a suplementação de 500 μ M de Ácido Alfa Lipóico ocasionou um aumento na taxa
21 de degeneração de folículos ovarianos pré-antrais de ratas. Outros estudos também
22 relataram que uma exposição prolongada ao Ácido Alfa Lipóico resultou em um
23 aumento da peroxidação lipídica, danos mitocondriais e ainda uma inibição da síntese
24 de glicogênio, além de interromper ciclos celulares e provocar a morte celular (Moini;
Packer; Saris, 2002; Marsh et al., 2005; Wenzel; Nickel; Daniel, 2005; Cakatay, 2006).

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.

AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R. Oxidative stress and its implications in female infertility - a clinician's perspective. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 11, p. 641-650, 2005.

AGARWAL, A.; SALEH, R. A.; BEDAIWY, M. A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and Sterility**, v. 79, p. 829-843, 2003.

AGUIAR, F. L. N.; GASTAL, G. D. A.; ISHAK, G. M.; GASTAL, M. O.; TEIXEIRA, D. I. A.; FEUGANG, J. M.; FIGUEIREDO, J. R.; GASTAL, E. L. Effects of FSH addition to an enriched medium containing insulin and EGF after long-term culture on functionality of equine ovarian biopsy tissue. **Theriogenology**, v. 99, p. 124-133, 2017.

ANDRADE, E. R.; MELO-STERZA, F. A.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, p. 79-85, 2010.

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, p. 1-14, 2014.

ARUNAKUMARI, G.; SHANMUGASUNDARAM, N.; RAO, V. H. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. **Theriogenology**, v. 74, p. 884-894, 2010.

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.

BECKERS, J. F.; DRION, P. V.; FIGUEIREDO, J. R.; GOFFIN, L.; PIROTTIN, D.; ECTORS, F. J. The ovarian follicle in cow: *in vivo* growth and *in vitro* culture. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 31, p. 543-548, 1996.

BEDAIWY, M. A.; FALCONE, T.; MOHAMED, M. S.; ALEEM, A. A.; SHARMA, R. K.; WORLEY, S. E.; THORNTON, J. M. S.; AGARWAL, A. Differential growth of human embryos *in vitro*: role of reactive oxygen species. **Fertility and Sterility**, v. 82, p. 593-600, 2004.

BESSA, I. R.; DODE, M. A. N. Ovogênese e modificações epigenéticas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 37, 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 & Fertility**, v. 38, p. 87–98, 1989.

BRITO, I. R.; SILVA, C. M. G.; DUARTE, A. B. G.; LIMA, I. M. T.; RODRIGUES, G. Q.; ROSSETTO, R.; SALES, A. D.; LOBO, C. H.; BERNUCI, M. P.; ROSA-E-SILVA, A. C. J. S.; CAMPELLO, C. C.; XU, M.; FIGUEIREDO, J. R. Alginate hydrogel matrix stiffness influences the *in vitro* development of caprine preantral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v. 81, p. 636-645, 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.

BYSKOV, A. G. S. Cell kinetics studies of follicular atresia in the mouse ovary. **Journal of Reproduction & Fertility**, v. 37, p. 277-285, 1974.

CAKATAY, U. Pro-oxidant actions of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. **Medical hypotheses**, v. 66, p. 110-117, 2006.

CAMPOS-JUNIOR, P. H. A.; ASSUNCAO, C. M., CARVALHO, B. C., BATISTA, R. I. T. P.; GARCIA, R. M. G.; VIANA, J. H. M. Follicular populations, recruitment and atresia in the ovaries of different strains of mice. **Reproductive Biology**, v. 12, p. 41-55, 2012.

CARR, A.; FREI, B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? **The FASEB Journal**, v. 13, p. 1007-1024, 1999.

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

COLTRI, P. Sistema Reprodutor Feminino: Ovário (região cortical e medular). Disponível em: <http://www.coltri.bio.br/repfem_17.pdf> Acesso em: 21 de outubro de 2020.

COMBELLES, C. M.; GUPTA, S.; AGARWAL, A. Could oxidative stress influence the *in vitro* maturation of oocytes? **Reproductive BioMedicine Online**, v. 18, p. 864-880, 2009.

DANIEL, S. A. J.; ARMSTRONG, D. T.; GORELANGTON, R. E. Growth and development of rat oocytes *in vitro*. **Gamete Research**, v. 24, p. 109-121, 1989.

DE SÁ, N. A. R.; FERREIRA, A. C. A.; SOUSA, F. G. C.; DUARTE, A. B. G.; PAES, V. M. CADENAS, J.; ANJOS, J. C.; FERNANDES, C. C. L.; ROSSETO, R.; CIBIN, F. W. S.; ALVES, B. G.; RODRIGUES, A. P. R.; RONDINA, D.; GASTAL, E. L.; FIGUEIREDO J. R. First pregnancy after *in vitro* culture of early antral follicles in goats: Positive effects of anethole on follicle development and steroidogenesis. **Molecular Reproduction and Development**, v. 87, p. 1-12, 2020.

DRIANCOURT, M. A.; WEBB, R.; FRY, R. C. Does follicular dominance occur in ewe? **Journal of Reproduction & Fertility**, v. 93, p. 63-70, 1991.

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

ERICKSON, G. F. An analysis of follicle development and ovum maturation. **Seminars in Reproduction Endocrinology**, v. 4, p. 233-254, 1986.

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.

EVANS, T. J.; CONSTANTINESCU, G. M.; GANJAN, V. K. Clinical reproductive anatomy and physiology of the mare. In: YOUNGQUIST, R. S.; THRELFALL, W. R. **Current Therapy in Large Animal Theriogenology**, p. 47-67, 2007.

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, 1997.

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, p. 192–195, 2011.

FIGUEIREDO, J. R.; CELESTINO, J. J. H.; RODRIGUES, A. P. R.; SILVA, J. R. V. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção *in vitro* de embriões em larga escala. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 143-152, 2007.

FIGUEIREDO, J. R.; LIMA, L. F.; SILVA, J. R. V.; SANTOS, R. R. Control of growth and development of preantral follicle: insights from *in vitro* culture. **Animal Reproduction**, v. 35, 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.

FISCHER, B.; BAVISTER, B. D. Oxygen tension in the oviduct and uterus of hesus monkeys, hamsters and rabbits. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, p. 673-679, 1993.

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

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.

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.

GOMES, R. G.; SILVA, C. B.; GONZALEZ, 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.

GORDON, I. Prenatal development of the bovine ovary. In: GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos**. Raven Press, 1994, p. 43-49.

GOTO, Y.; NODA, Y.; NARIMOTO, K.; UMAOKA, Y.; MORI, T. Oxidative stress on mouse embryo development *in vitro*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 13, p. 47-53, 1992.

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

GUPTA, P. S. P.; RAMESH, H. S.; MANJUNATHA, B. M. Production of buffalo embryos using oocytes from *in vitro* grown preantral follicles. **Zygote**, v. 16, p. 57–63, 2008.

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.

HATZIRODOS, N.; HUMMITZSCH, K.; IRVING-RODGERS, H. F.; HARLAND, M. L.; MORRIS, S. E.; RODGERS, R. J. Transcriptome profiling of granulosa cells from bovine ovarian follicles during atresia. **BMC Genomics**, v.15, p. 1-26, 2014.

HIRAO, Y.; NAGAI, T.; KUBO, M.; MIYANO, T.; MIYAKE, M.; KATO, S. *In vitro* growth and maturation of pig oocytes. **Journal Reproduction & Fertility**, v. 100, p. 333-339, 1994.

HIRSHFIELD, A. N. Development of follicles in the mammalian ovary. **International Review of Cytology**, v. 124, p. 43–101, 1991.

HUANMIN, Z.; YONG, Z. *In vitro* development of caprine ovarian preantral follicles. **Theriogenology**, v. 54, p. 641-650, 2000.

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. **Veterinary Quarterly**, v. 16, p. 78-80, 1994.

HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLENSSEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 23-32, 1997.

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.

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

LI, Y.; SCHELLHORN, H. E. New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. **The Journal of Nutrition**, v. 137, p. 2171-2184, 2007.

LIMA, G. L.; SANTOS, E. A. A. Aplicação das biotécnicas de MOIFOPA, transgênese e clonagem na reprodução de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 4, p. 36–42, 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. New York: Nova Science Publisher's, 2015, p. 272–292.

LUCCI, C. M.; AMORIM, C. A.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R.; BÃO, 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.

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

LUTSENKO, E. A.; CÁRCAMO, J. M.; GOLDE, D. W. Vitamin C prevents DNA mutation induced by oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 19, p. 16895-16899, 2002.

LUVONI, G. C.; KESKINTEPE, L.; BRACKETT, B. G. Improvement in bovine embryo production *in vitro* by glutathione-containing culture media. **Molecular Reproduction & Development**, v. 43, p. 437-443, 1996.

MAGALHÃES, D. M.; DUARTE, A. B.; ARAÚJO, V. R.; BRITO, I. R.; SOARES, T. G.; LIMA, I. M.; LOPES, C. A.; CAMPELLO, C. C.; RODRIGUES, A. P.; FIGUEIREDO, J. R. *In vitro* production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. **Theriogenology**, v. 75, p. 182-188, 2010.

MARSH, S. A.; PAT, B. K.; GOBE, G. C.; COOMBES, J. S. Evidence for a non-antioxidant, dose-dependent role of alpha-lipoic acid in caspase-3 and ERK₂ activation in endothelial cells. **Apoptosis**, v. 10, p. 657-665, 2005.

MATOS, M. H. T.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Técnicas para avaliação da qualidade de folículos ovarianos pré-antrais cultivados *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 433–442, 2007.

MATSUDA, F.; INOUE, N.; MANABE, N.; OHKURA, S. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: Regulation by survival and death of granulosa cells, review. **Journal of Reproduction and Development**, v. 58, p. 44-50, 2012.

McCAFFERY, F. H.; LEASK, R.; RILEY, S. C.; TELFER, E. E. Culture of bovine preantral follicles in a serum-free system: Markers for assessment of growth and development. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 267-273, 2000.

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

MOINI, H.; PACKER, L.; SARIS, N. E. Antioxidant and prooxidant activities of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 182, p. 84-90, 2002.

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. Amesterdã: 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 and hourglass. **Developmental Biology**, v. 213, p. 1–17, 1999.

MURRAY, A. A.; MOLINEK, M. D.; BAKER, S. J.; KOJIMA, F. N.; SMITH, M. F.; HILLIER, S. G.; SPEARS, N. Role of ascorbic acid in promoting follicle integrity and survival in intact mouse ovarian follicles *in vitro*. **Reproduction**, v. 121, n. 1, p. 89-96, 2001.

NASCIMENTO, A. A.; PINHEIRO, N. L.; SALES, A.; VIANA, J. H. M. Correlação morfométrica do ovário de fêmeas bovinas em diferentes estádios reprodutivos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, p. 126-132, 2003.

NÓBREGA JUNIOR, J. E.; GONÇALVES, P. B. D.; PEREIRA, G. R.; FIGUEIREDO, J. R. Participação da esfingosina 1-fosfato e do fator inibidor de leucemia no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais de cabras. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, p. 75-79, 2014.

PACKER, L.; WITT, E. H.; TRITSCHLER, H. J. Alpha-Lipoic acid as a biological antioxidante. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 19, p. 227-250, 1995.

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, 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 folículo-estimulante recombinante sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos e ovinos isolados. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 4, 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 folículos pré-antrais. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 5, p. 15–23, 2011.

ROSSETTO, R.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T.; SARAIVA, M. V. A.; MARTINS, F. S.; FAUSTINO, L. R.; ARAÚJO, V. R.; SILVA, C. M. G.; BÁO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R.; BLUME, H. Interaction between ascorbic acid and follicle stimulating hormone maintains follicular viability after long-term *in vitro* culture of caprine preantral follicles. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 37, p. 112-123, 2009.

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.; TREACY, B. J. Isolation and long-term culture of human preantral follicles. **Fertility and Sterility**, v. 59, p. 783-790, 1993.

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

SADEU, J. C.; 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, p.1130–1141, 2006.

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

SARAIVA, M. V. A.; ROSSETTO, R.; BRITO, I. R.; CELESTINO, J. J. H.; SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; ALMEIDA, A. P.; BRUNO, J. B.; MAGALHÃES D. M.; MATOS, M. H. T.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Dynamic medium produces caprine embryo from preantral follicles grown *in vitro*. **Reproductive Sciences**, v. 12, p. 1135-1143, 2010.

SAUMANDE, J. La folliculogénèse chez les ruminants. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, v. 167, p. 205–218, 1991.

SCARAMUZZI, R. J.; BAIRD, D. T.; CAMPBELL, B. K.; DRIANCOURT, M. A.; DUPONT, J.; FORTUNE, J. E.; GILCHRIST, R. B.; MARTIN, G. B.; MCNATTY, K. P.; MCNEILLY, A. S.; MONGET, P.; MONNIAUX, D.; VIÑOLES, C.; WEBB, R. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, p. 444-467, 2011.

SHAW, J. M.; ORANRATNACHAI, A.; TROUNSON, A. O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 53, p. 59–72, 2000.

SILVA, A. W. B.; RIBEIRO, R. P.; MENEZES, V. G.; BARBERINO, R. S.; PASSOS, J. R. S.; DAUC, A. M. P.; COSTA, J. J. N.; MELO, L. R. F.; BEZERRA, F. T. G.; DONATO, M. A. M.; PEIXOTO, C. A.; MATOS, M. H. T.; GONÇALVES, P. B. D.; VAN DEN HURKE, R.; SILVA, J. R. V. Expression of TNF- α system members in bovine ovarian follicles and the effects of TNF- α or dexamethasone on preantral follicle survival, development and ultrastructure *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v.182, p. 56-68, 2017.

SILVA, G. M.; ARAÚJO, V. R.; DUARTE, A. B. G.; LOPES, C. A. P.; FIGUEIREDO, J. R. Papel dos antioxidantes no cultivo *in vitro* de células ovarianas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, p. 315-326, 2011.

SILVA, G. M.; ROSSETTO, R.; CHAVES, R. N.; DUARTE, A. B.; ARAÚJO, V. R.; FELTRIN, C.; BERNUCI, M. P.; ANSELMO-FRANCI, J.; XU, M.; WOODRUFF, T. K.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. *In vitro* development of secondary follicles from pre-pubertal and adult goats cultured in two-dimensional or three-dimensional systems. **Zygote**, v. 23, p. 475-484, 2015.

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

SILVA, J. R. V.; FERREIRA, M. A. L.; COSTA, S. H. F.; SANTOS, R. R.; CARVALHO, F. C. A.; RODRIGUES, A. P. R.; LUCCI, C. M.; BÁO, S.N.; FIGUEIREDO, J. R. Degeneration rate of preantral follicles in the ovaries of goats. **Small Ruminant Research**, v. 43, p. 203-209, 2002.

SILVA, J. R. V.; 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.

SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; MATOS, M. H. T.; SANTOS, R. R.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; 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-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* females. **Theriogenology**, v. 76, p. 1051-1057, 2011.

TALEBI, A.; ZAVAREH, S.; KASHANI, M. H.; LASHGARBLUKI, T.; KARIMI, I. The effect of alpha lipoic acid on the developmental competence of mouse isolated preantral follicles. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 29, p. 175-183, 2012.

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.

THOMAS, F. H.; LEASK, R.; SRSEN, V.; RILEY, S. C.; SPEARS, N.; TELFER, E. E. Effect of ascorbic acid on health and morphology of bovine preantral follicles during long-term culture. **Reproduction**, v. 122, p. 487-495, 2001.

TILLY J. L. Apoptosis and ovarian function. **Reviews of Reproduction**, v. 1, p. 162-172, 1996.

VIANA, J. H. M.; FIGUEIREDO, A. C. S.; GONÇALVES, R. L. R.; SIQUEIRA, L. G. B. A historical perspective of embryo-related technologies in South America. **Animal Reproduction**, v. 15, p. 963–970, 2018.

WANG, X.; FALCONE, T.; ATTARAN, M.; GOLDBERG, J. M.; AGARWAL, A.; SHARMA, R. K. Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. **Fertility and Sterility**, v. 78, p. 1272-1277, 2002.

WENZEL, U.; NICKEL, A.; DANIEL, H. Alpha-Lipoic acid induces apoptosis in human colon cancer cells by increasing mitochondrial respiration with a concomitant O₂-*⁻ generation. **Apoptosis**, v. 10, p. 359-368, 2005.

WU, J.; CARREL, D. T.; WILCOX, A. L. Development of *in vitro*-matured oocytes from porcine preantral follicles following intracytoplasmic sperm injection. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 1579–1585, 2001.

1 3 HIPÓTESE

2

3 A adição de Ácido Ascórbico ou Ácido Alfa Lipóico no meio de cultivo *in*
4 *vitro* de folículos ovarianos pré-antrais bovinos promove o adequado
5 desenvolvimento dos folículos, mantém a integridade folicular e minimiza o
6 efeito negativo das espécies reativas de oxigênio.

1 **4. OBJETIVOS**

2

3 4.1 OBJETIVOS GERAL

4

5 Avaliar o efeito da suplementação com Ácido Ascórbico e Ácido
6 Alfa Lipóico no desenvolvimento e na manutenção da integridade folicular e na
7 redução do estresse oxidativo em cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-
8 antrais de fêmeas *Bos taurus indicus*.

9

10 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

11

12 - Avaliar o efeito das diferentes concentrações de Ácido Ascórbico (50
13 e 100 ng/mL) e Ácido Alfa Lipóico (50, 100 e 250 ng/mL), aos 6 e 12 dias de cultivo,
14 no desenvolvimento e na integridade folicular avaliado por Histologia Clássica;

15

16 - Identificar a capacidade antioxidante do Ácido Ascórbico e Ácido Alfa
17 Lipóico ao longo do período de cultivo *in vitro* através das análises de FRAP, TBARS
18 e NBT.

ARTIGO A

Desenvolvimento folicular, integridade morfológica e potencial antioxidante de folículos ovarianos pré-antrais de fêmeas *Bos taurus indicus* cultivados *in vitro* com suplementação de Ácido Ascórbico

Follicular development, morphological integrity, and antioxidant potential of preantral ovarian follicles from *Bos taurus indicus* females cultured *in vitro* with Ascorbic Acid

Larissa Zamparone Bergamo^{1}; Denis Vinícius Bonato¹; Camila Bizarro da Silva^{1,2}; Francieli Gesleine Capote Bonato¹; Tamires Korchovei Sanches¹; Marcela Bortoletto Cerezetti¹; Ana Carolina Rossaneis³; Waldiceu Aparecido Verri Junior³; Fábio Morotti¹; Marcelo Marcondes Seneda¹*

¹Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal, REPROA; Departamento de Clínicas Veterinárias, DCV; Centro de Ciências Agrárias, CCA; Universidade Estadual de Londrina, UEL; Londrina, Paraná, Brasil.

²Laboratório de Reprodução Animal, Escola de Ciências da Vida; Pontifícia Universidade Católica do Paraná, PUCPR; Toledo, Paraná, Brasil.

³Departamento de Ciências Patológicas; Centro de Ciências Biológicas, CCB; Universidade Estadual de Londrina, UEL; Londrina, Paraná, Brasil.

*Autor para correspondência:

Larissa Zamparone Bergamo

E-mail: larissabergamo1@hotmail.com

1 RESUMO

2

3 O objetivo deste trabalho foi avaliar o desenvolvimento folicular, a integridade
4 morfológica e o potencial antioxidante de folículos ovarianos pré-antrais de fêmeas
5 *Bos taurus indicus* cultivados *in vitro* com suplementação de Ácido Ascórbico. Foram
6 coletados ovários (n=20) provenientes de abatedouro, de fêmeas *Bos taurus indicus*,
7 e os mesmos foram fragmentados. Um fragmento escolhido aleatoriamente, de cada
8 par de ovário, foi fixado em fixador histológico Bouin (controle não cultivado; D0).
9 Esses fragmentos foram destinados para análise da morfologia e do crescimento
10 folicular (histologia clássica). Um fragmento escolhido aleatoriamente, de cada par de
11 ovário (n=5), foi congelado a -80° C (controle não cultivado; D0), para análise do
12 estresse oxidativo (TBARS, NBT e FRAP). Os demais fragmentos (n=60) foram
13 cultivados *in vitro* por 6 (D6) ou 12 (D12) dias, em somente Meio Essencial Mínimo
14 (MEM⁺) ou em MEM⁺ suplementado com 50 ou 100 ng/mL de Ácido Ascórbico, com
15 uma matriz extracelular de gel de agarose, em estufa a 38,5° C. A cada dois dias,
16 realizou-se a troca total do meio de cultivo. A suplementação com 100 ng/mL de Ácido
17 Ascórbico promoveu o desenvolvimento folicular após 6 dias de cultivo *in vitro*
18 (33,56%; 49/146; p < 0,0001). Na comparação entre tratamentos, a concentração de
19 100 ng/mL se mostrou mais eficiente em manter a integridade folicular aos 6 dias de
20 cultivo (35,33%; 53/150; p < 0,0001) em relação aos demais tratamentos. Após o
21 período de 6 dias de cultivo *in vitro*, a adição de 100 ng/mL de Ácido Ascórbico ao
22 meio de cultivo (10,72 ± 3,41 nmol de TROLOX Eq/mg de proteína) resultou em
23 atividade antioxidante semelhante, avaliada pelo ensaio de FRAP, quando comparada
24 ao controle não cultivado (21,27 ± 2,86 nmol de TROLOX Eq/mg de proteína; p ≤ 0,05).
25 Adicionalmente, não foi observada diferença na produção de radicais livres, pelo
26 ensaio NBT, e na degradação oxidativa dos lipídeos, pelo ensaio de TBARS, entre os
27 tratamentos comparados ao tratamento controle não cultivado (D0; p > 0,05). A
28 suplementação com Ácido Ascórbico do meio de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos
29 pré-antrais de fêmeas bovinas promoveu o desenvolvimento folicular e a concentração
30 de 100 ng/mL foi a mais eficiente em manter a integridade folicular, bem como os
31 níveis de espécies reativas de oxigênio estáveis, após 6 dias de cultivo.

32

33 **Palavras-chave:** cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais; estresse oxidativo; FRAP:
34 NBT; TBARS.

1 ABSTRACT

2

3 The aim of this work was to evaluate follicular development, morphological integrity
4 and antioxidant potential of preantral ovarian follicles from *Bos taurus indicus* females
5 grown *in vitro* with Ascorbic Acid supplementation. Ovaries (n=20) were collected from
6 *Bos taurus indicus* females, and they were fragmented. A randomly obtained fragment
7 from each pair of ovaries was fixed in a Bouin fixative (non-cultivated control; D0).
8 These fragments were intended for analysis of morphology and follicular growth
9 (classical histology). A randomly obtained fragment from each pair of ovaries (n=5)
10 was frozen at -80° C (non-cultivated control; D0), for analysis of oxidative stress
11 (TBARS, NBT and FRAP). The other fragments (n = 60) were cultured *in vitro* for 6
12 (D6) or 12 (D12) days, in Minimum Essential Medium (MEM⁺) or in MEM⁺
13 supplemented with 50 or 100 ng/mL of Ascorbic Acid, with an extracellular matrix of
14 agarose gel, in an oven at 38.5° C. Every two days, 100% of the culture medium was
15 replaced. Supplementation with 100 ng/mL of Ascorbic Acid promoted follicular
16 development after 6 days of *in vitro* culture (33.56%; 49/146; P < 0.0001). When
17 comparing treatments, the concentration of 100 ng/mL was more efficient in
18 maintaining follicular integrity after 6 days of culture (35.33%; 53/150; P < 0.0001)
19 compared to the other treatments. After a period of 6 days of *in vitro* culture, the
20 addition of 100 ng/mL of Ascorbic Acid to the culture medium (10.72 ± 3.41 nmol of
21 TROLOX Eq/mg of protein) resulted in similar antioxidant activity, assessed by FRAP
22 assay, when compared to the uncultivated control (21.27 ± 2.86 nmol of TROLOX
23 Eq/mg protein; P ≤ 0.05). In addition, no significant difference was observed in the
24 production of free radicals, by the NBT test, and in the oxidative degradation of lipids,
25 by the TBARS test, between treatments when compared with non-cultivated control
26 (D0; P > 0.05). The addition of Ascorbic Acid in the *in vitro* culture medium of preantral
27 ovarian follicles from bovine females promoted follicular development and the
28 concentration of 100 ng/mL was the most efficient in maintaining follicular integrity, as
29 well as the levels of reactive oxygen species stable, after 6 days of cultivation.

30

31 **Keywords:** *in vitro* culture of preantral follicles; oxidative stress; FRAP; NBT; TBARS.

1 INTRODUÇÃO

2

3

4 Dentre as principais biotécnicas estudadas, a manipulação de oócitos
5 inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA) ganha destaque devido ao
6 crescente interesse em minimizar os efeitos deletérios da atresia folicular e do
7 estresse oxidativo. Busca-se, assim, desenvolver um sistema capaz de manter o
8 crescimento folicular e a integridade dos folículos cultivados *in vitro*, evitando a grande
9 perda folicular que ocorre *in vivo*, que é de aproximadamente 99,9% dos folículos
(Matsuda et al., 2012; Araújo et al., 2014; De Sá et al., 2020).

10

11 A MOIFOPA vem auxiliando a compreensão de eventos envolvidos
12 na fase inicial de formação e crescimento dos folículos presentes nos ovários com o
13 objetivo de desenvolver um ambiente favorável capaz de proporcionar o crescimento
14 ideal dos folículos ovarianos pré-antrais sob condições *in vitro*. Visando avaliar os
15 meios de cultivo, fatores de crescimento, antioxidantes e hormônios que influenciam
16 o desenvolvimento folicular a utilização de folículos ovarianos pré-antrais,
17 principalmente de bovinos, equinos, ovinos, caprinos e camundongos, se tornou um
18 recurso importante para estudos relacionados com a reprodução humana, a fim de
19 auxiliar em tratamentos de infertilidade e/ou doenças reprodutivas (Araújo et al., 2014;
20 Gomes et al., 2015; Frydman; Grynberg, 2016; Silva et al., 2017; Bizarro-Silva et al.,
2018; Gomes et al., 2018; Max et al., 2018; De Sá et al., 2020).

21

22 Outro fator bastante importante no desenvolvimento de um sistema
23 ideal de cultivo *in vitro* é a liberação excessiva de espécies reativas de oxigênio
24 (EROs), resultando no estresse oxidativo (Andrade et al., 2010; Gomes et al., 2015;
25 2018; De Sá et al., 2020). O resultado desse estresse oxidativo pode ocasionar danos
26 celulares irreversíveis nas células foliculares e ainda provocar efeitos deletérios no
sistema reprodutor feminino (Andrade et al., 2010).

27

28 Em estudos realizados, o Ácido Ascórbico proporcionou melhora da
29 viabilidade e promoveu a ativação dos folículos primordiais e dos folículos em
30 crescimento de diversas espécies, cultivados *in vitro* (Melo et al., 2011; Silva et al.,
31 2011; Andrade et al., 2012). Este antioxidante também atua diretamente na eliminação
32 de EROs e quelação de metais e ainda, na prevenção de mutações de DNA que são
33 induzidas por oxidação e na proteção contra a peroxidação lipídica (Barja et al., 1994;
34 Packer; Witt; Tritschler, 1995; Lutsenko; Cárcamo; Golde, 2002). Entretanto, não há
relatos de estudos utilizando a suplementação de Ácido Ascórbico com uma matriz

1 extracelular de gel de agarose no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais de
2 fêmeas bovinas para avaliar o desenvolvimento folicular, a integridade morfológica e
3 o potencial antioxidante dos folículos.

4 Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar o
5 desenvolvimento folicular, a integridade morfológica e o potencial antioxidante de
6 folículos ovarianos pré-antrais de fêmeas *Bos taurus indicus* cultivados *in vitro* com
7 suplementação de Ácido Ascórbico.

8

9 MATERIAL E MÉTODOS

10

11 A menos que mencionado de outra forma no texto, todos os produtos
12 químicos utilizados neste experimento foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis,
13 MO, EUA). Os ovários utilizados neste experimento foram provenientes de animais de
14 abatedouro, que foram destinados ao abate comercial seguindo todas as normas
15 estabelecidas pela Lei nº 1.283 de 18 de dezembro de 1950 que dispõe sobre a
16 inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal.

17

18 *Obtenção e Processamento dos Ovários*

19

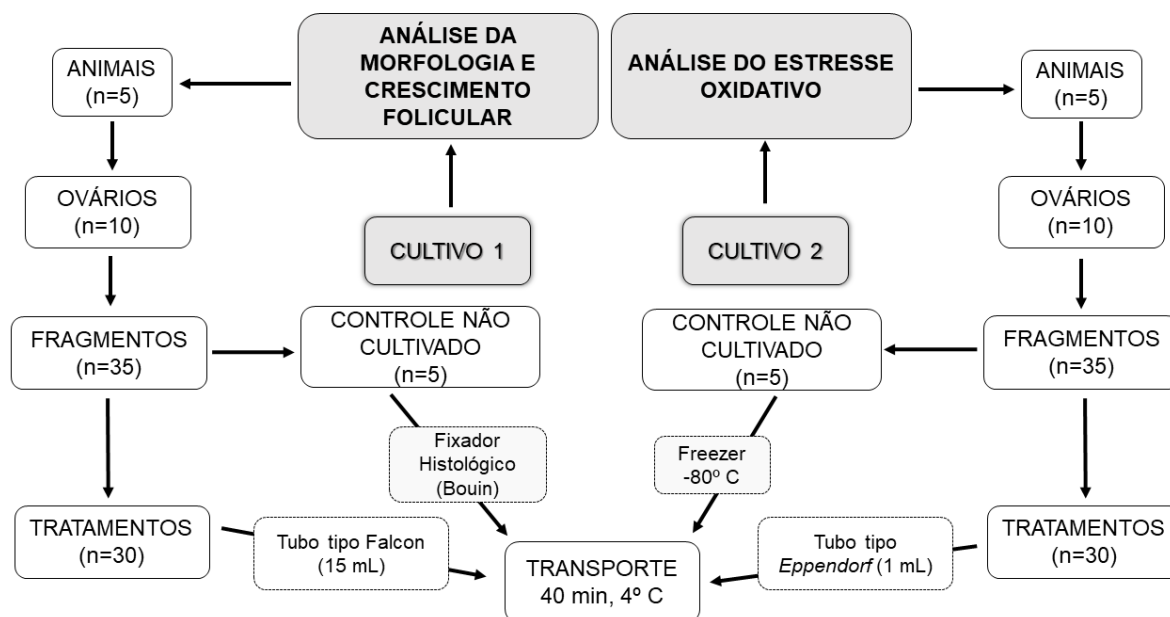
20 Para a realização deste estudo foram coletados, de abatedouro
21 distante 48 Km (40 minutos) do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal
22 (ReproA – UEL), ovários (n=20) de fêmeas bovinas cíclicas (n=10), *Bos taurus indicus*,
23 da raça Nelore, com escore de condição corporal (ECC) entre 3 e 4 (escala de 0 a 5;
24 Ayres et al., 2009). Para a análise da morfologia e do desenvolvimento folicular
25 (histologia clássica) foram destinados dez ovários, assim como para as análises do
26 estresse oxidativo (TBARS, NBT e FRAP). Todos os processos envolvendo a
27 fragmentação ovariana foram realizados imediatamente após o abate, antes do
28 transporte para o laboratório.

29

30 Sequencialmente após a coleta, os tecidos adjacentes envolvendo os
31 ovários foram retirados com o auxílio de uma pinça e bisturi estéreis, com o objetivo
32 de melhor visualizar a região cortical. Os pares de ovários foram individualmente
33 lavados em três banhos de solução fisiológica (0,9%; JP Farma, São Paulo, Brasil) e
34 dois banhos de álcool 70%. Posteriormente, procedeu-se a fragmentação dos ovários
com o auxílio de um *punch* dermatológico (6 mm; Kolplast, São Paulo, Brasil), estéril

1 e descartável, originando fragmentos de aproximadamente 9 mm². Cada par de ovário
2 foi fragmentado em sete fragmentos retirados de regiões aleatórias do córtex
3 ovariano, totalizando 70 fragmentos dos dez pares de ovários. Ainda no abatedouro,
4 os fragmentos foram lavados em três banhos de solução fisiológica (0,9%; JP Farma,
5 São Paulo, Brasil) e dois banhos de Meio Essencial Mínimo (MEM⁺; Gibco BRL,
6 Rockville, MD, USA; osmolaridade 300 mOsm/L, pH 7,2), contidos em uma placa de
7 24 poços. As soluções de lavagem eram completamente substituídas a cada banho
8 dos fragmentos de cada par de ovário. Um fragmento de cada par de ovário foi
9 escolhido aleatoriamente para compor o controle não cultivado (dia 0; D0) das
10 análises. Para isso, cinco fragmentos destinados à histologia clássica, foram
11 acondicionados individualmente em tubos do tipo Falcon (15 mL) contendo fixador
12 histológico Bouin, mantidos por 24 horas até o processamento histológico e cinco
13 fragmentos foram acondicionados individualmente em microtubos do tipo *Eppendorf*
14 (1 mL), mantidos em recipiente térmico (4 ° C), que posteriormente foram
15 armazenados em freezer –80° C até a realização da análise do estresse oxidativo.

16 Os fragmentos (n=30) destinados à análise da morfologia e
17 desenvolvimento folicular (histologia clássica) foram acondicionados em tubos do tipo
18 Falcon (15 mL) contendo MEM⁺ e antibióticos (100 µL de penicilina e 100 µL de
19 estreptomicina). Os fragmentos (n=30) destinados à análise do estresse oxidativo,
20 foram acondicionados em tubos do tipo *Eppendorf* (1 mL). Todos os fragmentos foram
21 transportados à temperatura de 4° C até a chegada no laboratório (Figura 1).



1
2 **Figura 1** – Esquema demonstrativo da obtenção e processamento dos ovários no
3 abatedouro.

4

5 *Cultivo In vitro de Folículos Ovarianos Pré-Antrais*

6

7 Após a chegada ao laboratório, os fragmentos (n=60) do córtex
8 ovariano foram acomodados em placas de 24 poços, devidamente identificados,
9 contendo somente Meio Essencial Mínimo (MEM⁺) ou MEM⁺ suplementado com 50
10 ou 100 ng/mL de Ácido Ascórbico, sobre uma matriz extracelular de gel de agarose
11 (Agarose Molecular Biology Grade; Kasvi, Brasil), e cultivados por 6 ou 12 dias em
12 estufa a 38,5° C, atmosfera de 5% de CO₂ com ar e umidade saturada (Figura 2).

13 Para o preparo da matriz extracelular de gel de agarose utilizou-se 3
14 g de agarose em pó (Agarose Molecular Biology Grade; Kasvi, Brasil) em 200 mL de
15 água destilada para a obtenção de uma solução na concentração de 1,5% de agarose.
16 Após a completa diluição, a solução foi submetida à esterilização em autoclave por 15
17 minutos. Sequencialmente, a solução foi acondicionada em placa do tipo Petri de vidro
18 estéril, para a solidificação do gel. Ao obter estrutura gelatinosa, a placa foi mantida
19 em estufa de 37° C por 24 horas para comprovar a esterilidade. Seguidamente, o gel
20 foi fragmentado em fragmentos de aproximadamente 1 cm³ (Silva et al., 2017),
21 estabilizado e hidratado com MEM⁺ durante 24 horas e cada fragmento foi
22 acondicionado na placa de 24 poços.

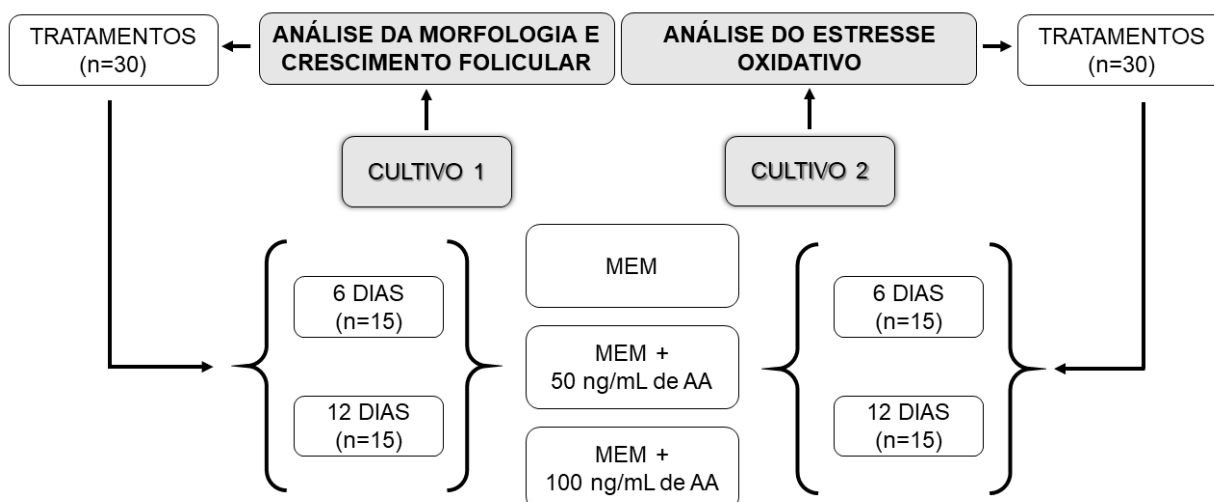


Figura 2 - Esquema demonstrativo da distribuição dos grupos para os cultivos *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais, durante 6 ou 12 dias, para análise da morfologia e do crescimento folicular e para análise do estresse oxidativo, com diferentes concentrações de Ácido Ascórbico (AA).

O MEM⁺ foi suplementado com ITS (6,25 mg/mL de insulina, 6,25 mg/mL de transferrina e 6,25 mg/mL de selênio), 0,23 mM de piruvato, 2 mM glutamina, 2 mM de 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. A cada dois dias, o meio de cultivo foi totalmente substituído por meio novo. O período de cultivo utilizado foi baseado em estudos previamente realizados com outras espécies (Gomes et al., 2015; Figueiredo et al., 2018; Gomes et al., 2018; De Sá et al., 2020). Os fragmentos foram acondicionados sobre gel de agarose 1,5% (Agarose Molecular Biology Grade; Kasvi, Brasil).

Análise da Morfologia e do Crescimento Folicular

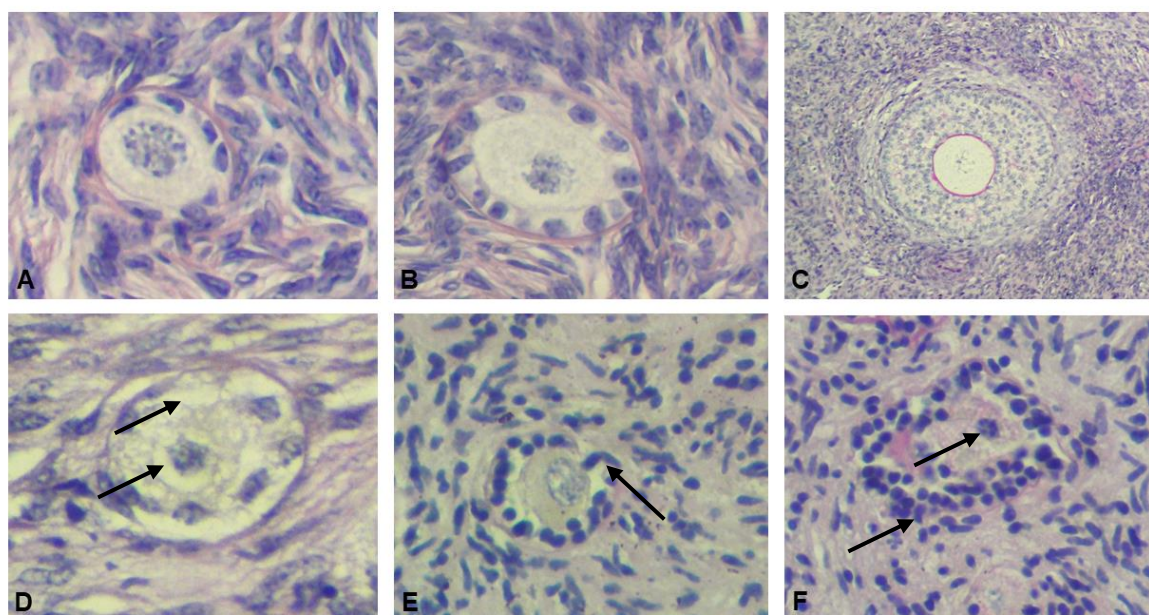
Os folículos ovarianos pré-antrais, cultivados *in vitro* por 6 ou 12 dias, foram classificados de acordo com sua fase de desenvolvimento, em folículos primordiais (contendo uma camada de células da granulosa de formato achatado ao redor do oócito) ou folículos em desenvolvimento, sendo considerado folículos primários aqueles que apresentavam uma única camada de células da granulosa de formato cuboide envolvendo o oócito; ou folículos secundários aqueles folículos que apresentavam duas ou mais camadas de células da granulosa de formato cuboide.

1 Para avaliar o crescimento folicular, foi realizada a quantificação dos folículos nas
2 diferentes fases do desenvolvimento (primordiais, primários e secundários) no
3 tratamento controle não cultivado e após o cultivo *in vitro* por 6 ou 12 dias, nos
4 diferentes tratamentos.

5 Os folículos também foram classificados de acordo com sua
6 morfologia em folículos íntegros, quando os oócitos se apresentaram com os núcleos
7 não picnóticos e cercados por células da granulosa organizadas em camadas; ou
8 folículos degenerados, quando os oócitos se encontraram retraídos com os núcleos
9 picnóticos, presença de vacúolos citoplasmáticos e cercados por células da granulosa
10 dispostas de maneira desorganizadas (Figura 3; Búfalo et al., 2016).

11 Os folículos foram avaliados por tratamentos e tempo de cultivo. As
12 porcentagens de folículos primordiais, primários e secundários foram calculados após
13 0, 6 e 12 dias de cultivo. Para evitar a recontagem, os folículos ovarianos pré-antrais
14 foram contados apenas na secção onde os núcleos dos oócitos foram observados.

15



16

17 **Figura 3** - Ilustração histológica da morfologia dos folículos ovarianos pré-antrais de
18 fêmeas *Bos taurus indicus* corados com Ácido Periódico de Schiff (PAS) e
19 Hematoxilina. (A) Folículo primordial íntegro; (B) Folículo primário íntegro; (C) Folículo
20 secundário íntegro; (D) Folículo primordial degenerado (oócito retraído e presença
21 de vacúolos citoplasmáticos - setas); (E) Folículo primário degenerado (células da
22 granulosa desorganizadas - seta); (F) Folículo secundário degenerado (oócito retraído
23 e células da granulosa desorganizadas - setas).

1 Após o período de cultivo, os fragmentos (n=30), foram fixados em
2 Bouin durante 24 horas e depois mantidos em álcool 70%. Após isso, os fragmentos
3 foram desidratados em concentrações crescentes de álcool, clarificados e
4 diafanizados em xilol, embebidos e incluídos em blocos de parafina para realização
5 dos cortes histológicos.

6 Cada bloco foi seccionado individualmente a 5 µm de espessura com
7 intervalo de 10 secções de tecido ovariano, em micrótomo rotativo (Leica®, Wetzlar-
8 Alemanha), para montagem de lâminas histológicas. Antes da coloração, o excesso
9 de parafina contido nas lâminas foi retirado com xilol e, em seguida, as lâminas foram
10 reidratadas com álcool 70%. As lâminas foram coradas com Ácido Periódico de Schiff
11 (PAS) e Hematoxilina. A leitura das lâminas histológicas e a classificação folicular foi
12 realizada por uma única pessoa usando microscopia óptica em aumento de 10 e 40
13 vezes (Nikon, Tokyo, Japão).

14

15 *Análise do Estresse Oxidativo*

16

17 Os fragmentos (n=30), submetidos aos tratamentos com Ácido
18 Ascórbico ao cultivo *in vitro* por 6 ou 12 dias, foram posteriormente submetidos à
19 análise do estresse oxidativo pelos ensaios cinético-colorimétricos de FRAP, TBARS
20 e NBT, para capacidade do tecido ovariano em resistir aos danos oxidativos,
21 determinação da peroxidação lipídica e produção de ânion superóxido,
22 respectivamente. Os ensaios foram realizados conforme anteriormente descrito por
23 Pinho-Ribeiro et al. (2016).

24

25 *Avaliação da atividade antioxidante pelo ensaio de FRAP*

26

27 Para o ensaio de FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) os
28 fragmentos ovarianos foram triturados e homogeneizados com solução tampão de
29 cloreto de potássio (KCl; 500 µL; 1,15%) e centrifugados (1500 rpm) por 10 minutos
30 (4° C). Sequencialmente, foram adicionados 30 µL de água ultrapura e 150 µL do
31 reagente de FRAP ao sobrenadante (20 µL) da amostra.

32

33 Usando um espectrofotômetro, leitor de microplacas de 96 poços,
34 realizou-se a leitura da placa com a absorbância de 595 nm (Multiskan GO Thermo
Scientific). Os resultados foram apresentados como nmol equivalente de TROLOX por

1 mg de proteína e o que se espera é um aumento da capacidade antioxidante das
2 amostras avaliadas.

3

4 Avaliação da peroxidação lipídica pelo ensaio de TBARS

5

6 O ensaio de TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substances) foi
7 determinado através dos níveis de malondialdeído (MDA), um produto intermediário
8 de peroxidação lipídica. Para a realização deste ensaio, utilizou-se o homogenato (50
9 μL) obtido anteriormente no ensaio de FRAP, acondicionado em um microtubo do tipo
10 *Eppendorf* (1 mL), com cloreto de ferro (FeCl_3 ; 5 μL), ácido ascórbico (5 μL), ácido
11 tricloroacético (TCA; 50 μL ; 2,8%) e ácido tiobarbitúrico (TBA; 50 μL ; 1,0%).

12 Após a obtenção da mistura, esta foi agitada e mantida em banho-
13 maria (90° C) por 15 minutos. Posteriormente, as amostras foram resfriadas em banho
14 de gelo, novamente agitadas por 15 minutos (4° C) e centrifugadas (3000 rpm). O
15 sobrenadante contido nos microtubos foi distribuído em placas de 96 poços e os níveis
16 de MDA foram determinados pela diferença obtida entre a absorbância em 535 e 572
17 nm (Multiskan GO, Thermo Scientific) através de um espectrofotômetro, leitor de
18 microplacas. Os resultados para o ensaio de TBARS foram apresentados como OD
19 (*Optical Density*) por mg de proteína e o que se espera é uma diminuição da
20 degradação dos lipídeos das amostras avaliadas.

21

22 Avaliação da produção de ânion superóxido pelo ensaio de NBT

23

24 O ensaio de nitroazul de tetrazólio (NBT) foi utilizado para realizar a
25 mensuração da produção de ânion superóxido, sendo a redução do NBT mensurada
26 em espectrofotômetro leitor de microplacas a 600 nm (Multiskan GO, Thermo
27 Scientific). O homogenato (50 μL) foi adicionado ao NBT (100 μL ; 1 mg/mL) em placas
28 de 96 poços. Após o período de incubação (15 minutos), todas as amostras foram
29 descartadas da placa e sequencialmente foi adicionado hidróxido de potássio (KOH;
30 120 μL) e dimetilsulfóxido (DMSO; 120 μL). Os resultados foram apresentados como
31 OD por mg de proteína e o que se espera é uma diminuição da produção de radicais
32 livres das amostras avaliadas.

1 *Análise Estatística*

2

3 A proporção de folículos íntegros foi estabelecida a partir da
4 quantidade total de folículos avaliados (íntegros e degenerados) em cada estágio de
5 desenvolvimento e para cada tratamento. Diferenças entre as proporções de folículos
6 primordiais e em desenvolvimento (primário e secundário), para cada tratamento
7 (controle cultivado e diferentes concentrações de Ácido Ascórbico nos diferentes
8 tempos), foram analisadas pelo teste de Qui-quadrado e/ou teste Exato de Fisher. Na
9 ocorrência de um efeito significativo, as proporções foram comparadas por um teste
10 de proporção 2x2 para se estabelecer o *ranking* entre os tratamentos. Para a análise
11 descritiva, os dados foram apresentados como porcentagem (%). Todas as análises
12 foram realizadas no programa estatístico Minitab® 18.1.1. Os dados das análises de
13 estresse oxidativo foram submetidos à ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni,
14 utilizando o software GraphPad Prism 7.0. Os valores foram considerados
15 significativos quando $p \leq 0,05$.

16

17 **RESULTADOS**

18

19 *Análise da Morfologia e do Crescimento Folicular*

20

21 A suplementação com 100 ng/mL de Ácido Ascórbico, durante 6 dias
22 de cultivo *in vitro*, promoveu a melhor proporção de desenvolvimento folicular
23 (35,33%; 53/150; $p < 0,0001$) quando comparado com os demais tratamentos (Figura
24 4).

25

26 Com relação à integridade folicular, o uso de 100 ng/mL de Ácido
27 Ascórbico também favoreceu uma maior proporção de folículos íntegros em
28 desenvolvimento (33,56%; 49/146; $p < 0,0001$), após 6 dias de cultivo, quando
comparado com os demais tratamentos (Tabela 1).

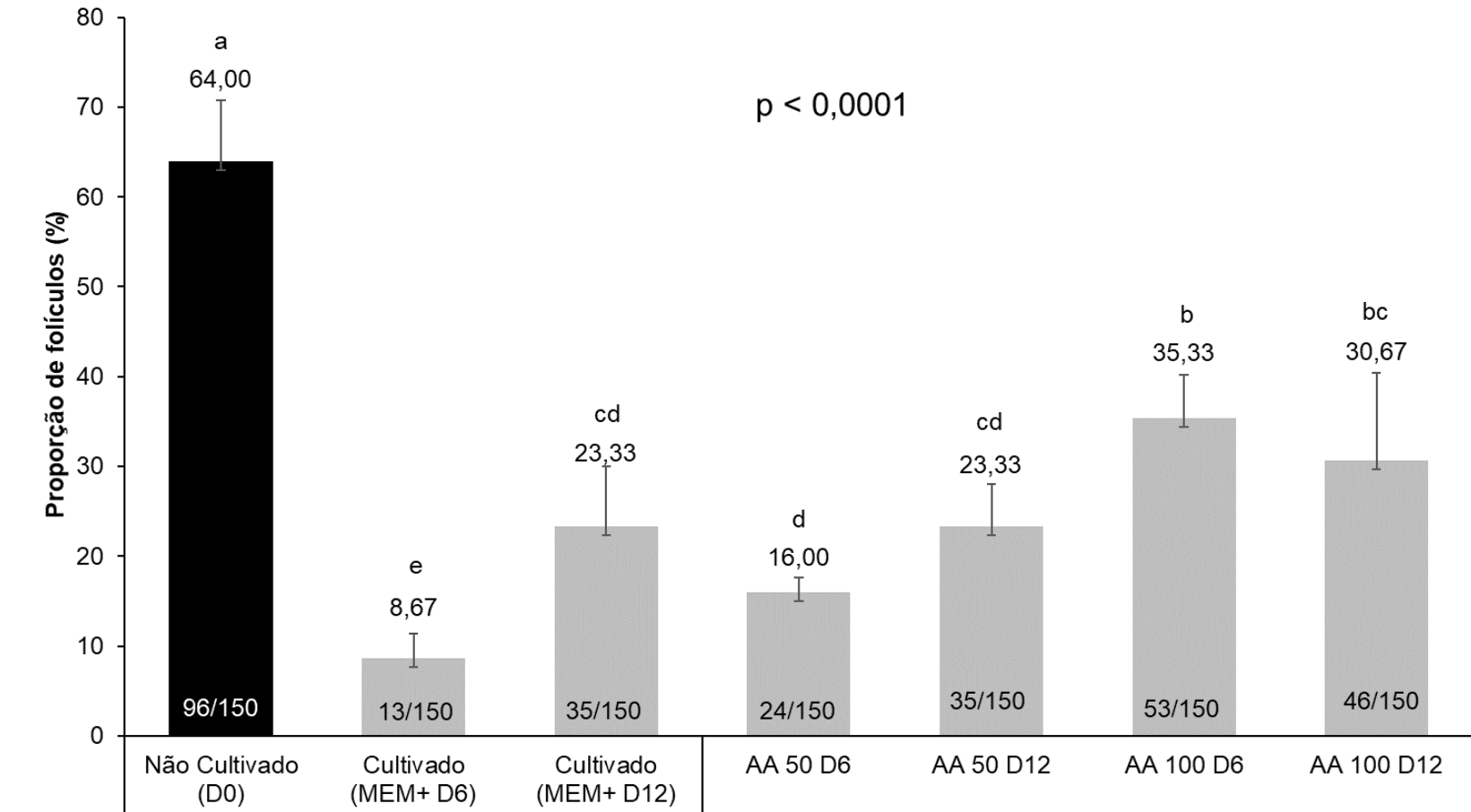


Figura 4 - Proporção de folículos ovarianos pré-antrais totais, classificados como íntegros, de fragmentos do córtex ovariano, de fêmeas *Bos taurus indicus*, cultivados por 6 (D6) ou 12 (D12) dias em Meio Essencial Mínimo (MEM⁺) suplementado com diferentes concentrações (50 ou 100 ng/mL) de Ácido Ascórbico (AA).

Letras minúsculas diferentes (a-e) significa diferença ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

1 **Tabela 1** - Porcentagem de folículos ovarianos pré-antrais íntegros, primordiais e em
 2 desenvolvimento, avaliados após o cultivo *in vitro* de fragmentos do córtex ovariano
 3 de fêmeas *Bos taurus indicus*, cultivados por 6 (D6) ou 12 (D12) dias com Meio
 4 Essencial Mínimo (MEM⁺) suplementado com diferentes concentrações (50 ou 100
 5 ng/mL) de Ácido Ascórbico (AA).
 6

Tratamentos		Primordial	Desenvolvimento
		% (n/N)	% (n/N)
Controle Não Cultivado (D0)		75,27 ^a (70/93)	45,61 ^a (26/57)
Controle	MEM D6	0 ^c (0/7)	9,09 ^e (13/143)
Cultivado	MEM D12	33,33 ^b (9/27)	21,14 ^d (26/123)
	AA 50 D6	20,00 ^{bc} (1/5)	15,86 ^d (23/145)
Ácido	AA 50 D12	18,75 ^{bc} (3/16)	23,88 ^{cd} (32/134)
	AA 100 D6	100 ^a (4/4)	33,56 ^{ab} (49/146)
Ascórbico	AA 100 D12	0 (0/0)	30,67 ^{bc} (46/150)
	Valor de p	<0,0001	<0,0001

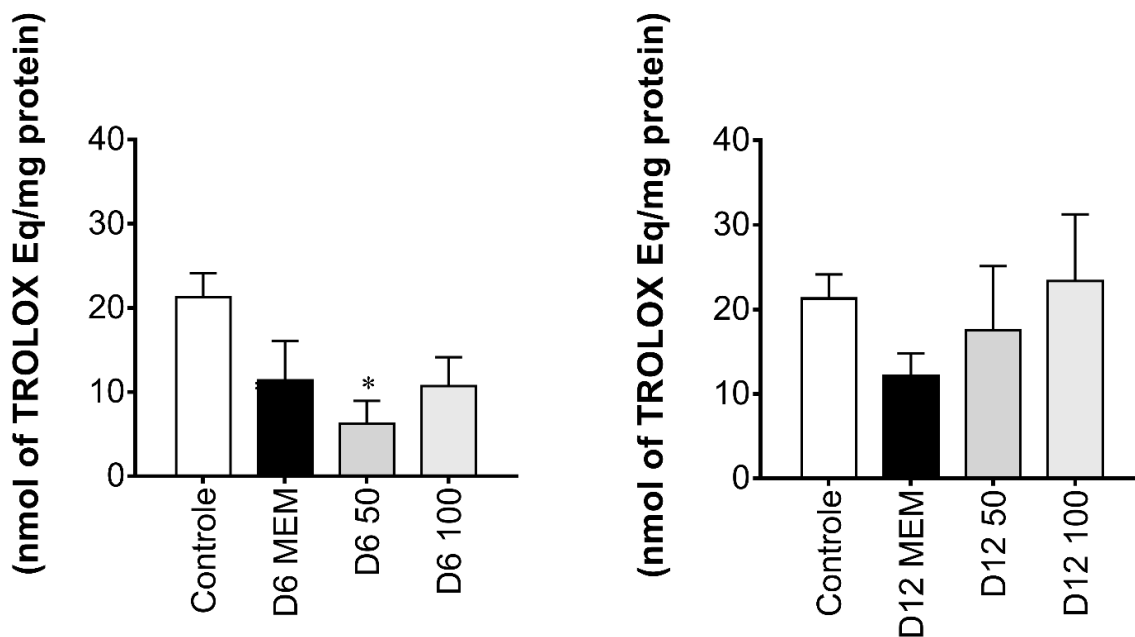
7 Letras minúsculas diferentes (a-e), na mesma coluna, significa diferença ($p < 0,05$) entre os
 8 tratamentos.

9

10 *Análise de Estresse Oxidativo*

11

12 Nos períodos avaliados, 6 e 12 dias de cultivo, não foi observada
 13 diferença nos parâmetros de estresse oxidativo entre o grupo controle cultivado
 14 (MEM⁺) e controle não cultivado (D0). Após o período de 6 dias de cultivo *in vitro*,
 15 apenas a concentração de 50 ng/mL ($6,27 \pm 2,68$ nmol de TROLOX Eq/mg de
 16 proteína) de Ácido Ascórbico apresentou diminuição ($p \leq 0,05$) da capacidade
 17 antioxidante avaliada pelo ensaio de FRAP quando comparada ao controle não
 18 cultivado ($21,27 \pm 2,86$ nmol de TROLOX Eq/mg de proteína). Após 12 dias de cultivo,
 19 não houve diferença ($p > 0,05$) nos níveis de FRAP entre nenhum dos grupos
 20 avaliados. O que se espera é um aumento da capacidade antioxidante das amostras
 21 avaliadas pelo ensaio de FRAP (Figura 5).



1

2 **Figura 5** – Efeito da suplementação com Ácido Ascórbico (MEM⁺, 50 ou 100 ng/mL)
 3 sobre a capacidade de resistir aos danos oxidativos, através da habilidade da redução
 4 do ferro (FRAP), do tecido ovariano após cultivo *in vitro* de 6 ou 12 dias.

5 *Difere do controle não cultivado (D0).

6

7

8 Com relação à produção de ânions superóxido, avaliada pelo ensaio
 9 NBT, não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos
 10 suplementados com diferentes concentrações de Ácido Ascórbico e o grupo controle
 11 na produção de radicais livres aos 6 e aos 12 dias de cultivo *in vitro*. O que se espera
 12 é uma diminuição da produção de radicais livres das amostras avaliadas pelo ensaio
 de NBT. (Figura 6).

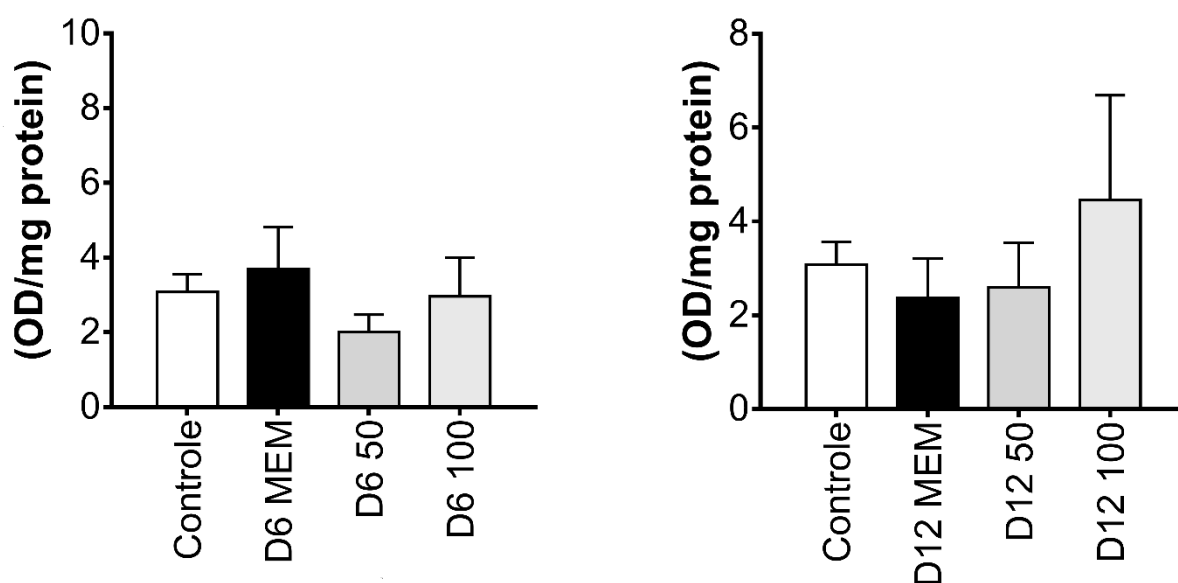


Figura 6 - Efeito da suplementação com Ácido Ascórbico (MEM⁺, 50 ou 100 ng/mL) sobre a produção de ânion superóxido (NBT) após cultivo *in vitro* de 6 ou 12 dias.

Ao avaliarmos a degradação oxidativa dos lipídeos, pelo ensaio de TBARS (média \pm EPM), também não observamos diferença ($p > 0,05$) entre os tratamentos suplementados com diferentes concentrações de Ácido Ascórbico e o grupo controle aos 6 e aos 12 dias de cultivo *in vitro*. O que se espera é uma diminuição da degradação dos lipídeos das amostras avaliadas pelo ensaio de TBARS (Figura 7).

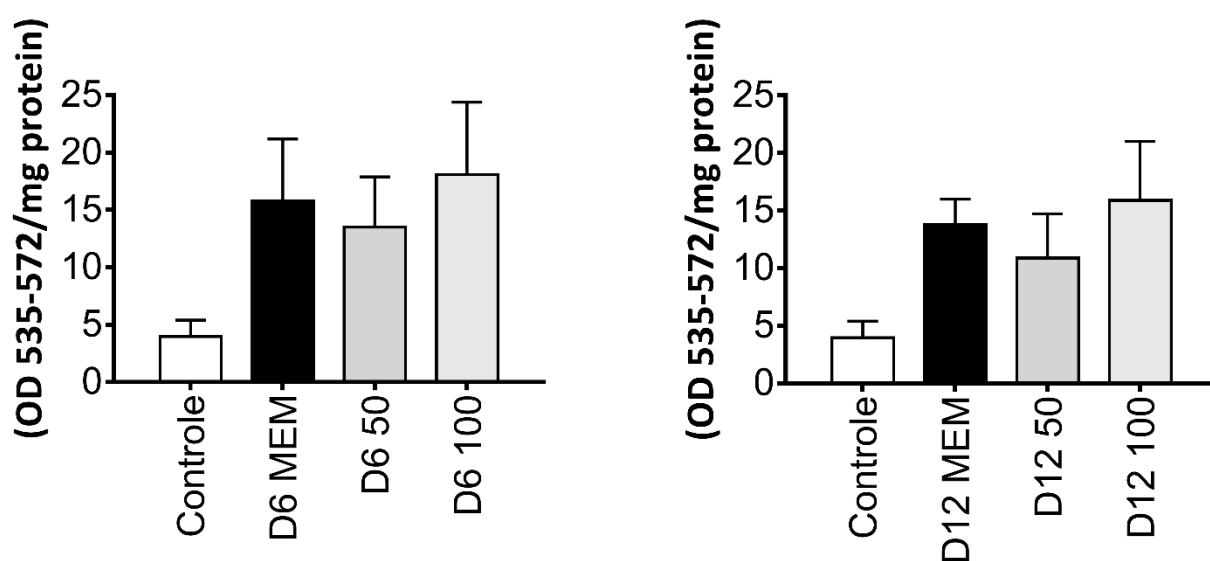


Figura 7 - Efeito da suplementação com Ácido Ascórbico (MEM⁺, 50 ou 100 ng/mL) sobre a peroxidação lipídica (TBARS) após cultivo *in vitro* de 6 ou 12 dias.

1 DISCUSSÃO

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

Neste estudo, ao compararmos a proporção total de folículos ovarianos pré-antrais, observou-se que a suplementação do Meio Essencial Mínimo (MEM⁺) com 100 ng/mL de Ácido Ascórbico, aos 6 dias de cultivo, proporcionou melhores condições para o desenvolvimento dos folículos ovarianos pré-antrais bovinos em relação aos demais tratamentos cultivados. Além disso, a suplementação com 100 ng/mL de Ácido Ascórbico também favoreceu o aumento da proporção de folículos íntegros quando comparado às demais concentrações testadas. Até onde sabemos, este é um dos poucos estudos em que se utiliza uma matriz extracelular a base de gel de agarose durante o cultivo *in vitro* para avaliação do desenvolvimento folicular e da integridade de folículos ovarianos pré-antrais de ovários de fêmeas bovinas obtidos de abatedouro, bem como, para avaliar o estresse oxidativo com a suplementação de Ácido Ascórbico ao longo de 12 dias de cultivo *in vitro*.

Em um estudo realizado com cultivo *in vitro* de 8 dias, houve efeito positivo ao suplementar com 50 µg/mL de Ácido Ascórbico o meio de cultivo de folículos ovarianos provenientes de fêmeas bovinas. Os autores relatam a ativação e o crescimento de folículos ovarianos nos estágios iniciais de desenvolvimento folicular, bem como a preservação da viabilidade e integridade folicular e o estímulo de proliferação das células da granulosa (Andrade et al., 2012), corroborando com os resultados encontrados em nosso estudo. Thomas et al. (2001) também relataram, ao realizarem o cultivo *in vitro* com folículos ovarianos isolados de fêmeas bovinas, que a suplementação com Ácido Ascórbico promoveu a manutenção da integridade e sobrevivência folicular após cultivo *in vitro* por 12 dias com meio suplementado com 50 µg/mL. Para a espécie equina, Gomes et al. (2015) relataram que ao suplementar o meio de cultivo *in vitro* com 100 µg/mL (79,5%), por 6 dias de cultivo, o Ácido Ascórbico foi capaz de promover o desenvolvimento dos folículos de ovários obtidos de abatedouro, assim como em nosso estudo realizado com ovários de fêmeas bovinas.

O Ácido Ascórbico se acumula nos oócitos, células da granulosa, células luteais e da teca interna, dando origem ao ascorbato, um radical livre bastante estável, diminuindo significativamente os danos causados pelas espécies reativas de oxigênio (Thomas et al., 2001; Lutsenko; Cárcamo; Golde, 2002) e em concentrações fisiológicas, os antioxidantes possuem a função de proteger as células dos danos

1 causados pelas EROs.

2 Embora em nosso modelo não tenha sido observado, pelos
3 parâmetros avaliados, aumento do estresse oxidativo pós-cultivo, foi possível
4 observar que a suplementação com Ácido Ascórbico manteve os níveis de EROs
5 estáveis ao longo do período. Ao suplementarmos o meio de cultivo com Ácido
6 Ascórbico, observamos que este antioxidante exerceu ação benéfica sobre os
7 folículos ovarianos pré-antrais cultivados *in vitro*, como já relatado por outros autores
8 para camundongos, bovinos, equinos e caprinos (Murray et al., 2001; Thomas et al.,
9 2001; Rossetto et al., 2009; Silva et al., 2011; Andrade et al., 2012; Gomes et al.,
10 2015).

11 A fim de proporcionar um ambiente equilibrado para promover o
12 adequado desenvolvimento *in vitro* e reduzir os níveis das espécies reativas de
13 oxigênio produzidas pelo sistema, este experimento identificou a melhor concentração
14 de Ácido Ascórbico (100 ng/mL) no melhor tempo (6 dias) de cultivo *in vitro* de folículos
15 ovarianos pré-antrais de fêmeas *Bos taurus indicus*. O potencial reprodutivo destas
16 fêmeas é diretamente influenciado pelos danos causados pelo estresse oxidativo,
17 resultado do desequilíbrio da produção de espécies reativas de oxigênio presente nas
18 células; o Ácido Ascórbico é capaz de reduzir esses danos (Thomas et al., 2001;
19 Lutsenko; Cárcamo; Golde, 2002).

20 Além disso, dependendo do tempo de cultivo, a suplementação de
21 Ácido Ascórbico pode ser útil ou não ao meio de cultivo *in vitro*. O Ácido Ascórbico
22 promoveu efeitos positivos no desenvolvimento e na manutenção da integridade dos
23 folículos cultivados ao longo de 6 dias. É esperado que uma maior quantidade de
24 EROs seja produzida aos 12 dias de cultivo, quando comparado com 6 dias de cultivo,
25 possivelmente devido ao tempo prolongado de cultivo. Levando todos esses fatores
26 em consideração, sugerimos que a suplementação com Ácido Ascórbico e, ainda, a
27 associação com outros antioxidantes, podem variar de acordo com a concentração e
28 período de cultivo testados. Os resultados obtidos sobre os benefícios proporcionados
29 pelo antioxidante Ácido Ascórbico sobre o cultivo são de extrema importância para o
30 direcionamento de futuros trabalhos que viabilizem o uso dessa biotécnica de forma
31 rotineira no Brasil.

1 **CONCLUSÃO**

2

3

4

5

6

7

Em conclusão, a suplementação com Ácido Ascórbico no meio de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais promoveu melhores condições para o desenvolvimento folicular e a concentração de 100 ng/mL, após 6 dias de cultivo, foi a mais eficiente em manter a integridade folicular, bem como os níveis de espécies reativas de oxigênio estáveis.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, E. R.; MELO-STERZA, F. A.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, p. 79-85, 2010.

ANDRADE, E. R.; VAN DEN HURK, R.; LISBOA, L. A.; HERTEL, M. F.; MELO-STERZA, F. A.; MORENO, K.; BRACARENSE, A. P. F. R. L.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A. Effects of ascorbic acid on *in vitro* culture of bovine preantral follicles. **Zygote**, v. 20, n. 4, p. 379-388, 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, p. 1-14, 2014.

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

BARJA, G.; LÓPEZ-TORRES, M.; PÉREZ-CAMPO, R.; ROJAS, C.; CADENAS, S.; PRAT, J.; PAMPLONA, R. Dietary vitamin C decreases endogenous protein oxidative damage, malondialdehyde, and lipid peroxidation and maintains fatty acid unsaturation in the guinea pig liver. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 17, p. 105-115, 1994.

BIZARRO-SILVA, C.; SANTOS, M. M.; GERREZ, 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**, v. 26, n. 5, p. 417-423, 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, p. 243–250, 2016.

DE SÁ, N. A. R.; FERREIRA, A. C. A.; SOUSA, F. G. C.; DUARTE, A. B. G.; PAES, V. M. CADENAS, J.; ANJOS, J. C.; FERNANDES, C. C. L.; ROSSETO, R.; CIBIN, F. W. S.; ALVES, B. G.; RODRIGUES, A. P. R.; RONDINA, D.; GASTAL, E. L.; FIGUEIREDO J. R. First pregnancy after *in vitro* culture of early antral follicles in goats: Positive effects of anethole on follicle development and steroidogenesis. **Molecular Reproduction and Development**, v. 87, p. 1-12, 2020.

FIGUEIREDO, J. R.; LIMA, L. F.; SILVA, J. R. V.; SANTOS, R. R. Control of growth and development of preantral follicle: insights from *in vitro* culture. **Animal Reproduction**, v. 35, p. 648–659, 2018.

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

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.

GOMES, R. G.; SILVA, C. B.; GONZALEZ, 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.

LUTSENKO, E. A.; CÁRCAMO, J. M.; GOLDE, D. W. Vitamin C prevents DNA mutation induced by oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 19, p. 16895-16899, 2002.

MATSUDA, F.; INOUE, N.; MANABE, N.; OHKURA, S. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: Regulation by survival and death of granulosa cells, review. **Journal of Reproduction and Development**, v. 58, p. 44-50, 2012.

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. 54, p. 687-691, 2018.

MELO, M. A. P.; OSKAM, I. C.; CELESTINO, J. J. H.; CARVALHO, A. A.; CASTRO, S. V.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; SANTOS, R. R. Adding ascorbic acid to vitrification and IVC medium influences preantral follicle morphology, but not viability. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 4, p. 742-745, 2011.

MURRAY, A. A.; MOLINEK, M. D.; BAKER, S. J.; KOJIMA, F. N.; SMITH, M. F.; HILLIER, S. G.; SPEARS, N. Role of ascorbic acid in promoting follicle integrity and survival in intact mouse ovarian follicles *in vitro*. **Reproduction**, v. 121, n. 1, p. 89-96, 2001.

PACKER, L.; WITT, E. H.; TRITSCHLER, H. J. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 19, p. 227-250, 1995.

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.

ROSSETTO, R.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T.; SARAIVA, M. V. A.; MARTINS, F. S.; FAUSTINO, L. R.; ARAÚJO, V. R.; SILVA, C. M. G.; NAME, K. P. O.; BÁO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R.; BLUME, H. Interaction between ascorbic acid and folliclestimulating hormone maintains follicular viability after long-term *in vitro* culture of caprine preantral follicles. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 37, p. 112-123, 2009.

SILVA, A. W. B.; RIBEIRO, R. P.; MENEZES, V. G.; BARBERINO, R. S.; PASSOS, J. R. S.; DAUC, A. M. P.; COSTA, J. J. N.; MELO, L. R. F.; BEZERRA, F. T. G.; DONATO, M. A. M.; PEIXOTO, C. A.; MATOS, M. H. T.; GONÇALVES, P. B. D.; VAN DEN HURKE, R.; SILVA, J. R. V. Expression of TNF- α system members in bovine ovarian follicles and the effects of TNF- α or dexamethasone on preantral follicle survival, development and ultrastructure *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v. 182, p. 56-68, 2017.

SILVA, G. M.; ARAÚJO, V. R.; DUARTE, A. B. G.; CHAVES, R. N.; SILVA, C. M. G.; LOBO, C. H.; ALMEIDA, A. P.; MATOS, M. H. T.; TAVARES, L. M. T.; CAMPELO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Ascorbic acid improves the survival and *in vitro* growth of isolated caprine preantral follicles. **Animal Reproduction**, v. 8, n. 1/2, p. 14-24, 2011.

THOMAS, F. H.; LEASK, R.; SRSEN, V.; RILEY, S. C.; SPEARS, N.; TELFER, E. E. Effect of ascorbic acid on health and morphology of bovine preantral follicles during long-term culture. **Reproduction**, v. 122, p. 487-495, 2001.

ARTIGO B

Desenvolvimento folicular, integridade morfológica e potencial antioxidante de folículos ovarianos pré-antrais de fêmeas *Bos taurus indicus* cultivados *in vitro* com suplementação de Ácido Alfa Lipóico

Follicular development, morphological integrity, and antioxidant potential of preantral ovarian follicles from *Bos taurus indicus* females cultured *in vitro* with Alpha Lipoic Acid

Larissa Zamparone Bergamo^{1}; Denis Vinícius Bonato¹; Camila Bizarro da Silva^{1,2}; Francieli Gesleine Capote Bonato¹; Andressa Guidugli Lindquist¹; Suellen Miguez Gonzalez¹; Ana Carolina Rossaneis³; Waldiceu Aparecido Verri Junior³; Fábio Morotti¹; Marcelo Marcondes Seneda¹*

¹Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal, REPROA; Departamento de Clínicas Veterinárias, DCV; Centro de Ciências Agrárias, CCA; Universidade Estadual de Londrina, UEL; Londrina, Paraná, Brasil.

²Laboratório de Reprodução Animal, Escola de Ciências da Vida; Pontifícia Universidade Católica do Paraná, PUCPR; Toledo, Paraná, Brasil.

³Departamento de Ciências Patológicas; Centro de Ciências Biológicas, CCB; Universidade Estadual de Londrina, UEL; Londrina, Paraná, Brasil.

*Autor para correspondência:

Larissa Zamparone Bergamo

E-mail: larissabergamo1@hotmail.com

1 RESUMO

2

3 O objetivo deste trabalho foi avaliar o desenvolvimento folicular, a integridade
4 morfológica e o potencial antioxidante de folículos ovarianos pré-antrais de fêmeas
5 *Bos taurus indicus* cultivados *in vitro* com suplementação de Ácido Alfa Lipóico.
6 Ovários (n=24) de fêmeas *Bos taurus indicus* (n=12), provenientes de abatedouro,
7 foram coletados e fragmentados. Um fragmento, de cada par de ovário, foi escolhido
8 aleatoriamente e fixado em Bouin (controle não cultivado; D0). Esses foram
9 destinados para histologia clássica (morfologia e avaliação do crescimento folicular);
10 e um fragmento, de cada par de ovário, foi congelado a -80° C (controle não cultivado;
11 D0), atribuído para análise do estresse oxidativo (TBARS, NBT e FRAP). Os demais
12 fragmentos foram cultivados *in vitro*, por 6 (D6) ou 12 (D12) dias, contendo somente
13 Meio Essencial Mínimo (MEM⁺) ou MEM⁺ suplementado com 50, 100 ou 250 ng/mL
14 de Ácido Alfa Lipóico, sobre uma matriz extracelular de gel de agarose, em estufa a
15 38,5° C. A cada dois dias, efetuou-se a troca total do meio de cultivo. Na comparação
16 entre os tratamentos, a suplementação com 100 ng/mL se mostrou mais eficiente em
17 manter a integridade folicular após 6 dias de cultivo (primordial: 51,28%; $p < 0,0001$;
18 desenvolvimento: 36,88%; $p < 0,0001$). Não houve diferença ($p > 0,05$), pelo ensaio
19 NBT e TBARS, entre os tratamentos comparando-os ao tratamento controle não
20 cultivado (D0). Assim, a suplementação do meio de cultivo *in vitro* de folículos
21 ovarianos pré-antrais bovinos com a concentração de 100 ng/mL de Ácido Alfa Lipóico
22 após 6 dias de cultivo foi a mais eficiente em conservar a integridade folicular e, após
23 6 dias, manter os níveis de espécies reativas de oxigênio estáveis.

24

25 **Palavras-chave:** antioxidantes; bovino; cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais; Nelore;
26 EROs.

1 ABSTRACT

2

3 The aim of this work was to evaluate follicular development, morphological integrity
4 and antioxidant potential of preantral ovarian follicles from *Bos taurus indicus* females
5 grown *in vitro* with Alpha Lipoic Acid supplementation. Ovaries (n=24) of *Bos taurus*
6 *indicus* (n=12) females were collected in a slaughter and fragmented. A randomly
7 obtained fragment from each pair of ovaries was fixed in a Bouin (non-cultivated
8 control; D0). These fragments were intended for classical histology (morphology and
9 evaluation of follicular growth); and a fragment from each pair of ovaries was frozen at
10 -80° C (non-cultivated control; D0), assigned for analysis of oxidative stress (TBARS,
11 NBT and FRAP). The remaining fragments were cultured *in vitro*, for 6 (D6) or 12 (D12)
12 days, containing only Minimum Essential Medium (MEM⁺) or MEM⁺ supplemented with
13 Alpha Lipoic Acid (50, 100 or 250 ng/mL), on an extracellular matrix of agarose gel, in
14 an oven at 38.5° C. Every two days, 100% of the culture medium was replaced. The
15 supplementation with 100 ng/mL was more efficient in maintaining follicular integrity
16 after 6 days of culture (primordial: 51.28%; P < 0.0001; development: 36.88%; P <
17 0.0001). There was no difference (P > 0.05) between treatments compared to the non-
18 cultivated control treatment (D0), using the NBT and TBARS assay. Thus,
19 supplementation of the *in vitro* culture medium of bovine preantral ovarian follicles with
20 a concentration of 100 ng/mL of Alpha Lipoic Acid at 6 days of culture was the most
21 efficient in maintaining follicular integrity and, after 6 days, maintaining the levels of
22 reactive oxygen species stable.

23

24 **Keywords:** antioxidants; bovine; *in vitro* culture of preantral follicles; Nelore; ROS.

1 INTRODUÇÃO

2

3 A recuperação de folículos ovarianos bovinos na fase pré-antral
4 tornou-se um importante recurso para a reprodução humana, aplicado a pacientes
5 com alterações de fertilidade ou com afecções reprodutivas (Frydman; Grynberg,
6 2016). Estima-se que durante a fase fetal ocorra a formação de aproximadamente
7 235.000 folículos por ovário para a espécie bovina (Silva-Santos et al., 2011). No
8 entanto, a grande maioria (99,9%) desse estoque de folículos acaba culminando em
9 atresia (Matsuda et al., 2012). Devido ao interesse em minimizar o processo de atresia
10 e os seus efeitos deletérios, busca-se desenvolver um sistema de cultivo *in vitro*, que
11 mantenha o crescimento folicular e permita o melhor aproveitamento da reserva
12 folicular (Araújo et al., 2014; Hatzirodos et al., 2014).

13 O desenvolvimento de condições de cultivo *in vitro* é essencial para a
14 melhor compreensão da foliculogênese em animais, como bovinos, caprinos e
15 murinos, sendo modelo para as biotécnicas aplicadas à reprodução humana
16 (Langbeen et al., 2015; Green; Shikanov, 2016; De Sá et al., 2020). Na busca pelas
17 melhores condições de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais, diversos
18 fatores têm sido investigados, como fatores de crescimento, antioxidantes e
19 hormônios, que podem auxiliar no desenvolvimento e crescimento folicular satisfatório
20 (Araújo et al., 2014; Gomes et al., 2015; Silva et al., 2017; Bizarro-Silva et al., 2018;
21 Gomes et. al., 2018; Max et al., 2018).

22 Outro fator relevante relacionado à biotécnica de cultivo *in vitro* de
23 folículos ovarianos pré-antrais refere-se à produção e liberação de radicais livres em
24 excesso, repercutindo no estresse oxidativo, nos danos celulares e efeitos deletérios
25 no aparelho reprodutor feminino (Andrade et al., 2010). Neste contexto, a produção
26 excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs), resultado do estresse oxidativo,
27 gera um grande volume de radicais livres presentes nas células (Andrade et al., 2010;
28 Silva et al., 2011; Gomes et al., 2018). Assim, a suplementação com Ácido Alfa Lipóico
29 nos meios de cultivos *in vitro* poderia promover um ambiente de desenvolvimento
30 ideal, considerando que o mesmo é um antioxidante conhecido pela sua ação em
31 processos biológicos, atuando diretamente na eliminação das EROs e quelação de
32 metais (Packer; Witt; Tritschler, 1995), além de ser um cofator essencial em
33 complexos multienzimáticos, que catalisa a descarboxilação dos α -cetoácidos no ciclo
34 de Krebs (Silva et al., 2011).

1 Ainda não há relatos de estudos utilizando a suplementação com
2 Ácido Alfa Lipóico adicionado de uma matriz extracelular de gel de agarose no cultivo
3 *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais de fêmeas bovinas para avaliar o
4 desenvolvimento folicular, a integridade morfológica e o potencial antioxidante.
5 Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o desenvolvimento folicular, a integridade
6 morfológica e o potencial antioxidante de folículos ovarianos pré-antrais de fêmeas
7 *Bos taurus indicus*, cultivados *in vitro* e suplementados com o antioxidante Ácido Alfa
8 Lipóico no meio de cultivo.

9

10 **MATERIAL E MÉTODOS**

11

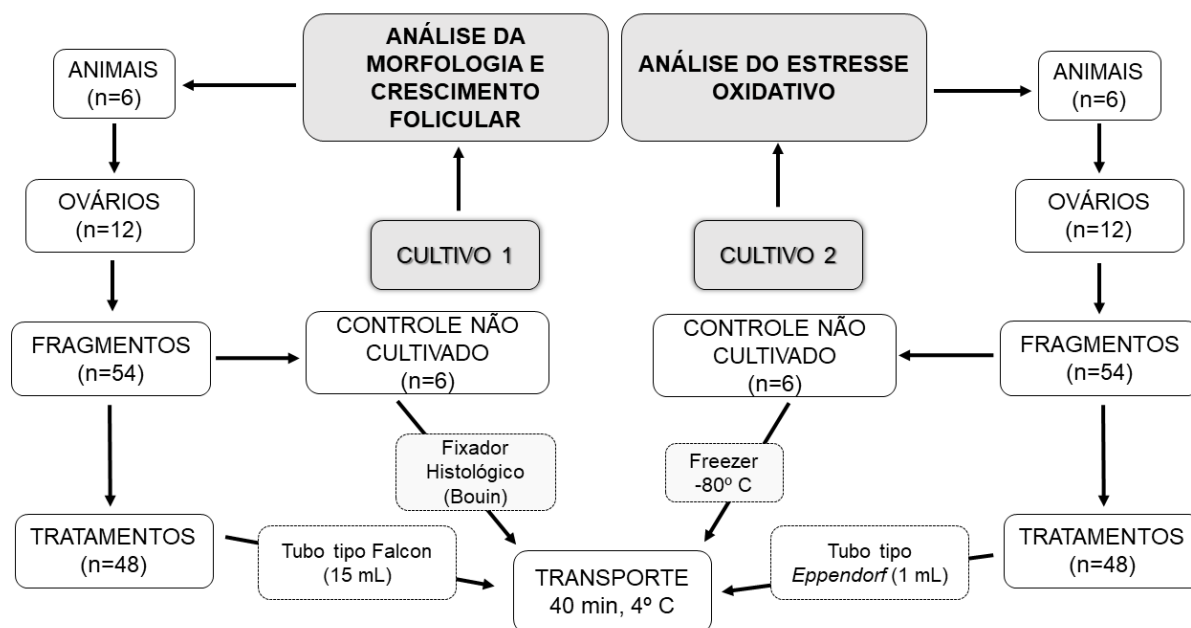
12 Os produtos químicos utilizados neste experimento foram adquiridos
13 da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), a menos que indicado de outra forma no texto.
14 Os ovários utilizados neste experimento foram provenientes de fêmeas bovinas
15 oriundas de abatedouro, destinadas ao abate comercial, seguindo todas as normas
16 estabelecidas pela Lei nº 1.283 de 18 de dezembro de 1950 que dispõe sobre a
17 inspeção industrial e sanitária dos produtos de origem animal.

18

19 *Obtenção e Processamento dos Ovários*

20

21 Ovários (n=24) de fêmeas bovinas (n=12) adultas, *Bos taurus indicus*,
22 da raça Nelore, cíclicas e com escore de condição corporal (ECC) variando de 3 e 4
23 (escala de 0 a 5; Ayres et al., 2009), foram coletados e processados em abatedouro,
24 distante 48 Km (40 minutos) do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal
25 (Figura 1).



1

2 **Figura 1** - Esquema demonstrativo da obtenção dos ovários no abatedouro.

3

4

5 Imediatamente após o abate, cada par de ovário foi lavado
 6 separadamente em três lavagens de solução fisiológica a 0,9% (JP Farma, São Paulo,
 7 Brasil) e duas lavagens de álcool 70%. Os pares de ovários foram fragmentados com
 8 o auxílio de um *punch* dermatológico estéril e descartável (6 mm; Kolplast, São Paulo,
 9 Brasil), originando fragmentos de aproximadamente 9 mm². Foram obtidos nove
 10 fragmentos de cada par de ovário de regiões aleatórias do córtex ovariano, totalizando
 11 108 fragmentos. Na sequência, os fragmentos obtidos foram submetidos a três
 12 lavagens com solução fisiológica a 0,9% (JP Farma, São Paulo, Brasil) e duas
 13 lavagens com Meio Essencial Mínimo (MEM⁺; Gibco BRL, Rockville, MD, USA;
 14 osmolaridade 300 mOsm/L, pH 7,2) contidos em placa de 24 poços. Os fragmentos
 15 do controle não cultivado (D0) foram acondicionados em um tubo do tipo Falcon (15
 16 mL) contendo fixador Bouin. Tais fragmentos destinaram-se para análise da
 17 morfologia e do crescimento folicular; e um fragmento, de cada par de ovário, foi
 18 escolhido aleatoriamente e acondicionado em microtubo do tipo *Eppendorf* (1 mL),
 19 mantido em recipiente térmico a 4° C, caracterizando o tratamento controle não
 20 cultivado (dia 0; D0), para as análises do estresse oxidativo. Todos os fragmentos
 foram transportados à temperatura de 4° C, até a chegada no laboratório.

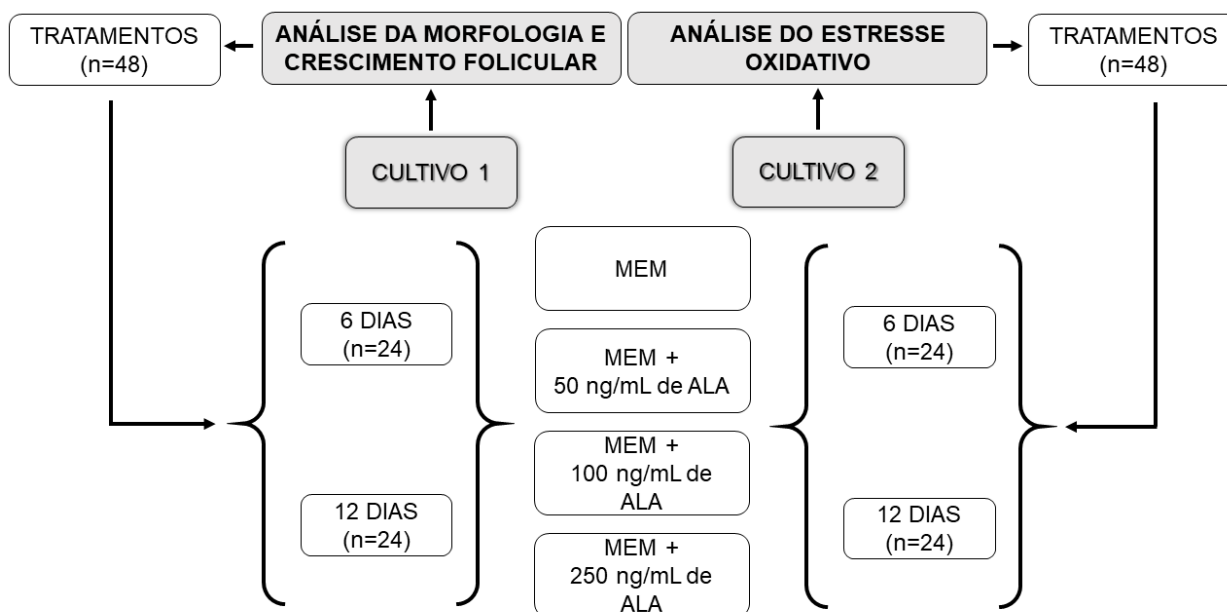
1 *Cultivo In vitro de Folículos Ovarianos Pré-Antrais*

2

3 Os cultivos *in vitro* foram realizados separadamente para a análise da
4 morfologia e crescimento folicular e para as análises do estresse oxidativo. Os
5 fragmentos (n=96) do córtex ovariano foram cultivados individualmente em placas de
6 24 poços contendo somente MEM⁺ ou MEM⁺ suplementado com Ácido Alfa Lipóico,
7 compondo os seguintes tratamentos: MEM⁺, 50, 100 ou 250 ng/mL, sobre gel de
8 agarose (Agarose Molecular Biology Grade; Kasvi, Brasil), em estufa a 38,5° C, numa
9 atmosfera de 5% de CO₂ com ar e umidade saturada. O meio base do cultivo
10 constituiu-se de MEM⁺ suplementado com ITS (6,25 mg/mL de insulina, 6,25 mg/mL
11 de transferrina e 6,25 mg/mL de selênio), 0,23 mM de piruvato, 2 mM glutamina, 2 mM
12 de hipoxantina, 1,25 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA; Gibco BRL, Rockville,
13 MD, USA), 20 UI/mL de penicilina e 200 mg/mL de estreptomicina.

14 Para o preparo da matriz extracelular de gel de agarose utilizou-se 3
15 g de agarose em pó (Agarose Molecular Biology Grade; Kasvi, Brasil) em 200 mL de
16 água destilada para a obtenção de uma solução na concentração de 1,5% de agarose.
17 Após a completa diluição, a solução foi submetida à esterilização em autoclave por 15
18 minutos. Sequencialmente, a solução foi acondicionada em placa do tipo Petri, de
19 vidro estéril, para a solidificação do gel. Ao obter estrutura gelatinosa, a placa foi
20 mantida em estufa de 37° C por 24 horas para comprovar a esterilidade.
21 Seguidamente, após completar as 24 horas em condições estéreis, o gel foi
22 fragmentado em fragmentos de aproximadamente 1 cm³ (Silva et al., 2017) e cada
23 fragmento foi acondicionado na placa de 24 poços.

24 Para cada concentração de Ácido Alfa Lipóico, fragmentos do córtex
25 ovariano de cada animal foram cultivados por 6 (D6) ou 12 (D12) dias (Figura 2). A
26 cada dois dias, o meio de cultivo era totalmente substituído por meio novo. O período
27 de cultivo utilizado foi baseado em estudos previamente realizados (Figueiredo et al.,
28 2018; Gomes et al., 2018; De Sá et al., 2020).



1
2 **Figura 2** - Esquema ilustrando os grupos destinados ao cultivo *in vitro* de folículos
3 ovarianos pré-antrais, com a suplementação de Ácido Alfa Lipóico (ALA), atribuídos
4 para a análise da morfologia e do crescimento folicular tanto quanto para as análises
5 do estresse oxidativo.

6

7 *Análise da Morfologia e do Crescimento Folicular*

8

9 Para a análise da morfologia e do crescimento folicular, os fragmentos
10 do córtex ovariano (n=54) que integravam o controle não cultivado (D0) e os
11 tratamentos cultivados durante 6 (D6) ou 12 (D12) dias foram fixados em Bouin
12 durante 24 horas e mantidos em álcool 70%. Após a fixação, os fragmentos foram
13 desidratados em concentrações crescentes de álcool, clarificados e diafanizados em
14 xilol, embebidos e incluídos em blocos de parafina para realização dos cortes
15 histológicos.

16

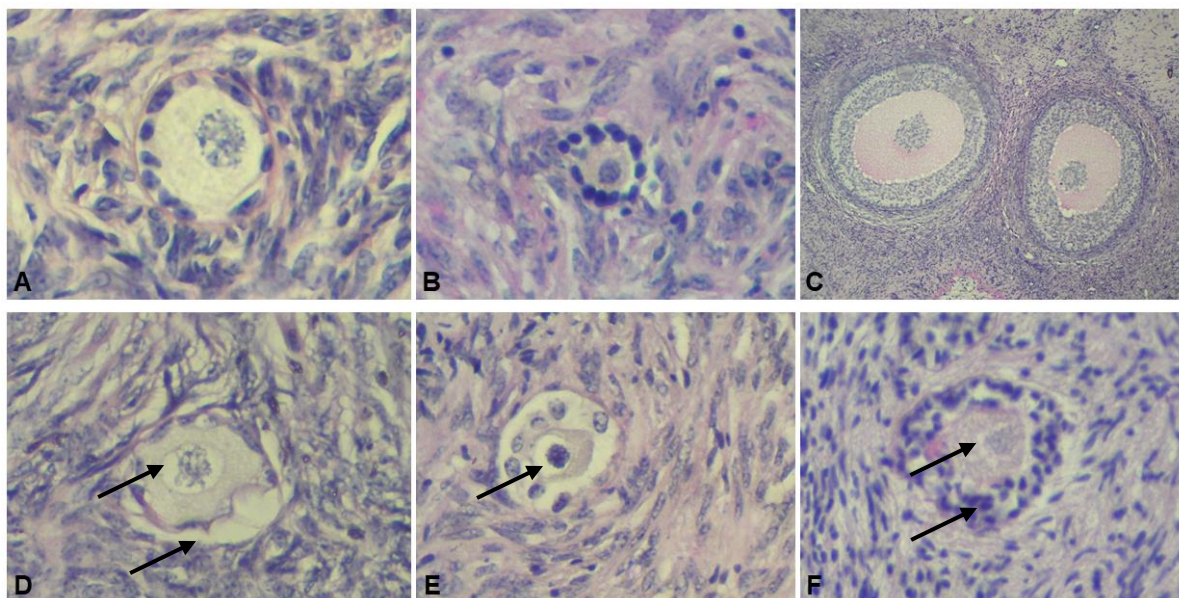
17 Cada bloco foi seccionado individualmente a 5 µm de espessura com
18 intervalo de 10 secções de tecido ovariano, em micrótomo rotativo (Leica®, Wetzlar-
19 Alemanha), para montagem de lâminas histológicas. Antes da coloração, o excesso
20 de parafina contido nas lâminas foi retirado com xilol e, em seguida, as lâminas foram
21 reidratadas com álcool 70%. As lâminas foram coradas com Ácido Periódico de Schiff
(PAS) e Hematoxilina.

22

23 Todas as secções foram examinadas usando microscopia óptica em
aumento de 10 e 40 vezes (Nikon, Tokyo, Japão). Os folículos ovarianos pré-antrais

1 foram classificados, de acordo com sua fase de desenvolvimento, em primordial
2 (contendo uma camada de células da granulosa, de formato achatado, ao redor do
3 oócito), ou em desenvolvimento, sendo considerado primário aqueles que
4 apresentavam uma única camada de células da granulosa de formato cuboide,
5 envolvendo o oócito; ou secundário, aqueles folículos que apresentavam duas ou mais
6 camadas de células da granulosa de formato cuboide. Para avaliar o crescimento
7 folicular, foi realizada a quantificação dos folículos nas diferentes fases do
8 desenvolvimento (primordiais, primários e secundários) no tratamento controle não
9 cultivado e após 6 ou 12 dias de cultivo *in vitro* nos diferentes tratamentos.

10 Os folículos também foram classificados de acordo com sua
11 morfologia em íntegros, quando o oócito apresentou núcleo não picnótico e cercado
12 por células da granulosa organizadas em camadas; ou degenerados, quando o oócito
13 se encontrou retraído com núcleo picnótico, presença de vacúolos citoplasmáticos e
14 cercado por células da granulosa dispostas de maneira desorganizada (Búfalo et al.,
15 2016; Figura 3).



1
2 **Figura 3** – Ilustração histológica da morfologia dos folículos ovarianos pré-antrais
3 antrais de fêmeas *Bos taurus indicus* corados com Ácido Periódico de Schiff (PAS) e
4 Hematoxilina. (A) Folículo primordial íntegro (40x); (B) Folículo primário íntegro (40x);
5 (C) Folículos secundários íntegros (10x); (D) Folículo primordial degenerado (oócito
6 retraído e células da granulosa desorganizadas - seta; 40x); (E) Folículo primário
7 degenerado (oócito retraído e núcleo picnótico - seta; 40x); (F) Folículo secundário
8 degenerado (oócito retraído e células da granulosa desorganizadas - seta; 40x).

9

10 Os folículos foram avaliados por tratamentos e duração do tempo de
11 cultivo. As porcentagens de folículos primordiais, primários e secundários foram
12 calculadas após 0, 6 e 12 dias de cultivo. Para evitar a contagem repetida, os folículos
13 ovarianos pré-antrais foram contados apenas na secção onde o núcleo do oócito foi
14 observado.

15

16 *Análise do Estresse Oxidativo*

17

18 Após o período de cultivo *in vitro*, os fragmentos (n=54) foram
19 analisados através de ensaios cinético-colorimétricos para determinação da
20 peroxidação lipídica (TBARS) e produção de ânion superóxido (NBT). Também foi
21 avaliada a capacidade do tecido ovariano em resistir aos danos oxidativos através da
22 habilidade da redução do ferro (FRAP), conforme descrito por Pinho-Ribeiro et al.
23 (2016).

1 Avaliação da atividade antioxidante pelo ensaio de FRAP

2

3 A capacidade do tecido ovariano de suportar o dano oxidativo foi
4 determinada pelas propriedades de redução férrica (FRAP; Ferric Reducing
5 Antioxidant Power). O método FRAP determinou a redução férrica de 2,4,6-tripiridil-s-
6 triazina (TPTZ) para um produto colorido. A reação detectou compostos com potencial
7 redox $< 0,7$ (o potencial redox do Fe^{+3} TPTZ) e o poder redutor foi relacionado com o
8 grau de hidroxilação e extensão de conjugação em polifenóis.

9 Os fragmentos ovarianos foram triturados e homogeneizados com
10 500 μL de solução tampão de cloreto de potássio (KCl) a 1,15%, centrifugadas a 1500
11 rpm por 10 minutos a 4° C. Foi adicionado 30 μL de água ultrapura e 150 μL do
12 reagente de FRAP juntamente com 20 μL do sobrenadante da amostra. A absorbância
13 do ensaio foi medida a 595 nm (Multiskan GO Thermo Scientific) usando um
14 espectrofotômetro leitor de microplacas. Os resultados foram apresentados como
15 nmol equivalente de TROLOX por mg de proteína e o que se espera é um aumento
16 da capacidade antioxidante das amostras avaliadas.

17

18 Avaliação da peroxidação lipídica pelo ensaio de TBARS

19

20 A peroxidação lipídica foi medida pelo ensaio TBARS (Thiobarbituric
21 Acid Reactive Substances). Utilizou-se 50 μL do homogenato obtido anteriormente,
22 para a avaliação da atividade antioxidante pelo ensaio de FRAP, acondicionado em
23 microtubo do tipo *Eppendorf* (1 mL) juntamente com 5 μL de cloreto de ferro (FeCl_3),
24 5 μL de ácido ascórbico, 50 μL de ácido tricloroacético (TCA) a 2,8% e 50 μL de ácido
25 tiobarbitúrico (TBA) a 1,0%. A mistura foi agitada e mantida em banho maria por 15
26 minutos a 90° C. As amostras foram resfriadas em banho de gelo e submetidas a nova
27 agitação e centrifugação a 3000 rpm, por 15 minutos a 4° C. O sobrenadante foi
28 retirado (100 μL) do microtubo do tipo *Eppendorf* e pipetado em placas de 96 poços.

29 Os níveis de malondialdeído (MDA), um produto intermediário de
30 peroxidação lipídica, foram determinados nas amostras pela diferença entre a
31 absorbância em 535 e 572 nm (Multiskan GO, Thermo Scientific) usando um
32 espectrofotômetro leitor de microplacas. Os resultados foram apresentados como OD
33 (*Optical Density*) por mg de proteína e o que se espera é uma diminuição da
34 degradação dos lipídeos das amostras avaliadas.

1 Avaliação da produção de ânion superóxido pelo ensaio de NBT

2

3 A mensuração da produção de ânion superóxido foi realizada
4 utilizando o ensaio de nitroazul de tetrazólio (NBT). Incubou-se 50 µL do homogenato
5 com 100 µL de NBT (1 mg/mL) em placa de 96 poços, durante 15 minutos. Todas as
6 amostras foram retiradas da placa e foi adicionado 120 µL de hidróxido de potássio
7 (KOH) e 120 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). A redução do NBT foi medida a 600 nm
8 (Multiskan GO, Thermo Scientific) usando um leitor espectrofotômetro de microplacas.
9 Os resultados foram apresentados como OD por mg de proteína e o que se espera é
10 uma diminuição da produção de radicais livres das amostras avaliadas.

11

12 *Análise Estatística*

13

14 A proporção de folículos íntegros foi estabelecida a partir da
15 quantidade total de folículos avaliados (íntegros e degenerados) em cada estágio de
16 desenvolvimento e para cada tratamento. Diferenças entre as proporções de folículos
17 primordiais e em desenvolvimento (primário e secundário), para cada tratamento
18 (controle cultivado e diferentes concentrações de Ácido Alfa Lipóico nos diferentes
19 tempos), foram analisadas pelo teste de Qui-Quadrado e/ou teste Exato de Fisher. Na
20 ocorrência de um efeito significativo, as proporções foram comparadas por um teste
21 de proporção 2x2 para se estabelecer o *ranking* entre os tratamentos. Para análise
22 descritiva, os dados estão apresentados como porcentagem (%). Todas as análises
23 foram realizadas no programa estatístico Minitab® 18.1.1. Para a análise do estresse
24 oxidativo os dados foram submetidos à ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. Os
25 valores foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$.

26

27 **RESULTADOS**

28

29 *Análise da Morfologia e do Crescimento Folicular*

30

31 Ao avaliarmos o desenvolvimento folicular, a suplementação com 100
32 ng/mL de Ácido Alfa Lipóico, em 6 dias de cultivo, apresentou o melhor resultado
33 (40,00%; 72/180) em relação aos demais tratamentos. A mesma concentração aos 12
34 dias de cultivo também apresentou um bom desempenho (31,11%; 56/180); apesar

1 da semelhança com o grupo 50 D12 (25,56%; 46/180), o grupo 100 D6 foi superior a
2 todos os demais grupos. A proporção total de folículos ovarianos pré-antrais totais
3 está demonstrada na figura 4.

4 Com relação à integridade folicular, excluindo o controle não cultivado
5 (D0; primordial: 83,64%; 92/110; desenvolvimento: 71,43%; 50/70; $p < 0,0001$), a
6 suplementação com 100 ng/mL aos 6 dias de cultivo apresentou o melhor resultado,
7 tanto para folículos primordiais (51,28%; 20/39; $p < 0,0001$) quanto para folículos em
8 desenvolvimento (36,88%; 52/141; $p < 0,0001$) em relação aos demais tratamentos.
9 A proporção de folículos ovarianos pré-antrais íntegros está demonstrada na tabela 1.

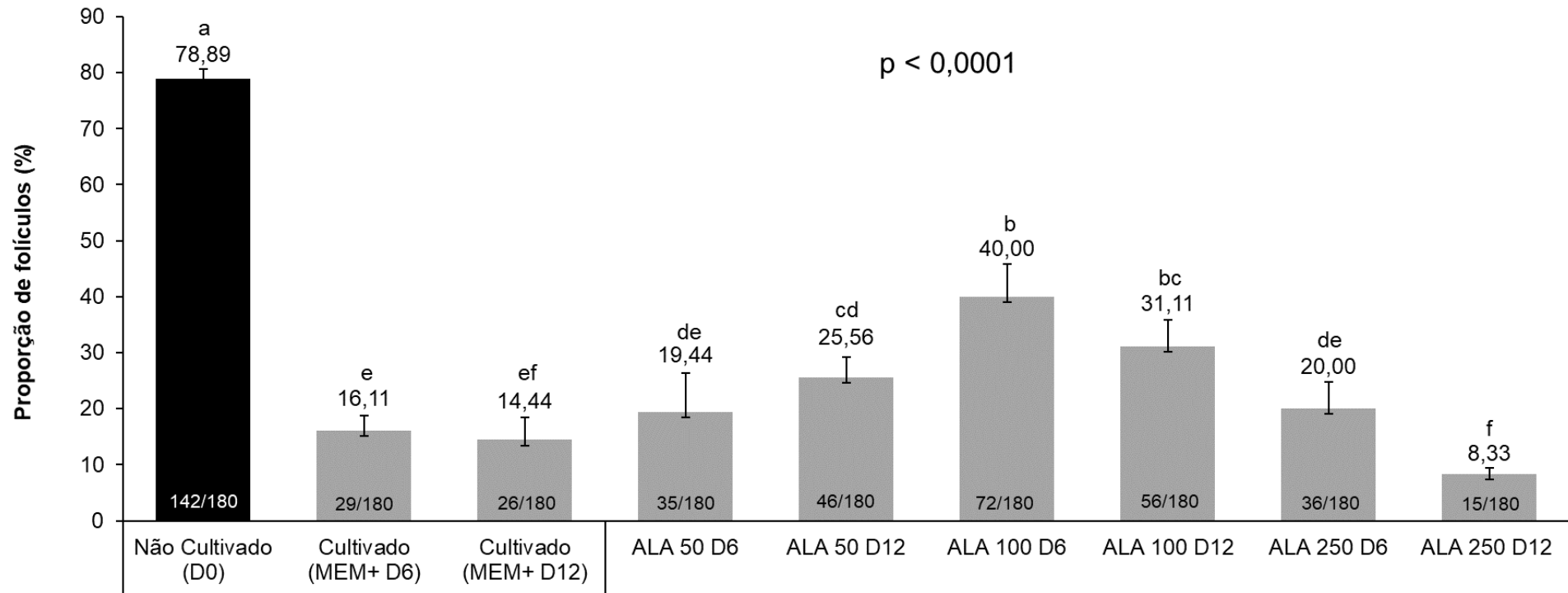


Figura 4 – Proporção de folículos ovarianos pré-antrais totais, classificados como íntegros, de fragmentos do córtex ovariano, de fêmeas *Bos taurus indicus* cultivados *in vitro* por 6 (D6) ou 12 (D12) dias em Meio Essencial Mínimo (MEM+) suplementado com diferentes concentrações (50, 100 ou 250 ng/mL) de Ácido Alfa Lipóico (ALA).

Letras minúsculas diferentes (a-f) significa diferença ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

1 **Tabela 1** – Porcentagem de folículos ovarianos pré-antrais íntegros, primordiais e em
 2 desenvolvimento, avaliados após o cultivo *in vitro* de fragmentos do córtex ovariano
 3 de fêmeas *Bos taurus indicus*, cultivado por 6 (D6) ou 12 (D12) dias com Meio
 4 Essencial Mínimo (MEM⁺) suplementado com diferentes concentrações (50, 100 ou
 5 250 ng/mL) de Ácido Alfa Lipóico (ALA).
 6

Tratamentos		Primordial	Desenvolvimento
		% (n/N)	% (n/N)
Controle Não Cultivado (D0)		83,64 ^a (92/110)	71,43 ^a (50/70)
Controle	MEM D6	26,98 ^c (17/63)	10,26 ^{fg} (12/117)
Cultivado	MEM D12	24,24 ^c (8/33)	12,24 ^{efg} (18/147)
	ALA 50 D6	24,14 ^c (7/29)	18,54 ^{def} (28/151)
Ácido Alfa	ALA 50 D12	20,83 ^c (5/24)	26,28 ^{cd} (41/156)
Lipóico	ALA 100 D6	51,28 ^b (20/39)	36,88 ^b (52/141)
	ALA 100 D12	33,33 ^{bc} (8/24)	30,77 ^{bc} (48/156)
	ALA 250 D6	21,43 ^c (9/42)	19,57 ^{de} (27/138)
	ALA 250 D12	20,00 ^c (2/10)	7,65 ^g (13/170)
Valor de p		< 0,0001	< 0,0001

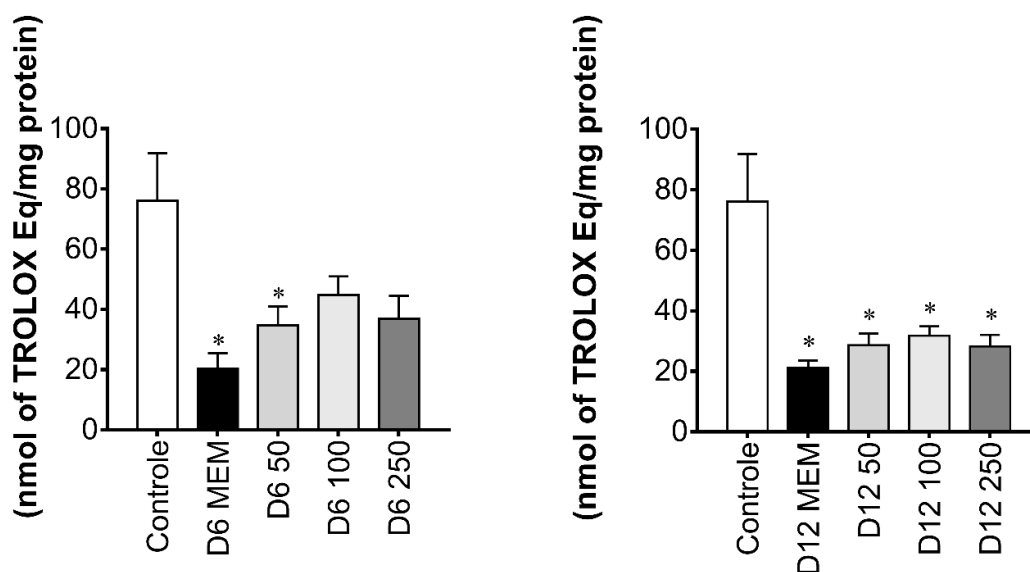
7 Letras minúsculas diferentes (a-g), na mesma coluna, significa diferença ($p < 0,05$) entre os
 8 tratamentos.

9

10 *Análise de Estresse Oxidativo*

11

12 Após o período de 6 e 12 dias de cultivo *in vitro*, as amostras de tecido
 13 ovariano apresentaram diminuição da capacidade antioxidante avaliada pelo ensaio
 14 de FRAP (média \pm EPM), quando comparadas ao controle não cultivado (D0), exceto
 15 os tratamentos suplementados com 100 e 250 ng/mL de Ácido Alfa Lipóico aos 6 dias
 16 de cultivo ($44,78 \pm 6,17$ nmol de TROLOX Eq/mg de proteína; $36,91 \pm 7,62$ nmol de
 17 TROLOX Eq/mg de proteína, respectivamente; $p \leq 0,05$). Os resultados encontrados
 18 pelo ensaio de FRAP estão representados na figura 5 e o que se espera é um aumento
 19 da capacidade antioxidante das amostras avaliadas.



1

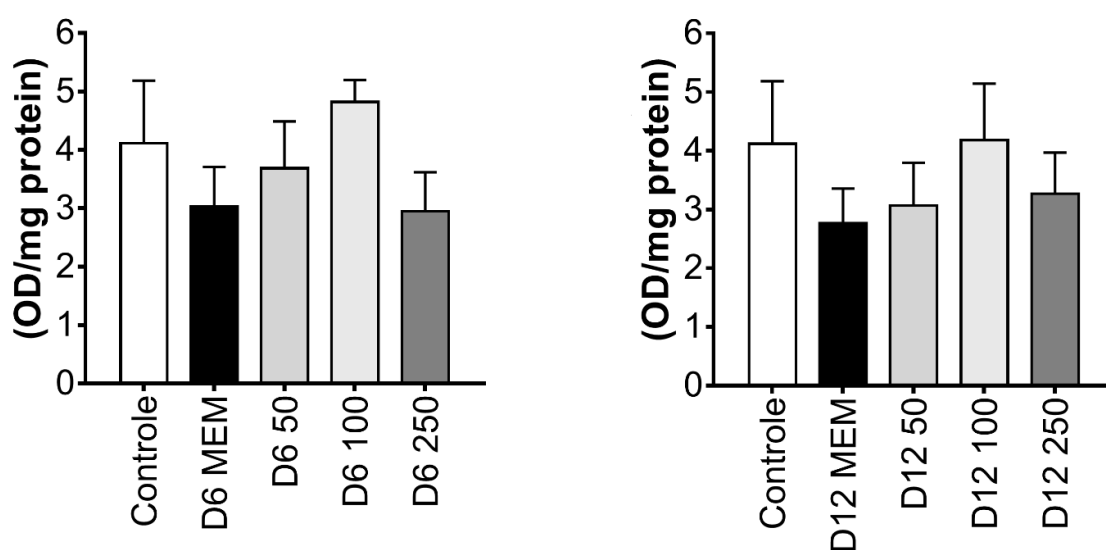
2 **Figura 5** – Efeito da suplementação com Ácido Alfa Lipóico (MEM⁺, 50, 100 ou 250
3 ng/mL) sobre a capacidade do tecido ovariano em resistir aos danos oxidativos através
4 da habilidade da redução do ferro (FRAP) após cultivo *in vitro* de 6 ou 12 dias.

5 * Diferem do controle não cultivado (D0).

6

7 Por outro lado, não foi observada diferença ($p > 0,05$) na produção de
8 ânions superóxido pelo ensaio NBT entre os tratamentos com a suplementação de
9 Ácido Alfa Lipóico. O que se espera é uma diminuição da produção de radicais livres
10 das amostras avaliadas (Figura 6).

11

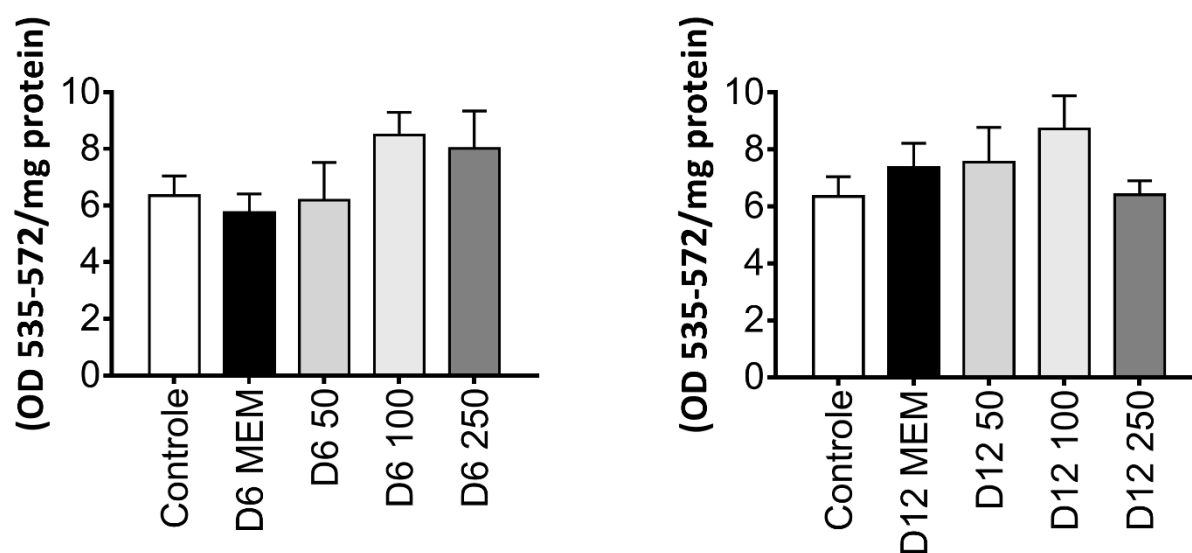


12

13 **Figura 6** - Efeito da suplementação com Ácido Alfa Lipóico (MEM⁺, 50, 100 ou 250
14 ng/mL) sobre a produção de ânion superóxido (NBT) após cultivo *in vitro* de 6 ou 12
15 dias.

1 Ao avaliarmos a degradação oxidativa dos lipídeos, pelo ensaio de
 2 TBARS, que considera a peroxidação lipídica, também observamos que não houve
 3 diferença ($p > 0,05$) entre os tratamentos quando comparado ao tratamento controle
 4 não cultivado (D0; Figura 7) O que se espera é uma diminuição da degradação lipídica
 5 das amostras avaliadas.

6



7

8 **Figura 7** - Efeito da suplementação com Ácido Alfa Lipóico (MEM⁺, 50, 100 ou 250
 9 ng/mL) sobre a peroxidação lipídica (TBARS) após cultivo *in vitro* de 6 ou 12 dias.

10

11 DISCUSSÃO

12

13 No presente estudo foi observado que a suplementação do meio de
 14 cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais bovinos com a concentração de 100
 15 ng/mL de Ácido Alfa Lipóico foi a mais eficiente em manter a integridade folicular, bem
 16 como manter os níveis de EROs estáveis ao longo de 12 dias de cultivo *in vitro*. Este
 17 é um dos poucos estudos em que utilizou o cultivo *in vitro* adicionado de uma matriz
 18 extracelular a base de agarose para avaliação do desenvolvimento e da integridade
 19 de folículos ovarianos pré-antrais, bem como, para avaliar o estresse oxidativo.

20

21 Ao observarmos a integridade folicular notamos que a suplementação
 22 de 100 ng/mL de Ácido Alfa Lipóico se mostrou eficiente em manter a integridade dos
 23 folículos cultivados após 6 ou 12 dias de cultivo *in vitro*. Corroborando com os nossos
 24 resultados, Zoheir et al. (2017), em um estudo realizado com folículos ovarianos pré-
 antrais de bovinos, observaram que a suplementação do meio de cultivo com Ácido

1 Alfa Lipóico (250 e 500 μM), ao longo de 15 dias, também promoveu o aumento do
2 desenvolvimento e do crescimento folicular. Gomes et al. (2018) também observaram
3 efeitos positivos sobre a preservação da morfologia e da integridade folicular com a
4 suplementação de Ácido Alfa Lipóico (50 e 100 μM) em cultivo *in vitro* de folículos
5 ovarianos pré-antrais de equinos, durante 2 dias de cultivo, corroborando com os
6 nossos resultados acerca da integridade folicular.

7 Considerando que o estresse oxidativo é um evento muito comum
8 durante o cultivo *in vitro*, no presente estudo não foi observada a produção de radicais
9 livres em nenhum dos períodos e concentrações de Ácido Alfa Lipóico testadas. Não
10 houve diferença entre controle não cultivado (D0), controle cultivado (MEM⁺) e os
11 tratamentos (50, 100 e 250 ng/mL) avaliados pelos ensaios de NBT (produção de
12 ânion superóxido) e TBARS (peroxidação lipídica).

13 O aumento na proporção de folículos em desenvolvimento, bem como
14 a diminuição do estresse oxidativo, também foi relatado em estudo realizado com
15 folículos ovarianos pré-antrais de ratas suplementando o meio de cultivo com 100 μM
16 de Ácido Alfa Lipóico, por um período de 12 dias (Hatami et al., 2014). Em
17 concentrações fisiológicas, os antioxidantes protegem as células contra os diferentes
18 danos causados pelo estresse oxidativo. As EROs são geradas tanto pelo
19 metabolismo das células, como por diversos fatores externos, tais como, altas
20 concentrações de oxigênio, luminosidade do ambiente e manipulação dos fragmentos
21 ovarianos *in vitro*, influenciando o metabolismo geral das células. O resultado do
22 excesso de produção de radicais livres leva a um desequilíbrio no qual uma
23 quantidade excessiva de EROs é liberada, levando ao estresse oxidativo (Goto et al.,
24 1992; Combelles; Gupta; Agarwal, 2009; Gomes et al., 2018), fator pelo qual
25 decidimos suplementar o meio de cultivo com Ácido Alfa Lipóico, visando diminuir o
26 estresse oxidativo causado pelas EROs.

27 A produção de EROs *in vivo* é um subproduto da cadeia respiratória
28 das mitocôndrias, equilibrado pela presença fisiológica de antioxidantes nas células
29 (Agarwal; Gupta; Sharma, 2005; Agarwal; Gupta; Sikka, 2006). As baixas
30 concentrações de EROs podem ser positivas tanto para a maturação como para
31 competência e desenvolvimento dos oócitos (Halliwell; Gutteridge, 1988; Blondin;
32 Coenen; Sirard, 1997). Neste contexto, a suplementação do meio de cultivo com Ácido
33 Alfa Lipóico busca melhorar as condições de cultivo *in vitro*. Desta forma, os resultados
34 deste estudo contribuirão para o aprimoramento do sistema de cultivo *in vitro* de

1 folículos ovarianos pré-antrais na espécie bovina, além de contribuir para um melhor
2 controle do estresse oxidativo.

3 Sabendo da importância de um ambiente equilibrado para promover
4 o adequado desenvolvimento *in vitro*, o objetivo deste experimento foi identificar a
5 melhor concentração de Ácido Alfa Lipóico (100 ng/mL) no cultivo *in vitro* de folículos
6 ovarianos pré-antrais de fêmeas *Bos taurus indicus*. Diversos benefícios já foram
7 relatados com a suplementação do Ácido Alfa Lipóico para outras espécies, mas em
8 quantidades excessivas, o Ácido Alfa Lipóico pode ser prejudicial para as células
9 foliculares. Talebi et al. (2012) observaram que a concentração de 500 μ M de Ácido
10 Alfa Lipóico ocasionou um aumento na taxa de degeneração de folículos ovarianos
11 pré-antrais de ratas. Outros estudos também relatam que uma exposição prolongada
12 ao Ácido Alfa Lipóico resulta em um aumento da peroxidação lipídica, danos
13 mitocondriais e ainda uma inibição da síntese de glicogênio, além de interromper
14 ciclos celulares e provocar a morte celular (Moini; Packer; Saris, 2002; Marsh et al.,
15 2005; Wenzel; Nickel; Daniel, 2005; Cakatay, 2006). Dessa forma, ajustes nas
16 concentrações de Ácido Alfa Lipóico e no período de cultivo podem ser necessários
17 para melhorar a integridade folicular e a capacidade antioxidante dos folículos em
18 cultivos de longo prazo. Para isso, buscamos compreender melhor a foliculogênese e
19 os distúrbios reprodutivos associados à infertilidade animal e humana.

20

21 **CONCLUSÃO**

22

23 Em conclusão, a suplementação do meio de cultivo *in vitro* de folículos
24 ovarianos pré-antrais com a concentração de 100 ng/mL de Ácido Alfa Lipóico, após
25 6 dias de cultivo, foi a mais eficiente em promover o desenvolvimento folicular, manter
26 a integridade folicular, bem como manter os níveis de espécies reativas de oxigênio
27 estáveis.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R. Oxidative stress and its implications in female infertility - a clinician's perspective. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 11, p. 641-650, 2005.

AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SIKKA, S. The role of free radicals and antioxidants in reproduction. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v. 18, p. 325-332, 2006.

ANDRADE, E. R.; MELO-STERZA, F. A.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, p. 79-85, 2010.

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, p. 1-14, 2014.

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

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**, v. 26, n. 5, p. 417-423, 2018.

BLONDIN, P.; COENEN, K.; SIRARD, M. A. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. **Journal of Andrology**, v. 18, p. 454-460, 1997.

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, p. 243–250, 2016.

CAKATAY, U. Pro-oxidant actions of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. **Medical hypotheses**, v. 66, p. 110-117, 2006.

COMBELLES, C. M.; GUPTA, S.; AGARWAL, A. Could oxidative stress influence the *in vitro* maturation of oocytes? **Reproductive BioMedicine Online**, v. 18, p. 864-880, 2009.

DE SÁ, N. A. R.; FERREIRA, A. C. A.; SOUSA, F. G. C.; DUARTE, A. B. G.; PAES, V. M. CADENAS, J.; ANJOS, J. C.; FERNANDES, C. C. L.; ROSSETO, R.; CIBIN, F. W. S.; ALVES, B. G.; RODRIGUES, A. P. R.; RONDINA, D.; GASTAL, E. L.; FIGUEIREDO, J. R. First pregnancy after *in vitro* culture of early antral follicles in goats: Positive effects of anethole on follicle development and steroidogenesis. **Molecular Reproduction and Development**, v. 87, p. 1-12, 2020.

FIGUEIREDO, J. R.; LIMA, L. F.; SILVA, J. R. V.; SANTOS, R. R. Control of growth and development of preantral follicle: insights from *in vitro* culture. **Animal Reproduction**, v. 35, p. 648–659, 2018.

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

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.

GOMES, R. G.; SILVA, C. B.; GONZALEZ, 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.

GOTO, Y.; NODA, Y.; NARIMOTO, K.; UMAOKA, Y.; MORI, T. Oxidative stress on mouse embryo development *in vitro*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 13, p. 47-53, 1992.

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

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Free radicals and antioxidant protection: mechanisms and significance in toxicology and disease. **Human Toxicology**, v. 7, p. 7-13, 1988.

HATAMI, S.; ZAVAREH, S.; SALEHNIA, M.; LASHKARBOLOUKI, T.; KARIMI, I. Comparison of oxidative status of mouse pre-antral follicles derived from vitrified whole ovarian tissue and vitrified preantral follicles in the presence of alpha lipoic acid. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 40, p. 1680-1688, 2014.

HATZIRODOS, N.; HUMMITZSCH, K.; IRVING-RODGERS, H. F.; HARLAND, M. L.; MORRIS, S. E.; RODGERS, R. J. Transcriptome profiling of granulosa cells from bovine ovarian follicles during atresia. **BMC Genomics**, v.15, p. 1-26, 2014.

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

MARSH, S. A.; PAT, B. K.; GOBE, G. C.; COOMBES, J. S. Evidence for a non-antioxidant, dose-dependent role of alpha-lipoic acid in caspase-3 and ERK₂ activation in endothelial cells. **Apoptosis**, v. 10, p. 657-665, 2005.

MATSUDA, F.; INOUE, N.; MANABE, N.; OHKURA, S. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: Regulation by survival and death of granulosa cells, review. **Journal of Reproduction and Development**, v. 58, p. 44-50, 2012.

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. 54, p. 687-691, 2018.

MOINI, H.; PACKER, L.; SARIS, N. E. Antioxidant and prooxidant activities of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 182, p. 84-90, 2002.

PACKER, L.; WITT, E. H.; TRITSCHLER, H. J. Alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 19, p. 227-250, 1995.

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.

SILVA, A. W. B.; RIBEIRO, R. P.; MENEZES, V. G.; BARBERINO, R. S.; PASSOS, J. R. S.; DAUC, A. M. P.; COSTA, J. J. N.; MELO, L. R. F.; BEZERRA, F. T. G.; DONATO, M. A. M.; PEIXOTO, C. A.; MATOS, M. H. T.; GONÇALVES, P. B. D.; VAN DEN HURKE, R.; SILVA, J. R. V. Expression of TNF- α system members in bovine ovarian follicles and the effects of TNF- α or dexamethasone on preantral follicle survival, development and ultrastructure *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v. 182, p. 56-68, 2017.

SILVA, G. M.; ARAÚJO, V. R.; DUARTE, A. B. G.; LOPES, C. A. P.; FIGUEIREDO, J. R. Papel dos antioxidantes no cultivo *in vitro* de células ovarianas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, p. 315-326, 2011.

TALEBI, A.; ZAVAREH, S.; KASHANI, M. H.; LASHGARBLUKI, T.; KARIMI, I. The effect of alpha lipoic acid on the developmental competence of mouse isolated preantral follicles. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 29, p. 175-183, 2012.

WENZEL, U.; NICKEL, A.; DANIEL, H. Alpha-Lipoic acid induces apoptosis in human colon cancer cells by increasing mitochondrial respiration with a concomitant O₂-* generation. **Apoptosis**, v. 10, p. 359-368, 2005.

ZOHEIR, K. M. A.; HARISA, G. I.; ALLAM, A. A.; LIGUO, Y.; LI, X.; LIANG, A.; ABD-RABOU, A. A.; HARRATH, A. H. Effect of alpha lipoic acid on *in vitro* development of bovine secondary preantral follicles. **Theriogenology**, v. 88, p. 124-130, 2017.

1 7 CONCLUSÕES GERAIS

2

3

Os resultados obtidos nos permitem concluir que:

4

5

- Folículos ovarianos pré-antrais inclusos em fragmentos ovarianos bovinos, provenientes de abatedouro, podem ser cultivados *in vitro* ao longo de 6 dias, com meio suplementado com antioxidantes (Ácido Ascórbico ou Ácido Alfa Lipóico), sem comprometimento da integridade e do desenvolvimento folicular;

9

10

- A suplementação do meio de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais com Ácido Ascórbico, promoveu o desenvolvimento de folículos ovarianos pré-antrais e a concentração de 100 ng/mL, após 6 dias de cultivo *in vitro*, foi eficiente em manter a integridade folicular, bem como manter os níveis de EROs estáveis, minimizando parte dos impactos ocasionados pelo estresse oxidativo;

15

16

- A suplementação do meio de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais, com Ácido Alfa Lipóico, com a concentração de 100 ng/mL, após 6 dias de cultivo *in vitro*, foi eficiente em manter a integridade folicular, bem como manter os níveis de EROs estáveis, minimizando parte dos impactos ocasionados pelo estresse oxidativo.

21

22

Os resultados obtidos sobre os benefícios proporcionados pelos antioxidantes são de extrema importância para o direcionamento de futuros trabalhos que viabilizem o uso dessa biotécnica de forma rotineira no Brasil. Desta forma, é imprescindível que mais estudos sejam realizados visando aprimorar cada vez mais o sistema de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais, na espécie bovina, e responder as questões sobressalentes sobre o estresse oxidativo, especialmente no que diz respeito ao sistema reprodutor feminino.

28

APÊNDICES

**Produção Científica Desenvolvida Durante o Período de Doutorado
(2017-2020)**

Artigos Submetidos

BIZARRO-SILVA, C.; BERGAMO, L. Z.; CERZETTI, M. B.; HOHMANN, M. S.; VERRI JUNIOR, W. A.; SUDANO, M. J.; SENEDA, M. M. Establishment of *in vitro* culture methods for bovine preantral follicles as a model for assisted reproduction. 2020.

Artigos Publicados

GARCIA, S. M.; LUNARDELLI, P. A.; ANCIOTO, K. L.; OLIVEIRA, E. C.; BERGAMO, L. Z.; ZANGIROLAMO, A. F.; SENEDA, M. M. Effect of the antral follicle count of *Bos taurus* x *Bos indicus* dairy cows on *in vitro* embryo production. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 41, p. 2171-2178, 2020.

SENEDA, M. M.; ZANGIROLAMO, A. F.; BERGAMO, L. Z.; MOROTTI, F.; Follicular wave synchronization prior to ovum pick-up. **Theriogenology**, v. 150, p. 180-185, 2020.

ZANGIROLAMO, A. F.; SOUZA, A. K.; BERGAMO, L. Z.; SANCHES, T. K.; SILVA, N. C.; SENEDA, M. M. Recuento de folículos antrales en bovinos: ventajas, desafíos y datos controvertidos en IA y producción de embriones. **Revista Taurus - La Revista de Reproducción Animal**, v. 21, n. 81, p. 4-14, 2019.

SOUZA, A. C. C.; COSTA, C. B.; SILVA, C. B.; BERGAMO, L. Z.; MOROTTI, F.; SENEDA, M. M. Contagem de folículos antrais e subespécie: Influência das características da doadora sobre a produção *in vitro* de embriões bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 43, n. 1, p. 13-17, 2019.

CEREZETTI, M. B.; BERGAMO, L. Z.; COSTA, C. B.; SILVA, C. B.; SENEDA, M. M. Alternativas para substituição do uso de implantes vaginais de progesterona na Inseminação Artificial em Tempo Fixo em bovinos. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 6, n. 2, p. 416-433, 2019.

ZANGIROLAMO, A. F.; SOUZA, A. K.; BERGAMO, L. Z.; SILVA, N. C.; SANCHES, T. K.; SENEDA, M. M. Applications of embryo transfer biotechnology in dairy cattle. **Spermova**, v. 8, n. 1, p. 29-32, 2018.

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, s. 1, p. 1307-1311, 2017.

MOROTTI, F.; CAMPOS, J. T.; LUNARDELLI, P. A.; COSTA, C. B.; BERGAMO, L. Z.; BARREIROS, T. R. R.; SANTOS, G. M. G.; SENEDA, M. M. Injectable progesterone in timed artificial insemination programs in beef cows. **Animal Reproduction**, v. 15, n. 1, p. 17-22, 2017.

**Establishment of *in vitro* culture methods for bovine preantral follicles as a model
for assisted reproduction**

Abridged title: *In vitro* culture methods for preantral follicles

Camila Bizarro-Silva^{1*}; Larissa Zamparone Bergamo¹; Marcela Bortoletto Cerezzetti¹;
Miriam S. Hohmann²; Waldiceu A. Verri, Jr²; Mateus José Sudano^{3,4}; Marcelo
Marcondes Seneda¹

¹ Laboratory of Animal Reproduction, University of Londrina (UEL), Paraná, 86051-990,
Cx. Postal: 10.011, Brazil

² Department of Pathological Sciences, University of Londrina (UEL), Londrina, Paraná,
Brazil

³ Centro de Ciências Naturais e Humanas, Universidade Federal do ABC, Santo André,
SP, Brasil

⁴ Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos,
SP, Brasil

* Corresponding author

E-mail: camilabizarros@gmail.com

Abstract

The purpose of this study was to evaluate the efficiency of two-dimensional and three-dimensional systems for the *in vitro* culture of preantral follicles from bovine species. The fragments were obtained from a local slaughterhouse and were randomly distributed

DOI: 10.5433/1679-0359.2020v41n5Supl1p2171

Effect of the antral follicle count of *Bos taurus* × *Bos indicus* dairy cows on *in vitro* embryo production

Efeito da contagem de foliculos antrais de vacas *Bos taurus* x *Bos indicus* com aptidão leiteira na produção *in vitro* de embriões

Sheila Merlo Garcia¹; Paula Alvares Lunardelli²; Kleber Luciano Ancioto³; Eduardo Cardoso de Oliveira⁴; Larissa Zamparone Bergamo⁵; Amanda Fonseca Zangirolamo⁶; Marcelo Marcondes Seneda^{7*}

Highlights:

Antral follicle count (AFC) is an important reproductive characteristic in cattle.

AFC positively influenced the pregnancy rate in Girolando cow.

Girolando cow with high AFC had better IVEP success rates than those with low AFC.

Abstract

This study aimed to evaluate the potential of Girolando (*Bos taurus* × *Bos indicus*) cows with high and low antral follicle counts (AFC) for the *in vitro* production of bovine embryos (IVEP), as well as the pregnancy rates of the recipients of these embryos. Girolando cows (*Bos taurus* × *Bos indicus*) were classified as high and low AFC when they had 35-52 (n = 13) and 11-17 follicles (n = 15), respectively. All animals were subjected to repeated follicular aspiration [Ovum pick-up (OPU)] and subsequent IVEP sessions. The synchronization protocol of the recipients was performed on a random day of the estrous cycle (Day 0) with the implantation of progesterone, estradiol benzoate, and prostaglandin. The high AFC group had higher aspirated oocyte/OPU (42.6 ± 5.2 vs. 14.6 ± 1.9 ; $p < 0.01$) and cultured oocyte/OPU (38.1 ± 6.6 vs. 12.3 ± 2.8 ; $p < 0.01$) averages as well as a higher blastocyst percentage on D7 ($23.0 \pm 1.0\%$ vs. $18.4 \pm 1.5\%$; $p < 0.05$) and higher pregnancy rate ($42.7 \pm 2.7\%$ vs. $39.7 \pm 4.6\%$; $p < 0.05$) than the low AFC group. Thus, we can conclude that animals with high AFC had better IVEP success rates than animals with low AFC.

Key words: AFC. OPU. Embryo production. *Bos taurus* × *Bos indicus*.

¹ Prof^a Dr^a, Universidade do Oeste Paulista, UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil. E-mail: sheila@unoeste.br

² Dr^a, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, PR, Brasil. E-mail: palunardelli@hotmail.com

³ Gene Up, Presidente Prudente, SP, Brasil. E-mail: kleberancioto@geneup.com.br

⁴ M.e., Programa de Pós-Graduação em Matemática Aplicada e Computacional, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Presidente Prudente, SP, Brasil. E-mail: edcarov@gmail.com

⁵ Discente do Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, UEL, Londrina, PR, Brasil. E-mail: larissabergamo1@hotmail.com

⁶ Pós-Dr^a, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, UEL, Londrina, PR, Brasil. E-mail: amandafzvet@gmail.com

⁷ Prof. Dr., Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Departamento de Clínicas Veterinárias, UEL, Londrina, PR, Brasil. E-mail: marcelo.seneda@uel.br

* Author for correspondence



Contents lists available at ScienceDirect

Theriogenology

journal homepage: www.theriojournal.com

Follicular wave synchronization prior to ovum pick-up

Marcelo Marcondes Seneda ^{a, b, *}, Amanda Fonseca Zangirolamo ^{a, b},
Larissa Zamparone Bergamo ^a, Fábio Morotti ^a

^a Universidade Estadual de Londrina, Laboratório de Reprodução Animal, DCV-CCA-UEL, Londrina, Parana, Brazil

^b National Institute of Science and Technology for Dairy Production Chain (INCT-LEITE), Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid-Campus Universitário, PO Box 10011, Londrina, Parana, 86057-970, Brazil



ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 January 2020

Accepted 12 January 2020

Available online 14 January 2020

Keywords:

Follicular wave

Synchronization

OPU

IVEP

Bovine

ABSTRACT

Among the reproductive biotechnologies, *in vitro* embryo production (IVEP) is an important tool for multiplying genetic material of superior merit. Recently, the number of embryos produced and transferred *in vitro* became significantly higher than that produced *in vivo* worldwide. In this context, the enhancement was attributable to *ovum pick-up* (OPU). With the advent of genomic technology, shortened breeding intervals, and increased selection accuracy, IVEP has attracted increasing attention for commercial use. The IVEP technique is well-established, but the embryo production rate has reached a plateau at 30–40%. Despite constant advances, the OPU/IVEP programs face some challenges that hinder the efficient application of the technique. Previous studies have shown that the quantity and quality of aspirated oocytes are essential factors for successful IVEP. This paper presents a brief overview of alternatives that can be employed to improve the process-seeking methods that assist in the recovery of better-quality oocytes and higher competence in OPU to improve embryo production. These strategies include using follicular wave synchronization prior to OPU, employing the influence of antral follicle populations, using the pre-OPU gonadotrophic stimulus and applying non-hormonal methods for selecting female donors.

© 2020 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

The development and use of biotechnology are indispensable for increasing reproductive efficiency. In this context, *in vitro* embryo production (IVEP) is a useful tool when performing the selection and breeding of genetically superior animals [1]. The number of *in vitro*-produced embryos has grown exponentially worldwide in recent years. According to the International Embryo Technology Society (IETS) (2017), for the first time, the number of embryos produced *in vitro* was significantly higher compared to the number of embryos produced *in vivo* worldwide (Fig. 1) [2].

Currently, genomic analysis significantly affects IVF programs [1]. With the rise of genomics, IVF has become a considerably more powerful tool in genetic improvement. Genomic selection has revolutionized the breeding of livestock, increased selection accuracy, and shortened the breeding interval [3]. This tool has been

successfully used to optimize the collection and use of gametes from pre-pubertal females and males, aiming at more accurate measurement of genetic merit for young animals [3]. Moreover, genomic analysis can be used to evaluate the quality and viability of oocytes and embryos before transfer procedures [4]. In addition, the use of RNA-seq analysis in embryos from different culture conditions directs efforts to improve current culture media in IVEP [1].

However, despite constant advances in IVF, the blastocyst rate rarely exceeds 40–50% [5], which is highly similar to that obtained in the years 1990–2000 [1]. Thus, laboratories and companies have been seeking strategies that serve to improve and optimize methods to use IVF in large-scale programs.

The quality of the oocyte is the central factor interfering with embryo production and is a potential explanation for the limited success rates of OPU/IVEP [5]. During OPU, oocytes are recovered on random days of the estrous cycle; therefore, there are follicles at different stages of development [6]. Consequently, more than 85% of aspirated ovarian follicles have some degree of atresia [7]. In this context, follicular wave synchronization prior to OPU was recently observed to improve the embryo production rates, as well as the

* Corresponding author. Laboratório de Reprodução Animal, DCV, CCA, UEL, Londrina, PR, Cep, 86057-970, Cx. Postal: 10.011, Brazil.

E-mail addresses: marcelo.seneda@uel.br, marcelo.seneda@gmail.com (M.M. Seneda).

Recuento de folículos antrales en bovinos: ventajas, desafíos y datos controvertidos en IA y producción de embriones

Zangirolamo, A.F.^(1,2); Souza, A.K.^(1,2); Bergamo, L.Z.⁽²⁾; Sanches, T.K.^(1,2); da Silva, N.C.⁽²⁾; Seneda, M.M.^(1,2)

Resumen

Las biotécnicas reproductivas han colaborado mucho para el mejoramiento de los rodeos. El progreso genético logrado por generación en la especie bovina es acelerado a medida que la eficiencia reproductiva aumenta con el uso de técnicas como la inseminación artificial (IA) y la producción in vitro de embriones (PIVE). Así, la selección de hembras con mejor fertilidad para ser incluidas en programas reproductivos ha sido cada vez más cuidadosa y el recuento de folículos antrales (RFA) se ha convertido en una herramienta auxiliar en esta evaluación. Diversos trabajos vienen demostrando que el RFA está asociado a índices que reflejan fertilidad, teniendo la ventaja de ser un parámetro de alta repetibilidad a lo largo de la vida del animal. Sin embargo, se han reportado datos controvertidos al considerar diferentes subespecies y biotécnicas. En general, las hembras *Bos taurus* con alto RFA son consideradas más fértiles, no obstante, estudios más recientes demostraron que al monitorear la vida reproductiva de estos animales por un período mayor, se observó un mejor desempeño para aquellas de bajo RFA. De la misma manera, en *Bos indicus*, mientras que en la PIVE se evidencia una ventaja cuantitativa en la tasa de producción embrionaria para aquellas hembras que tienen alto RFA, fue descrito por algunos grupos de investigación que en la IA, la mayor tasa de preñez fue alcanzada en hembras con bajo RFA. De esta forma, aún es necesario elucidar mejor diversas cuestiones que interfieren en el uso del RFA como un parámetro reproductivo a ser aplicado en el campo. Entre estos factores se destaca el efecto del score corporal y de la ganancia de peso, fase gestacional, momento de la onda de crecimiento folicular en el desarrollo del ovocito incluido en los folículos, patrones de clasificación del RFA, además de aspectos epigenéticos y de la foliculogénesis de cada subespecie. En definitiva, a pesar de que el uso del RFA como una herramienta auxiliar en la evaluación de la fertilidad en hembras puede ser importante, nuevos estudios vienen demostrando que ese parámetro no es algo tan consolidado y establecido, por lo que es necesario considerar los diversos aspectos que pueden interferir en el RFA, así como en la eficiencia de los programas reproductivos en bovinos.

(1) Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para a Cadeia Produtiva do Leite (INCT-LEITE), Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid-Campus Universitário, Cx Postal 10.011, Londrina, Paraná 86057-970, Brasil.

(2) Laboratório de Reprodução Animal, DCV-CCA-UEL, Londrina, Paraná, Brasil.

+55 43 3371 5622; FAX: +55 43 3371 4063. marcelo.seneda@uel.br.

Trabajo presentado en el "Cuarto Congreso Internacional de Tecnologías Embrionarias de la SATE", 27 y 28 de septiembre de 2018, Centro Cultural Universitario UNICEN, Tandil, Argentina.



Influência da contagem de folículos antrais na produção *in vitro* de embriões bovinos de doadoras *Bos indicus* e *Bos taurus* – Revisão de literatura

Influence of the antral follicle count on bovine in vitro embryo production from Bos indicus and Bos taurus donors

Ana Clara Canto Souza, Camila Bortoliero Costa, Camila Bizarro da Silva, Larissa Zamparone Bergamo, Fábio Morotti, Marcelo Marcondes Seneda

Universidade Estadual de Londrina (UEL), Laboratório de Reprodução Animal, Londrina, PR, Brasil.

Resumo

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotécnica que se consolidou nos últimos anos e seu uso em bovinos continua a expandir-se, especialmente no Brasil. A facilidade em obter oócitos e as características do rebanho brasileiro foram determinantes para este crescimento. É conhecido que animais *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus* possuem diferenças fisiológicas, metabólicas, endócrinas e comportamentais que impactam diretamente a reprodução. Além disso, a contagem de folículos antrais (CFA) é um parâmetro conhecidamente repetível no indivíduo, mas seu impacto na reprodução das fêmeas ainda não está completamente elucidado, especialmente considerando suas interações com a subespécie. O objetivo da presente revisão é destacar os mecanismos pelos quais estas características influenciam o rendimento e aplicabilidade da produção *in vitro* de embriões bovinos.

Palavras-chave: *Bos indicus*, *Bos taurus*, contagem de folículos antrais, produção *in vitro* de embriões.

Abstract

In vitro embryo production (IVP) is a well established biotechnic, and its use in bovines is still expanding, especially in Brazil. The facility to obtain oocytes associated to the breed characteristics of the Brazilian herd were decisive for this expansion. It is known that the physiology, metabolism, endocrinal system and behavior are different for Bos taurus indicus and Bos taurus taurus animals, and these differences may impact directly on the characteristics of reproduction of these animals. Furthermore, the antral follicle count (AFC) is known to present high repeatability on the same female, but its impact on the female reproduction remains unclear, either in the interaction between AFC and subspecies. The aim of this review is to highlight the mechanisms through which the AFC and subspecies may influence the income and feasibility of bovine in vitro embryo production.

Keywords: *antral follicle count, Bos indicus, Bos taurus, in vitro embryo production.*

Introdução

A produção *in vitro* de embriões (PIVE), a partir de 1995, obteve uma grande expansão, com destaque para o Brasil que figura hoje como um dos países mais importantes no mercado mundial de embriões (Hasler, 2014). São produzidos no mundo, cerca de 666 mil embriões pelo método *in vitro*, dos quais 346 mil são produzidos no Brasil (IETS, 2017).

Estudos recentes têm demonstrado a influência das características da doadora na qualidade dos oócitos obtidos, alterando significativamente os resultados da técnica (Batista et al., 2016). Ireland et al. (2007) observaram uma maior quantidade de oócitos recuperados e número de embriões produzidos a partir de doadoras com alta CFA quando comparada com aquelas de baixa CFA. Outros estudos também demonstram vantagens quantitativas da alta CFA para a produção de embriões, estudando individualmente animais *Bos taurus* (Ireland et al., 2007, 2009; Mossa et al., 2012) animais *Bos indicus* (Santos et al., 2016) ou seus cruzamentos (Pontes et al., 2010). Neste contexto, esta revisão visa discutir a influência da CFA de fêmeas bovinas, das subespécies *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus*, sobre a produção e a qualidade de embriões produzidos *in vitro*.

A produção de embriões bovinos ao longo dos anos

A partir de 2005, a produção mundial de embriões alcançou números recordes, e pela primeira vez, em 2015, a produção *in vitro* de embriões bovinos superou a produção *in vivo* (IETS, 2016), reflexo do crescimento expressivo do uso da técnica de aspiração folicular guiada por ultrassom (*Ovum Pick-Up* - OPU) associada as técnicas de maturação, fertilização e cultivo *in vitro*, especialmente na América do Sul.

A América do Norte lidera hoje a produção mundial de embriões obtidos *in vivo*. Por outro lado, na produção *in vitro* de embriões obtidos a partir da OPU, o Brasil se destaca como líder mundial (IETS, 2016, 2017). O país teve um crescimento histórico a partir de 1998 com a utilização das técnicas de OPU e PIVE associadas,

ALTERNATIVAS PARA SUBSTITUIÇÃO DO USO DE IMPLANTES VAGINAIS DE PROGESTERONA NA INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL EM TEMPO FIXO EM BOVINOS

(Alternatives for replacing the use of vaginal progesterone implants in the Fixed Time Artificial Insemination in cattle)

CEREZETTI, Marcela Bortoletto¹; BERGAMO, Larissa Zamparone^{2*}; COSTA, Camila Bortoliero³; SILVA, Camila Bizarro da⁴; SENEDA, Marcelo Marcondes⁵

1. Mestranda em Clínicas Veterinárias, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brasil.
2. Doutoranda em Ciência Animal na área de Reprodução de Grandes Animais, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brasil.
3. Doutoranda em Farmacologia e Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Departamento de Farmacologia, Botucatu, SP, Brasil.
4. Doutora em Ciência Animal na área de Reprodução de Grandes Animais, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brasil.
5. Professor Doutor, Departamento de Clínicas Veterinárias, Laboratório de Reprodução Animal, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Londrina, PR, Brasil.

*Autor para correspondência: larissabergamo1@hotmail.com

Artigo enviado em: 03/10/2018, aceito para publicação em 20/02/2019

DOI: <http://dx.doi.org/10.4025/revcivet.v6i2.44851>

RESUMO

A progesterona (P4) é um dos principais hormônios responsáveis pela ciclicidade reprodutiva e atua na manutenção da gestação em vacas. Esse hormônio caracteriza-se pela rápida metabolização, o que leva a necessidade de disponibilizá-lo de forma lenta a fim de mimetizar sua liberação fisiológica. Diferentes dispositivos de liberação dos progestágenos associados à aplicação de ésteres de estrógeno são utilizados com frequência em protocolos para sincronizar as ondas foliculares e ovulação. Entre os dispositivos liberadores de progestágenos, o mais utilizado é o intravaginal, sendo disponíveis outras alternativas de dispositivos como o auricular, oral, injetável e o adesivo transdérmico. Dessa forma, conhecer as alternativas de implantes de P4 é importante para garantir a eficiência dos protocolos reprodutivos, assim como o bem-estar animal e o desenvolvimento de novos dispositivos de P4. O objetivo dessa revisão é descrever as principais alternativas de implantes de progesterona utilizados na inseminação artificial em tempo fixo (IATF) bem como suas vantagens e desvantagens.

Palavras chaves: biotecnologia; dispositivos de progesterona; reprodução animal; IATF.

ABSTRACT

The Progesterone (P4) is one of the main hormones for the recovery of reproductive energy and acts in the maintenance of pregnancy in cows. This hormone is characterized by rapid metabolism, which makes it necessary for the availability of slow form to mimic its physiological release. Different progestogen releasing

APPLICATIONS OF EMBRYO TRANSFER BIOTECHNOLOGY IN DAIRY CATTLE

Aplicaciones de la biotecnología de transferencia de embriones en ganado lechero

Amanda Fonseca Zangirolamo^{1,2}, Anne Kemmer Souza^{1,2}, Larissa Zamparone Bergamo²,
Nathália Covre da Silva², Tamires Korchovei Sanches^{1,2}, Marcelo Marcondes Seneda^{1,2}

1 National Institute of Science and Technology for Dairy Production Chain (INCT-LEITE), Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid-Campus Universitário, PO Box 10011, Londrina, Paraná 86057-970, Brazil.

2 Laboratory of Animal Reproduction, DCV-CCA-UEL, Londrina, Paraná, Brazil.

* Corresponding author

Marcelo Marcondes Seneda, Laboratório de Reprodução Animal, DCV, CCA, UEL, Londrina - PR. Cep: 86057-970, Cx. Postal: 10.011, Brazil. Tel.: +55 43 3371 5622; FAX: +55 43 3371 4063.

E-mail:
marcelo.seneda@uel.br

ABSTRACT

The dairy sector plays an important role in global socioeconomic scenarios. However, world milk production experienced a modest growth rate of only 0.5% during 2017, a smaller increase than any time in the last decade. Therefore, the more effective application of biotechniques related to bovine reproduction is an alternative to support the large-scale production of dairy cattle. Among the different reproductive biotechnologies, embryo transfer (ET) maximizes the reproduction of the herd through improved genetics and the ability to guarantee the birth of a greater number of females. In general, embryos are more resistant to thermal stress compared to gametes, representing an advantage over the application of biotechniques such as artificial insemination (AI) and fixed-time artificial insemination (FTAI). Thus, ET together with the benefits from the application of sexed semen and in vitro embryo production (IVEP) are some of the main strategies for the necessary modifications that aim to improve the dairy cattle sector. This review summarizes the main advantages of embryo transfer biotechnology for increasing reproductive efficiency and production in dairy cattle.

Keywords: *Bos taurus taurus*, bovine embryo transfer, reproductive biotechniques

RESUMEN

El sector lácteo tiene un papel importante en el escenario socioeconómico global. Sin embargo, la producción mundial de leche experimentó una tasa de crecimiento moderada del 0,5% durante 2017, lo que representó un aumento menor en comparación con el logrado en la última década. En vista de esto, la aplicación más efectiva de biotecnologías relacionadas con la reproducción bovina es una alternativa para apoyar la producción de ganado lechero a gran escala. Entre las diferentes biotecnologías reproductivas, la transferencia de embriones (TE) maximiza la reproducción del rebaño, con un alto beneficio genético, al mismo tiempo que garantiza el nacimiento de un mayor número de hembras. En general, el embrión es más resistente al estrés térmico en comparación con los gametos, lo que representa una ventaja sobre la aplicación de biotécnicas como la inseminación artificial IA e inseminación artificial en tiempo fijo - IATF, por ejemplo. Por lo tanto, la TE junto con los beneficios generados por la aplicación de semen sexado y la producción in vitro de embriones (PIVE) son algunas de las estrategias clave para las modificaciones necesarias para la mejora en la producción lechera. Esta revisión resume las principales ventajas de la biotecnología de transferencia de embriones para aumentar los aspectos reproductivos y la producción en el ganado lechero.

Palabras clave: *Bos taurus taurus*, bovino, transferencia de embriones, biotécnicas reproductivas.

Cell proliferation in ovarian follicles from *Bos taurus indicus* females with different antral follicle count

Fernanda Zandonadi Machado, Larissa Zamparone Bergamo, Camila Bizarro-Silva, Fábio Morotti, Katia Cristina Silva-Santos, Marcelo Marcondes Seneda¹

Laboratory of Animal Reproduction, University of Londrina. DCV / CCA / UEL. 86057-970, Parana, Brazil.

Abstract

The aim of this study was to compare the cell proliferation rate of follicles from *Bos taurus indicus* females with different antral follicle counts (AFCs). Thirty pairs of ovaries were classified as having low (≤ 31 follicles), intermediate (≥ 46 and ≤ 76 follicles) or high AFC (≥ 91 follicles). The ovaries were cut into 1 x 1 x 0.3 cm fragments, fixed in 10% buffered formalin solution and subjected to immunohistochemical analysis for proliferating cell nuclear antigen (PCNA). PCNA detection was detected in all stages of follicular development, being 1,388 (82.23%) primordial, 197 (11.67%) primary, 29 (1.72%) secondary and 74 (4.83%) antral follicles. The PCNA detection rate was higher ($P \leq 0.05$) for antral and secondary follicles in ovaries with intermediate and low AFCs. This study showed that higher PCNA at early stages of follicular growth is detected in animals with high AFC, whereas a higher PCNA is seen in secondary and antral follicles of animals with low AFC.

Keywords: bovine, follicular development, immunohistochemistry, ovaries, PCNA.

Introduction

The antral follicle count (AFC) is a remarkable reproductive feature that can be determined quickly and accurately. Therefore, after an ultrasound examination, females can be classified into groups defined in number

by a low, intermediate or high antral follicles. Some studies have been proposed to elucidate the influence of AFC on the fertility of cows because the number of antral follicles in the same animal is highly repeatable (Burns *et al.*, 2005; Ireland *et al.*, 2007, 2008, 2009; Silva-Santos *et al.*, 2014). The AFC in *Bos taurus* is directly correlated with the ovarian follicular reserve (Ireland *et al.*, 2011), but this relationship has not been fully elucidated in *Bos taurus indicus* females. *Bos taurus indicus* females have a higher population of antral follicles than *Bos taurus* (Batista *et al.*, 2014), generating a greater number of viable oocytes (Pontes *et al.*, 2011).

Mossa *et al.* (2012) reported that *Bos taurus* cows with low AFCs have lower fertility than those with high AFCs. In addition, they reported a positive correlation between high AFC, and better reproductive efficiency in several aspects studied. However, recent

studies have revealed different patterns in Zebu cattle. When comparing pregnancy rates after artificial insemination, *Bos taurus indicus* cows with low AFCs presented better results, while females with high AFCs showed lower pregnancy rates (Santos *et al.*, 2012, 2013; Morotti *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2016).

Considering the contrast between practical aspects, such as pregnancy rates, described in those reports, it would be interesting to evaluate the physiological mechanisms of ovarian activity according to the AFC. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) is a protein that plays an essential role in regulating cellular functions of eukaryotic organisms (Strzalka *et al.*, 2015). It is well established that the PCNA is a marker for cellular proliferation and is associated with DNA synthesis in all eukaryotic species that include *Bos taurus indicus* (Strzalka and Ziemienowicz, 2007; Sun *et al.*, 2012). In this way, the investigation of PCNA activity on follicular activity in cattle ovaries should contribute to clarify the controversial aspects mentioned above, mainly in *Bos indicus* females.

Therefore, the aim of this study was to evaluate the cell proliferation of follicles from *Bos taurus indicus* females with a low, intermediate or high antral follicle count.

Material and methods

Ovaries

Ovaries (n = 60) from cyclic (presence of corpus luteum) Nelore (*Bos taurus indicus*) cows (n = 30), 72 to 96 months of age, with a body condition score (BCS) from 4 to 4.5 (scale of 1 to 5; Lowman *et al.*, 1976) were obtained from a local slaughterhouse (latitude 23° 17' 34" S and longitude 51° 10' 24" W), and transported to the laboratory within 20 minutes. The ovaries were placed in pairs, separated by animal, and transported in an insulated box with NaCl 0.9% solution at 30°C. At the laboratory, each pair of ovaries was placed in a container with NaCl 0.9% solution, and the AFC was assessed by the same operator using a real-time B- mode ultrasound scanner (Scanner 200 Vet; Pie Medical, Maastricht, The Netherlands). All antral follicles (≥ 2 mm in diameter) were identified and counted. Considering the AFC average and standard deviations, each pair of ovaries was classified into one of three groups: low (≤ 31 follicles, n = 6), intermediate

¹Corresponding author: mseneda@uel.br

Phone: +55(43)3371-5622

Fax: +55(43)3371-4063.



Injectable progesterone in timed artificial insemination programs in beef cows

Fábio Morotti¹, Jefferson Tadeu de Campos¹, Paula Alvares Lunardelli¹, Camila Bortoliero Costa¹, Larissa Zamparone Bergamo¹, Thales Ricardo Rigo Barreiros², Gustavo Martins Gomes dos Santos³, Marcelo Marcondes Seneda^{1,4}

¹Laboratory of Animal Reproduction, University of Londrina, Parana, Brazil.

²Laboratory of Animal Biotechnology, University of North Parana, Bandeirantes, PR, Brazil.

³Sheep Embryo Reprodução Animal, Assaí, Parana, Brazil.

Abstract

The aims of this study were I) to compare the follicular diameter, corpus luteum diameter and serum progesterone (P4) concentrations in cows treated with conventional protocol vs. injectable P4 protocol; II) to determine the serum P4 profile in ovariectomized heifers; and III) to compare pregnancy rate between protocols. In experiment I, multiparous cows received a protocol for ovulation synchronization with an intravaginal P4 device (n = 38; device + EB day 0; device removal + PGF2 α + eCG + EC day 8) or injectable P4 (n = 38; injection + EB day 0; PGF2 α + eCG + EC day 8). In experiment II, ovariectomized heifers (n = 8) were treated with injectable P4 and blood samples were collected to determine the serum P4 profile. In experiment III, multiparous cows were timed AI with two different P4 approaches, intravaginal P4 device (n = 48) or injectable P4 (n = 47). In the first experiment, cows treated with P4 device had higher (P < 0.05) diameter of dominant follicle after ovulation induction (11.6 \pm 1.8 vs. 10.3 \pm 1.8 mm) and ovulation rate (97%, 37/38 vs. 47.3%, 18/38) than cows treated with injectable P4. But, the follicular growth daily was higher (P < 0.05) in cows treated with injectable P4 than intravaginal device (1.3 \pm 0.4 vs. 1.0 \pm 0.3 mm/day, respectively). In experiment II, the P4 concentration peak occurred within 48 hours (6.54 ng/mL) and decreased after 96 hours (P < 0.05) after P4 injection. In experiment III, cows with P4 device had higher (P < 0.05) pregnancy rate than the injectable P4 group (60.4 vs. 34.0%, respectively). These results demonstrate that although the intravaginal P4 devices showed a higher pregnancy rate, a protocol with injectable P4 represents an easier method and a promising alternative for TAI in cattle.

Keywords: follicular diameter, injectable progesterone, pregnancy, synchronization of ovulation.

Introduction

The timed artificial insemination (TAI) programs have been considered one of the largest biotechnological achievements for breeding cattle. Certainly, this is related to the fact that TAI allows all females receiving hormonal treatment to be inseminated without the need for estrus detection (Baruselli *et al.*, 2004; Lamb *et al.*, 2010).

In this context, the synchronic control of wave emergence, dominant follicle growth and ovulation are

the main requirements of a hormonal protocol that allow to AI or embryo transfer at a fixed time (Bo *et al.*, 2003; Baruselli *et al.*, 2004; Carvalho *et al.*, 2008; Sá Filho *et al.*, 2013; Sá Filho *et al.*, 2015). Additionally, this pharmacological strategy optimizes the use of females as well as increases the pregnancy rate and reduces the costs of reproductive programs (Marinho *et al.*, 2012).

To assist reproductive biotechnology, several pharmacological strategies have been proposed (Sales *et al.*, 2012; Campos *et al.*, 2013; Barreiros *et al.*, 2014; Torres *et al.*, 2014; Marques *et al.*, 2015; Pellegrino *et al.*, 2016) and progesterone (P4) has been the main exogenous hormonal basis for estrus synchronization in cattle; treatment can be performed through intravaginal devices (Macmillan *et al.*, 1991; Macmillan and Peterson, 1993), ear implants (Baruselli *et al.*, 2004; Sa Filho *et al.*, 2011), oral formulations (Fike *et al.*, 1999) or injectable sources (Morotti *et al.*, 2013a; Morotti *et al.*, 2013b; Campos *et al.*, 2016a).

Commonly the treatment with P4 includes the insertion of releasing P4 devices for 5-10 days that maintains its plasma concentrations this period (Baruselli *et al.*, 2004). The purpose is to maintain high P4 levels to block estrus manifestation and to suppress the endogenous peak of LH (Kinder *et al.*, 1996). In this way, it is possible avoiding ovulation, but keeping the growth and maturation of the dominant follicle (Savio *et al.*, 1993a; Stock and Fortune, 1993; Rhodes *et al.*, 2002).

The use of injectable P4 for TAI has provided lower pregnancy rates in comparison to protocols with P4 devices (Morotti *et al.*, 2013b; Campos *et al.*, 2016b). However, several positive aspects of injectable P4 have been encouraging new experiments. For example, injectable P4 has been related to low cost of handling, easy management of animals, hygienic benefits and no discard of devices (Morotti *et al.*, 2013a; Morotti *et al.*, 2013b; Campos *et al.*, 2016a; Campos *et al.*, 2016b).

Thus, the objectives of this study were: i) to evaluate the follicular diameter, corpus luteum diameter, and serum P4 concentrations in cows treated with conventional ovulation synchronization protocol vs. injectable P4 protocol; ii) to determine the serum P4 profile in ovariectomized heifers, and iii) to compare pregnancy rate between protocols.

Materials and Methods

Location, animals and feed management

The present study was performed in

³Corresponding author: marcelo.seneda@uel.br

Received: November 16, 2016

Accepted: January 1, 2018