



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

POLYANA CAROLINA MARINO

**EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GDF-9
NO CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-
ANTRAIS NA ESPÉCIE EQUINA**

Londrina
2015

POLYANA CAROLINA MARINO

**EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GDF-9
NO CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-
ANTRAIS NA ESPÉCIE EQUINA**

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

Orientador: Prof. PhD Marcelo Marcondes Seneda.

Londrina
2015

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M339e Marino, Polyana Carolina.

Efeito das diferentes concentrações de GDF-9 no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais na espécie equina / Polyana Carolina Marino. – Londrina, 2015.
48 f. : il.

Orientador: Marcelo Marcondes Seneda.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Folículos ovarianos – Teses. 2. Ovários – Teses. 3. Reprodução animal Teses. 4. Equino – Teses. 5. Biotecnologia – Teses. I. Seneda, Marcelo Marcondes. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

CDU 636.082.4

POLYANA CAROLINA MARINO

**EFEITO DAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE GDF-9 NO
CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIIS NA
ESPÉCIE EQUINA**

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

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Thales Ricardo Rigo Barreiros
Universidade Estadual do Norte do Paraná -
UENP

Profa. PhD Kátia Cristina Silva Santos
Centro Universitário Filadélfia - UNIFIL

Londrina, 27 de março de 2015.

***Dedico esse trabalho a Deus meu grande
Mestre, e aos meus pais Paulo Roberto
Marino e Helaine Maire Herbe Marino e meus
irmãos Vitor Hugo Marino e Paula Katharina
Marino, por estarem sempre ao meu lado e
acreditarem na minha capacidade sempre
dando apoio as minhas conquitas.***

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por me dar forças para seguir adiante, por me levantar nas horas em que eu achava que tudo estaria perdido e por me acolher em seus braços quando eu mais precisei.

Aos meus pais, Paulo Roberto Marino e Helaine Maire Herbe Marino por todo apoio em minhas decisões, por todo o amor que eles me proporcionam e por estarem sempre comigo sempre que eu preciso, não importa onde eu esteja. Amo muito vocês meus amores.

Aos meus irmãos Paula Katharina Marino e Vitor Hugo Marino, que mesmo com minha ausência sempre estavam comigo e torcendo por mim.

À minha família maravilhosa, que sempre tiveram muito orgulho das minhas decisões, dos caminhos em que eu optei pra seguir em minha vida.

Ao meu namorado Gustavo Pereira Faune pelo companheirismo, amizade e compreensão em todos os momentos de dificuldade nesses 6 anos de namoro. Eu amo você.

Ao Professor Marcelo Marcondes Seneda, que na hora em que eu mais precisei estendeu a mão e me aceitou como orientada, além de sempre estar ao meu lado tanto em minhas decisões pessoais quanto na preocupação com o bem-estar de seus orientados. Um verdadeiro Pai que estará comigo pra sempre em meu coração. Obrigada por tudo!

Aos membros da banca de qualificação Prof^a Wanessa Blaschi e Prof^a Livia Aires Lisboa por terem aceito o convite de colaborar com a melhoria do meu trabalho. E aos membros da banca de defesa Prof^o Thales Ricardo Rigo Barreiros e Prof^a Kátia Cristina Santos pela aceitação do convite em fazer parte desse momento tão especial.

À todos os professores da UEL por me proporcionarem os melhores anos de aprendizado no meu período de residência e por me tornarem uma pessoa mais segura em minhas condutas profissionais.

À toda equipe do Laboratório de Reprodução Animal (REPROA-UEL) por todo companheirismo e auxílio em minhas atividades.

Ao Professor Thales Ricardo Rigo pelo auxílio nas análises estatísticas do meu experimento.

Ao Professor Luiz Francisco Zanella pela grande amizade que construímos desde quando foi meu Orientador na UNOPAR e até hoje por me direcionar e apoiar em minhas escolhas profissionais. Meu eterno agradecimento. Meu verdadeiro amigo.

Aos Professores da Universidade Estadual Norte do Paraná - UENP pela compreensão em minhas ausências durante alguns períodos semanais para que eu conseguisse realizar minhas atividades do mestrado.

Ao frigorífico de Apucarana Oregon® e seus funcionários por ceder os ovários para a concretização do experimento.

Ao Programa de Pós-graduação da UEL pelo apoio aos pós-graduandos e ao CNPq e CAPES pelo apoio científico e financeiro na realização dos projetos e ao financiamento das bolsas.

A secretária de pós-graduação Helenice por todo apoio, paciência e auxílio aos pós-graduandos.

E a todos os meus amigos em especial a Renata Paiano Monegatto por ser minha amiga irmã e estar sempre comigo em todos os momentos de minha vida.

“Muito Obrigada e que Deus abençoe a todos!”

“O prazer no trabalho aperfeiçoa a obra”.

Aristóteles

MARINO, Polyana Carolina. **Efeito das diferentes concentrações de GDF-9 no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais na espécie equina**. 2015. 48 folhas. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

Devido ao interesse por parte dos criadores de cavalos no desenvolvimento de novas biotecnologias voltadas à reprodução equina, estudos estão sendo realizados em fêmeas afim de avaliar os folículos ovarianos pré-antrais por meio da biotécnica de MIOFOPA. Com o objetivo de avaliar o efeito das diferentes concentrações de GDF-9 no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais na espécie equina, foram utilizados ovários de éguas provenientes de abatedouro local (n=5) em anestro estacional. Os tecidos ovarianos foram seccionados sob condições assépticas em nove fragmentos de cada dos cinco animais (total= 45 fragmentos) sendo cada um deles fixados imediatamente em Bouin para controle não cultivado do experimento. Os outros fragmentos foram destinados ao cultivo *in vitro* em duas placas de 24 poços contendo meio base (MEM) mais a adição de diferentes concentrações de GDF-9 (50 ng/ml, 100 ng/ml e 200 ng/ml) em estufa a 39°C em atmosfera a 5% de CO₂ em ar por um período de dois e seis dias. Após o cultivo os fragmentos foram fixados em bouin por 24 horas e mantidos em álcool 70% até o processamento histológico. A avaliação morfológica dos folículos pré-antrais foi realizada por meio de histologia clássica. Dos 445 folículos classificados, 49% (220/445) eram folículos primordiais, 51% (225/445) encontravam-se em desenvolvimento e 60% (266/445) apresentavam-se morfolologicamente normais ($p < 0,05$). Os folículos cultivados *in vitro* na concentração de 200 ng/ml foi superior (63%) quando comparado as outras concentrações de GDF-9 após dois dias de cultivo ($p < 0,05$) e os folículos que estavam em desenvolvimento cultivados até seis dias nas diferentes concentrações de GDF-9 50, 100 e 200 ng/ml (63,6%, 77,3% e 87,5% respectivamente), apresentaram desenvolvimento similar ao grupo controle MEM D6 (81,6%) ($p > 0,05$). Em conclusão, o GDF-9 na concentração de 200 ng/ml por um período de dois dias de cultivo promove o desenvolvimento folicular, podendo ser utilizado no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais na espécie equina por até dois dias de cultivo, mas não obteve bons resultados com 6 dias de cultivo.

Palavras-chave: MOIFOPA, cultivo *in vitro*, equinos, ovários, biotecnologias.

MARINO, Polyana Carolina. **Effect of different concentrations of GDF-9 in vitro culture of preantral follicles in the equine species**. 2015. 48 leaves. Dissertation (Master's Degree in Animal Science) – State University of Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

Due to the interest of horse breeders at developing new biotechnologies aiming the equine reproduction, studies are being conducted on females in order to assess the pre-antral follicles by biotech MIOFOPA. Aiming to evaluate the effect of different concentrations of GDF-9 in vitro pre-antral follicles' culture in the equine specie, seasonal anoestrus mares' ovaries from a local slaughterhouse were used (n = 5). Ovarian tissues were cut under aseptic conditions into nine fragments of five animals each (total = 45 fragments) each one being immediately fixed in Bouin, as not cultivated experiment control. Other fragments were used to in vitro culture in two 24-well plates containing basal medium (MEM) plus the addition of different concentrations of GDF-9 (50 ng / ml, 100 ng / ml and 200 ng / mL) in an oven at atmosphere of 39 ° C in 5% CO₂ air for a period of two to six days. After the cultivation the fragments were fixed in Bouin solution for 24 hours and kept in 70% alcohol until histological processing. Morphological assessment of pre-antral follicles was performed by histology. Of 445 follicles classified 49% (220/445) were primordial follicles, 51% (225/445) were in development and 60% (266/445) seem to be morphologically normal (p <0.05). The follicles cultured in vitro at a concentration of 200 ng / ml were higher (63%) when compared to other concentrations of GDF-9 after two days of cultivation (p <0.05) and follicles that were in development culture up to six days in different concentrations of GDF-9 50, 100 and 200 ng / ml (63.6%, 77.3% and 87.5% respectively), presented similar development to the control group MEM D6 (81.6%) (P> 0.05). In conclusion, the GDF-9 at 200 ng / mL concentration for a period of two days of cultivation promotes promoting follicular development, and presenting high chance of being used in vitro cultivation of preantral follicles in the equine specie for up to two days of culture, but did not presented good results with at the six days cultivation.

Keywords: MOEPF, in vitro culture, horses, ovaries, biotechnologies.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Representação esquemática do desenvolvimento dos folículos ovarianos pré-antrais e antrais17
- Figura 2** – Estrutura histológica dos folículos ovarianos pré-antrais de caprinos após coloração com Ácido Periódico de Schiff-hematoxilina, mostrando os diferentes fases de desenvolvimento folicular22
- Figura 3** – Estado atual e avanços na biotecnologia de manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais em mamíferos no decorrer dos anos.....23
-
- ARTIGO 1 – Efeito das diferentes concentrações de GDF-9 no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais na espécie equina.**
-
- Figura 1** – Protocolo experimental de cinco replicatas para o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais equinos com diferentes concentrações de GDF-9.37
- Figura 2** – Cortes de histologia clássica do tecido ovariano equino com folículos pré-antrais viáveis.....41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Influência dos hormônios e fatores de crescimento sobre a ativação e o crescimento *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais.....21

ARTIGO 1 – Efeito das diferentes concentrações de GDF-9 no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais na espécie equina

Tabela 1 – Total de folículos primordiais e em desenvolvimento após o cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos equinos por 2 e 6 dias, em MEM+ suplementado com GDF-9 em diferentes concentrações39

Tabela 2 – Total de folículos primordiais e em desenvolvimento viáveis e degenerados após o cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos equinos por 2 e 6 dias, em MEM+ suplementado com GDF-9 em diferentes concentrações40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMH – Hormônio anti-mulleriano

BMP-15 – Proteína morfogenética do osso-15

BPU – Biópsia Pick-up

CO₂ – gás carbônico

D0 – Dia 0

D2 – Dia 2

D6 – Dia 6

EGF – Fator de crescimento epidermal

GDF-9 – Fator de diferenciação 9

GNRH – Hormônio liberador de gonadotrofina

FGF – Fator de crescimento fibroblástico

FOPA – Folículos ovarianos pré-antrais

FSH – Hormônio folículo estimulante

IGF-1 – Fator de crescimento semelhante a insulina

KGF – Fator de crescimento keratinócito

KL – Kit ligand

LH – Hormônio luteinizante

MEM – Meio essencial mínimo

ml - mililitro

MOIFOPA - Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais

Ng – nanograma

PAS – Ácido periódico - Schiff

PBS – Tampão fosfato-salino

PCNA – Antígeno nuclear de proliferação celular

TGF- β – Fator de crescimento e transformação beta

USA – United States of America

VIP – Peptídeo intestinal vasoativo

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 16 |
| 2.1 | OOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE..... | 16 |
| 2.2 | POPULAÇÃO E ATRESIA..... | 18 |
| 2.3 | PARTICULARIDADES NA ESPÉCIE EQUINA..... | 18 |
| 2.4 | CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIS | 20 |
| 2.5 | USO DO FATOR DE CRESCIMENTO E DIFERENCIAÇÃO 9 (GDF-9) NO CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIS | 24 |
| 2.6 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 25 |
| 3 | HIPÓTESE | 30 |
| 4 | OBJETIVOS | 31 |
| 4.1 | OBJETIVO GERAL..... | 31 |
| 4.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICO | 31 |
| 5 | ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO – Efeito das diferentes concentrações de GDF-9 no cultivo <i>in vitro</i> de folículos ovarianos pré-antrais na espécie equina | 32 |
| | INTRODUÇÃO | 34 |
| | MATERIAL E MÉTODOS | 35 |
| | RESULTADOS | 38 |
| | DISCUSSÃO | 41 |
| | CONCLUSÃO..... | 43 |
| | REFERÊNCIAS..... | 44 |
| 6 | CONCLUSÃO GERAL | 46 |

1 INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa o terceiro lugar mundial e lidera o rebanho de equinos da América Latina. Somando-se os muares e asininos o valor total ultrapassa os oito milhões de animais, movimentando cerca de 13 bilhões de reais somente com a produção de equinos. Grande parte desse desenvolvimento econômico deve-se aos eventos esportivos desenvolvidos no país, sendo estimadas cerca de 300 a 1500 inscrições entre provas de tambor, laço e saltos por final de semana (MAPA, 2014).

Com o incremento dos esportes equestres, verificou-se um maior interesse nas técnicas de reprodução assistida. Desta forma, a aplicação de biotécnicas voltadas à reprodução equina vem ganhando destaque no agronegócio como ferramenta para acelerar o ganho genético e têm despertado interesse entre criadores de cavalos. A transferência de embrião, inseminação artificial e produção *in vitro* de embriões são as biotécnicas atualmente que merecem. Essas técnicas visam melhorar as taxas de concepção, além de maximizar o aproveitamento de animais férteis de alto potencial genético (BORTOT; ZAPPA, 2013).

Sendo assim, estudos estão sendo realizados a fim de aumentar a disponibilidade de oócitos de éguas para maturação e fecundação *in vitro* para gerar números maiores de animais. Essas pesquisas envolvem os folículos ovarianos pré-antrais que representam cerca de 90 a 95% de toda a população folicular, armazenando os oócitos presentes em ovários de mamíferos (SILVA et al., 2003).

A técnica empregada para recuperação dos oócitos provenientes desses folículos pré-antrais é conhecida como manipulação dos oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA), que tem como objetivo resgatar ou isolar os folículos ovarianos pré-antrais a partir de ovários para posteriormente cultivá-los afim de avaliar seu crescimento e maturação (FIGUEIREDO et al., 2008).

Desta forma, os sistemas de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais possibilitam a recuperação de um número maior de oócitos imaturos para futuramente serem fecundados para o desenvolvimento de embriões (HEMAMALINI et al., 2003). Apesar do crescente interesse nesta biotécnica, um dos fatores que dificultam o seu desenvolvimento na espécie equina, é a obtenção de ovários para

realizar o cultivo folicular *in vitro*. Alguns autores sugerem que os ovários podem ser obtidos após a morte de éguas ou quando são sacrificadas por razões médicas (CARNEVALE; MACLELLAN, 2006). Quando há disponibilidade de ovários oriundos de abatedouro também podem ser utilizados. Porém no Brasil, isso torna-se crítico pela falta de abatedouros autorizados.

Outro fator importante para obter sucesso no cultivo *in vitro* para o crescimento de folículo pré-antrais é a composição do meio a ser utilizado (SMITZ; CORTVRINDT, 2002). Várias substâncias adicionadas ao meio podem influenciar na sobrevivência e crescimento dos folículos, como antibióticos, tampões, substratos nutricionais, diferentes fontes proteicas, antioxidantes, hormônios e fatores de crescimento (FIGUEIREDO et al., 2008). Esses fatores de crescimento são sintetizados pelas células foliculares e atuam modulando o efeito dos hormônios, regulando assim, o desenvolvimento dos folículos ovarianos. Sabe-se que a adição desses fatores ao meio de cultivo pode influenciar positivamente o crescimento folicular (PICTON et al., 2008). Entre os fatores de crescimento, pode-se destacar o fator de crescimento e diferenciação-9 (GDF-9).

Nos sistemas de cultivo *in vitro*, o GDF-9 têm auxiliado na sobrevivência de folículos secundários em diversas espécies (HREISSON et al., 2002; WANG; ROY, 2004; ZHANG et al., 2008). Em ovelhas e cabras, o GDF-9 ativou folículos primordiais e promoveu o desenvolvimento dos mesmos (ALMEIDA et al., 2011; SILVA et al., 2004). No entanto, até o presente momento, na espécie equina não há informações sobre o efeito do GDF-9 no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais.

Com base nessas informações, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do GDF-9 no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais da espécie equina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 OOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE

Nas espécies domésticas, as fêmeas nascem com um estoque de oócitos que são formados ainda no desenvolvimento fetal durante a oogênese e foliculogênese (SAUMANDE, 1991).

As células germinativas responsáveis pela formação dos oócitos são originadas a partir do saco vitelino primitivo, migrando posteriormente para a crista genital e colonizam a gônada não diferenciada, recebendo a denominação de oogônias, as quais multiplicam-se por meio de divisões mitóticas (VAN DEN HURK et al., 1997).

As células somáticas do mesonéfron circundam as oogônias formando cordões corticais que darão origem aos folículos primordiais. Esses cordões corticais, também conhecidos como cordões ovígeros, são estruturas alongadas contendo células germinativas que repousam sobre a lâmina basal (JUENGEL et al., 2002).

Essas células germinativas proliferam-se por meio de mitose no córtex ovariano. As oogônias presentes no interior dessas células começam a se multiplicar a partir do 50º dia de gestação e terminam aproximadamente no 150º dia. Após esse processo, a divisão meiótica se inicia a partir do 80º dia de gestação e continua até a puberdade da fêmea (PICTON, 2001). Os primeiros folículos formados são classificados como folículos primordiais e se formam após a individualização dos cordões das células germinativas (BRISTOL-GOULD et al., 2006).

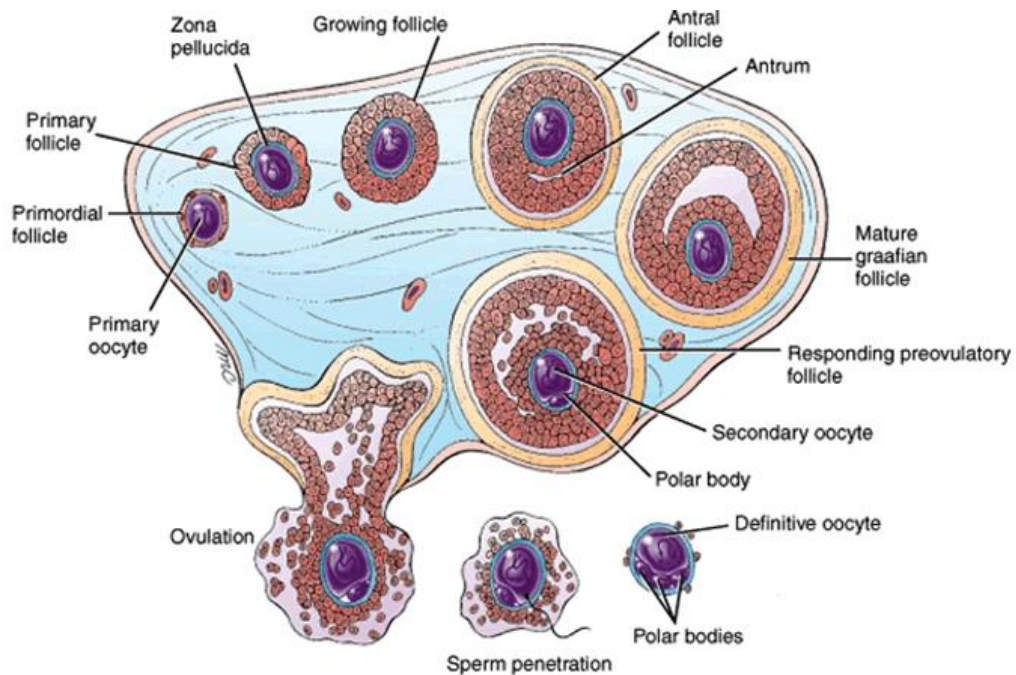
A formação dos folículos primordiais, seu crescimento e maturação até o estágio pré-ovulatório caracteriza o início da foliculogênese (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Esse processo de desenvolvimento é controlado por fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos (MAGALHÃES, 2009). Neste processo, simultaneamente à ativação dos folículos primordiais ocorre o crescimento e diferenciação do oócito e das camadas de células da granulosa (ADAMS; JAISWAL, 2008).

Os folículos primordiais representam a grande maioria (aproximadamente 95%) da população folicular presente no ovário, constituindo

assim, o *pool* de reserva dos folículos quiescentes. Estes folículos, após saírem da fase de quiescência, são ativados por meio da ação de hormônios e fatores de crescimento, mas cerca de 99% entram em atresia folicular (FIGUEIREDO et al., 2008).

Os folículos ovarianos podem ser divididos em folículos pré-antrais, folículos primordiais, primários e secundários, e os folículos antrais, resultantes da formação do antro folicular são classificados como folículos terciários e pré-ovulatórios (Figura 1); (FORTUNE, 2003).

Figura 1 – Representação esquemática do desenvolvimento dos folículos ovarianos pré-antrais e antrais. FONTE: Schoenwolf et al. (2008).



Eventos fisiológicos para aumentar o diâmetro oocitário, a proliferação das células da granulosa e a mudança na morfologia das células de pavimentosas para cubóides marcam a ativação dos folículos. Os folículos que apresentam ao seu redor células da granulosa pavimentosas e cubóide são denominados folículos em transição (FORTUNE, 2003; ADAMS; JAISWAL, 2008; AERTS; BOLS, 2010). Em seguida, quando o oócito é circundado por uma camada completa de células da granulosa de morfologia cubóide, os folículos passam a ser denominados primários (GOUGEON; BUSSO, 2000; AERTS; BOLS, 2010).

Posteriormente, duas ou mais camadas de células da granulosa são formadas ao redor do oócito, dando origem aos folículos secundários. Nesta fase ocorre a diferenciação das células da teca e é possível a visualização da zona pelúcida em torno do oócito (FORTUNE, 2003; ADAMS; JAISWAL, 2008; AERTS; BOLS, 2010).

Após o desenvolvimento dos folículos secundários, ocorre a organização das células da granulosa em múltiplas camadas e forma-se uma cavidade repleta de líquido proveniente da transudação do plasma periférico denominada antro que confere a classificação destes folículos antrais em terciários e pré-ovulatórios (BARNETT et al., 2006; YOUNGQUIST; THRELFALL, 2007).

2.2 POPULAÇÃO E ATRESIA FOLICULAR

Cerca de 90% dos folículos presentes nos ovários de mamíferos é constituído por folículos pré-antrais. Destes, 95% são folículos primordiais (FIGUEIREDO et al., 2008).

A população e a distribuição dos diferentes tipos foliculares nos ovários podem ser afetadas por vários fatores como idade, raça, níveis hormonais e estado reprodutivo (RUSSE, 1983).

Em bovinos, estima-se que a população ovariana ao nascer, seja de aproximadamente 235.000 folículos pré-antrais (ERICKSON et al., 1966), 160.000 em ovelhas (DRIANCOURT et al., 1991), cerca de 2.000.000 na mulher (ERICKSON, 1986) e apenas 35.590 na espécie equina (DRIANCOURT et al., 1982).

A grande maioria desses folículos não chega até a ovulação pois sofrem um evento fisiológico conhecido como atresia folicular. Esse processo pode ocorrer por meio degenerativo ou apoptótico, com duração pouco conhecida (FIGUEIREDO et al., 2008).

2.3 PARTICULARIDADES NA ESPÉCIE EQUINA

Na espécie equina, o ciclo estral difere de algumas espécies pois a égua são poliéstricas estacionais, ou seja, sofrem influências sazonais assim como os pequenos ruminantes (HAFEZ, 2003). O fotoperíodo é o fenômeno

responsável por interferir na ciclicidade das éguas, sendo um fator determinante para a presença ou ausência de estro nessa espécie (BISOL, 2008).

No outono o fotoperíodo é menor, sendo assim, as éguas não ciclam e permanecem em fase de anestro estacional. Isso ocorre devido há uma redução na secreção de gonadotrofinas e conseqüente diminuição da atividade ovariana. Em dias longos e climas favoráveis, principalmente na primavera e no verão, os sinais ambientais auxiliam na atividade cíclica das éguas (BISOL, 2008).

Esse evento no ciclo estral das éguas, inicia-se por estímulo luminoso (solstício de inverno) que incide na retina, estimulando os seus receptores de rodopsina. Estes conectam-se com a glândula pineal responsável pela produção e secreção do hormônio melatonina, que inibe a ação do GnRH no hipotálamo. Em períodos luminosos, ocorre a inibição da produção desse hormônio inibidor de GnRH favorecendo a liberação do mesmo e a ação do hormônio folículo estimulante e do hormônio luteinizante (HFSH e LH) (HAFEZ, 2003).

Devido a esta influência ambiental, alguns autores preconizam a iluminação artificial para reduzir o tempo de anestro. A temperatura ambiente, a condição corpórea, o histórico reprodutivo, a aplicação de hormônios como o GnRH e seus antagonistas, também são fatores importantes quando se trata de reprodução equina e quando empregado em conjunto com a iluminação artificial no ciclo estral desses animais podem oferecer resultados (DAVID, 2011).

Além disso, ao contrário das outras espécies, a ovulação da égua ocorre na fossa de ovulação, localizada no bordo ventral ou côncavo do ovário, estrutura esta que diferencia os ovários das éguas das demais espécies domésticas (GETTY, 1975). A localização das zonas cortical e medular no interior ovariano está invertida. Os folículos e corpos lúteos estão espalhados no interior da parte central do órgão e em direção à fossa ovulatória e são circundados por tecido conjuntivo denso, altamente vascularizado caracterizando a região cortical do ovário equino (DYCE et al., 1996). Essas características devem ser consideradas durante a fragmentação ovariana para o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais nessa espécie.

2.4 CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIS

O objetivo principal dessa biotécnica é recuperar os oócitos inclusos em folículos pré-antrais e cultivá-los *in vitro* até sua completa maturação, evitando que entrem em atresia. Um sistema eficiente de cultivo deve promover o desenvolvimento folicular, crescimento e maturação, bem como permitir a multiplicação e a diferenciação das células da granulosa inclusas nesses folículos. Após isso, espera-se que esses folículos sejam maturados até que o oócito esteja capacitado para a fecundação (MATOS et al., 2007; DOMINGUES et al., 2011).

Para realizar essa biotécnica, utiliza-se ovários de animais destinados a eutanásia por problemas clínicos, por meio de biópsias do córtex ovarianos, ovariectomias ou até mesmo oriundos de abatedouros (SANTOS et al., 2006). Porém, segundo Haag et al. (2013), os fragmentos ovarianos de éguas utilizados no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais, podem ser provenientes de métodos cirúrgicos, por meio de biopsia sendo possível a manutenção da viabilidade folicular.

Em casos de cultivos *in vitro* com fragmentos ovarianos oriundos de ovários de abatedouro, o transporte do material até o local da pesquisa deve ser considerado afim de minimizar os efeitos deletérios do tempo, do meio de armazenamento e da temperatura sobre a viabilidade folicular. Gomes et al. (2012) comprovaram que os ovários de éguas provenientes de abatedouro devem ser transportados em solução salina (PBS) à uma temperatura de 4°C para manter a viabilidade e integridade folicular nesta espécie.

Após obter o material, é necessário o preparo do meio em que esses fragmentos ovarianos serão cultivados. O cultivo ideal deverá preservar a viabilidade dos folículos, conservar sua aparência morfológica pré-existente *in vivo* e, finalmente assegurar o crescimento e maturação folicular. A composição dos meios utilizados para o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais necessitam de alguns componentes essenciais como meio essencial mínimo (MEM), antibióticos, tampões e diferentes substratos nutricionais. Além disso, são enriquecidos com fontes proteicas, hormônios, peptídeos e diversos fatores de crescimento (FIGUEIREDO et al., 2008).

Os fatores de crescimento desempenham funções importantíssimas sobre o desenvolvimento folicular. Segundo Martins et al. (2008) o

crescimento dos folículos presentes nos ovários dos mamíferos são regulados por gonadotrofinas, somatotrofinas e por fatores presentes dentro dos ovários. Os fatores de crescimento são sintetizados pelas células foliculares e atuam modulando o efeito dos hormônios e regulando o desenvolvimento dos folículos ovarianos. Entre eles, os fatores que já foram testados cientificamente sobre o desenvolvimento de folículos ovarianos pré-antrais de mamíferos e obtiveram resultados satisfatórios foram: fator de crescimento e diferenciação-9 (GDF-9), fator de crescimento semelhante a insulina-1 (IGF-1), Kit ligand (KL), fator de crescimento epidermal (EGF), proteína morfogenética do osso-15 (BMP-15), fator de crescimento fibroblástico (FGF), fator de crescimento keratinócito (KGF), neutrofinas, peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e ativina (Tabela 1).

Tabela 1 - Influência dos hormônios e fatores de crescimento sobre a ativação e o crescimento *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais. FONTE: Adaptado de Figueiredo et al., 2008.

| Espécie | Estágio folicular | Efeito positivo | Efeito Negativo |
|----------------|--------------------------|--|--------------------------|
| Bovinos | Primordial | Insulina | IGF-1 |
| | Primário | FGF-2; Estradiol | AMH |
| | Secundário | FSH; FGF-2; IGF-1; Estradiol; EGF; Ativina | FSH; IGF-1; TGF- β |
| Ovinos | Primordial | - | - |
| | Primário | GDF-9; BMP-15 | - |
| | Secundário | GDF-9; BMP-15; | - |
| Primatas | Primordial | IGF-1 e 2; Insulina; | - |
| | Primário | FSH; GDF-9; Andrógenos | - |
| | Secundário | FSH; GDF-9; Andrógenos | - |
| Roedores | Primordial | GDF-9; Insulina; Kit ligand; FGF-2; LIF | AMH |
| | Primário | FSH; GDF-9; EGF; TGF- β ; Ativina | Estradiol |
| | Secundário | FSH; GDF-9; KGF; IGF-1; LH; GH; EGF; TGF- β ; Ativina | FSH; Ativina; AMH |

Após o cultivo, os fragmentos ovarianos podem ser destinados a várias técnicas para avaliação da viabilidade e morfologia celular dos folículos pré-antrais. A mais utilizada ainda é a histologia clássica, pois permite verificar o número e a mudança na morfologia das células da granulosa de pavimentosa para cúbica, além de permitir a análise da integridade morfológica do oócito e das células da granulosa (Figura 2); (MATOS et al., 2007).

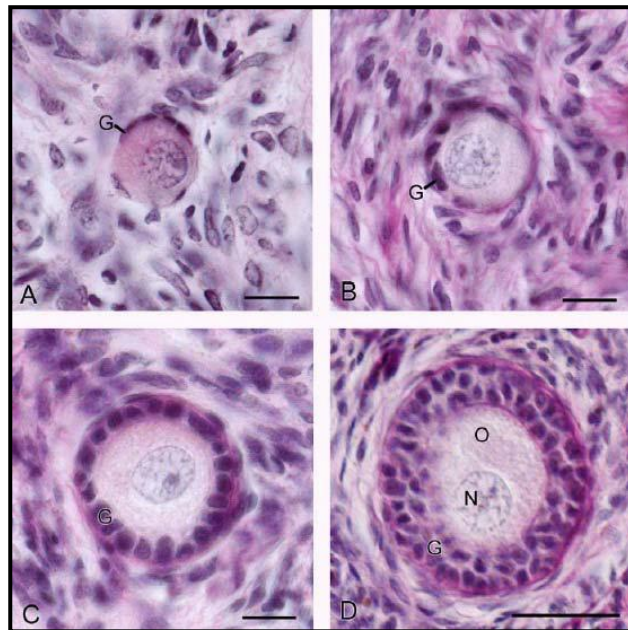


Figura 2 – Estrutura histológica dos folículos ovarianos pré-antrais após coloração com Ácido Periódico de Schiff-hematoxilina, representando as diferentes fases de desenvolvimento folicular. (A) folículo primordial – oócito circundado por uma camada de células da granulosa pavimentosas; (B) folículo em transição – oócito circundado por uma camada de células da granulosa pavimentosas e cúbicas; (C) folículo primário – oócito circundado por uma camada de células da granulosa cúbicas; (D) folículo secundário – oócito circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa cúbicas). O: oócito; N: núcleo; G: células da granulosa. Barras: A, B e C = 12,5 μm e D = 25 μm . Fonte: SILVA et al., 2004.

Além das técnicas para avaliar a morfologia das células foliculares, existem marcadores de atividade celular que tem por finalidade avaliar a ativação dos folículos primordiais e a mudança do oócito e das células da granulosa. (WANDJI et al., 1996; FIGUEIREDO et al., 2008).

Sobre o estado atual do cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais, pode-se afirmar que já foram desenvolvidos vários cultivos *in vitro* nas

diferentes espécies domésticas apresentando diferentes resultados. Alguns alcançaram apenas o crescimento folicular, já outros conseguiram alcançar a formação do antro, formação do embrião e posteriormente o nascimento (Figura 3).

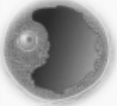
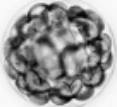

| ESPÉCIE | Crescimento | Antro | Embrião | Nascimento |
|---|--|---|--|--|
| GATA Jewgenow et al., 1998 | ██████████ |  | | |
| MACACA Nayudu et al., 2003 | ████████████████████ | | | |
| CADELA Serafim et al., 2010 | ████████████████████ | | | |
| VACA McCaffery et al., 2000 | ████████████████████ | |  | |
| OVELHA Arunakumari et al., 2010 | ██ | | | |
| CABRA Magalhães et al., 2010 | ██ | | | |
| PORCA Wu et al., 2001 | ██ | | | |
| BÚFALA Gupta et al., 2008 | ██ | | | |
| CAMUNDONGA O'Brien et al., 2003 | ██ | | |  |

Figura 3 - Estado atual e avanços na biotecnologia de manipulação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais em mamíferos no decorrer dos anos. FONTE: Chaves et al., 2010.

O principal desafio dos pesquisadores da área de cultivo folicular consiste no desenvolvimento de cultivo especiais que proporcionem condições favoráveis e adequadas para o desenvolvimento adequado desses folículos *in vitro*. Alguns autores conseguiram registrar o nascimento de camundongos a partir de folículos pré-antrais congelados, descongelados, cultivados e fecundados *in vitro* (O'BRIEN et al., 2003), porém, nas outras espécies, esse avanço ainda continua como perspectiva para o futuro.

2.5 USO DO FATOR DE CRESCIMENTO E DIFERENCIAÇÃO-9 (GDF-9) NO CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIS

Como já descrito anteriormente, diversos fatores de crescimento participam do desenvolvimento folicular e das atividades intraovarianas nas diferentes espécies.

O fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF-9) é um fator de crescimento produzido dentro do oócito e está diretamente envolvido na foliculogênese e na fertilidade das fêmeas (ERICKSON; SHIMASAKI, 2000).

O GDF-9 desempenha diversas funções sobre o crescimento de folículos primários e a proliferação de células da teca, estimulando a manutenção da viabilidade folicular e a proliferação de células da granulosa (ALMEIDA et al., 2011; REYES et al., 2013). Além disso, exerce efeito sinérgico com o FSH sobre o crescimento e a diferenciação dos oócitos inclusos em folículos pré-antrais (NILSON; SKINNER, 2002; HREISSON et al., 2002).

Na biotécnica de MOIFOPA, o GDF-9 têm demonstrado a progressão e sobrevivência de folículos secundários (ZHANG et al., 2008). Em ovelhas e cabras, o GDF-9 ativou folículos primordiais (ALMEIDA et al., 2011; SILVA et al., 2004).

Além disso, o GDF-9 também promove a sobrevivência e a progressão dos folículos ao estágio secundário após sete dias de cultivo e exerce influência sobre outros fatores de crescimento folicular como o KL, além de estimular o crescimento de folículos primordiais e aumentar a proporção de folículos secundários (WANG; ROY, 2004).

Em outras espécies como ratos (WANG; ROY, 2004), humanos (HUANG et al., 2009), caprinos (SILVA et al., 2004b), cães (REYES et al., 2013), bovinos (TANG et al., 2012) e em suínos (ZHANG et al., 2008), o GDF-9 também foi testado no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais apresentando resultados benéficos quanto a ação desse fator de crescimento sobre o desenvolvimento folicular.

Na espécie equina até o presente momento não há resultados demonstrando a influência do GDF-9 sobre o crescimento dos folículos ovarianos pré-antrais.

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, G.P.; JAISWAL, R. Follicular dynamics in cattle: Historical overview and research update. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.36, n.2, p.377-396, 2008.

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

ALMEIDA, F.Q.; SILVA, V.P. Progresso científico em equideocultura na 1ª década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.119-129, 2010.

ALMEIDA, A.P.; SARAIVA, M.V.A.; ARAÚJO, V.R.; MAGALHÃES, D.M.; DUARTE, A.B.G.; FROTA, I.M.A.; LOPES, C.A.P.; CAMPELLO, C.C. SILVA, J.R.V.; FIGUEIREDO, J.R. Expression of growth and differentiation factor 9 (GDF-9) and its effect on the *in vitro* culture of caprine preantral ovarian follicles. **Small Ruminants Research**, v.100, p.169-176, 2011.

BARNETT, K.R.; SCHILLING, C.; GREENFELD, C.R.; TOMIC, D.; FLAWS, J.A. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. **Human Reproduction Update**, v.10, p.1-19, 2006.

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

BISOL, J. F. W. Fotoperíodo artificial sobre a atividade reprodutiva de éguas durante a transição outonal, 2008. <http://hdl.handle.net/10183/12701> acessado em 05 de janeiro de 2015.

BODENSTEINER, K.J.; CLAY, C.M.; MOELLER, C.L. SAWYER, H.R. Molecular cloning of the ovine GDF-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. **Biology Reproduction**, v.60, p.381-386, 1999.

BORTOT, D.C.; ZAPPA, V. Aspectos da reprodução equina: Inseminação Artificial e Transferência de Embrião. **Revista Eletrônica de Medicina Veterinária**, n.21, 2013.

BRISTOL-GOULD, S.K.; KREEGER, P.K.; SELKIRK, C.G.; KILEN, S.M.; COOK, R.W.; KIPP, J.L.; SHEA, L.D.; MAYO, K.E.; WOODRUFF, T.K. Postnatal regulation of germ cells by activin: The establishment of the initial follicle pool. **Developmental Biology**, v.298, p.132-148, 2006.

CARNEVALE, E.M.; MACLELLAN, L.J. Collection, evaluation and use of oocytes in equine assisted reproduction. **Veterinary Clinics Equine Practice**, v.22, p.843-856, 2006.

CHAVES, R.N.; DUARTE, A.B.G.; MATOS, M.H.T.; FIGUEIREDO, J.R. Sistemas de cultivo *in vitro* para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, n.1, p.37-49, 2010.

DOMINGUES, S.F.S.; LIMA, J.S.; OLIVEIRA, K.G.; SANTOS, R.R. Biotecnologias de reprodução como uma estratégia complementar à conservação *in situ* de primatas neotropicais ameaçados de extinção: perspectivas e desafios. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.2, p.124-129, 2011.

DOWNEY, K.M.; TAN, C.K.; SO, A.G. DNA polimerase rase delta: a second eucaryotic DNA replicase. **Bioessays**, v.12, p.231-236, 1990.

DRIANCOURT, M.A. Follicular dynamics in sheep and cattle. **Theriogenology**, v.35, p.55-72, 1991.

DYCE, K. M., W. O. SACK, AND C. J. G. WENSING,: Text Book of Veterinary Anatomy 2nd edn. Philadelphia: W.B. Saunders company, 1996 528-529.

ERICKSON, B.H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. **Journal of Animal Science**, v.25, p.800-805, 1966.

ERICKSON, G.F.; SHIMASAKI, S. The role of the oocyte in folliculogenesis. **TEM**, v.11, n.5, p.193-198, 2000.

FIGUEIREDO, J.R.; SILVA, J.R.V.; RODRIGUES, A.P.R. Estado atual da biotécnica de manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA). **Ciência animal**, v.9, n. 1, p. 11-25, 1999.

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**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2008. p.303-327.

FORTUNE, J.E. The early stages of follicular development, p. activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v.78, p.135-163, 2003.

GETTY, R. Sisson and Grossman's the Anatomy of the Domestic Animals 5th ed, v. 1. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1975 542-544.

GINTHER, O.J.; KNOPF, L.; KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two or three follicular waves. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.87, p.223-230, 1989.

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

HAFEZ, E.S.E. Anatomia da reprodução feminina. In:_____ . **Reprodução animal**. São Paulo: Ed. Manole, 2003. p.21-58.

HAYASHI, M.; MCGEE, E.A.; MIN, G.; KLEIN, C.; ROSE, U.M.; VAN DUIN, M.; HSUEH, A.J.W. Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early follicles. **Endocrinology**, v.140, p.1236-1244, 1999.

HEMAMALINI, N.C.; RAO, B.S. TAMILMANI, G.; AMARNATH, D.; VAGDEVI, R.; NAIDU, K.S.; REDDY, K.K.; RAO, V.H. Influence of transforming growth factor- α , insulin like growth factor II, epidermal growth factor or follicle stimulating hormone on in vitro development of preantral follicles in sheep. **Small Ruminants Research**, v.50, p.11-22, 2003.

HREISSON, J.G.; SCOTT, J.E.; RASMUSSEN, C.; SWAHN, M.L.; HSUEH, A.L.W.; HOVATTA, O. Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development and survival of human ovarian follicles in organ culture. *J Clin Endocrinol Metab*, v.87, p.316-321, 2002.

JAATINEN, R.; LAITINEN, M.P.; VUOJOLAINEN, K.; AALTONEN, J.; LOUHIO, H.; HEIKINHEIMO, K.; LEHTONEN, E.; RITVOS, O. Localization of growth differentiation factor-9 (GDF-9) mRNA and protein in rat ovaries and cDNA cloning of rat GDF-9 and its novel homolog GDF-9B. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.156, p.189–193, 1999.

JUENGEL, J.L.; SAWYER, H.R.; SMITH, P.R.; QUIRKE, L.D.; HEATH, D.A.; LUN, S.; WAKEFIELD, S.J.; MCNATTY, K.P. Origins of follicular cells and ontogeny of steroidogenesis in ovine fetal ovaries. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.191, p.1-10, 2002.

LIMA, R.A.S.; SHIROTA, R.; BARROS, G.S.C. Estudo do complexo do agronegócio do cavalo. Piracicaba: **ESALQ/USP**, p.250, 2006.

MAGALHÃES, D.M.; FERNANDES, D.D.; ARAÚJO, V.R.; ALMEIDA, A.P.; MATOS, M.H.T.; FIGUEIREDO, J.R. Papel do hormônio folículo estimulante na foliculogênese *in vivo* e *in vivo*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.4, p.171-182, 2009.

MAPA, Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, 2014. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br.html>> Acesso em: 01/02/2012 às 14:30 hrs.

MARTINS, F.S.; SILVA, J.R.V.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, n.1, p.36-49, 2008.

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, n.4, p.433-442, 2007.

NILSON, E.; KEZELE, P.; SKINNER, M.K. Leukemia inhibiting factor (LIF) promotes primordial to primary follicle transition in rato varies. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.175, p.123-130, 2001.

PICTON, H.M. Activation of follicle development: the primordial follicle. *Theriogenology*, v.55, p.193-210, 2001.

REYES, M.; ROJAS, C.; PARRAGUES, V.H.; PALOMINO, J. Expression of growth differentiation factor 9 (GDF-9) during *in vitro* maturation in canine oocytes.

Theriogenology, v.80, p.587-596, 2013.

RÜSSE, I.. Oogenesis in cattle and sheep. *Bibl Anat*, v.24, p.77-92, 1983.

SANTOS, R.R.; THARASANIT, T.; FIGUEIREDO, J.R.; HAEFTEN, T.; VAN DEN HURK, R.V.D. Preservation of caprine preantral follicle viability after cryopreservation in sucrose and ethylene glycol. *Cell Tissue Res*, v.325, p.523-553, 2006.

SAUMANDE, J. La folliculogénèse chez les ruminants, *Rec Vét*, v.167, p.205-218, 1991.

SCHOENWOLF, G.C.; BLEYL, S.B.; BRAUER, P.R.; FRANCIS-WEST, P.H.

Larsen's human embryology. 4th ed. Philadelphia: Churchill and Livingston, 2008.

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, 2004a.

SILVA, J.R.V.; VAN DEN HURK, R.; VAN TOL, H.T.A.; ROELEN, B.A.J, FIGUEIREDO, J.R. Expression of Growth Differentiation Factor 9 (GDF9), Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15) and BMP Receptors in the Ovaries of Goats. *Mol Reprod Dev*, v.70, p.11-19, 2004b.

SILVA, J.R.V.; SANTOS, R.R.; COSTA, S.H.F.; RODRIGUES, A.P.R.; FERREIRA, M.A.L.; MACHADO, V.P.; FIGUEIREDO, J.R. Degeneration rate of goat primordial follicles maintained in TCM 199 or PBS at different temperatures and incubation times. **Ciência rural**, v.33, p.913-919, 2003.

SMITZ, J.E.J.; CORTVRINDT, R.G. The earliest stages of folliculogenesis *in vitro*. **Reproduction**, v.123, p.185-202, 2002.

VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M.M.; BECKERS, J.F. In vivo and in vitro development of preantral follicles. **Theriogenology**, v.47, p.73-82, 1997.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, p.1717-1751, 2005.

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

WANG, J.; ROY, S.K. Growth differentiation factor-9 and stem cell factor promote primordial follicle formation in the hamster, p. modulation by follicle-stimulating hormone. **Biology Reproduction**, v.70, p.577-585, 2004.

ZHANG, Y.; HONGLI, D.; CHEN, J.; GUANFU, Y.; ZHANG, X. Porcine growth differentiation factor 9 gene polymorphisms and their associations with litter size. **Journal of Genetic Genomics**, v.35, p.163-169, 2008.

3 HIPÓTESE

O fator de crescimento e diferenciação-9 (GDF-9) favorece o crescimento dos folículos ovarianos no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais na espécie equina.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Estudar o efeito do GDF-9 em diferentes concentrações no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais na espécie equina.

4.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Testar as diferentes concentrações de GDF-9 (50 ng/ml, 100 ng/ml e 200 ng/ml) no meio de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais utilizando fragmentos ovarianos de éguas em dois e seis dias de cultivo;
- Comparar a taxa de desenvolvimento folicular das diferentes concentrações de GDF-9 por meio de análise histológica;
- Avaliar a viabilidade folicular, classificando os folículos como normais e degenerados, de acordo com a morfologia das células.

5. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

Efeito de diferentes concentrações de GDF-9 no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais da espécie equina

Polyana Carolina Marino¹, Camila Bizarro da Silva¹, Livia Aires Lisboa¹, Thales Ricardo Rigo Barreiros², Marcelo Marcondes Seneda¹

RESUMO

O presente estudo avaliou o efeito de diferentes concentrações de GDF-9 no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais na espécie equina. Para avaliar esse efeito foram coletados ovários de éguas (n=5) provenientes de abatedouro local e seccionados em nove fragmentos e um deles fixado imediatamente em bouin para controle (D0). Os outros fragmentos (n= 40) foram destinados ao cultivo *in vitro* em placas de 24 poços contendo meio de cultivo base (MEM+ suplementos) com adição das diferentes concentrações de GDF-9 (50 ng/ml, 100 ng/ml e 200 ng/ml) por um período de dois e seis dias. Cada tratamento foi repetido cinco vezes. Após o cultivo os fragmentos foram fixados em bouin por 24 horas e em seguida fixados em álcool 70% até a confecção das lâminas para histologia clássica. A leitura das lâminas foi realizada com objetivo de avaliar a viabilidade dos folículos ovarianos pré-antrais e classificá-los em normais ou degenerados conforme a integridade celular. A análise estatística foi realizada pelo programa SigmaStar® versão 3.5. As proporções dos folículos em desenvolvimento foram comparadas por meio do teste exato de Fisher e a viabilidade folicular por meio do teste de Q-quadrado. Dos 445 folículos avaliados, 49% (220/445) eram folículos primordiais, 51% (225/445) encontravam-se em fase de desenvolvimento e 60% (266/445) estavam morfológicamente normais ($p < 0,05$). Os folículos cultivados *in vitro* na concentração de GDF-9 de 200 ng/ml foi superior (63,3%) quando comparado ao grupo controle (MEM+) (53,0%) após dois dias de cultivo ($p < 0,05$). E com relação a quantidade de folículos disponíveis durante o experimento (n=445), observou-se que a maioria dos folículos encontrados foram nas diferentes concentrações de GDF-9 até 6 dias de cultivo (76,0%); ($p < 0,05$). Em conclusão, o GDF-9 na concentração de 200 ng/ml por um período de dois dias de cultivo, favoreceu o crescimento folicular.

Palavra-chave: fator de diferenciação-9, equinos, biotecnologia, MOIFOPA.

¹ Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, Paraná.

² Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Estadual do Norte do Paraná, UENP, Bandeirantes, Paraná.

ABSTRACT

This study evaluated the effect of different concentrations of GDF-9 in vitro culture of pre-antral follicles in the equine species. To evaluate this effect were collected mares' ovaries (n = 5) from a local slaughterhouse and sectioned into nine segments and one fixed immediately with bouin to control (D0). The other fragments (n = 40) were used for in vitro culture in 24-well plates containing base cultivation (MEM + supplements) with addition of different concentrations of GDF-9 (50 ng / ml, 100 ng / ml and 200 ng / ml) for a period of two to six days. Each treatment was replicated five times. After the cultivation the fragments were fixed in Bouin solution for 24 hours and then fixed in 70% alcohol to make the slides for histology. The tissue was performed to evaluate the feasibility of pre-antral follicles and classify them as normal or degenerated as cellular integrity. Statistical analysis was performed by SigmaStar® program version 3.5. The proportions of the developing follicles were compared using Fisher's exact test and the follicular viability through the Q-square test. Of 445 evaluated follicles, 49% (220/445) were primordial follicles, 51% (225/445) were in the development phase and 60% (266/445) were morphologically normal (p <0.05). The in vitro cultured follicles in the concentration of GDF-9 200 ng / ml was higher (63.3%) compared to the control group (MEM +) (53.0%) after two days of culture (p <0.05) . And regarding the amount of available follicles during the experiment (n = 445), it was observed that most follicles were found in different concentrations of GDF-9 to 6 days of cultivation (76.0%); (P <0.05). In conclusion, the GDF-9 at a concentration of 200 ng / mL for a period of two days of culture favored the follicular growth.

Keywords: differentiation factor-9, horses, biotechnology, MOEPF.

1. Introdução

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2014), o rebanho de equinos no Brasil está em terceiro lugar no ranking mundial na criação de cavalos. Incluindo os muares e asininos, chegam a ultrapassar oito milhões de cabeças e movimentando em média 13 bilhões de reais somente com a equinocultura. Os responsáveis por este grande avanço econômico são as atividades esportivas praticada com os animais dessa espécie no país, incluindo as provas de tambor, laço e saltos.

Devido a esse grande crescimento, criadores e associações de criadores de cavalos têm demonstrado interesse na aplicação de biotécnicas voltadas à reprodução equina, visando acelerar o ganho genético desses animais, bem como melhorar as taxas de concepção de animais portadores de subfertilidade (BORTOT; ZAPPA, 2013).

Uma dessas biotécnicas que merece destaque, é o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais que tem como objetivo aumentar a disponibilidade de oócitos imaturos, para posteriormente serem maturados e futuramente fertilizados (GOMES et al., 2012; HAAG et al., 2013ab; ALVES et al., 2014). Apesar do interesse por parte de pesquisadores nessa técnica, há dificuldade de obter material suficiente para o desenvolvimento dessas pesquisas. Em alguns trabalhos, sugere-se a utilização de ovários provenientes de éguas sacrificadas ou de morte eminente e por métodos cirúrgicos como biópsias e ovariectomias (GOMES et al., 2012; HAAG et al., 2013). Uma outra alternativa seria a obtenção desses ovários em abatedouros, os quais são escassos em todo o mundo (CARNEVALE; MACLELLAN, 2006).

Independente da origem do material que será processado, é necessário preparar o meio de cultivo a ser utilizado antes de iniciar a manipulação dos fragmentos ovarianos (SMITZ; CORTVRINDT, 2002). Segundo Figueiredo et al (2008) algumas substâncias como antibióticos, tampões, substratos nutricionais, fontes proteicas, antioxidantes, hormônios e fatores de crescimento são acrescentados para favorecer a nutrição e manter a integridade dessas células evitando processos degenerativos.

Os fatores de crescimento adicionados ao meio, podem colaborar no crescimento e maturação folicular. Na espécie equina, poucas

pesquisas voltadas ao cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais com a adição de fatores de crescimento foram realizadas, principalmente quanto ao fator de crescimento e diferenciação-9 (GDF-9). Este fator de crescimento proporciona a proliferação das células da granulosa e da teca, colabora no crescimento de folículos primários e promove a manutenção da viabilidade folicular (ZHANG et al., 2008; ALMEIDA et al., 2011; TANG et al., 2012; REYES et al., 2013).

Com base nessas informações, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito das diferentes concentrações de GDF-9 no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais na espécie equina.

2. Material e Métodos

Coleta e transporte dos ovários

Foram coletados ovários de éguas (n=5), sem sinais de ciclicidade (ausência de corpo lúteo e folículos com diâmetros maiores que 10 mm), em anestro estacional no mês de maio, provenientes do abatedouro Oregon®, há uma distância aproximada de 50 km do laboratório de reprodução animal da Universidade Estadual de Londrina (latitude 23° 33'03" S e longitude 51° 27'39" W). O transporte dos ovários foi realizado de acordo com Gomes et al. (2012), em um recipiente térmico contendo solução de PBS modificada (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), Penicilina (1.000.000 U.I.) e estreptomicina (50 mg) a 4° C, em aproximadamente 40 minutos.

Processamento dos ovários

No laboratório, os ovários foram lavados com álcool a 70% e PBS modificado a 4° C. Os ligamentos e tecidos conectivos foram retirados com o auxílio de bisturi e tesoura e em seguida um corte sagital na curvatura maior do ovário foi realizado obtendo-se dois hemiovários.

Os fragmentos ovarianos de 5 animais (n=9 de cada ovário) foram obtidos através de secções do parênquima na região equidistante entre as curvaturas maior e menor com tamanhos aproximados de 5x5x1 mm. Em seguida, os fragmentos foram lavados com solução PBS e um deles foi fixado em Bouin,

considerando o controle não cultivado e os outros fragmentos foram destinados ao cultivo de folículos pré-antrais *in vitro*. Cada tratamento foi repetido cinco vezes.

Cultivo in vitro

Os fragmentos ovarianos (n=8) foram cultivados individualmente em placas de cultivo de 24 poços contendo 1 ml de meio base (MEM+) ou MEM+ suplementado com diferentes concentrações de GDF-9 (50, 100 e 200 ng/ml – Figura 1) por 2 e 6 dias.

O MEM+ foi constituído de MEM (Gibco BRL, Rockville, MD, USA – osmolaridade 300 mOsm/l, pH 7,2); (47 ml), suplementado com piruvato (500 µl), glutamina (500 µl), hipoxantina (500 µl), ITS (500 µl) , albumina sérica bovina (0,07 g/ml- Gibco BRL, Rockville, MD, USA), penicilina (500µl) e estreptomicina (500µl).

As placas com os fragmentos foram encaminhadas para a estufa a 39°C em atmosfera com 5% CO₂ em ar e com umidade saturada durante 2 ou 6 dias, sendo a troca do meio de cultivo realizada a cada 2 dias. Após o término do cultivo, os fragmentos foram fixados em Bouin e processados para histologia clássica.

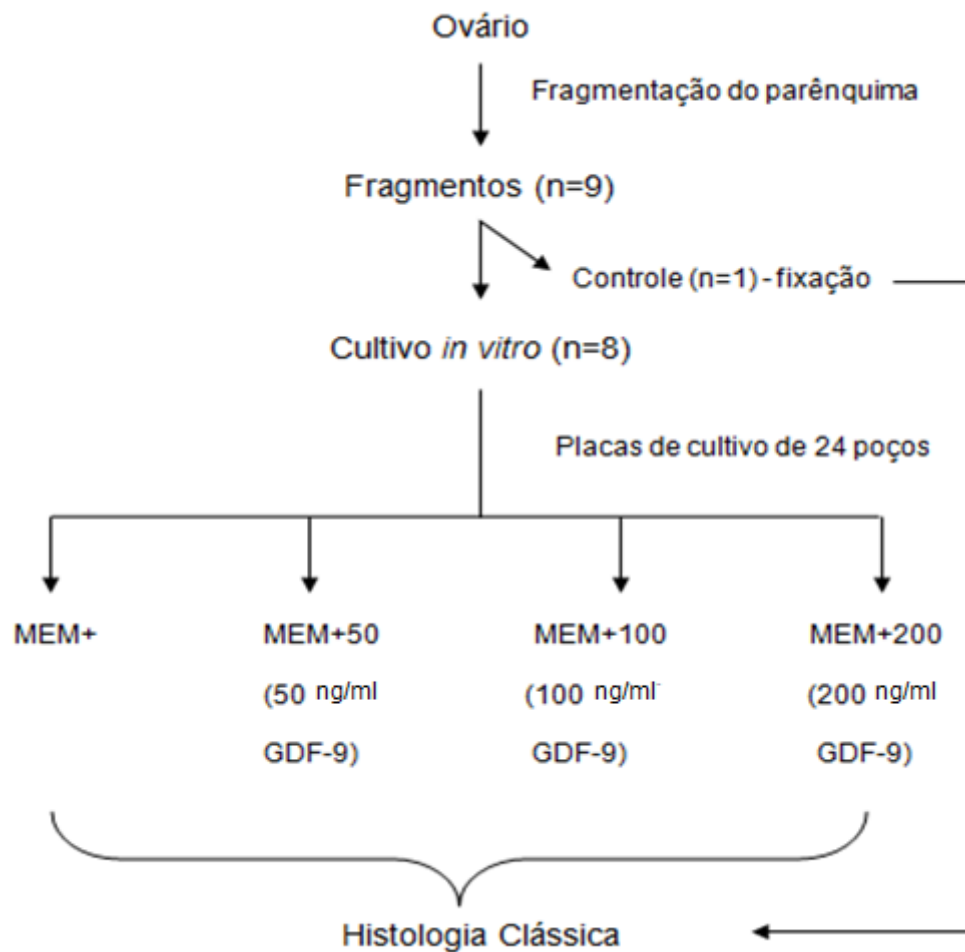


Figura 1. Protocolo experimental de cinco replicatas para o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais equinos com diferentes concentrações de GDF-9.

Processamento histológico

Os fragmentos ovarianos (controle, D2 e D6) foram fixados em Bouin por 24 horas e posteriormente mantidos em álcool 70% até o início do processamento histológico. Ao serem destinados para a histologia, os fragmentos foram desidratados em etanol, diafanizados em xilol, incluídos em blocos com parafina e destinados ao corte seriado com intervalos de 5 μ m em micrótomo rotativo (Leica®, Wetzlar – Alemanha) e fixados em lâminas histológicas e coradas pelo método PAS e hematoxilina. Após a confecção das lâminas, foi realizada a leitura das mesmas por meio de microscopia. Para evitar a contagem do mesmo folículo, foram consideradas apenas as secções em que o núcleo do oócito foi observado.

Classificação folicular

Quanto ao desenvolvimento folicular, os folículos pré-antrais foram classificados em primordiais e em desenvolvimento (primários e secundários). Os primordiais eram os folículos que apresentavam uma camada de células da granulosa de formato pavimentoso envolvendo o oócito. Os folículos em desenvolvimento apresentavam pelo menos uma camada de células da granulosa de formato cubóide envolvendo o oócito ou eram os folículos secundários, com duas ou mais camadas de células da granulosa também com formato cubóide (HULSHOF et al., 1995; GOMES et al., 2012).

Quanto a morfologia folicular, os folículos foram classificados em normais ou degenerados. Os folículos classificados como degenerados apresentavam núcleo picnótico, desorganização das células da granulosa, retração do citoplasma, condensação da cromatina ou destruição total dos componentes foliculares e os normais apresentavam integridade em suas estruturas.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada pelo programa SigmaStat® versão 3.5. A viabilidade dos folículos foram comparadas utilizando o teste do Qui-quadrado e as proporções de folículos em desenvolvimento foram comparadas por meio do teste exato de Fisher. Os dados considerados significativos apresentaram $P > 0,05$.

3. Resultados

Um total de 445 folículos ovarianos foram analisados neste estudo. A distribuição dos folículos pré-antrais foi realizada de acordo com a classificação do crescimento folicular e sua integridade (Figura 2).

A concentração de 200 ng/ml de GDF-9 por 2 dias de cultivo *in vitro* apresentaram desenvolvimento folicular (63,3%) superior quando comparado as outras concentrações de GDF-9 (50 e 100 ng/ml) no período de 2 dias de cultivo (Tabela 1).

Os folículos cultivados nas diferentes concentrações (50, 100 e 200 ng/ml) de GDF-9 durante 6 dias de cultivo também apresentaram desenvolvimento folicular (63,6%, 77,3% e 87,5% respectivamente) quando comparado aos folículos primordiais ($p < 0,05$), porém, o desenvolvimento desses folículos nas três diferentes concentrações foram similares aos folículos presentes no controle do cultivo MEM D6 (81,6%) ($p < 0,05$). Esses resultados demonstram que o GDF-9 adicionado ao meio de cultivo por um período de 6 dias não influenciam no desenvolvimento folicular (Tabela 1).

Tabela 1 - Total de folículos primordiais e em desenvolvimento após o cultivo in vitro de fragmentos ovarianos equinos por 2 ou 6 dias, em MEM+ suplementado com GDF-9 em diferentes concentrações (50, 100 e 200 ng/mL) ($p < 0,05$).

| TRATAMENTO | PRIMORDIAL(%) | DESENVOLVIMENTO(%) | TOTAL |
|-------------|-----------------------------|-----------------------------|-------|
| CTRL (D0) | 68,8 (93/135) ^{aA} | 31,1 (42/135) ^{bB} | 135 |
| MEM D2 | 47,0 (8/17) ^{abA} | 53,0 (9/17) ^{bA} | 17 |
| GDF9 50 D2 | 69,5 (41/59) ^{aA} | 30,5 (18/59) ^{bB} | 59 |
| GDF9 100 D2 | 54,3 (19/35) ^{aA} | 45,7 (16/35) ^{bB} | 35 |
| GDF9 200 D2 | 36,7 (33/90) ^{bB} | 63,3 (57/90) ^{abA} | 90 |
| MEM D6 | 18,4 (7/38) ^{bB} | 81,6 (31/38) ^{aA} | 38 |
| GDF9 50 D6 | 36,4 (12/33) ^{abB} | 63,6 (21/33) ^{aA} | 33 |
| GDF9 100 D6 | 22,7 (5/22) ^{bB} | 77,3 (17/22) ^{aA} | 22 |
| GDF9 200 D6 | 12,5 (2/16) ^{bB} | 87,5 (14/16) ^{aA} | 16 |

Valores seguidos por letras minúsculas indicam diferença entre linhas ($p < 0,05$).

Valores seguidos por letras maiúsculas indicam diferença entre colunas ($p < 0,05$).

Dos 445 folículos encontrados, 49% (220/445) eram folículos primordiais, 51% (225/445) apresentavam-se em desenvolvimento e 60% (266/445) estavam morfolologicamente normais ($p < 0,05$) (Tabela 2).

Comparando-se a morfologia entre os folículos primordiais e em desenvolvimento, pode-se notar que não houve diferença entre o número de folículos primordiais viáveis quando comparado aos folículos viáveis em desenvolvimento nas diferentes concentrações de GDF-9 ($p > 0,05$) (Tabela 2).

As diferentes concentrações de GDF-9 (100 e 200 ng/ml D2 e 50, 100 e 200 ng/ml D6), grupo controle não cultivado (D0) e grupo controle cultivado (MEM D2 e D6) não apresentaram diferença entre si e mantiveram uma taxa de degeneração folicular consideravelmente alta com exceção da concentração 50 ng/ml no período de 2 dias de cultivo ($p>0,05$) (Tabela 2).

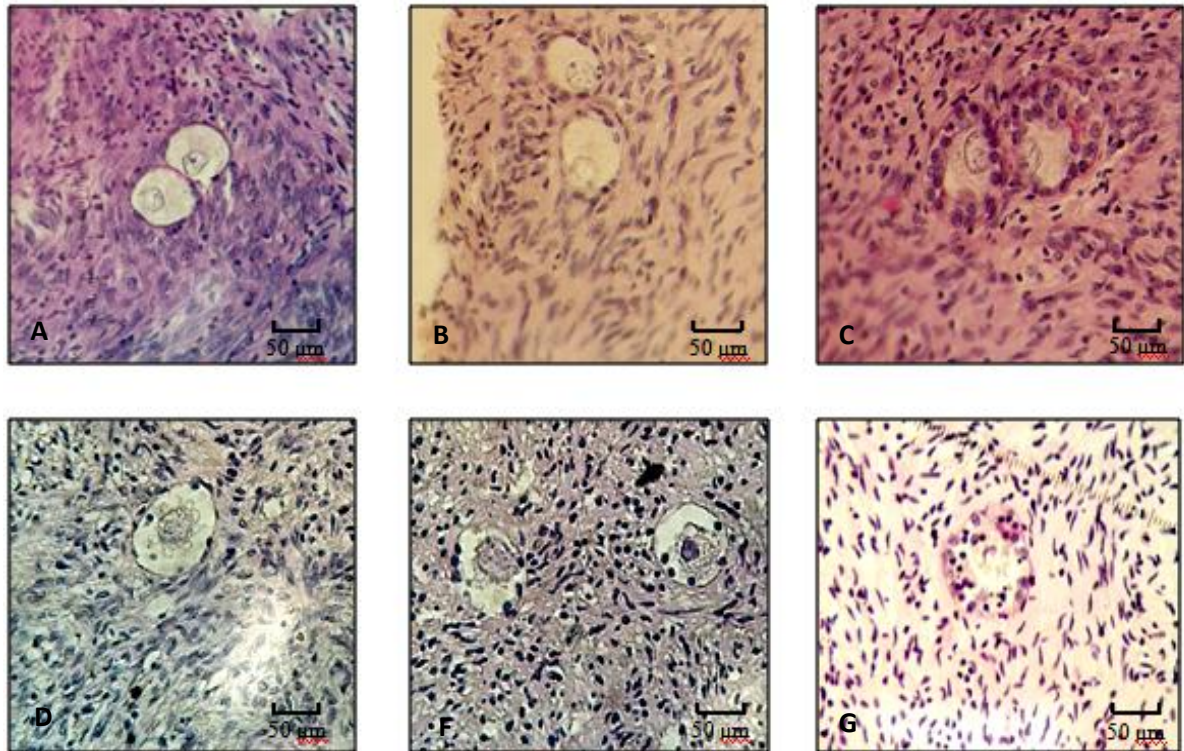
Tabela 2 - Total de folículos primordiais e em desenvolvimento viáveis e degenerados após o cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos equinos por 2 e 6 dias, em MEM+ suplementado com GDF-9 em diferentes concentrações (50, 100 e 200 ng/mL) ($p<0,05$).

| Tratamentos | Primordiais (%) | | Desenvolvimento (%) | | TOTAL |
|-------------|-----------------|-----------------|---------------------|-----------------|-------|
| | Viáveis | Degenerados | Viáveis | Degenerados | |
| D0 | 68,0 (85/125)AA | 80,0 (8/10)aA | 32,0 (40/125)aB | 20,0 (2/10)bB | 135 |
| MEM D2 | 40,0 (2/5)aA | 50,0 (6/12)aA | 60,0 (3/5)aA | 50,0 (6/12)aA | 17 |
| 50 D2 | 70,0 (35/50)aA | 67,0 (6/9)aA | 30,0 (15/50)aB | 33,3 (3/9)bB | 59 |
| 100 D2 | 63,0 (15/24)aA | 36,0 (4/11)bB | 37,0 (9/24)aA | 64,0 (7/11)aA | 35 |
| 200 D2 | 60,0 (12/20)aA | 30,0 (21/70)bB | 40,0 (8/20)aA | 70,0 (49/70)aA | 90 |
| MEM D6 | 90,0 (18/20)aA | 100,0 (41/41)aA | 10,0 (2/20)aB | 0,0 (0/41)cB | 61 |
| 50 D6 | 50,0 (7/14)aA | 26,0 (5/19)bB | 50,0 (7/14)aA | 74,0 (14/19)aA | 33 |
| 100 D6 | 40,0 (4/10)aA | 8,0 (1/12)bB | 60,0 (6/10)aA | 92,0 (11/12)aA | 22 |
| 200 D6 | 67,0 (2/3)aA | 0,0 (0/13)cB | 33,0 (1/3)aA | 100,0 (13/13)aA | 16 |

Valores seguidos de letras maiúsculas em cada categoria de folículo tanto (viáveis primordiais e em desenvolvimento e primordiais e em desenvolvimento degenerados) indicam diferença entre colunas ($p<0,05$).

Valores seguidos de letras minúsculas indicam diferença entre linhas em cada categoria de folículo (viáveis primordiais e em desenvolvimento e degenerados primordiais e em desenvolvimento) ($p<0,05$).

Figura 2 - Cortes de histologia clássica do tecido ovariano equino com folículos pré-antrais viáveis. A) Folículo primordial; B) Folículo primário e C) Folículo secundário. Em seguida, observa-se os folículos pré-antrais degenerados. D) Folículo primordial degenerado; E) Folículo primário degenerado e F) Folículo secundário degenerado (Objetiva de 40X). Método de coloração PAS e Hematoxilina (Barras=50 μ m).



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

4. Discussão

No presente estudo, pode-se observar que a melhor concentração de GDF-9 adicionada ao meio de cultivo promovendo o crescimento dos folículos ovarianos pré-antrais foi a de 200 ng/ml em dois dias de cultivo quando comparado ao grupo controle (MEM D2) e ao grupo não cultivado (D0). Devido a ausência de trabalhos utilizando o GDF-9 no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais na espécie equina, a análise comparativa dos resultados será realizada por meio de trabalhos publicados em outras espécies de mamíferos (WANG; ROY, 2004; SILVA et al., 2004; ZHANG et al., 2008; HUANG et al., 2009; ALMEIDA et al., 2011)

De acordo com Almeida et al (2011), a concentração de 200 ng/ml de GDF-9 adicionada ao meio de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais em caprinos apresentou melhor resultado no crescimento folicular quando comparada as outras concentrações, corroborando com os dados apresentados nesta pesquisa, porém os folículos ovarianos de caprinos mantiveram a viabilidade folicular em até 6 dias de cultivo, já no presente estudo, a integridade dos folículos foram mantidas nos 2 primeiros dias de cultivo.

Com relação a quantidade de folículos disponíveis, pode-se observar que a maioria dos folículos foram localizados em fragmentos ovarianos que permaneceram por 6 dias de cultivo independente da concentração de GDF-9 administrada. Esses resultados também foram similares ao apresentado por Almeida et al (2011) na espécie caprina tanto na concentração de 100 ng/ml quando a de 200 ng/ml os números de folículos foram maiores com 6 dias de cultivo, após esse período os números demonstraram declínio significativo.

Em outras espécies como os ratos (WANG;ROY, 2004), humanos (HUANG et al., 2009), caprinos (SILVA et al., 2004b), cães (REYES et al.,2013) e em suínos (ZHANG et al., 2008), o GDF-9 também teve uma importante participação sobre crescimento e desenvolvimento folicular assim como foi demonstrado no presente trabalho.

O fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF-9) utilizado nesse experimento, é um fator de crescimento produzido dentro do oócito e está diretamente envolvido na foliculogênese e na fertilidade das fêmeas. O GDF-9 está principalmente envolvido no crescimento folicular de folículos primários (única camada de células da granulosa de formato cubóide). Os níveis desse fator de crescimento se elevam quando o oócito sofre o crescimento na fase pré-antral e permanecem em níveis elevados até a ovulação e reduzidos após a fecundação (ERICKSON; SHIMASAKI, 2000).

Além do GDF-9, outros fatores de crescimento adicionados ao meio de cultivo, ainda são pouco estudados na espécie equina. Um dos motivos da pouca disponibilidade desses trabalhos é a dificuldade de obter ovários oriundos de abatedouro, devido a baixa disponibilidade de locais autorizados ao abate dessa espécie. Sendo assim, Haag et al (2013a) utilizou como alternativa, a obtenção de fragmentos ovarianos por meio de biópsia Pick-Up (BPU) em éguas vivas, tornando assim, esse método como um meio para o início de pesquisas voltadas a essa área.

Porém, poucos fragmentos ovarianos podem ser obtidos por esse tipo de coleta. Com isso, a vantagem de obter fragmentos ovarianos de abatedouro favorece uma maior quantidade de material disponível, como foi o caso desta pesquisa.

Outra pesquisa recentemente voltada ao cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais de equinos, teve como objetivo verificar a espessura do corte histológico em que colabora para uma melhor leitura e localização dos folículos ovarianos pré-antrais. Os cortes histológicos foram realizados em três espessuras: 3, 5 e 7 μm e o resultado em que obtiverem um número maior de folículos e melhor visualização dos mesmos foi a espessura de 7 μm (ALVES et al., 2014). Resultado esse que contradiz o método utilizado no presente estudo, mas que também apresentou resultados satisfatórios quanto a visualização dos folículos e sua distribuição nas lâminas histológicas.

No geral, ainda não existe um protocolo ideal no processamento dos ovários, manipulação das amostras e no desenvolvimento de meios de cultivo para cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais na espécie equina. Porém, no presente estudo, os cuidados tomados para o transporte e manipulação das amostras, considerando a temperatura, meio utilizado e o tempo de transporte do abatedouro até o laboratório, foram condições adequadas para manter a integridade do tecido ovariano conforme descrito por Gomes et al. (2012).

Com base nos dados apresentados, é possível adicionar o GDF-9 na concentração de 200 ng/ml por dois dias de cultivo com o objetivo de auxiliar no crescimento folicular. No entanto, mais estudos são necessários afim de aprimorar a técnica, para diminuir as taxas de degeneração folicular para que futuramente os sistemas de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais na espécie equina, poderão garantir uma maior taxa na produção de embriões equinos, além de armazenar materiais genéticos e facilitar no melhoramento genético desses animais.

5. Conclusão

De acordo com os resultados apresentados nesta pesquisa, conclui-se que o GDF-9 na concentração de 200 ng/ml por um período de dois dias de cultivo adicionado no meio de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais, favorece o crescimento folicular.

6. Referências bibliográficas

- ALMEIDA, A.P.; SARAIVA, M.V.A.; ARAÚJO, V.R.; MAGALHÃES, D.M.; DUARTE, A.B.G.; FROTA, I.M.A.; LOPES, C.A.P.; CAMPELLO, C.C. SILVA, J.R.V.; FIGUEIREDO, J.R. Expression of growth and differentiation factor 9 (GDF-9) and its effect on the in vitro culture of caprine preantral ovarian follicles. *Small Rum Res*, v.100, p.169-176, 2011.
- ALVES, K.A.; ALVES, B.G.; ROCHA, C.D.; VISONNA, M.; MOHALLEM, R.F.F.; JACOMINI, J.O.; BELETTI, M.E.; FIGUEIREDO, J.R.; GAMBARINI, M.L.; GASTAL, E.L. Number and density of equine preantral follicles in different ovarian histological section thicknesses. *Theriogenology*, *in press*, 2014.
- CARNEVALE, E.M.; MACLELLAN, L.J. Collection, evaluation and use of oocytes in equine assisted reproduction. *Veterinary Clinics Equine Practice*, v.22, p.843-856, 2006.
- ERICKSON, G.F.; SHIMASAKI, S. The role of the oocyte in folliculogenesis. *TEM*, v.11, n.5, p.193-198, 2000.
- 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**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2008. p.303-327.
- GOMES, R.G.; ANDRADE, E.R.; LISBOA, L.A.; CIQUINI, A.; BARREIROS, T.R.R.; FONSECA, N.A.N.; SENEDA, M.M. Effect of holding medium, temperature and time on structural integrity of equine ovarian follicles during the non-breeding season. *Theriogenology*, v.78, p.731-736, 2012.
- HAAG, K.T.; MAGALHÃES-PADILHA, D.M.; FONSECA, G.R.; WISCHRAL, A.; GASTAL, M.O.; KING, S.S.; JONES, K.L.; FIGUEIREDO, J.R.; GASTAL, E.L. Quantification, morphology, and viability of equine preantral follicles obtained via the Biopsy Pick-Up method. *Theriogenology*, v.79, p.599-609, 2013a.
- HAAG, K.T.; MAGALHÃES-PADILHA, FONSECA, G.R.; WISCHRAL, A.; GASTAL, M.O.; KING, S.S.; JONES, K.L.; FIGUEIREDO, J.R.; GASTAL, E.L. In vitro culture of equine preantral follicles obtained via the Biopsy Pick-up method. *Theriogenology*, v.79, p.911-917, 2013b.
- HUANG, H.Y.; WANG, H.S.; CHAN, S.H.; LEE, C.L.; WANG, C.W.; SOONG, Y.K. Granulosa-lutein cell growth differentiation factor-9 (GDF-9) messenger RNA and protein expression in vitro fertilization (IVF) cycles: relation to characteristics of ovulation induction and IVF. *Fertil Steril*, v.91, n.4, p.1583-1585, 2009.
- HULSHOF, S.C.J.; FIGUEIREDO, J.R.; BEKERS, J.F.; BEVERS, M.M.; VAN DER DONK, J.A. Effects of fetal bovine serum, FSH and 17 β -estradiol on the culture of bovine preantral follicles. *Theriogenology*, 44, p.217-226, 1995.

JAATINEN, R.; LAITINEN, M.P.; VUOJOLAINEN, K.; AALTONEN, J.; LOUHIO, H.; HEIKINHEIMO, K.; LEHTONEN, E.; RITVOS, O. Localization of growth differentiation factor-9 (GDF-9) mRNA and protein in rat ovaries and cDNA cloning of rat GDF-9 and its novel homolog GDF-9B. *Mol. Cell. Endocrinol.*, v.156, p.189–193, 1999.

REYES, M.; ROJAS, C.; PARRAGUEZ, V.H.; PALOMINO, J. Expression of growth differentiation factor9 (GDF-9) during *in vitro* maturation in canine oocytes. **Theriogenology**, v.80, n.6, p.587-596, 2013.

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, 2004a.

SILVA, J.R.V.; VAN DEN HURK, R.; VAN TOL, H.T.A; ROELEN, B.A.J, FIGUEIREDO, J.R. Expression of Growth Differentiation Factor 9 (GDF9), Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15) and BMP Receptors in the Ovaries of Goats. *Mol Reprod Dev*, v.70, p.11-19, 2004b.

SMITZ, J.E.J.; CORTVRINDT, R.G. The earliest stages of folliculogenesis *in vitro*. **Reproduction**, v.123, p.185-202, 2002.

TANG, K.; YANG, W.; XIANG, L.; CAN-JIE, W.; SANG, L.; YANG, L. GDF-9 and bFGF enhance the effect of FSH on the survival, activation, and growth of cattle primordial follicles. **Animal Reproduction Science**, v.131, n.3-4, p.129-134, 2012.
WANG, J.; ROY, S.K. Growth differentiation factor-9 and stem cell factor promote primordial follicle formation in the hamster, p. modulation by follicle-stimulating hormone. *Biol Reprod*, v.70, p.577–585, 2004.

ZHANG, Y.; HONGLI, D.; CHEN, J.; GUANFU, Y.; ZHANG, X. Porcine growth differentiation factor 9 gene polymorphisms and their associations with litter size. *J. Genet. Genomics*, v.35, p.163-169, 2008.

WANG, J.; ROY, S.K. Growth differentiation factor-9 and stem cell factor promote primordial follicle formation in the hamster, p. modulation by follicle-stimulating hormone. **Biology Reproduction**, v.70, p.577–585, 2004.

6. CONCLUSÃO GERAL

Na espécie equina, o fator de crescimento e diferenciação-9, assim como nas outras espécies já estudadas, promove o desenvolvimento folicular quando adicionado ao meio de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais na concentração de 200 ng/ml.