# UTILIZAÇÃO DA BIOTECNOLOGIA DO OVÁRIO ARTIFICIAL PARA A ELABORAÇÃO DE UM SISTEMA DE CULTIVO IN VITRO EFICIENTE PARA O DESENVOLVIMENTO E A MATURAÇÃO DE FOLÍCULOS OVARIANOS CAPRINOS

**Alesandro Silva Ferreira**[1]
**José Ricardo De Figueiredo**[2]
**Rebeca Magalhães Pedrosa Rocha**[3]
**André Luiz Da Conceição Santos**[4]
**Juliana Jales De Hollanda Celestino**[5]

**RESUMO**

O objetivo deste estudo foi, através da biotecnologia do Ovário Artificial, avaliar o efeito do GDF-9 sobre o crescimento folicular e a maturação oocitária de FOA caprinos isolados e cultivados *in vitro* na presença de anetol e insulina. Para tanto, de cada par ovariano foram obtidos FOAs (300-350 µm), os quais foram cultivados em meio de base α-MEM+ contendo anetol (300 ng/mL) e insulina (10 ng/mL) na ausência (tratamento controle) ou presença de GDF-9 (tratamento GDF-9), por 18 dias. Após o cultivo *in vitro*, os COCs foram selecionados para a maturação *in vitro*. Durante o cultivo *in vitro* foram avaliados morfologia e crescimento folicular, e após a maturação *in vitro* foram avaliados morfologia, diâmetro e configuração da cromatina do oócito. Em ambos os tratamentos, foi observada diminuição na porcentagem de folículos intactos com concomitante aumento nas taxas de extrusão e degeneração ($P < 0,05$). Comparado ao tratamento controle, o tratamento com GDF-9 apresentou maiores taxas de extrusão folicular apenas no dia 6 de cultivo ($P < 0,05$). O diâmetro folicular aumentou progressivamente ao longo do período de cultivo ($P < 0,05$) com diâmetros semelhantes entre os tratamentos nos intervalos a cada seis dias de cultivo (0-6, 6-12, 12-18) ($P > 0,05$). Por outro lado, o GDF-9 aumentou a taxa de crescimento do dia 6 para o dia 12 do cultivo, sendo maior ($P < 0,05$) do que o controle no intervalo 6-12 dias. Todos os outros parâmetros avaliados no dia 18 foram semelhantes entre os dois tratamentos, ou seja, viabilidade, crescimento e taxas de maturação oocitária ($P > 0,05$). Em conclusão, este estudo mostrou pela primeira vez que o GDF-9 adicionado a um meio de cultivo contendo anetol aumentou a taxa de crescimento de folículos antrais iniciais caprinos isolados e cultivados *in vitro*.

**Palavras-chave:** competência oocitária; antioxidante; fator de crescimento; folículo ovariano.

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira, Instituto de Ciênicas da Saúde- iCS, Discente, silvaalesandro90@gmail.com[1]
Universidade Estadual do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Docente, figueiredo.lamofopa@gmail.com[2]
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira, Instituto de Ciências da Saúde-ICS, Docente, rebecarocha@unila.edu.br[3]
Universidade Estadual do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária, Discente, andrelouizst@gmail.com[4]
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira, Instituto de Ciências da Saúde-ICS, Docente, juliana.celestino@unilab.edu.br[5]


**ISSN: 2447-6161**

**INTRODUÇÃO**

A biotecnologia do Ovário Artificial consiste no uso de sistemas de cultivo *in vitro* que visem oferecer condições ideais e ambiente favorável para o desenvolvimento de folículos ovarianos fora do ovário.

Resultados promissores no cultivo *in vitro* de folículos secundários caprinos foram obtidos recentemente com a adição do antioxidante anetol no meio de base, em que este proporcionou maiores taxas de retomada meiótica e menor concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs), quando comparado a outros antioxidantes (SÁ *et al.,* 2017). Além disso, foi relatado a primeira gestação após cultivo *in vitro* (CIV) de folículos antrais caprinos cultivados na presença de anetol e hormônio do crescimento (GH - SÁ *et al.,* 2020).

Além do anetol, outra substância ao qual já foi observado efeitos benéficos no CIV de folículos ovarianos é o fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF-9). Em estudos realizados em caprinos, o GDF-9 apresentou resultados bastante promissores, promovendo a ativação, o desenvolvimento, a manutenção da sobrevivência folicular, a formação de antro, crescimento de folículos primários e secundários e a manutenção da ultraestrutura folicular no cultivo in situ de tecido ovariano (MARTINS *et al.,* 2008; ALMEIDA *et al.*, 2011), especialmente quando utilizado na concentração de 200 ng/mL. No entanto, ainda não há relatos da influência do GDF-9, nem da sua associação ao anetol, no CIV de folículos antrais iniciais isolados caprinos.

Com base nisso, o presente estudo teve como objetivo investigar o efeito do GDF-9 durante o cultivo *in vitro* de folículos antrais iniciais caprinos isolados, em meio contendo anetol.

**METODOLOGIA**

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE; No 2422377/2016).

Para este fim, ovários de cabras adultas sem raça definida (n= 60) foram coletados em abatedouro local, e transportados ao laboratório em MEM-HEPES por no máximo 1 h a 4 °C (CHAVES *et al.,* 2008).

Folículos antrais iniciais (FOA) que possuíam aproximadamente 300-350 µm de diâmetro, foram visualizados, manualmente dissecados e selecionados para o cultivo *in vitro* (CADENAS *et al.,* 2017). O meio de cultivo base consistiu em Alfa Meio Essencial Mínimo modificado (α-MEM) suplementado com 50 ng/mL de hormônio do crescimento (GH) e 300 µg/mL de anetol, dentre outros, referido como α- MEM+ (SÁ *et al.,* 2017), na ausência (tratamento controle) ou presença de 200 ng/mL de fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF-9 - tratamento GDF-9). Os FOAs foram cultivados individualmente por 18 dias em gotas de 100 µL de meio de base sob óleo mineral, a 38,5oC em atmosfera umidificada com 7,5% de CO2.

A cada seis dias de cultivo, os folículos foram avaliados quanto aos aspectos morfológicos, sendo classificados como normais, extrusos ou degenerados, bem como foi realizada a mensuração do diâmetro e taxa de crescimento folicular.

Após o período de cultivo folicular, os complexos cumulus oócitos (COCs) foram recuperados, selecionados e destinados a maturação *in vitro* (MIV). Os complexos cumulus oócitos (COCs) selecionados foram lavados três vezes em meio MIV composto de Meio de Cultivo de Tecidos 199 (TCM 199) suplementado com 1 µg/mL de 17β-estradiol, 5 µg/mL de hormônio luteinizante (LH), 0,5 µg/mL de FSHr, 10 ng/mL de fator de crescimento epidermal (EGF), 1 mg/mL de BSA, 22 µg/mL de piruvato, 50 ng/mL de fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-I) e 100 µM/L de cisteamina (FERREIRA *et al.*, 2016). Após a lavagem, os COCs foram transferidos individualmente para meio MIV fresco (1 COC por 10 µL de gota) em placas de cultivo sob óleo mineral e incubados por 32 horas a 38,5 ° C com 7,5 % de CO2 em atmosfera (SÁ *et al.*, 2019).

Após a MIV, para avaliação da configuração da cromatina por fluorescência, os COCs foram desnudados mecanicamente e incubados individualmente com Hoechst 33342 e 1% de glutaraldeído, e processados como


**ISSN: 2447-6161**

descrito previamente (CADENAS *et al.,* 2017). De acordo com a configuração da cromatina, os oócitos foram classificados como vesícula germinativa (VG), metáfase I (MI), metáfase II (MII), ou degenerado, quando a cromatina apresentou configuração anormal.

Os dados estatísticos foram apresentados como média (± EPM) ou percentagem. A normalidade e homogeneidade da variância foram analisadas previamente utilizando os testes de Shapiro-Wilk e de Levene, respectivamente. A comparação de médias foi realizada com ANOVA one-way seguido de teste post-hoc de Student-Newman-Keuls. As variáveis proporcionais (folículos intactos, degenerados, extrusos e retomada meiótica) foram analisadas entre dias e entre tratamentos com o teste de Qui-Quadrado ou teste G. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou os efeitos do fator de crescimento e diferenciação (GDF-9), na presença de anetol, sobre o desenvolvimento e maturação de folículos antrais iniciais caprinos.

Ao fim do cultivo folicular, foi observada uma redução no número de folículos intactos em ambos os tratamentos (controle e GDF-9 - P

## CONCLUSÕES

Em conclusão, este estudo mostra, pela primeira vez, que a adição de GDF-9 ao meio de cultivo de base contendo anetol aumentou a taxa de crescimento de folículos antrais iniciais caprinos cultivados *in vitro*. Entretanto, não houve qualquer influência sobre a maturação oocitária.

## AGRADECIMENTOS

o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq por proporcionar subsídios para a realização por meio da concessão da bolsa. À Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira (UNILAB), à Universidade Estadual do Ceará (UECE) e ao Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-Antrais (LAMOFOPA) da UECE, pelo apoio no desenvolvimento dos experimentos desta pesquisa

## REFERÊNCIAS

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 Ruminant Research, v. 100, n. 2–3, p. 169–176, 2011.

CADENAS, J.; LEIVA-REVILLA, J.; VIEIRA, L. A.; APOLLONI, L. B.; AGUIAR, F. L. N.; ALVES, B. G.; LOBO, C. H.; RODRIGUES, A. P. R.; APGAR, G. A.; SMITZ, J.; FIGUEIREDO, J. R.; MASIDE, C. Caprine ovarian follicle requirements differ between preantral and early antral stages after IVC in medium supplemented with GH and VEGF alone or in combination. Theriogenology, v. 87, p. 321–332, 2017.

CHAVES, R. N.; MARTINS, F. S.; SARAIVA, M. V. A.; CELESTINO, J. J. H.; LOPES, C. A. P.; CORREIA, J. C.; VERDE, I. B. L.; MATOS, M. H. T.; BÁO, S. N.; NAME, K. P. O.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured in vitro. Reproduction, Fertility and Development, v. 20, n. 5, p. 640–647, 2008.


**ISSN: 2447-6161**

FERREIRA, A. C. A.; CADENAS, J.; SÁ, N. A. R.; CORREIA, H. H. V.; GUERREIRO, D. D.; LOBO, C. H.; ALVES, B. G.; MASIDE, C.; GASTAL, E. L.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. In vitro culture of isolated preantral and antral follicles of goats using human recombinant FSH: Concentration-dependent and stage-specific effect. Animal Reproduction Science, v. 196, n. June, p. 120–129, 2018.

HREINSSON, J. G.; SCOTT, J. E.; RASMUSSEN, C.; SWAHN, M. L.; HSUEH, A. J. W.; HOVATTA, O. Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v. 87, n. 1, p. 316–321, 2002.

MARTINS, F. S.; CELESTINO, J. J. H.; SARAIVA, M. V. A.; MATOS, M. H. T.; BRUNO, J. B.; ROCHA, C. M. C.; LIMA-VERDE, I. B.; LUCCI, C. M.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Growth and differentiation factor-9 stimulates activation of goat primordial follicles in vitro and their progression to secondary follicles. Reproduction, Fertility and Development, v. 20, n. 8, p. 916–924, 2008.

PERALTA, M. B.; BARAVALLE, M. E.; BELOTTI, E. M.; STASSI, A. F.; SALVETTI, N. R.; ORTEGA, H. H.; REY, F.; VELÁZQUEZ, M. L. Involvement of Matrix Metalloproteinases and their Inhibitors in Bovine Cystic Ovarian Disease. Journal of Comparative Pathology, v. 156, p. 191–201, 2016..

SÁ, N. A. R.; ARAÚJO, V. R.; CORREIA, H. H. V.; FERREIRA, A. C. A.; GUERREIRO, D. D.; SAMPAIO, A. M.; ESCOBAR, E.; SANTOS, F. W.; MOURA, A. A.; LÔBO, C. H.; CECCATTO, V. M.; CAMPELLO, C. C.; RODRIGUES, A. P. R.; LEAL-CARDOSO, J. H.; FIGUEIREDO, J. R. Anethole improves the in vitro development of isolated caprine secondary follicles. Theriogenology, v. 89, n. 2016, p. 226–234, 2017.

SÁ, N. A. R.; VIEIRA, L, A.; FERREIRA, A. C. A.; CADENAS, J.; BRUNO, J. B.; MASIDE, C.; SOUSA, F. G. C.; CIBIN, F. W. S.; ALVES, B. G.; RODRIGUES, A. P. R.; LEAL-CARDOSO, J. H.; GASTAL, E. L.; FIGUEIREDO, J. R. Anethole supplementation during oocyte maturation improves in vitro production of bovine embryos. Reproductive Sciences, v. 27, p. 1602-1608, 2019

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, n. 9, p. 966–977, 2020.


**ISSN: 2447-6161**