

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

Alessandro Silva Ferreira¹

José Ricardo De Figueiredo²

Rebeca Magalhães Pedrosa Rocha³

André Luiz Da Conceição Santos⁴

Juliana Jales De Hollanda Celestino⁵

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 μ m), 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). 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). 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 Ciências da Saúde- ICS, Discente, silvaalesandro90@gmail.com¹

Universidade Estadual do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Docente, figueiredo.lamofopa@gmail.com²

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira, Instituto de Ciências da Saúde-ICS, Docente, rebecarocha@unila.edu.br³

Universidade Estadual do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária, Discente, andreloizst@gmail.com⁴

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira, Instituto de Ciências da Saúde-ICS, Docente, juliana.celestino@unilab.edu.br⁵

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 38,5°C 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

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 ($\pm$ EPM) ou porcentagem. 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

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.; BÃO, 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.

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.; BÃO, 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.