

**CAMILA ARRIVABENE NEVES**

**AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIIS  
CAPRINOS *IN SITU* CO-CULTIVADOS COM CÉLULAS-TRONCO  
MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA**

**Teresina  
Piauí - Brasil  
2017**

**CAMILA ARRIVABENE NEVES**

**AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS  
CAPRINOS *IN SITU* CO-CULTIVADOS COM CÉLULAS-TRONCO  
MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Área de concentração:

**Sanidade e Reprodução Animal**

Orientadora:

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Acelina Martins de  
Carvalho**

Co-orientador:

**Prof. Dr. Cleidson Manoel Gomes da Silva**

**Teresina**

**Piauí – Brasil**

**2017**

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias  
Serviço de Processamento Técnico

**N513a** Neves, Camila Arrivabene

Avaliação do desenvolvimento de folículos pré-antrais caprinos *in situ* co-cultivados com células-tronco mesenquimais da medula óssea / Camila Arrivabene Neves - 2018.  
60 f.: il.

Dissertação( Mestrado em Ciência Animal)– Universidade Federal do Piauí, Teresina,2018.

Orientação: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Acelina Martins de Carvalho

1.Gado caprino 2. MOIFOPA 3.Ovário 4.Nitrito 5.Glutationa  
I. Título.

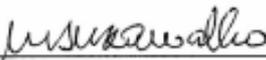
**CDD 636.4**

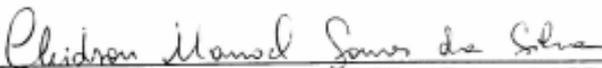
**AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIIS  
CAPRINOS *IN SITU* CO-CULTIVADOS COM CÉLULAS-TRONCO  
MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA**

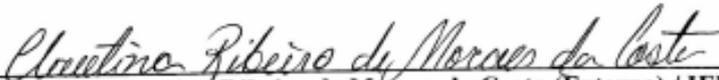
**CAMILA ARRIVABENE NEVES**

**Dissertação aprovada em: 16/10/2017**

**Banca Examinadora:**

  
\_\_\_\_\_  
**Profa. Dra. Maria Acelina Martins de Carvalho (Presidente) / DMV/CCA/UFPI**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Cleidson Manoel Gomes da Silva (Interno) / CPCE/UFPI**

  
\_\_\_\_\_  
**Profa. Dra. Clautina Ribeiro de Moraes da Costa (Externa) / IFPI**

  
\_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Felipe de Jesus Moraes Junior (Externo) / UEMA**

*Dedico àqueles que sem dizer uma só palavra despertam o melhor de  
nossos sentimentos, que nos ensinam a amar apenas com o brilho do olhar,  
motivo da profissão que escolhi, aos animais!*

## AGRADECIMENTOS

A Deus e todos os espíritos de luz, por me guiarem em todas as trajetórias da vida, por estarem sempre prontos a me amparar quando o caminho é difícil e nunca deixar que me falte o necessário para seguir em frente.

Aos meus pais, Mônica e Willams, pessoas que tanto amo e admiro e busco me espelhar, nunca mediram esforços para investir nos meus estudos, sempre prezaram pela boa educação em casa e sempre estiveram presentes na minha vida, aconselhando e apoiando minhas decisões. Sem eles, com certeza, nada disso seria possível.

À minha irmã, Tábatta, pelo companheirismo e amizade, pois independente de qualquer coisa, nós sabemos que sempre podemos contar uma com a outra.

Ao meu noivo, Marcelo, com quem há sete anos compartilho todos os momentos da minha vida, é quem me ensina todos os dias como ser uma pessoa melhor, com sua paciência, carinho, ternura, respeito, companheirismo e compreensão.

À minha avó Sônia (*in memoriam*), uma das pessoas mais inteligentes que já conheci, por sempre me incentivar a estudar, e por sempre me acompanhar mesmo estando do “outro lado”.

À Universidade Federal do Piauí, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal e ao Centro de Ciências Agrárias, por serem minha segunda casa, me acolhendo e dando todo o suporte o qual precisei para realizar esta pesquisa, os quais em nome do diretor do centro Prof. Dr. Paulo Ramalho, agradeço.

A CAPES pelo auxílio referente à concessão de bolsa durante todo período do mestrado, e pela oportunidade de migrar diretamente para o doutorado.

Ao CNPQ pelo auxílio financeiro para aquisição dos materiais para a realização desta pesquisa.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Acelina, que foi como uma mãe durante toda a minha trajetória acadêmica, que sempre me ofereceu as melhores oportunidades, e nunca deixou que me faltasse absolutamente nada para a execução de todos os experimentos, pois

sempre estava pronta para fazer o que fosse necessário. Não tenho palavras para agradecer todo o apoio e confiança em mim depositados.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Cleidson Manoel, que apareceu como um anjo no meio do caminho, oferecendo suporte e conhecimento necessário para a execução desse estudo, sendo, portanto, peça fundamental nesse trabalho.

A toda a equipe do NUPCelt, em especial à Pós-doutoranda Lucilene e a acadêmica Marina, que estiveram presentes e ajudaram demais em etapas decisivas desse trabalho. À Camila Ernanda, Maria Éllida, Thaís, Dayse, Elis, Renata, Wanderson, Huanna, Prof. Napoleão e todos os demais que sempre que podiam ajudavam em alguma coisa, mesmo que fosse com uma sugestão. À Fabiana, Leiliane e Hermínio pelo apoio moral e companhia, pois sempre tinham uma palavra amiga. À Flávia e Luciana, que sempre estavam dispostas a ajudar e fazer o que fosse necessário dentro dos laboratórios.

Ao professor Lindemberg Sarmiento, que foi extremamente solícito e prontamente atendeu meu pedido de ajuda com a estatística do trabalho, fazendo e refazendo os cálculos todas as vezes que foi necessário, e com paciência me explicava tudo detalhadamente.

Ao doutorando Antônio Luiz Júnior, que também sem demora se prontificou a me ajudar com as análises do estresse oxidativo, me ensinando pacientemente cada etapa e fazendo o possível para que tudo desse certo.

À Fernanda e Joilson, do LASAN, que me emprestaram materiais quando precisei, bem como ofereceram ajuda para analisar algumas amostras.

À Prof. Dra. Tânia, que sempre se preocupou em saber do andamento do trabalho, e sempre que necessário dava uma opinião pertinente.

Ao Prof. Dr. Arnaud Azevedo, coordenador, e ao servidor Luís, secretário do PPGCA, quem me incentivaram e me ofereceram todo o auxílio necessário durante este período de mestrado, bem como a respeito de todos os trâmites para a passagem direta para o doutorado.

À todos os meus familiares e amigos pelos momentos de descontração, pelas conversas, conselhos e alegrias que nos fazem sentir vivos e estimulados a continuar trabalhando.

**SUMÁRIO**

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. CAPÍTULO.....	28
Abstract.....	29
Introdução.....	30
Material e métodos.....	32
Resultados.....	38
Discussão.....	43
Conclusões.....	47
Referências.....	47
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. Corte histológico do córtex ovariano (400x) demonstrando a morfologia dos folículos ovarianos pré-antrais caprinos, corados com hematoxilina-eosina. Folículos normais, com oócito e núcleo intactos são apresentados no controle fresco (A), um dia de cultivo CC (B), um dia de cultivo SC (C), sete dias de cultivo CC (D), sete dias de cultivo SC (E). Folículos degenerados são mostrados no controle fresco (F), um dia de cultivo CC (G), um dia de cultivo SC (H), sete dias de cultivo com CS (I), sete dias de cultivo SC (J). Presença de núcleo picnótico (\*), retração citoplasmática (ponta de seta) e desorganização das células da granulosa (seta). O: oócito; Nu: núcleo do oócito; CG: células da granulosa. Barra de escala 25µm.... 39
- Figura 2. Percentagem (média±EP) de folículos ovarianos pré-antrais caprinos morfologicamente normais no controle fresco (não-cultivado) e após cultivo *in vitro* por um ou sete dias CC e SC. \*Diferem estatisticamente do controle (P<0,05). Letras maiúsculas distintas indicam diferença no mesmo tratamento em dias de cultivo diferentes (P<0,05).....40
- Figura 3. Percentagem (média±EP) de folículos ovarianos pré-antrais caprinos primordiais e em desenvolvimento no controle fresco (não-cultivado) e após cultivo *in vitro* por um ou sete dias CC e SC. \*Diferem estatisticamente do controle (P<0,05). Letras maiúsculas distintas indicam diferença no mesmo tratamento em diferentes dias de cultivo (P<0,05); letras minúsculas distintas indicam diferença entre os tratamentos no mesmo dia de cultivo (P<0,05).....41
- Figura 4. Concentração de nitrito (média±EP) no meio de cultivo de folículos ovarianos pré-antrais caprinos após cultivo *in vitro* por um ou sete dias CC e SC. Letras maiúsculas distintas indicam diferença no mesmo tratamento em diferentes dias de cultivo (P<0,05); letras minúsculas distintas indicam diferença entre os tratamentos no mesmo dia de cultivo (P<0,05).....42

Figura 5. Concentração de glutathiona reduzida (média±EP) no meio de cultivo de folículos ovarianos pré-antrais caprinos após cultivo *in vitro* por um ou sete dias CC e SC. Letras maiúsculas distintas indicam diferença no mesmo tratamento em diferentes dias de cultivo ( $P<0,05$ ); letras minúsculas distintas indicam diferença entre os tratamentos no mesmo dia de cultivo ( $P<0,05$ ).....43

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Diâmetro folicular, oocitário e nuclear (média $\pm$ EP) no controle fresco (não-cultivado) e após cultivo <i>in vitro</i> de foliculos pré-antrais caprinos por um ou sete dias CC e SC.....	42
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## RESUMO

### **Avaliação do desenvolvimento de folículos pré-antrais caprinos *in situ* co-cultivados com células-tronco mesenquimais da medula óssea**

As biotécnicas da reprodução animal constituem ferramentas importantes para o desenvolvimento e avanço tecnológico, possibilitando a expansão e seleção de material genético de qualidade. Dentre as biotécnicas mais recentes, que visam otimizar o potencial reprodutivo de fêmeas, destaca-se a Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais (MOIFOPA). O co-cultivo utilizando FOPA e células de outras linhagens, como as células-tronco mesenquimais (CTM) tem se tornado uma alternativa vantajosa dentro da técnica de MOIFOPA. Este estudo tem como objetivo desenvolver um sistema de co-cultivo *in vitro* de FOPA caprinos *in situ* com Células-Tronco Mesenquimais da medula óssea (CTMMO), avaliando a influência dessas células no crescimento folicular, taxa de ativação e sobrevivência de folículos morfolologicamente normais. As CTMMO foram isoladas e co-cultivadas com fragmentos do córtex ovariano onde estão inclusos os FOPA's por um e sete dias, com meio de cultivo básico. Cortes histológicos dos fragmentos foram analisados e obtidos dados referentes à classificação morfológica, taxa de sobrevivência de folículos morfolologicamente normais e taxa de ativação folicular. Os meios de cultivo no dia um e sete também foram colhidos para dosagem de nitrito e glutatona reduzida. Verificou-se redução significativa ( $P < 0,05$ ) do percentual de folículos morfolologicamente normais em comparação ao controle fresco apenas no sétimo dia de cultivo no tratamento sem CTMMO (SC), no tratamento com CTM (CC) não foi observada redução significativa ( $P > 0,05$ ). Ao comparar os tratamentos CC vs. SC, no sétimo dia de cultivo foi evidenciada taxa significativamente superior de FOPA morfolologicamente normais no CC ( $P > 0,05$ ). Em ambos os tratamentos foi constatada taxas de folículos primordiais e em desenvolvimento similar ao controle fresco ( $P > 0,05$ ). Ao comparar os tratamentos entre si, bem como com o controle fresco não foi observada diferenças significativas no diâmetro folicular ( $P > 0,05$ ), tampouco na concentração de nitrito ( $P > 0,05$ ). A concentração de glutatona reduzida foi significativamente inferior no sétimo dia do co-cultivo. Concluindo, o co-cultivo não exerceu influência sobre o desenvolvimento folicular e oocitário. Entretanto, foi fundamental para manter a sobrevivência de folículos pré-antrais caprinos durante sete dias de cultivo. Além disso, ficou demonstrado que é possível o cultivo de FOPA's simultaneamente CTMMO.

Palavras-chave: MOIFOPA, Ovário, Caprino, Nitrito, Glutatona.

## ABSTRACT

### **Evaluation of the development of preantral caprine follicles *in situ* co-cultured with mesenchymal stem cells from bone marrow**

The biotechniques of animal reproduction are important tools for the development and technological advancement, allowing the expansion and selection of quality genetic material. Among the most recent biotechniques that aim to optimize the reproductive potential of females, we highlight the Manipulation of Oocytes Included in Pre-antral Ovarian Follicles (MOIFOPA). This study aims to develop an *in vitro* co-culture system of goat FOPA with bone marrow Mesenchymal Stem Cells (MSC), evaluating the influence of these cells on follicular growth, rate of activation and survival of morphologically normal follicles. MSC's were isolated and co-cultivated with fragments of the ovarian cortex where FOPA's are included for one and seven days, with basic culture medium. The histological sections of the fragments were analyzed, and data regarding the morphological classification, morphologically normal follicle survival rate and follicular activation rate were obtained. Culture medium on day one and seven were also harvested for nitrite dosage and reduced glutathione. There was a significant reduction ( $P < 0.05$ ) in the percentage of morphologically normal follicles compared to fresh control only after seven days of culture in the SC treatment, in the CC treatment no significant reduction was observed ( $P > 0.05$ ). When comparing treatments CC vs. SC on day one and seven of cultivation did not show significant differences ( $P > 0.05$ ). In both treatments primordial and developing follicle rates similar to the fresh control ( $P > 0.05$ ) were observed. When comparing treatments with each other, as well as with fresh control, no significant differences were observed in follicular diameter ( $P > 0.05$ ) or nitrite concentration ( $P > 0.05$ ). The concentration of reduced glutathione was significantly lower on the seventh day of co-cultivation. In conclusion, co-cultivation had no influence on follicular and oocyte development. However, it was critical to maintain the survival of preantral follicles for 7 days of culture. In addition, it has been demonstrated that it is possible to culture FOPA's simultaneously with CTMMO.

Keywords: MOIFOPA, Ovary, Goat, Nitrite, Glutathione.

## 1. INTRODUÇÃO

A biotecnologia tem se tornado uma área com papel cada vez mais relevante para a ciência. Na medicina veterinária, as biotécnicas da reprodução animal constituem ferramentas importantes para o desenvolvimento e avanço tecnológico do setor agropecuário, possibilitando, principalmente, a expansão e seleção de material genético de qualidade para o melhoramento animal. Essas biotécnicas, aplicadas em ensaios científicos, têm contribuído para a compreensão e elucidação de aspectos da fisiologia reprodutiva animal antes desconhecidos (RODRIGUES et al., 2016).

No tocante a ruminantes domésticos, biotécnicas como a inseminação artificial, fecundação *in vitro* (FIV) e a transferência de embriões têm sido utilizada com sucesso já há algum tempo. Dentre as biotécnicas mais recentes, segundo Figueiredo e Lima (2017), que visam otimizar o potencial reprodutivo de fêmeas, destaca-se a Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais (MOIFOPA).

Para entender o propósito da MOIFOPA e sua aplicabilidade é necessário conhecer e compreender a anatomia e fisiologia do sistema reprodutor feminino, mais especificamente, a dinâmica ovariana. O ovário dos mamíferos nunca se encontra em repouso absoluto, é composto por diferentes tipos celulares, que trabalham em conjunto para exercer sua função. Este órgão é constituído por duas zonas: uma vascular, onde está contida a medula, e outra parenquimatosa, onde se encontra o córtex, delimitado pela túnica albugínea. Na região medular estão os nervos, fibras musculares lisas, tecido conectivo, vasos linfáticos e sanguíneos, que se estendem para o córtex ovariano, responsáveis pela nutrição e sustentação do ovário. Na região cortical estão localizados os folículos ovarianos, que se apresentam em diferentes estádios de desenvolvimento e regressão (primordiais, primários, secundários,

terciários e ováricos vesiculosos), bem como, os corpos lúteos, *albicans* e hemorrágicos (KÖNIG e LIEBICH, 2016).

A gônada feminina desempenha dupla função: uma endócrina (produção e liberação de hormônios esteroides, responsáveis pelo desenvolvimento das características sexuais femininas secundárias e pela manutenção da gestação, e diversos peptídeos) e outra exócrina ou gametogênica (produção e liberação de oócitos aptos à fecundação), a qual só se faz possível devido à interação entre dois fenômenos que ocorrem no ovário: a oogênese e a foliculogênese (REECE e ROWE, 2017).

A oogênese é o processo de formação de oócitos (REECE e ROWE, 2017). Nos mamíferos, esse processo inicia-se com a migração das células germinativas primordiais (CGP) a partir do endoderma do saco vitelínico para a gônada primitiva, e sua posterior colonização, a fim de completar a formação dessa gônada e induzir a sua diferenciação. As CGP proliferam-se intensamente por meio de divisão mitótica e posteriormente transformam-se em oogônias; ainda no período embrionário, essas oogônias aumentam de tamanho e tornam-se meioticamente ativas com duplicação do DNA, diferenciando-se em oócitos primários, os quais se mantêm diploides ( $2n$ ) até essa fase. A meiose seguinte desses oócitos primários é interrompida logo na profase I, assim, o oócito permanece neste estágio da divisão celular até o início da maturação oocitária, que só ocorre após o nascimento, quando o indivíduo desenvolve a maturidade sexual (RAVEN, 2013).

Paralelamente a oogênese, durante a transformação das oogônias em oócitos primários, ocorre a foliculogênese, quando uma camada de células somáticas planas, as células da pré-granulosa, e uma lâmina basal circundam os oócitos primários formando os folículos primordiais. Finalizada essa etapa, alguns folículos podem ser estimulados a crescer imediatamente ou, como ocorre na maioria destes, as células da pré-granulosa param de se

multiplicar e entram em período de quiescência até receberem sinais para entrar no *pool* de crescimento (HIRSHFIELD, 1991; RAVEN, 2013).

A foliculogênese inicia-se com a formação do folículo primordial, e culmina com o estágio de folículo de De Graaf ou pré-ovulatório (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005). Durante esse processo, o início do crescimento folicular, a ativação de folículos primordiais, ocorre quando há o recrutamento de um *pool* de folículos da reserva; algumas características morfológicas marcam o início desse momento, são elas: aumento do diâmetro oocitário, proliferação das células da granulosa, mudança na morfologia destas células de pavimentosas para cúbicas, e aumento no conteúdo proteico (URIBE-VELÁSQUEZ, LENZ SOUZA e NARVÁEZ-SOLARTE, 2015; AMORIM et al., 2016).

Este período de crescimento e desenvolvimento folicular pode ser dividido nas seguintes fases: 1) fase pré-antral, caracterizada pela ativação dos folículos primordiais, formação do folículo primário e transição de folículos primários para secundários e 2) fase antral, caracterizada pelo crescimento inicial e terminal dos folículos terciários e transição para folículo pré-ovulatório. Assim, os folículos são classificados em pré-antrais e antrais. Na primeira categoria encontram-se os folículos primordiais, assim caracterizados por possuírem um oócito quiescente circundado por uma única camada de células da granulosa em formato pavimentoso; os folículos de transição, os quais apresentam o oócito envolvido simultaneamente por células da granulosa tanto pavimentosas quanto cúbicas; os folículos primários que detêm uma camada completa de células da granulosa de morfologia cúbica; e os secundários, quando há duas ou mais camadas de células da granulosa ao redor do oócito e, as células da teca, bem como a zona pelúcida, podem ser evidenciadas. Na classificação de folículos antrais, estão os folículos terciários, caracterizados pela organização das células da granulosa em várias camadas, e com a formação de uma cavidade repleta de líquido folicular, denominada antro (RIMON-DAHARI et al., 2016). O desenvolvimento dos folículos antrais é

caracterizado por uma fase de recrutamento, seleção e dominância, sendo a formação de folículos pré-ovulatórios um pré-requisito para a ovulação e posterior formação do corpo lúteo, bem como manutenção da fertilidade (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005).

Os oócitos primários inclusos nos folículos permanecem estacionados na fase de prófase I da meiose. A progressão da divisão meiótica ocorre somente na puberdade, quando o ovário torna-se responsivo ao hormônio gonadotrófico e há a ocorrência de um pico pré-ovulatório de LH, o que resulta na ovulação, e subsequente fim da foliculogênese, bem como finaliza a meiose I dos ovócitos meioticamente competentes dos folículos pré-ovulatórios, transformando-os em oócitos secundários, os quais, novamente têm sua meiose seguinte interrompida, desta vez na metáfase II. Nessa situação, a meiose somente será retomada se houver fecundação do oócito pelo espermatozóide, marcando assim o fim da oogênese (FAIR, 2003; GONÇALVES e FIGUEIREDO, 2008).

Como pode se perceber, a população folicular ovariana é bastante heterogênea, constituída de folículos pré-antrais e antrais, os primeiros correspondem a 90% dessa população, e destes, 95% são folículos primordiais, representando o estoque de gametas femininos (ALVES et al., 2017). Embora exista um “dogma” na literatura afirmando que esse estoque de gametas seja finito, alguns pesquisadores têm sugerido o contrário, gerando discussões no meio científico (PAN et al., 2016; HANNA e HENNEBOLD, 2014). Estes autores propõem a formação de novas células germinativas durante a fase adulta das fêmeas, a partir de células-tronco presentes na superfície do epitélio do ovário, assim como, Bukovsky et al. (2004) em mulheres e Johnson et al. (2005) em camundongas.

Independente disso, já é bem estabelecido que a população folicular pode variar de milhares a milhões de folículos por ovário, a depender de diversos fatores, dentre eles: a variação individual, idade (ALVES et al., 2017), raça, genética (SILVA-SANTOS et al., 2011), e principalmente entre espécies, 1.500 em camundonga (SHAW et al., 2000); de

295.000 a 2.500.000 na espécie humana (WALLACE e KELSEY, 2010) e 37.000 em cabra (LUCCI; AMORIM e RODRIGUES, 1999).

Apesar dessa enorme quantidade de folículos presentes no ovário mamífero, apenas uma pequena parte (0,01%) é capaz de se desenvolver até a ovulação, a maioria, cerca de 99,9%, não é potencialmente ovulável devido ao processo natural de atresia folicular, que causa a morte de folículos por via degenerativa e/ou apoptótica, reduzindo drasticamente o número de oócitos viáveis durante a vida reprodutiva de um animal (AERTS, 2010; HUTT, 2015). Os mecanismos que envolvem a atresia folicular ainda não estão muito bem esclarecidos (APOLLONI et al., 2016), mas acredita-se que na via degenerativa, a isquemia, estímulos tóxicos, degenerativos e imunológicos pode levar a morte dos folículos ovarianos, pois esses fatores resultam em alterações na permeabilidade da membrana celular, aumento de água intracelular, vacuolização citoplasmática e, conseqüente, degeneração (BARROS; HERMOSILLA e CASTRO, 2001).

No que concerne à via apoptótica, sabe-se que se trata de um evento geneticamente determinado, que depende da expressão de genes pró e anti-apoptóticos. Alguns fatores podem desencadear a ativação desses genes, como: estresse oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio, irradiação, danos no DNA, citocinas, proteínas virais, bem como deficiência de fatores de sobrevivência da célula (WU et al., 2011; MATSUDA et al., 2012; CHAUBE et al., 2014a; CHAUBE et al., 2014b; TRIPATHI e CHAUBE, 2015).

Diante da substancial perda folicular que ocorre naturalmente *in vivo*, pesquisadores têm buscado desenvolver e aprimorar técnicas capazes de recuperar os folículos pré-antrais, visando diminuir o número de FOPA que entram em atresia e conseqüentemente aumentar a eficiência reprodutiva das fêmeas, bem como apresentar alternativas que auxiliem na reprodução de animais em risco de extinção, e na reprodução humana, tendo em vista os

inúmeros problemas de infertilidade feminina, principalmente em mulheres jovens submetidas à quimioterapia (RODRIGUES et al., 2016).

Nesse contexto, a MOIFOPA, também conhecida como ovário artificial, tem sido bastante investigada nas duas últimas décadas e atualmente consiste em uma das principais ferramentas para a elucidação da foliculogênese. Esta biotécnica tem como principal objetivo resgatar os folículos pré-antrais a partir do tecido ovariano, e posteriormente cultivá-los *in vitro* até a maturação dos oócitos inclusos nestes folículos, prevenindo-os da atresia e possibilitando a utilização destes em outras biotécnicas reprodutivas, como a fertilização *in vitro* (FIV), a transgênese e a clonagem. Para tanto, diversos sistemas de cultivo *in vitro* com FOPA, isolados ou inclusos em fragmentos do córtex ovariano, têm sido experimentados, a fim de obter um protocolo ideal e bem estabelecido que permita um excelente crescimento e maturação folicular, seguido da produção de embriões e crias viáveis (FIGUEIREDO e LIMA, 2017).

Em roedores, a pequena dimensão dos ovários possibilita o cultivo do órgão inteiro, o que tem sido bastante útil para o estudo da foliculogênese inicial em pequenos mamíferos (FORTUNE, 2003). No entanto, em animais de médio e grande porte, devido o tamanho dos ovários, não é possível utilizar o mesmo protocolo, sendo necessária a fragmentação do órgão. Para estes animais, tem-se cultivado, então, os folículos completamente isolados do tecido, ou *in situ*, cultivando-se pequenos fragmentos de córtex ovariano, onde estão inclusos folículos primordiais, possibilitando, o estudo da ativação e do crescimento de folículos primordiais em diversas espécies, como: caprina (MARTINS; SARAIVA e CELESTINO, 2017), ovina (DUARTE; ROCHA e SILVA, 2017), equina (AGUIAR et al., 2017), bovinos (CASTRO et al., 2014) e até mesmo humana (XIA et al., 2015).

No sistema de cultivo isolado, os FOPA's podem ser desprendidos do tecido ovariano que o envolve de maneira mecânica e/ou enzimática (PAES et al., 2016), todavia o isolamento

mecânico sozinho tem sido o mais utilizado, apresentando melhores resultados (DONG et al., 2014). O isolamento mecânico pode ser realizado de duas formas: para os folículos que apresentam mais de 150 $\mu$ m de diâmetro, geralmente faz-se a microdissecção manual utilizando agulhas de insulina, e para folículos menores, normalmente o isolamento é feito por uma máquina denominada *tissue chopper*. Ambos os procedimentos mecânicos asseguram a integridade da estrutura tridimensional folicular, não danificando a membrana basal dos folículos e mantendo as interações entre oócito, células da granulosa e células da teca (ITOH e HOSHI, 2000; PAES et al., 2016). Como uma de suas principais vantagens, o cultivo isolado permite um monitoramento diário do crescimento de cada folículo individualmente, bem como a verificação do efeito *in vitro* de hormônios e fatores de crescimento sobre cada classe folicular de maneira bem específica (RAMESH et al., 2010).

Já no cultivo *in situ*, os FOPA's permanecem inclusos no córtex de tecido ovariano. Nesta técnica, dependendo da espécie, os ovários podem ser cultivados intactos, ou, caso o tamanho do ovário não permita tal metodologia, a região cortical do ovário será separada, por secção, da medular e fragmentada em cortes de aproximadamente 3x3x1mm, e estes fragmentos serão, então, cultivados *in vitro*. Os benefícios desse método consistem na certeza de manutenção da integridade estrutural dos folículos, bem como das interações entre as células foliculares e as células adjacentes, como as do estroma, da teca e da granulosa, o que favorece de maneira significativa o crescimento folicular, visto que o ambiente nessas condições aproxima-se mais do ambiente ao qual o folículo está inserido *in vivo*, evitando a exposição prolongada das células ao meio externo e facilitando uma melhor perfusão do meio de cultivo para o tecido ovariano (O'BRIEN; PENDOLA e EPPIG, 2003; AGUIAR et al., 2016).

O sucesso do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais que teve como desfecho o nascimento de murinos vivos, alcançados em dois estudos (O'BRIEN, PENDOLA e EPPIG,

2003; WANG et al., 2011) tem estimulado novas pesquisas em outras espécies. Até o momento, a ativação e o desenvolvimento de folículos primordiais para o estágio antral, foi o máximo alcançado em humanos (TELFER et al., 2008), bovinos (ARAÚJO et al., 2014) e caninos (SERAFIM et al., 2015). Estudos mais avançados, que obtiveram a produção de embriões, porém com baixa taxa de retomada de meiose, o que os impossibilitou de serem gestados, foram desenvolvidos nas espécies, caprina (SARAIVA et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2011); ovina (ARUNAKUMARI, SHANMUGASUNDARAM e RAO, 2010), bubalina (GUPTA et al., 2008), suína (WU, EMERY e CARRELL, 2001), e primatas não-humanos (XU et al., 2011).

Neste contexto, o cultivo *in vitro* associado à técnica de MOIFOPA mostra-se como uma ferramenta singular para a área da reprodução, que contribui de maneira inigualável para avanço dessas pesquisas, haja vista a possibilidade de simular e testar, sob condições plenamente controláveis, os mais diversos cenários no que tange o cultivo de FOPA, permitindo a avaliação da vascularização (KANG et al., 2017), apoptose (TRIPATHI e CHAUBE, 2015), influência de hormônios (SERAFIM et al., 2015), fatores de crescimento (MARTINS, SARAIVA e CELESTINO, 2017) e múltiplas variáveis envolvidas no desenvolvimento folicular, gerando estudos cada vez mais aprimorados e contíguos do objetivo principal, isto é, nascimentos de crias vivas saudáveis.

Nessa busca pelo protocolo ideal, o cultivo de oócitos ou embriões juntamente com células somáticas, tais como: células epiteliais do oviduto (CEOB), células da granulosa, células VERO, células BRL, entre outras, já é algo bastante abordado pelo meio científico. A esse tipo de sistema, no qual há a associação *in vitro* de dois ou mais tipos celulares distintos, é dado o nome de co-cultivo, e seu principal objetivo é simular o que ocorre naturalmente *in vivo*, onde o desenvolvimento das células é regulado por fatores parácrinos e autócrinos oriundos da relação entre células adjacentes, o que favorece o desenvolvimento dessas células

e otimiza a taxa de sobrevivência (GONÇALVES e FIGUEIREDO, 2008). Os benefícios dessa abordagem já puderam ser comprovados nas espécies humana (JAHROMI et al., 2015), suína (YOON et al., 2015), bubalina (RAMESH et al., 2010), felina (SOWIŃSKA et al., 2017), bovina (SCHMALTZ-PANNEAU et al., 2014) e ovina (DAVACHI et al., 2017).

Partindo dessa premissa, muito se tem questionado a respeito dos efeitos das células-tronco nesses sistemas de co-cultivo. Célula-tronco é toda e qualquer célula indiferenciada que possui a exclusiva capacidade de gerar outras células indiferenciadas, ou que mediante uma prévia sinalização está apta para se diferenciar em qualquer tipo celular especializado, incluindo células que compõem os tecidos de apoio ao feto. Esse perfil celular só pode ser obtido a partir de um zigoto ou mórula e, se diferenciam das demais pelo seu excelente potencial de plasticidade nos mais diversos tecidos que constituem um organismo, sendo capaz de desenvolver um indivíduo completo, incluindo placenta e membranas embrionárias. Por esse motivo essas células-tronco são caracterizadas como células totipotentes (RAMALHO-SANTOS e WILLENBRING, 2007).

Outro tipo de célula-tronco, reconhecida pelo seu alto potencial de diferenciação, *in vivo* e *in vitro*, em todos os tecidos dos três folhetos germinativos (ectoderma, mesoderma e endoderma), porém distinta da célula-tronco citada anteriormente, por ser incapaz de gerar células que constituem os anexos fetais e, portanto, incapaz de gerar um organismo em sua totalidade, é a célula-tronco embrionária, que por esta razão é classificada como pluripotente, e só pode ser obtida a partir de uma massa celular interna do blastocisto (HOLLAND, LEBACQZ e ZOLOTH, 2001; JANG et al., 2017; GRINFELD e GOMES, 2008). Ainda que as células-tronco embrionárias tenham alto poder de plasticidade e tenham contribuído para avanços na ciência, o fato de serem obtidas a partir de embriões gera inúmeros conflitos de natureza ética, impossibilitando seu acesso (HOLLAND, LEBACQZ e ZOLOTH, 2001).

Considerando essa problemática, cientistas têm investigado intensamente um outro tipo, a célula-tronco mesenquimal (CTM), que mesmo com um potencial de diferenciação mais limitado, pode se especializar em um número considerável de linhagens celulares, o que as classifica como multipotentes. As CTM podem ser obtidas a partir de tecidos adultos e apresentam como vantagem no cultivo *in vitro* uma maior possibilidade de controle nos processos de diferenciação e proliferação celular (WANG et al., 2014; ATKINSON, 2017). As CTM compõem o grupo das células-tronco somáticas, que são células indiferenciadas presentes em todos os tecidos adultos, com capacidade de auto renovação e função de se especializar em tipos celulares compatíveis com o tecido no qual residem, no intuito de reparar e manter esse tecido sempre que necessário (WANG et al., 2014); contudo, por serem indiferenciadas a princípio, podem também se diferenciar em outros tipos celulares de outros tecidos quando transplantadas, pois reprogramam-se de acordo com o novo ambiente (LEE et al., 2017; KULANDAVELU, BALKAN e HARE, 2017).

A presença desse tipo celular indiferenciado em um tecido adulto foi sugerido primeiramente pelo patologista alemão Julius Clonheim (COHNHEIM, 1867). Essa descoberta serviu de base para estudos posteriores, como o de Friedenstein, em 1976, na Rússia, que foi um dos primeiros pesquisadores a observar que a medula óssea continha células não hematopoiéticas que apresentavam formato fibroblastóide e que eram capazes de se diferenciar em outros tipos celulares, demonstrando multipotencialidade. Foi por meio desse estudo que se definiu algumas das características elementares das CTM, como: formato fibroblastóide, clonogenicidade, plasticidade celular, aderência ao substrato, cultura em monocamada e presença de unidades formadoras de colônias (UFC) (FRIEDENSTEIN, 1976).

Entretanto, até então, essas células não eram consideradas células-tronco, somente décadas depois, Caplan e Bruder (2001) as elucidou como tais; por essa razão, ao longo dos

anos as CTM receberam diversos nomes: células estromais precursoras, células progenitoras, células plástico aderentes, e por fim células-tronco mesenquimais. Mesenquimal por acreditarem inicialmente que essas células possuíam habilidade para se diferenciar apenas em tecidos provenientes do mesoderma. Todavia, atualmente sabe-se que, embora essas células não possuam o potencial de plasticidade das células-tronco embrionárias, as CTM's são capazes de originar também tecidos não mesodermis (LEE et al., 2017; KULANDAVELU, BALKAN e HARE, 2017). Ademais, são acessíveis quanto à coleta e isolamento, de fácil controle durante a expansão em cultura e não exibem perfil imunogênico, podendo ser empregadas em transplantes alogênicos (WANG et al., 2013; RYAN et al., 2014; VEGA et al., 2015).

Como as pesquisas em torno das células-tronco evoluíram e tomaram grandes proporções nos últimos anos, a Sociedade Internacional de Citoterapia passou a definir critérios mínimos para que uma célula seja qualificada como tal, o que inclui: aderência plástica quando isoladas em cultura; expressão de marcadores moleculares para CD105, CD73 e CD90 em mais e 95% das células em cultivo, bem como a ausência de expressão dos marcadores para CD34, CD45, CD14 ou ainda dos CD11b, CD79, CD19, HLA-DR em mais de 95% das células em cultivo; e, além dos aspectos citados (formação de colônia, formato fibroblastóide e aderência ao plástico), também a capacidade dessas células de se diferenciarem no mínimo em osso, gordura e cartilagem (DOMINICI et al., 2006).

As células-tronco mesenquimais estão presentes em todos os órgãos do corpo, fornecendo suporte estrutural e mantendo a homeostase dos tecidos durante os processos de maturação, envelhecimento ou injúrias (WANG et al., 2014; ANDERSSON-ROLF et al., 2017; STZEPOURGINSKI et al., 2017). Inúmeros estudos realizados já demonstraram a obtenção e o isolamento de tais células com sucesso, dentre esses: em cordão umbilical e

líquidos fetais (CAMPOS et al., 2017), tecido adiposo (COSTA et al., 2017), e medula óssea (SILVA FILHO et al., 2014).

De todas as fontes de CTM, a medula óssea é a mais antiga e foi a mais estudada por muitos anos consecutivos, sendo, portanto, um divisor de águas dentro do tema células-tronco, pois foi a partir dela que se descobriu a existência desse tipo celular indiferenciado em tecidos adultos. As células estromais da medula óssea são raras e heterogêneas, sendo uma mistura de células progenitoras em diferentes estágios e com diferentes comprometimentos; apenas uma pequena parte tem capacidade multipotencial e de autorrenovação. Além disso, as células provenientes desse sítio anatômico possuem capacidade de diferenciação indiretamente proporcional à idade do animal doador, ou seja, quanto mais velho for o animal cuja medula óssea foi coletada, menor a capacidade de diferenciação das células. Por esse motivo, é recomendada a coleta em animais jovens (STENDERUP et al., 2003; KERN et al., 2006; HEAZLEWOOD, 2017).

Contudo, devido à facilidade de obtenção dessas células, a rápida expansibilidade *in vitro*, capacidade de sobrevivência em longo prazo, pouca rejeição a xenoenxertos e integração no sítio hospedeiro, o potencial da medula óssea como fonte de CTM já está bem elucidado (HEAZLEWOOD, 2017; LEE et al., 2017). Outros estudos comprovam ainda que as células derivadas da medula óssea apresentam uma taxa de proliferação significativamente maior do que as células derivadas do tecido do cordão umbilical, indicando mais uma vantagem dessa fonte (LOVATI et al., 2011).

Na terapia regenerativa, as CTM têm ganhado cada vez mais espaço, independente da fonte de obtenção, uma vez que diversos estudos têm comprovado o potencial dessas células na reabilitação dos mais variados tecidos em diferentes espécies animais (ANDERSSON-ROLF et al., 2017; STZEPOURGINSKI et al., 2017; (KULANDAVELU; BALKAN e

HARE, 2017). Por esse motivo, as células-tronco mesenquimais tem sido um objeto de estudo bastante enfatizado desde sua descoberta.

Acreditando-se na competência das CTM de regenerar tecidos lesionados, na sua habilidade de manutenção da homeostase do ambiente o qual se encontra, e considerando que *in vivo* elas oferecem suporte a todas as células de todos os tecidos de um organismo, também tem sido investigada a possibilidade de utilização dessas células no co-cultivo *in vitro* com outros tipos celulares. Essa abordagem busca compreender a influência que uma célula tem sobre a outra, bem como os benefícios dessa relação (MOSHKDANIAN et al., 2011; XIA et al., 2015; MIRANDA; NASCIMENTO e COSTA, 2016; GREEN; ZHOU e SHIKANOV, 2016).

É sabido que os fatores circunjacentes às células cultivadas *in vitro* (fatores intrínsecos e extrínsecos), sejam elas diferenciadas ou não, são extremamente importantes para a manutenção e sobrevivência dessas células. A esse microambiente complexo e dinâmico, gerado a partir da interação das células cultivadas, que transmite e recebe sinais por meio de mediadores celulares e não celulares, é dado o nome de nicho. E até o presente momento, os cientistas desconhecem, quase que em sua totalidade, os mecanismos que estabelecem os nichos de cultivos isolados de células-tronco mesenquimais e folículos ovarianos pré-antrais, tampouco quando co-cultivados (JONES e WAGERS, 2008; FIGUEIREDO e LIMA, 2017). No entanto, embora esses fatores ainda não estejam completamente esclarecidos, mas considerando-se o histórico das CTM's em literatura, nesse contexto, elas surgem como uma alternativa para o desenvolvimento de um protocolo de co-cultivo que possa incrementar a taxa de ativação, sobrevivência e maturação de FOPA's caprinos.

Essa hipótese de uma possível relação benéfica entre CTM's e células da reprodução foi proposta inicialmente por Ling e colaboradores (2008), onde se pode constatar uma

melhora na taxa de maturação *in vitro* de oócitos de camundongos, utilizando-se meio de maturação condicionado por CTM's da medula óssea provenientes da mesma espécie.

Outras pesquisas também demonstraram o potencial salubre das CTM's no co-cultivo com embriões bovinos (KIM et al., 2011) e suínos (PARK et al., 2013), usando materiais bioativos, derivados de CTM humanas advindas de tecido adiposo, como substitutos do soro fetal bovino, demonstrando que esses materiais podem ser utilizados como um novo suplemento protéico para o desenvolvimento de embriões *in vitro*.

O uso das CTM's no co-cultivo *in vitro* também já foi relatado por Moshkdanian et al. (2011), utilizando CTM do cordão umbilical humano associadas a embriões de camundongos expostos previamente a luz visível, e o resultado foi extremamente satisfatório, pois constatou-se que as CTM's ajudaram na recuperação e desenvolvimento desses embriões, atuando da mesma forma que os antioxidantes. Os mesmos benefícios também já foram averiguados em embriões bovinos (MIRANDA; NASCIMENTO e COSTA, 2016). No que tange folículos ovarianos pré-antrais, o co-cultivo com CTM foi realizado em bovinos (ITOH e HOSHI, 2000), camundongos (GREEN; ZHOU e SHIKANOV, 2016), e humanos (XIA et al., 2015). Esses estudos conseguiram revelar ainda que, as CTM demonstraram capacidade para remover componentes tóxicos, como cátions bivalentes de metais pesados, inibidores metabólicos dos meios de cultura e espécies reativas de oxigênio presentes no meio, auxiliando no desenvolvimento dos embriões, bem como dos FOPA's.

Na espécie caprina, o co-cultivo de embriões com células epiteliais do oviduto produziu resultados satisfatórios (MAHAJAN et al., 2017; WANG et al., 2017). Entretanto, acerca de co-cultivo de FOPA nessa mesma espécie, foi encontrado apenas um relato em literatura; nesse estudo oócitos foram co-cultivados *in vitro* com oócitos crescidos *in vivo*, acreditando-se que esses últimos, por estarem em um estágio mais avançado e por terem se desenvolvido em seu ambiente natural, auxiliariam na maturação dos primeiros, porém, nesse

caso, não houve diferença significativa quando comparado a oócitos cultivados apenas com meio de cultivo (SILVA et al., 2017). Portanto, não há, até o presente momento, relatos científicos bem sucedidos de co-cultivo envolvendo FOPA caprinos, tampouco de sistemas de cultivo *in vitro* que foram capazes de gerar crias vivas a partir de FOPA nessa espécie.

Embora Saraiva et al. (2010) e Magalhães et al. (2011) tenham conseguido obter embriões a partir de FOPA caprinos, o que é considerado um avanço expressivo, ambos recomendam novos estudos para a definição de um meio apropriado para o desenvolvimento *in vitro* completo de folículos primordiais caprinos, pois nesses dois experimentos a taxa de retomada meiótica foi sub-ótima, impedindo, deste modo, subsequente produção em larga escala de oócitos e embriões maduros.

Este trabalho tem por objetivo desenvolver o primeiro sistema de co-cultivo *in vitro* de FOPA caprinos com células-tronco mesenquimais da medula óssea, avaliando a influência das CTM no crescimento folicular, taxa de ativação e sobrevivência de folículos morfológicamente normais; em busca de um protocolo bem definido, que represente o primeiro passo de uma linha de pesquisa bem sucedida, que contribua com esclarecimentos acerca da foliculogênese, e sirva de instrumento para a tecnologia do ovário artificial.

Essa dissertação encontra-se estruturada com uma Introdução, Capítulo I, Considerações Finais e Referências. O Capítulo I apresenta organização estrutural de um artigo científico cujo título é **“CULTIVO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS *IN SITU* ASSOCIADO A CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA”** e foi desenvolvido conforme as normas do periódico “Small Ruminant Research” - ISSN: 0921-4488, Qualis Capes Zootecnia e Recursos Pesqueiros A2.

## CAPÍTULO I\*

---

\*Apresentado segundo as normas da revista Small Ruminant Research

**CULTIVO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS *IN SITU* ASSOCIADOS ÀS  
CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DA MEDULA ÓSSEA**  
C.A. Neves<sup>a</sup>, M.A.M. Carvalho<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus Ministro Petrônio Portela.

<sup>b</sup> Departamento de Morfofisiologia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí (UFPI), Campus Ministro Petrônio Portela, Ininga, Teresina-PI, Brasil.

## RESUMO

As biotécnicas da reprodução animal constituem ferramentas importantes para o desenvolvimento e avanço tecnológico, possibilitando a expansão e seleção de material genético de qualidade. Dentre as biotécnicas mais recentes, que visam otimizar o potencial reprodutivo de fêmeas, destaca-se a Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais (MOIFOPA). O co-cultivo utilizando folículos ovarianos pré-antrais (FOPA) e células de outras linhagens, como as células-tronco mesenquimais (MSC) tem se tornado uma alternativa vantajosa dentro da técnica de MOIFOPA. Este estudo tem como objetivo desenvolver um sistema de co-cultivo *in vitro* de FOPA caprinos *in situ* com Células-Tronco Mesenquimais da medula óssea (BM-MSC), avaliando a influência dessas células no crescimento folicular, taxa de ativação e sobrevivência de folículos morfolologicamente normais. As BM-MSC foram isoladas e co-cultivadas com fragmentos do córtex ovariano onde estão inclusos os FOPA's por um e sete dias, com meio de cultivo básico. Cortes histológicos dos fragmentos foram analisados e obtidos dados referentes à classificação morfológica, taxa de sobrevivência de folículos morfolologicamente normais e taxa de ativação folicular. Os meios de cultivo no dia um e sete também foram colhidos para dosagem de nitrito e glutatona reduzida. Verificou-se redução significativa ( $P < 0,05$ ) do percentual de folículos morfolologicamente normais em comparação ao controle fresco apenas no sétimo dia de cultivo no tratamento sem BM-MSC (SC), no tratamento com BM-MSC (CC) não foi observada redução significativa ( $P > 0,05$ ). Ao comparar os tratamentos CC vs. SC, no sétimo

dia de cultivo foi evidenciada taxa significativamente superior de FOPA morfológicamente normais no CC ( $P>0,05$ ). Em ambos os tratamentos foi constatada taxas de folículos primordiais e em desenvolvimento similar ao controle fresco ( $P>0,05$ ). Ao comparar os tratamentos entre si, bem como com o controle fresco não foi observada diferenças significativas no diâmetro folicular ( $P>0,05$ ), tampouco na concentração de nitrito ( $P>0,05$ ). A concentração de glutathiona reduzida foi significativamente inferior no sétimo dia do co-cultivo. Concluindo, o co-cultivo não exerceu influência sobre o desenvolvimento folicular e oocitário. Entretanto, foi fundamental para manter a sobrevivência de folículos pré-antrais caprinos durante sete dias de cultivo. Além disso, ficou demonstrado que é possível o cultivo de FOPA's simultaneamente BM-MS.

Palavras-chave: MOIFOPA, Ovário, Caprino, Nitrito, Glutathiona.

## 1. Introdução

A Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais (MOIFOPA), também conhecida como ovário artificial, tem como principal objetivo a recuperação de oócitos inclusos nos folículos pré-antrais (FOPA) e cultivo *in vitro* desses até sua completa maturação, visto que os FOPA representam em torno de 95% de toda a população folicular, e que normalmente não se desenvolvem até o estágio de folículo pré-ovulatório, pois entram em um processo fisiológico conhecido como atresia (Gonçalves e Figueiredo, 2008).

O maior sucesso da MOIFOPA, até o momento, foi relatado em murinos, com o nascimento de camundongos saudáveis a partir de folículos primordiais crescidos, maturados e fecundados *in vitro* (O'Brien et al., 2003), bem como após criopreservação seguida do cultivo *in vitro* de tecido ovariano, resultando também na gestação e nascimento de filhotes vivos (Wang et al., 2011). Já em caprinos (Magalhães et al., 2011; Saraiva et al., 2010), ovinos (Arunakumari et al., 2010), bubalinos (Gupta et al., 2008), suínos (Wu et al., 2001), e

primatas não-humanos (Xu et al., 2011) o cultivo *in vitro* de FOPA resultou na produção de oócitos maduros, fecundados *in vitro*, dando origem a embriões, porém não gestados. Em humanos (Telfer et al., 2008), bovinos (Araújo et al., 2014) e caninos (Serafim et al., 2015), o máximo alcançado foi o desenvolvimento de folículos primordiais até o estágio antral.

O co-cultivo de oócitos ou embriões com células somáticas tem sido bastante sugerido na tentativa de simular o que ocorre naturalmente *in vivo*, uma vez que o desenvolvimento folicular é regulado por fatores parácrinos e autócrinos das células somáticas circundantes (Gonçalves e Figueiredo, 2008).

As células-tronco mesenquimais (MSC) são células somáticas com maior potencial de diferenciação, que em condições adequadas, são capazes de estabelecer um microambiente regenerativo por meio da secreção de fatores bioativos, moléculas tróficas e antiapoptóticas. Além disso, são capazes de remover componentes tóxicos e espécies reativas de oxigênio (EROs), auxiliando, dessa forma, a sobrevivência e proliferação de outros tipos celulares. Esses benefícios já foram constatados no co-cultivo de MSC com embriões bovinos (Miranda et al., 2016) e de camundongos (Moshkdanian et al., 2011), bem como no co-cultivo com folículos pré-antrais em bovinos (Itoh e Hoshi, 2000), camundongos (Green et al., 2016) e humanos (Xia et al., 2015).

Embora Saraiva et al. (2010) e Magalhães et al. (2011) tenham conseguido obter embriões a partir de FOPA caprinos, o que é considerado um avanço expressivo, ambos recomendam novos estudos para a definição de um meio apropriado para o desenvolvimento *in vitro* completo de folículos primordiais caprinos, pois nesses dois experimentos a taxa de maturação oocitária foi sub-ótima, impedindo, deste modo, subsequente produção em larga escala de oócitos e embriões desenvolvidos *in vitro*.

Este trabalho tem por objetivo desenvolver um sistema de co-cultivo *in vitro* de FOPA caprinos com células-tronco mesenquimais da medula óssea, avaliando a sua influência no

crescimento folicular, taxa de ativação e sobrevivência de folículos morfologicamente normais, em busca de um protocolo bem definido, que represente o primeiro passo de uma linha de pesquisa bem sucedida, que contribua com esclarecimentos acerca da foliculogênese, e sirva de instrumento para a tecnologia do ovário artificial.

## **2. Materiais e métodos**

### **2.1. Delineamento Experimental**

Foram utilizados ovários de cinco cabras adultas (n=5), sem padrão racial definido (SPRD), coletados em abatedouro com fiscalização municipal, localizado em Teresina-PI. A partir de cada par de ovários foram obtidos 10 fragmentos, dos quais dois foram utilizados como controle fresco e os demais distribuídos aleatoriamente entre os tratamentos. CC e SC, onde: CC representa o co-cultivo de FOPA *in situ* com célula-tronco mesenquimal da medula óssea de caprinos (BM-MSC) e SC representa o cultivo de FOPA *in situ* sem BM-MSC. Para ambos os tratamentos foram testados dois períodos de cultivo *in vitro* (D1 e D7), onde: D1 indica um dia de cultivo e D7 equivale a sete dias de cultivo. O estudo foi conduzido em duplicata, utilizando-se sempre dois fragmentos para cada tratamento e tempo de cultivo.

### **2.3. Processamento dos ovários**

Imediatamente após o abate das cabras, cada ovário foi lavado uma vez com álcool 70% por 10 segundos e duas vezes com Meio Essencial Mínimo (MEM) suplementado com 25mM de HEPES (solução tampão), penicilina (100 mg/mL) e estreptomicina (100 mg/mL). Esse material foi acondicionado em uma caixa isotérmica e transportado até o laboratório em temperatura aproximada de 4°C, no prazo máximo de uma hora, onde foram manipulados em capela de fluxo laminar.

Com auxílio de uma lâmina de bisturi estéril e pinça anatômica, cada ovário foi seccionado ao meio no sentido longitudinal, sendo removidos a meula, os folículos antrais e

os corpos lúteos, quando presentes, restando apenas o córtex ovariano. De cada par de ovários, o córtex foi dividido para a obtenção de 10 fragmentos de 9 mm<sup>3</sup> (3x3x1mm). Dos 10 fragmentos obtidos de cada animal, dois foram imediatamente fixados em solução de carnoy e encaminhados para processamento histológico, para o controle fresco. Os outros oito fragmentos restantes de cada animal foram distribuídos aleatoriamente em placas de 24 poços (01 fragmento/poço) e cultivados por um e sete dias na presença (CC) ou ausência (SC) de BM-MSC.

#### 2.4. Obtenção e preparo das células-tronco mesenquimais da medula óssea de caprinos (BM-MSC)

As BM-MSC foram obtidas a partir da descongelação de células criopreservadas no banco de células-tronco do Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisas com Células-Tronco (NUPCelt) da Universidade Federal do Piauí, situado no município de Teresina-PI. As células foram isoladas, caracterizadas e criopreservadas na terceira passagem em estudo anterior (Santos, 2017) a partir de caprinos adultos, hípidos, provenientes do aprisco do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí.

Após a descongelação em banho maria (NOVA TÉCNICA®) à 37°C, as BM-MSC foram transferidas para tubos de polipropileno de 15mL (TPP®) contendo o dobro da quantidade da alíquota de meio de crescimento  $\alpha$ -MEM (Invitrogen®). Em seguida, foram centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspenso em 1ml do mesmo meio, esse processo era repetido por duas vezes; ao final a solução resultante foi depositada em uma garrafa de cultivo de 25cm<sup>2</sup> já contendo 2ml do meio de cultivo. A garrafa foi mantida em estufa com atmosfera úmida a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, e o meio de cultivo era trocado a cada 72h até que as células atingissem uma confluência de 80%. O acompanhamento da aderência e do crescimento celular foi realizado pela observação

microscópio invertido. Após a confluência, as células foram repicadas para placas de cultivo de 24 poços. Para o repique, foram adicionados à garrafa 3ml de solução de tripsin-EDTA (Sigma Aldrich), a qual foi incubada em estufa a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> por cinco minutos. Após o desprendimento das células, foi adicionado o dobro de meio de cultivo, para neutralização da tripsina, totalizando uma solução de 9ml, que foi centrifugada a 1500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em 1ml de meio para realizar a contagem de células em câmara de Neubauer, de modo que cada poço recebesse 1x10<sup>3</sup> células. Após a aderência dessas células, fato que ocorreu geralmente após 24h, os fragmentos ovarianos foram depositados juntamente com elas para realização do co-cultivo (um fragmento por poço).

#### 2.5. Co-cultivo de folículos pré-antrais *in situ* de caprinos associado às BM-MSc

O co-cultivo iniciou-se somente quando as BM-MSc apresentaram confluência de 80% nos poços de cultivo. O meio de cultivo para ambos os tratamentos, CC e SC, foi composto por 1 mL de meio de cultivo Alfa-MEM (Minimum Essential Medium - Invitrogen®), suplementado com ITS (insulina 6,25µg/mL, transferina 6,25mg/ml e selênio 6,25ng/mL), 2mM de glutamina, 2mM de hipoxantina, 1,25mg/mL de albumina sérica bovina (BSA Gibco BRL, Rockville, MD, USA), 20 UI/mL de penicilina, 200 mg/mL de estreptomicina e 0,005g de ácido ascórbico. A incubação foi realizada em ambiente estéril em atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub>, 95 % de umidade relativa e 37°C. Os folículos inclusos em tecido ovariano foram cultivados por até sete dias, com trocas de meio realizadas a cada 48h. Durante o cultivo, nos dias D1 e D7, os fragmentos foram coletados e encaminhados para processamento histológico, a fim de avaliar a morfologia, crescimento, e taxas de sobrevivência e ativação folicular. Além dos fragmentos, foram coletados também os meios de cultivo desses mesmos dias, para dosagem de nitrito, glutatona reduzida.

## 2.6. Processamento histológico

Todos os fragmentos coletados ao longo do experimento (controle fresco e após cultivo *in vitro*) foram fixados em solução de Carnoy por 4 horas. Em seguida foram submetidos a uma bateria com sequência de álcoois 70, 80, 90 e 100% para desidratação, diafanizados em xilol e inclusão em parafina a 60°C. Os fragmentos incluídos em parafina foram seccionados seriadamente à espessura de 7µm para montagem das lâminas, que foram coradas pela técnica de hematoxilina-eosina.

## 2.7 Análise morfológica

Foram analisados 30 folículos por tratamento, por animal, em cada período de cultivo, e em cada repetição, totalizando 750 folículos avaliados. Somente os folículos ovarianos pré-antrais cujos oócitos apresentavam o núcleo evidente na secção observada fizeram parte da análise. Quanto à classificação morfológica, os folículos foram inicialmente divididos segundo o estágio de desenvolvimento em: primordiais (oócito circundado por células da pré-granulosa de forma pavimentosa) e em desenvolvimento (oócito circundado por uma ou mais camadas de células da pré-granulosa de forma pavimentosa e pelo menos uma célula da granulosa de formato cúbico). Os FOPA's foram classificados ainda como morfológicamente normais (folículos contendo oócito e células da granulosa intactos) ou folículos degenerados (com núcleo picnótico ou presença de corpos picnóticos, retração citoplasmática e desorganização das células da granulosa).

## 2.8. Taxa de folículos morfológicamente normais e ativação folicular

A taxa de folículos morfológicamente normais teve como base a classificação morfológica realizada anteriormente (normais ou degenerados), que compreende a proporção de folículos normais encontrados dentre todos os folículos analisados. As médias das

proporções foram calculadas em cada tratamento e em cada período de cultivo, e em seguida foram comparadas entre si.

O cálculo da taxa de ativação folicular foi feito com base na proporção de folículos primordiais e em desenvolvimento dentre os folículos morfologicamente normais, calculada tanto no D1 como no D7 e nos diferentes tratamentos testados.

## 2.9. Avaliação do desenvolvimento folicular

O diâmetro oocitário e folicular dos FOPA's classificados como normais, foram obtidos a partir da média de duas mensurações perpendiculares (90°). Todos os cortes histológicos foram examinados utilizando microscópio óptico trinocular (Nova Optical Systems®, São Paulo, Brasil), equipado com câmera digital (TOPCAM™ 5 Megapixel) para registro fotográfico das imagens. Todas as mensurações foram realizadas com auxílio do software ToupView® 3.7.

## 2.10. Determinação do conteúdo de nitrito e dos níveis de glutathiona reduzida (GSH)

A dosagem do conteúdo de nitrito foi baseada na reação de Griess (Green et al., 1978) no qual, em um tubo branco foi adicionado 500µL do reagente de Griess, mais 500 µL do meio de cultura sem cultivo (Branco). Em outro tubo teste foi adicionado 500 µL do reagente de Griess mais 500 µL do meio de cultura (tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7,4) (Teste). Foi feita a leitura em espectrofotômetro a 560 nm. Os resultados foram expressos em µM/mg de proteína.

A determinação da concentração de GSH é baseada na reação de Ellman (5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico) conforme algumas modificações da técnica descrita por Sedlak e Lindsay (1968), em um tubo foi adicionado 400 µL do meio de cultura e adicionado 320 µL de água destilada e mais 80 µL de ácido tricloroacético a 10%. O material foi agitado e

centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos. Em seguida, foi recolhido 400  $\mu$ L do sobrenadante e acrescido de 800  $\mu$ L de tampão Tris-HCl 0,4 M, pH 8,9 e mais 20  $\mu$ L de DTNB 0,01 M e, após 1 minuto de reação, foi feita a leitura em espectrofotômetro em 412 nm. A concentração foi expressa em mg/g de hemoglobina.

## 2.11. Análise Estatística

Os dados dos diâmetros, taxa de ativação e taxa de folículos morfológicamente normais foram obtidos e analisados utilizando o pacote estatístico SAS (Statistical Analysis System®, versão 9.2.) O teste de Shapiro Wilk foi utilizado para testar a normalidade, no entanto, para aqueles referentes ao crescimento folicular (diâmetros do oócito e folículo) os resíduos não seguiram distribuição normal, desse modo, para esses dados optou-se por utilizar um modelo linear generalizado em substituição aos testes não paramétricos. O modelo Gama foi o que demonstrou distribuições possíveis de serem ajustadas, sendo, portanto, o escolhido. Para este caso, o teste empregado para comparação de médias foi o teste de Wald. Para taxa de ativação folicular os dados apresentaram normalidade pelo teste de Shapiro Wilk, sendo submetidos à análise de variância (ANAVA) e as diferenças entre os tratamentos foram observadas pelo teste de Tukey, já para a taxa de folículos morfológicamente normais, os dados foram analisados pelo qui-quadrado. Os dados referentes ao estresse oxidativo também foram avaliados por meio da Análise de Variância (ANAVA) seguida do teste Neuman-Keuls. Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism 6.0 (San Diego, CA, EUA). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando  $P < 0,05$ .

### 3. Resultados

#### 3.1. Porcentagem de Folículos ovarianos pré-antrais caprinos morfologicamente normais

Os FOPA's inclusos no tecido ovariano foram considerados morfologicamente normais quando o oócito apresentava-se esférico ou ligeiramente alongado, com núcleo sem evidência de picnose e com as células da granulosa bem organizadas circundando o oócito. Foram considerados degenerados aqueles que apresentavam retração citoplasmática, núcleo do oócito picnótico ou células da granulosa desorganizadas. Folículos normais e atresícos foram encontrados no controle fresco, bem como após um e sete dias de cultivos, em ambos tratamentos (Fig. 1).

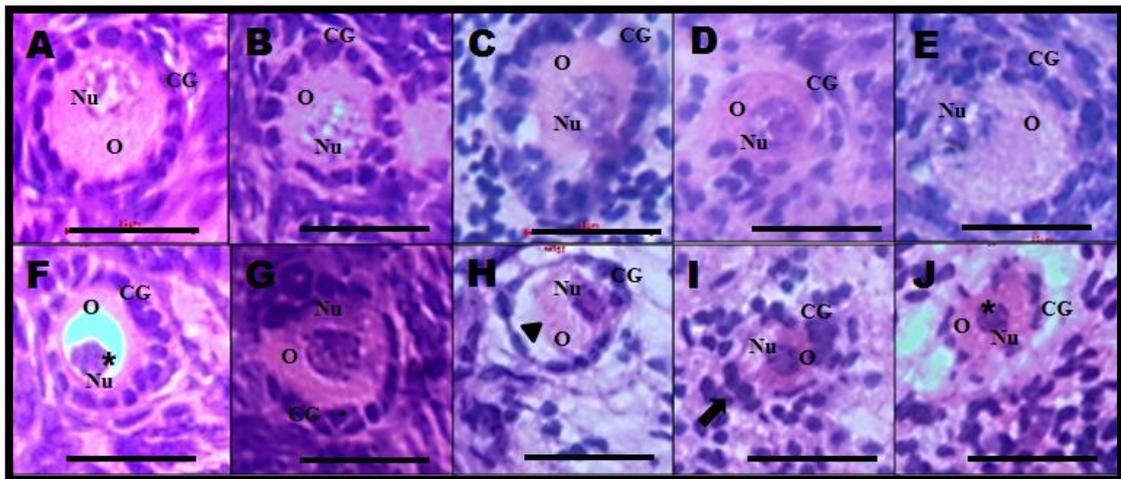


Fig. 1. Corte histológico do córtex ovariano (400x) demonstrando a morfologia dos folículos ovarianos pré-antrais caprinos, corados com hematoxilina-eosina. Folículos normais, com oócito e núcleo intactos são apresentados no controle fresco (A), um dia de cultivo CC (B), um dia de cultivo SC (C), sete dias de cultivo CC (D), sete dias de cultivo SC (E). Folículos degenerados são mostrados no controle fresco (F), um dia de cultivo CC (G), um dia de cultivo SC (H), sete dias de cultivo com CS (I), sete dias de cultivo SC (J). Presença de núcleo picnótico (\*), retração citoplasmática (ponta de seta) e desorganização das células da granulosa (seta). O: oócito; Nu: núcleo do oócito; CG: células da granulosa. Barra de escala 25 $\mu$ m.

Na fig. 2 está representado o percentual de folículos morfologicamente normais encontrados no controle fresco, bem como em um e sete dias de cultivo *in vitro* CC e SC. Nota-se que houve uma redução significativa ( $P < 0,05$ ) desse percentual em comparação ao

controle fresco apenas em sete dias de cultivo no tratamento SC. No tratamento CC não foi observada redução significativa ( $P>0,05$ ) no percentual de folículos morfologicamente normais entre os dias um e sete de cultivo. No entanto, no tratamento SC o percentual de folículos morfologicamente normais em sete dias de cultivo foi significativamente inferior em relação ao dia um ( $P<0,05$ ). Ao comparar os tratamentos CC vs. SC no dia um não foram evidenciadas diferenças significativas ( $P>0,05$ ) no percentual de folículos morfologicamente normais, mas no dia sete, o número de folículos morfologicamente normais encontrado no tratamento CC é significativamente superior ao tratamento SC.

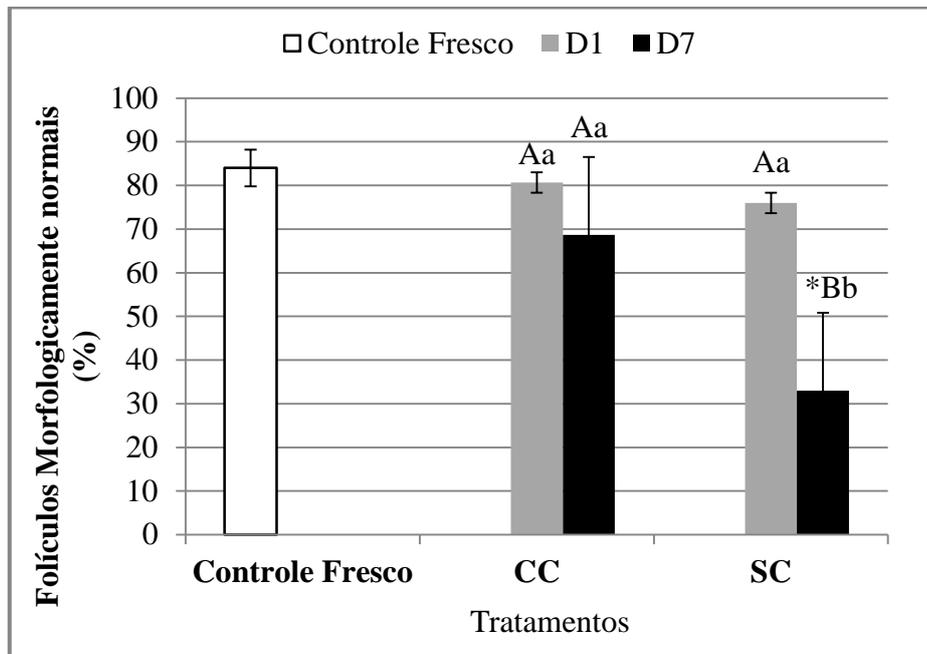


Fig. 2. Percentagem (média $\pm$ EP) de folículos ovarianos pré-antrais caprinos morfologicamente normais no controle fresco (não-cultivado) e após cultivo *in vitro* por um ou sete dias CC e SC. \*Diferem estatisticamente do controle ( $P<0,05$ ). Letras maiúsculas distintas indicam diferença no mesmo tratamento em dias de cultivo diferentes ( $P<0,05$ ). Letras minúsculas distintas indicam diferença entre os tratamentos no mesmo dia de cultivo ( $P<0,05$ ).

### 3.2. Desenvolvimento folicular

A porcentagem de folículos primordiais e em desenvolvimento observada em todos os momentos está demonstrada na fig. 3. Não houve redução significativa no número de folículos primordiais e aumento significativo no número de folículos em desenvolvimento ( $P>0,05$ ) ao longo do cultivo dos dois tratamentos, CC e SC. Além disso, em ambos os tratamentos testados foram constatadas taxas de folículos primordiais e em desenvolvimento similar ao controle fresco ( $P>0,05$ ).

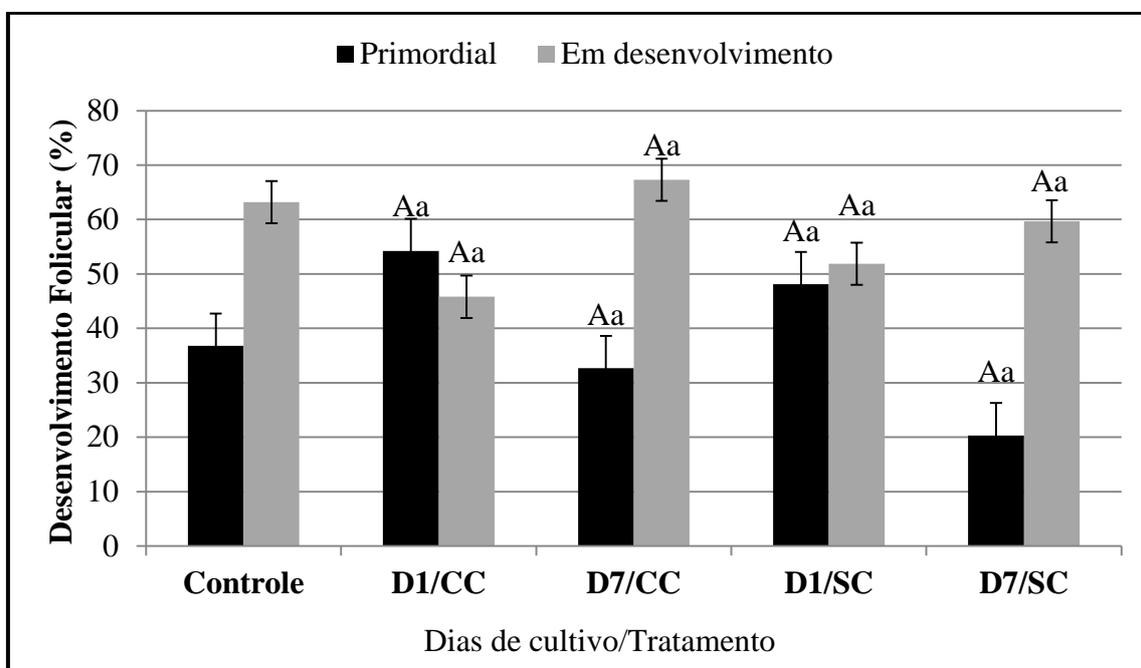


Fig. 3. Percentagem (média±EP) de folículos ovarianos pré-antrais caprinos primordiais e em desenvolvimento no controle fresco (não-cultivado) e após cultivo *in vitro* por um ou sete dias CC e SC. \*Diferem estatisticamente do controle ( $P<0,05$ ). Letras maiúsculas distintas indicam diferença no mesmo tratamento em diferentes dias de cultivo ( $P<0,05$ ); letras minúsculas distintas indicam diferença entre os tratamentos no mesmo dia de cultivo ( $P<0,05$ ).

Ao comparar os tratamentos testados entre si, bem como com o controle fresco, nos diferentes dias de cultivo, não foi observada diferenças significativas no diâmetro folicular ( $P>0,05$ ). Entretanto, no dia um de cultivo o diâmetro do oócito apresentou-se significativamente maior ( $P<0,05$ ) no tratamento CC em relação ao tratamento SC. Após sete

dias de cultivo, ambos os tratamentos apresentaram diâmetros similares ( $P>0,05$ ) e ao comparar com o controle fresco também não foram observadas diferenças significativas (Tabela 1).

**Tabela 1.** Diâmetro folicular, oocitário e nuclear ( $\mu\text{m}$ ) (média  $\pm$  EP) no controle fresco (não-cultivado) e após cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos por um ou sete dias CC e SC.

Tratamentos	Diâmetro do Folículo		Diâmetro do Oócito	
	D1	D7	D1	D7
<b>Controle</b>	27,23 $\pm$ 4.42		19,44 $\pm$ 3.33	
<b>Cultivados</b>	<b>D1</b>	<b>D7</b>	<b>D1</b>	<b>D7</b>
CC	23.30 $\pm$ 2.62 <sup>Aa</sup>	23.56 $\pm$ 2.28 <sup>Aa</sup>	18.02 $\pm$ 3.25 <sup>Aa</sup>	16.64 $\pm$ 3.12 <sup>Aa</sup>
SC	23.36 $\pm$ 2.42 <sup>Aa</sup>	23.18 $\pm$ 2.85 <sup>Aa</sup>	16.77 $\pm$ 3.17 <sup>Ba</sup>	17.02 $\pm$ 3.15 <sup>Aa</sup>

\*Diferem estatisticamente do controle ( $P<0,05$ ). Letras maiúsculas distintas indicam diferença entre os tratamentos no mesmo dia de cultivo ( $P<0,05$ ); letras minúsculas distintas indicam diferença entre o mesmo tratamento em dias de cultivo diferentes ( $P<0,05$ ).

### 3.3 Concentração de Nitrito e Glutathiona Reduzida

A fig. 4 mostra a produção de nitrito após cultivo *in vitro* de FOPA por um ou sete dias na ausência (SC) ou presença (CC) de Células-tronco mesenquimais da medula óssea de caprinos. Não houve diferença significativa entre os tratamentos testados, independente do dia de cultivo ( $P>0,05$ ).

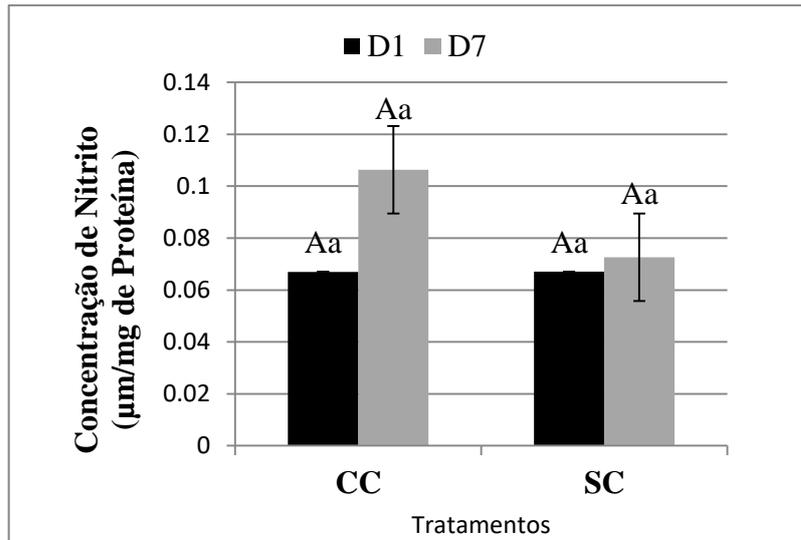


Fig. 4. Concentração de nitrito (média±EP) no meio de cultivo de folículos ovarianos pré-antrais caprinos após cultivo *in vitro* por um ou sete dias CC e SC. Letras maiúsculas distintas indicam diferença no mesmo tratamento em diferentes dias de cultivo ( $P < 0,05$ ); letras minúsculas distintas indicam diferença entre os tratamentos no mesmo dia de cultivo ( $P < 0,05$ ).

Os níveis de glutathione reduzida estão expressos na fig. 5, onde nota-se uma diminuição significativa ( $P < 0,05$ ) da concentração de glutathione do dia um para o dia sete no tratamento CC, enquanto no cultivo SC não há diferença estatística ao longo dos dias de cultivo ( $P > 0,05$ ). Apesar dos níveis de glutathione reduzida terem diminuído significativamente no dia sete do tratamento CC, não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ) dos níveis encontrados no mesmo dia do tratamento SC.

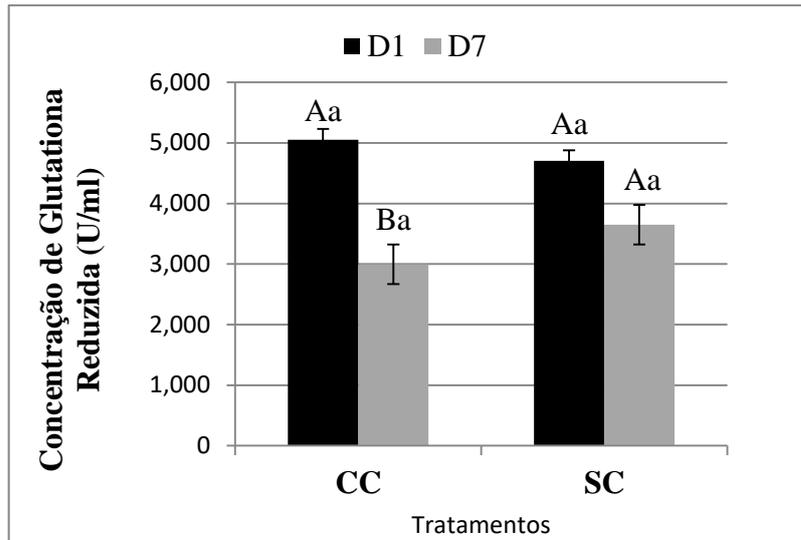


Fig. 5. Concentração de glutatona reduzida (média±EP) no meio de cultivo de folículos ovarianos pré-antrais caprinos após cultivo *in vitro* por um ou sete dias CC e SC. Letras maiúsculas distintas indicam diferença no mesmo tratamento em diferentes dias de cultivo ( $P < 0,05$ ); letras minúsculas distintas indicam diferença entre os tratamentos no mesmo dia de cultivo ( $P < 0,05$ ).

#### 4. Discussão

Nesse estudo buscou-se desenvolver um sistema de co-cultivo de células-tronco mesenquimais da medula óssea com folículos ovarianos pré-antrais, ambos da espécie caprina, com o intuito de averiguar se as BM-MSCs seriam capazes de oferecer melhores condições de desenvolvimento *in vitro* para estes folículos. Observou-se no tratamento CC, que o percentual de folículos morfologicamente normais foi mantido durante todo período de cultivo. Por outro lado, após sete dias de cultivo no tratamento SC, foi verificado que apenas 33% de folículos estavam com a morfologia preservada, diferindo significativamente do que foi encontrado no tratamento CC no mesmo dia de cultivo, em que 68% dos FOPA eram morfologicamente normais. Esses resultados estão de acordo com o estudo anterior descrito por Xia et al. (2015), ao verificarem que as taxas de sobrevivência folicular (30%) após 8 dias de cultivo na ausência de MSC apresentaram-se significativamente inferiores em relação ao co-cultivo com alta ( $0.5 \times 10^5$ ) e baixa ( $0.5 \times 10^3$ ) densidade de MSC, onde foi relatada taxas de 58.8% e 42.9% de sobrevivência folicular, respectivamente.

Com base nesse estudo, o co-cultivo de FOPA com BM-MSC desenvolvido, pode ser considerado com baixa densidade de MSC, uma vez que a quantidade de células presentes nos poços de co-cultivo foi de  $1 \times 10^3$ . Isso pode explicar, pelo menos em parte, a manutenção da taxa de folículos morfolologicamente normais no co-cultivo ao longo dos sete dias em comparação ao controle fresco, sem haver diferença significativa entre os tratamentos testados, CC vs, SC, no final do período de cultivo. Portanto, em nossas condições experimentais foram observadas fortes evidências de que as BM-MSC podem oferecer um suporte adequado para a sobrevivência de FOPA caprino.

Durante o desenvolvimento deste estudo, foi realizada inicialmente uma tentativa de co-cultivo com  $1 \times 10^5$  BM-MSC por poço. No entanto, foi observado que essa densidade de células era muito alta e que impossibilitava o desenvolvimento do experimento, uma vez que atingiam confluência de 100% nos poços de  $1,91\text{cm}^2$  antes dos setes dias de cultivo. Após total confluência, as BM-MSC começavam a morrer prejudicando o objetivo principal da pesquisa, que era manter os FOPA's co-cultivados com células vivas indiferenciadas em cultivo de curta duração.

Os fatores envolvidos na morte das BM-MSC são desconhecidos, mas acredita-se que a falta de área para expansão aliada a falta de condições ideais para diferenciação possam provocar aumento do estresse oxidativo dessas células predispondo a apoptose (Park et al., 2011). Acredita-se que uma alternativa a esse protocolo seria a troca do fragmento para um novo poço contendo BM-MSC ainda em expansão celular, quando o anterior atingisse 100% de confluência. No entanto, essa hipótese não foi testada nesse experimento e futuramente deverá ser analisada.

Os mecanismos pelos quais as MSC atuam para manter a taxa de sobrevivência de FOPA's morfolologicamente normais no co-cultivo ainda não estão totalmente elucidados. Entretanto, alguns estudos já comprovaram que as MSC são capazes de secretar fatores que

auxiliam na manutenção da viabilidade e desenvolvimento folicular, como: fator de crescimento de fibroblastos (Kim et al., 2009; Parte et al., 2013) e membros da superfamília do fator transformador de crescimento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Estes fatores de crescimento têm demonstrado ser fundamentais para manutenção da ultraestrutura do folículo ovariano, mantendo não somente sua morfologia intacta, mas também seu funcionamento (Kim et al., 2015; Rodrigues et al., 2014). Dentre os membros dessa superfamília, produzidos pelas MSC, com eficácia comprovada sobre o desenvolvimento folicular, estão a ativina A (Park et al., 2016) e a proteína morfogenética óssea (BMP) (Araújo et al., 2010; Xia et al., 2015).

Nesse estudo optou-se pelo co-cultivo com MSC derivadas da medula óssea exatamente pela possibilidade desse tipo celular secretar BMP, uma vez que são moléculas sintetizadas por células osteoprogenitoras, assim como as BM-MSc. Até o presente momento 15 tipos de BMP's já foram descritas, e sete delas (BMP-2, -3, -3b, -4, -6, -7 e -15) já foram localizadas em ovários de mamíferos (Fatehi et al., 2005; Glister et al., 2004; Persani et al., 2014). Essas proteínas desempenham um papel essencial no desenvolvimento de vários tipos de células, em vários tecidos, atuando na proliferação e diferenciação celular, organogênese, desenvolvimento embrionário, apoptose e reparo de uma ampla variedade de tecidos (Carreira et al., 2014). Além disso, tem sido recorrente o apontamento das BMP's como fatores benéficos para o desenvolvimento de FOPA cultivados *in vitro* (Araújo et al., 2010). Estas observações justificam a alta taxa de sobrevivência de folículos morfologicamente normais encontrada no presente estudo após sete dias de co-cultivo com BM-MSc. Além disso, é importante ressaltar que o meio de cultivo base utilizado neste experimento não recebeu suplementação exógena de hormônios e/ou fatores de crescimento, uma vez que objetivou-se avaliar a influência única e exclusiva das BM-MSc.

O co-cultivo com BM-MSc não teve influência sobre a taxa de desenvolvimento, ativação, crescimento folicular e oocitário, exceto no primeiro dia de cultivo, em que o

diâmetro oocitário apresentou-se superior no co-cultivo com BM-MSc. No entanto, é possível que essa diferença não tenha sido provocada pelas BM-MSc, uma vez que ao final do co-cultivo não foi detectada diferença entre os tratamentos testados. Em estudo prévio, Rossetto et al. (2010) também não encontram diferença significativa no crescimento de folículos ovarianos pré-antrais após sete dias de cultivo com meios de cultivo contendo FSH e androstenediona. Entretanto, houve ativação folicular, o que pode ser explicado pela possibilidade dos folículos primordiais não aumentarem em diâmetro, mas serem ativados, ou seja, desenvolvem de primordiais para folículos em transição ou primários, o que é constatado pela mudança na morfologia das células da granulosa que deixam de ser pavimentosas para tornarem-se cúbicas. Esse fenômeno muitas vezes não implica no diâmetro do oócito ou do folículo, mas representa o desenvolvimento folicular, indicando ativação.

No intuito de avaliar o estresse oxidativo foi realizada a dosagem de nitrito e glutathiona reduzida nos meios de cultivo coletados ao longo do experimento. Bruno et al. (2008), relataram que os níveis de nitrito no meio de cultivo pode ser utilizado como indicadores de viabilidade das células da granulosa dos folículos ovarianos pré-antrais caprinos. Entretanto, em nossas condições experimentais não foi constatada diferença significativa entre os tratamentos no mesmo dia de cultivo, bem como no mesmo tratamento em diferentes períodos. Em relação a concentração de glutathiona reduzida, houve diferença significativa entre os dias um e sete no co-cultivo, com este último apresentando níveis inferiores, já entre os tratamentos não houve diferença. Esses resultados demonstram a possibilidade da ocorrência de maior estresse oxidativo no sétimo dia de co-cultivo com BM-MSc quando comparado ao dia um. Geralmente a intensidade do estresse oxidativo é mensurado pelos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO's) (Aguiar et al., 2016), e não por meio da dosagem direta de glutathiona reduzida como aqui está demonstrado. Entretanto,

ambos os métodos podem ser utilizados como parâmetros para determinar a presença de radicais livres que são deletérios para as células em cultivo (Crocomo et al., 2012).

## 5. Conclusão

O co-cultivo de fragmentos do córtex ovariano de caprinos com células-tronco mesenquimais da medula óssea (BM-MSC) não exerceu influência sobre o desenvolvimento folicular e oocitário. Entretanto, foi fundamental para manter a sobrevivência de folículos pré-antrais caprinos durante sete dias de cultivo. Além disso, ficou claramente demonstrado que é possível o cultivo de FOPA's simultaneamente com BM-MSC, tornando essencial o desenvolvimento de novos estudos que visem ajustar as condições de cultivo *in vitro* para ambas as culturas de células.

## Referências

- Aguiar, F.L.N., Lunardi, F.O., Lima, L.F., Rocha, R.M.P., Bruno, J.B., Magalhães-Padilha, D.M., Cibin, F.W.S., Nunes-Pinheiro, D.C.S., Gastal, M.O., Rodrigues, A.P.R., Apgar, G.A., Gastal, E.L., Figueiredo, J.R., 2016. FSH supplementation to culture medium is beneficial for activation and survival of preantral follicles enclosed in equine ovarian tissue. *Theriogenology* 85, 1106–1112.
- Araújo, V.R., Gastal, M.O., Figueiredo, J.R., Gastal, E.L., 2014. *In vitro* culture of bovine preantral follicles: a review. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 12, 78.
- Araújo, V.R., Gomes, C.M., Deborah, M., Modesto, G., Bão, S.N., Viana, J.R., Figueiredo, J.R. De, Rodrigues, A.P.R., R, A.A. V, Silva, C.M.G., Magalhães, D.M., Silva, G.M., Bão, S.N., Figueiredo, J.R., Effect, R.A.P.R., 2010. Effect of Bone Morphogenetic Protein-7 ( BMP-7 ) on *in vitro* survival of caprine preantral follicles. *Pesq. Vet. Bras.* 1 30, 305–310.

- Arunakumari, G., Shanmugasundaram, N., Rao, V.H., 2010. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. *Theriogenology* 74, 884–894.
- Bruno, J.B., Lima-Verde, I.B., Martins, F.S., Matos, M.H.T., Lopes, C.A.P., Maia, J.E., Bão, S.N., Nobre Junior, H. V., Maia, F.D., Pessoa, C., Moraes, M.O., Silva, J.R. V, Figueiredo, J.R., Rodrigues, A.P.R., 2008. Característica histológica, ultra-estrutural e produção de nitrito de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro* na ausência ou presença de soro. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 60, 1329–1337.
- Carreira, A.C., Alves, G.G., Zambuzzi, W.F., Sogayar, M.C., Granjeiro, J.M., 2014. Bone Morphogenetic Proteins: Structure, biological function and therapeutic applications. *Arch. Biochem. Biophys.* 561, 64–73.
- Crocomo, L.F., Marques Filho, W.C., Landin-Alvarenga, F.C., Bicudo, S.D., 2012. Produção de embriões *in vitro*: Estresse oxidativo e antioxidantes. *Veterinária e Zootec.* 19, 470–479.
- Fatehi, A.N., Van Den Hurk, R., Colenbrander, B., Daemen, A.J.J.M., Van Tol, H.T.A., Monteiro, R.M., Roelen, B.A.J., Bevers, M.M., 2005. Expression of bone morphogenetic protein2 (BMP2), BMP4 and BMP receptors in the bovine ovary but absence of effects of BMP2 and BMP4 during IVM on bovine oocyte nuclear maturation and subsequent embryo development. *Theriogenology* 63, 872–889.
- Glister, C., Kemp, C.F., Knight, P.G., 2004. Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: Actions of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation of follistatin. *Reproduction.* 127, 239-254
- Gonçalves, P., Figueiredo, J. de, 2008. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal, 2<sup>o</sup> ed. São Paulo.
- Green, L.C.; Tannenbaum S.R.; Goldman, P., 1978. Nitrite and nitrate are formed by

- endogenous synthesis in the human intestine. *Science* (80-. ). 200, 1487–1489.
- Green, L.J., Zhou, H., Shikanov, A., 2016. Utilization of adipose derived stem cells for the *in vitro* maturation of primary and early secondary ovarian follicles. *Fertility and Sterility* 106, 49.
- Gupta, P.S.P., Ramesh, H.S., Manjunatha, B.M., Nandi, S., Ravindra, J.P., 2008. Production of buffalo embryos using oocytes from *in vitro* grown preantral follicles. *Zygote* 16, 57–63.
- Itoh, T., Hoshi, H., 2000. Efficient isolation and long-term viability of bovine small preantral follicles *in vitro*. *Vitr. Cell. Dev. Biol.—Animal* 36, 235–240.
- Kim, H.S., Yun, J.W., Shin, T.H., Lee, S.H., Lee, B.C., Yu, K.R., Seo, Y., Lee, S., Kang, T.W., Choi, S.W., Seo, K.W., Kang, K.S., 2015. Human umbilical cord blood mesenchymal stem cell-derived PGE2 and TGF- $\beta$ 1 alleviate atopic dermatitis by reducing mast cell degranulation. *Stem Cells*. 33, 1254–1266.
- Kim, W.-S., Park, B.-S., Sung, J.-H., 2009. Protective role of adipose-derived stem cells and their soluble factors in photoaging. *Arch. Dermatol. Res.* 301, 329–336.
- Magalhães, D.M., Duarte, A.B.G., Araújo, V.R., Brito, I.R., Soares, T.G., Lima, I.M.T., Lopes, C.A.P., Campello, C.C., Rodrigues, A.P.R., Figueiredo, J.R., 2011. *In vitro* production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. *Theriogenology* 75, 182–188.
- Miranda, M., Nascimento, H., Costa, M., 2016. Increasing of blastocyst rate and gene expression in co-culture of bovine embryos with adult adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *J. Assist.* 33, 1395-1403.
- Moshkdanian, G., Nematollahi-Mahani, S.N., Pouya, F., Nematollahi-Mahani, A., 2011. Antioxidants rescue stressed embryos at a rate comparable with co-culturing of embryos with human umbilical cord mesenchymal cells. *J. Assist. Reprod. Genet.* 28, 343–349.
- O'Brien, M.J., Pendola, J.K., Eppig, J.J., 2003. A Revised Protocol for *In Vitro* Development

- of Mouse Oocytes from Primordial Follicles Dramatically Improves Their Developmental Competence. *Biol. Reprod.* 68, 1682–1686.
- Park, S.E., Lee, J., Chang, E.H., Kim, J.H., Sung, J.H., Na, D.L., Chang, J.W., 2016. Activin A secreted by human mesenchymal stem cells induces neuronal development and neurite outgrowth in an *in vitro* model of Alzheimer's disease: neurogenesis induced by MSCs via activin A. *Arch. Pharm. Res.* 39, 1171–1179.
- Park, S.G., Kim, J.H., Xia, Y., Sung, J.-H., 2011. Generation of reactive oxygen species in adipose-derived stem cells: friend or foe? *Expert Opin. Ther. Targets* 15, 1297–1306.
- Parte, S., Bhartiya, D., Manjramkar, D.D., Chauhan, A., Joshi, A., 2013. Stimulation of ovarian stem cells by follicle stimulating hormone and basic fibroblast growth factor during cortical tissue culture. *J. Ovarian Res.* 6, 20.
- Persani, L., Rossetti, R., Di pasquale, E., Cacciatore, C., Fabre, S., 2014. The fundamental role of bone morphogenetic protein 15 in ovarian function and its involvement in female fertility disorders. *Hum. Reprod. Update* 20, 869–883.
- Rodrigues, G.Q., Lima, I.M.T., Chaves, R.N., Rossetto, R., Costa, S.L., Castro, S. V., Barros, V.R.P., Matos, M.H.T., Lopes, C.A.P., Bão, S.N., Campello, C.C., Figueiredo, J.R., 2014. Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) maintains follicular ultrastructure and stimulates preantral follicle growth in caprine ovarian tissue cultured *in vitro*. *Arq. Bras. Med. Vet. e Zootec.* 66, 411–416.
- Rossetto, R., Matos, M.H.T., Celestino, J.J.H., Bruno, J.B., Silva, C.M.G., Faustino, L.R., 2010. Androstenedione and follicle stimulating hormone involvement in the viability and development of goat preantral follicles *in vitro*. *Animal Reproduction.* 7, 80–89.
- Santos, T. M. V. Interação *in vitro* dos meios de cultivo glutamina aditivado e folicular ovariano sobre a cinética e plasticidade de células-tronco mesenquimais caprinas. 2017. 47 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Piauí,

- Teresina. 2017.
- Saraiva, M.V.A., Rossetto, R., Brito, I.R., Celestino, J.J.H., Silva, C.M.G., Faustino, L.R., Almeida, A.P., Bruno, J.B., Magalhães, D.M., Matos, M.H.T., Campello, C.C., Figueiredo, J.R., 2010. Dynamic Medium Produces Caprine Embryo From Preantral Follicles Grown *In Vitro*. *Reprod. Sci.* 17, 1135–1143.
- Sedlak, J., Lindsay, R.H., 1968. Estimation of Total, Protein-Bound, and Nonprotein Sulfhydryl Groups in Tissue with Ellman's Reagent. *Anal. Biochem.* 25, 192–205.
- Serafim, M.K.B., Duarte, A.B.G., Silva, G.M., Souza, C.E.A., Magalhães-Padilha, D.M., Moura, A.A.A., Silva, L.D.M., Campello, C.C., Figueiredo, J.R., 2015. Impact of growth hormone (GH) and follicle stimulating hormone (FSH) on *in vitro* canine preantral follicle development and estradiol production. *Growth Horm. IGF Res.* 25, 85–89.
- Silva Filho, O., Argolo-Neto, N., 2014. Isolation and characterization of mesenchymal progenitors derived from the bone marrow of goats native from northeastern Brazil. *Acta Cirurgica Brasileira*, 29, 478-484.
- Telfer, E.E., McLaughlin, M., Ding, C., Thong, K.J., 2008. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. *Hum. Reprod.* 23, 1151–1158.
- Wang, X., Catt, S., Pangestu, M., Temple-Smith, P., 2011. Successful *in vitro* culture of preantral follicles derived from vitrified murine ovarian tissue: Oocyte maturation, fertilization, and live births. *Reproduction* 141, 183–191.
- Wu, J., Emery, B.R., Carrell, D.T., 2001. *In vitro* growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. *Biol. Reprod.* 64, 375–81.
- Xia, X., Wang, T., Yin, T., Yan, L., Yan, J., Lu, C., Zhao, L., Li, M., Zhang, Y., Jin, H., Zhu, X., Liu, P., Li, R., Qiao, J., 2015. Mesenchymal Stem Cells Facilitate *In Vitro*

Development of Human Preantral Follicle. *Reprod. Sci.* 22, 1367–1376.

Xu, J., Lawson, M.S., Yeoman, R.R., Pau, K.Y., Barrett, S.L., Zelinski, M.B., Stouffer, R.L., 2011. Secondary follicle growth and oocyte maturation during encapsulated three-dimensional culture in rhesus monkeys: Effects of gonadotrophins, oxygen and fetuin. *Hum. Reprod.* 26, 1061–1072.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse estudo permitiu o desenvolvimento de um sistema de co-cultivo de células-tronco mesenquimais da medula óssea com folículos ovarianos pré-antrais, ambos derivados da espécie caprina, com resultados bastantes satisfatórios. A partir desse experimento verificou-se que as (BM-MSC) não exerceram influência sobre o desenvolvimento folicular e oocitário. Entretanto, foram fundamentais para a manutenção da sobrevivência dos folículos pré-antrais caprinos durante sete dias de cultivo. Esses resultados são de extrema importância no âmbito científico no que está relacionado à MOIFOPA, seja associado à reprodução animal ou humana.

Nesse experimento ficou comprovado que é possível o cultivo de FOPA's simultaneamente com (BM-MSC), representando um dos primeiros passos de uma linha de pesquisa que muito provavelmente trará resultados promissores no que diz respeito à clínica e reprodução. Com a possibilidade de co-cultivo desses dois tipos celulares comprovada, surge a possibilidade do desenvolvimento de novos estudos que visem ajustar as condições de cultivo *in vitro* para ambas culturas de células, testando os mais diversos fatores que possam influenciar o desenvolvimento de FOPA's *in vitro*, bem como o estudo dos mecanismos presentes nessa relação.

Vale ressaltar que esse trabalho é parte integrante de um projeto maior da Rede de Pesquisa do Ovário Artificial intitulado “Avaliação do potencial de células-tronco no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos e na regeneração *in vivo* de tecido ovariano lesionado”, Chamada MCTI/CNPq/FNDCT Ação Transversal - Redes Regionais de Pesquisa em Ecossistemas, Biodiversidade e Biotecnologia N ° 79/2013.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AERTS, J. Ovarian Follicular Dynamics: A Review with Emphasis on the Bovine Species. Part I: Folliculogenesis and Preantral Follicle Development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 179, p. 171–179, 2010.
- AGUIAR, F. et al. Role of EGF on in situ culture of equine preantral follicles and metabolomics profile. **Research in Veterinary**, v. 115, p. 155-164, 2017.
- AGUIAR, F. L. N. et al. FSH supplementation to culture medium is beneficial for activation and survival of preantral follicles enclosed in equine ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 85, n. 6, p. 1106–1112, 2016.
- ALVES, K. A. et al. Preantral follicle density in ovarian biopsy fragments and effects of mare age. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, n. 5, p. 867–875, 2017.
- AMORIM, C. A. et al. Morphometric characteristics of preantral and antral follicles and expression of factors involved in folliculogenesis in ovaries of adult baboons (*Papio anubis*). **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 33, n. 5, p. 617–626, 5 maio 2016.
- ANDERSSON-ROLF, A. et al. Stem Cells in Repair of Gastrointestinal Epithelia. **Physiology**, v. 32, n. 4, p. 278–289, 2017.
- APOLLONI, L. B.; BRUNO, J. B.; ALVES, B. G.; FIGUEIREDO, J. R. DE. Papel dos andrógenos na foliculogênese em mamíferos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, p. 1–15, 2016.
- ARAÚJO, V. R. et al. In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 12, p. 78, 2014.
- ARUNAKUMARI, G.; SHANMUGASUNDARAM, N.; RAO, V. H. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. **Theriogenology**, v. 74, n. 5, p. 884–894, 2010.
- ATKINSON, K. The mesenchymal stem cell, the mesenchymal stromal cell, and the mesenchymal stromal cell exosome. In: **The Biology and Therapeutic Application of Mesenchymal Cells**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2017. p. 1–7.
- BARROS, L. F.; HERMOSILLA, T.; CASTRO, J. Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 130, n. 3, p. 401–409, 2001.
- BUKOVSKY, A. et al. Origin of germ cells and formation of new primary follicles in adult human ovaries. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, n. 1, p. 20, 28 abr. 2004.
- CAMPOS, L. L. et al. Isolation, culture, characterization and cryopreservation of stem cells derived from amniotic mesenchymal layer and umbilical cord tissue of bovine fetuses. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 37, n. 3, p. 278–286, 2017.
- CAPLAN, A. I.; BRUDER, S. P. **Mesenchymal stem cells: Building blocks for molecular**

**medicine in the 21st century** *Trends in Molecular Medicine*, 2001.

CASTRO, S. V. et al. Fresh and vitrified bovine preantral follicles have different nutritional requirements during in vitro culture. **Cell and Tissue Banking**, v. 15, n. 4, p. 591–601, 2014.

CHAUBE, S. K. et al. Clomiphene Citrate Induces ROS-Mediated Apoptosis in Mammalian Oocytes. **Open Journal of Apoptosis**, v. 3, n. 3, p. 52–58, 2014a.

CHAUBE, S. K. et al. Neem (*Azadirachta indica* L.) leaf extract deteriorates oocyte quality by inducing ROS-mediated apoptosis in mammals. **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 464, 26 ago. 2014b.

COHNHEIM, J. Ueber entzündung und eiterung. **J. Arch. Path. Anat. Physiol. Klin. Med.**, v. 40, p. 1–79, 1867.

COSTA, C. R. M. et al. Labeling of adipose-derived stem cells with quantum dots provides stable and long-term fluorescent signal for ex vivo cell tracking. **In Vitro Cellular and Developmental Biology - Animal**, v. 53, n. 4, p. 363–370, 30 abr. 2017.

DAVACHI, N. D. et al. The effect of conspecific ampulla oviductal epithelial cells during in vitro maturation on oocyte developmental competence and maturation-promoting factor (MPF) activity in sheep. **Theriogenology**, v. 88, p. 207–214, 2017.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006.

DONG, F.-L. et al. An research on the isolation methods of frozen-thawed human ovarian preantral follicles. **International journal of clinical and experimental medicine**, v. 7, n. 8, p. 2298–303, 2014.

DUARTE, S.; ROCHA, S.; SILVA, D. Evaluation of IGF-1 concentration in the activation of ovine pre-antral follicles after in situ culture. **Animal Reproduction**, v. 14, n. 1, p. 261–261, 2017.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3, p. 203–216, 2003.

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

FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal reproduction science**, v. 78, n. 3, p. 135–163, 2003.

FRIEDENSTEIN, A. J. Precursor cells of mechanocytes. **International review of cytology**, v. 47, p. 327–359, 1976.

GONÇALVES, P.; FIGUEIREDO, J. DE. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. Editora Roca, 2008.

GREEN, L. J.; ZHOU, H.; SHIKANOV, A. Utilization of adipose derived stem cells for the in

vitro maturation of primary and early secondary ovarian follicles. *v.* 106, n. 3, p. 49, 2016.

GRINFELD, S.; GOMES, R. G. DA C. Células-tronco: um breve estudo. **Odontol. clín.-cient**, v. 7, n. 1, p. 29-33, 2008.

GUPTA, P. S. P. et al. Production of buffalo embryos using oocytes from in vitro grown preantral follicles. **Zygote**, v. 16, n. 1, p. 57–63, 2008.

HANNA, C. B.; HENNEBOLD, J. D. Ovarian germline stem cells: An unlimited source of oocytes? **Fertility and Sterility**, v. 101, n. 1, p. 20–30, 1 jan. 2014.

HEAZLEWOOD, C. F. The isolation and expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. In: **The Biology and Therapeutic Application of Mesenchymal Cells**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2017. p. 11–23.

HIRSHFIELD, A. N. Development of Follicles in the Mammalian Ovary. **International Review of Cytology**, v. 124, n. C, p. 43–101, 1991.

HOLLAND, S.; LEBACQZ, K.; ZOLOTH, L. **The human embryonic stem cell debate: science, ethics and public policy**. Cambridge, MA: MIT Press, 2001.

HUTT, K. J. The role of BH3-only proteins in apoptosis within the ovary. **Reproduction**, v. 149, n. 2, p. R81-R89, 2015.

ITOH, T.; HOSHI, H. EFFICIENT ISOLATION AND LONG-TERM VIABILITY OF BOVINE SMALL PREANTRAL FOLLICLES IN VITRO. **In Vitro Cell. Dev. Biol.—Animal**, v. 36, p. 235–240, 2000.

JAHROMI, B. N. et al. The potential role of granulosa cells in the maturation rate of immature human oocytes and embryo development: A co-culture study. **Clinical and Experimental Reproductive Medicine**, v. 42, n. 3, p. 111–117, 2015.

JANG, S. et al. Dynamics of embryonic stem cell differentiation inferred from single-cell transcriptomics show a series of transitions through discrete cell states. **eLife**, v. 6, p. e20487, 2017.

JOHNSON, J. et al. Oocyte Generation in Adult Mammalian Ovaries by Putative Germ Cells in Bone Marrow and Peripheral Blood. **Cell**, v. 122, n. 2, p. 303–315, 2005.

JONES, D. L.; WAGERS, A. J. No place like home: anatomy and function of the stem cell niche. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 1, p. 11–21, 2008.

KANG, B. et al. Basic Fibroblast Growth Factor Improved Angiogenesis of Vitrified Human Ovarian Tissues After In Vitro Culture and Xenotransplantation. **Cryoletters**, v. 38, n. 3, p. 194–201, 2017.

KERN, S. et al. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Umbilical Cord Blood, or Adipose Tissue. **Stem Cells**, v. 24, n. 5, p. 1294–1301, 2006.

KIM, E. Y. et al. The Use of Embryonic Stem Cell Derived Bioactive Material as a New Protein Supplement for the In Vitro Culture of Bovine Embryos. **Journal of Reproduction and Development**, v. 57, n. 3, p. 346–354, 2011.

KÖNIG, H. E.; LIEBICH, H.-G. **Anatomia dos animais domésticos: texto e atlas colorido**. 6. ed. Artmed, 2016.

KULANDA VELU, S.; BALKAN, W.; HARE, J. M. Next-Generation Stem Cell Therapy: Genetically Modified Mesenchymal Stem Cells for Cardiac Repair: Editorial to: “Mesenchymal Stem Cells with eNOS Over-Expression Enhance Cardiac Repair in Rats with Myocardial Infarction” by Leilei Chen et al. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v. 31, n. 1, p. 5–7, 2017.

LEE, K. et al. Induction of Mesenchymal Stem Cell Differentiation to a Meniscus Cell Phenotype by a Combination of Mohawk Transcription Factor and TGF- $\beta$  For Meniscus Repair and Regeneration. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 25, p. S283, 2017.

LING, B. et al. Effect of conditioned medium of mesenchymal stem cells on the in vitro maturation and subsequent development of mouse oocyte. **Brazilian journal of medical and biological research**, v. 41, n. 11, p. 978-985, 2008.

LOVATI, A. B. et al. Comparison of equine bone marrow-, umbilical cord matrix and amniotic fluid-derived progenitor cells. **Veterinary Research Communications**, v. 35, n. 2, p. 103–121, 2011.

LUCCI, C. M. et al. Study of preantral follicle population in situ and after mechanical isolation from caprine ovaries at different reproductive stages. **Animal Reproduction Science**, v. 56, n. 3–4, p. 223–236, 1999.

MAGALHÃES, D. M. et al. In vitro production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. **Theriogenology**, v. 75, n. 1, p. 182–188, 2011.

MAHAJAN, M. et al. 90 OVIDUCTAL EPITHELIAL CELLS Co-CULTURE PROMOTES GOAT (CAPRA HIRCUS) IN VITRO PARTHENOGENETIC EMBRYO DEVELOPMENT. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, n. 1, p. 152, 2017.

MARTINS, F. S. et al. Expression of protein and mRNA encoding Insulin Growth Factor-I (IGF-I) in goat ovarian follicles and the influence of IGF-I on in vitro development and survival of caprine preantral follicles. **Animal**, p. 349–361, 2010.

MARTINS, F.; SARAIVA, M.; CELESTINO, J. Expression of protein and mRNA encoding Insulin Growth Factor-I (IGF-I) in goat ovarian follicles and the influence of IGF-I on in vitro development and survival of caprine preantral follicles. **Animal Reproduction**, v. 7, n. 4, p. 349-361, 2017.

MATSUDA, F. et al. Follicular Growth and Atresia in Mammalian Ovaries: Regulation by Survival and Death of Granulosa Cells. **J. Reprod. Dev**, v. 58, p. 44–50, 2012.

MIRANDA, M.; NASCIMENTO, H.; COSTA, M. Increasing of blastocyst rate and gene expression in co-culture of bovine embryos with adult adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 33, n. 10, p. 1395-1403, 2016.

MOSHKDANIAN, G. et al. Antioxidants rescue stressed embryos at a rate comparable with co-culturing of embryos with human umbilical cord mesenchymal cells. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 28, n. 4, p. 343–349, 2011.

O'BRIEN, M. J.; PENDOLA, J. K.; EPPIG, J. J. A Revised Protocol for In Vitro Development of Mouse Oocytes from Primordial Follicles Dramatically Improves Their Developmental Competence<sup>1</sup>. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 5, p. 1682–1686, 2003.

PAES, V. M. et al. Effect of heat stress on the survival and development of in vitro cultured bovine preantral follicles and on in vitro maturation of cumulus–oocyte complex. **Theriogenology**, v. 86, n. 4, p. 994–1003, 2016.

PAN, Z. et al. The Controversy, Challenges, and Potential Benefits of Putative Female Germline Stem Cells Research in Mammals. **Stem Cells International**, v. 2016, p. 1–9, 2016.

PARK, H. Y. et al. Effect of human adipose tissue-derived mesenchymal-stem-cell bioactive materials on porcine embryo development. **Molecular Reproduction and Development**, v. 80, n. 12, p. 1035–1047, 2013.

RAMALHO-SANTOS, M.; WILLENBRING, H. On the Origin of the Term “Stem Cell”. **Cell Stem Cell**, v. 1, n. 1, p. 35–38, 2007.

RAMESH, H. S. et al. In vitro development of buffalo preantral follicles in co-culture with cumulus or granulosa cells. **Veterinarski Arhiv**, v. 80, n. 1, p. 41–50, 2010.

RAVEN, C. P. **Oogenesis: The storage of developmental information**. Elsevier, 2013.

REECE, W.; ROWE, E. **Functional anatomy and physiology of domestic animals**. 5 ed. John Wiley & Sons, 2017.

RIMON-DAHARI, N. et al. Ovarian Folliculogenesis. In: **Molecular Mechanisms of Cell Differentiation in Gonad Development**. Springer International Publishing, 2016. v. 58p. 167–190.

RODRIGUES, A. P. R. et al. Criopreservação do tecido ovariano visando restaurar a fertilidade humana. p. 188–193, 2016.

RYAN, A. E. et al. Chondrogenic Differentiation Increases Antidonor Immune Response to Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Transplantation. **Molecular Therapy**, v. 22, n. 3, p. 655–667, 2014.

SARAIVA, M. V. A. et al. Dynamic Medium Produces Caprine Embryo From Preantral Follicles Grown In Vitro. **Reproductive Sciences**, v. 17, n. 12, p. 1135–1143, 2010.

SCHMALTZ-PANNEAU, B. et al. Early bovine embryos regulate oviduct epithelial cell gene expression during in vitro co-culture. **Animal Reproduction Science**, v. 149, n. 3–4, p. 103–116, 2014.

SERAFIM, M. K. B. et al. Impact of growth hormone (GH) and follicle stimulating hormone (FSH) on in vitro canine preantral follicle development and estradiol production. **Growth Hormone and IGF Research**, v. 25, n. 2, p. 85–89, 2015.

SHAW, J. et al. Evaluation of the long-term function of cryopreserved ovarian grafts in the mouse, implications for human applications. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 161, n. 1, p. 103–110, 2000.

SILVA-SANTOS, K. C. et al. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. **Theriogenology**, v. 76, n. 6, p. 1051–1057, 2011.

SILVA, G. M. et al. In vitro growth and maturation of isolated caprine preantral follicles: Influence of insulin and FSH concentration, culture dish, coculture, and oocyte size on meiotic resumption. **Theriogenology**, v. 90, p. 32–41, 2017.

SILVA FILHO, O.; ARGOLO-NETO, N. Isolation and characterization of mesenchymal progenitors derived from the bone marrow of goats native from northeastern Brazil. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 29, n. 8, p. 478-484, 2014.

SOWIŃSKA, N.; FILIPCZYK, K. F. A.; NALIK, A. A. K. The effect of cumulus cells on domestic cat (*Felis catus*) oocytes during in vitro maturation and fertilization. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n. S2, p. 108-113, 2017.

STENDERUP, K. et al. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. **Bone**, v. 33, n. 6, p. 919–926, 2003.

STZEPOURGINSKI, I. et al. CD34 + mesenchymal cells are a major component of the intestinal stem cells niche at homeostasis and after injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 4, p. E506–E513, 2017.

TELFER, E. E. et al. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. **Human Reproduction**, v. 23, n. 5, p. 1151–1158, 2008.

TRIPATHI, A.; CHAUBE, S. K. Roscovitine inhibits extrusion of second polar body and induces apoptosis in rat eggs cultured in vitro. **Pharmacological Reports**, v. 67, n. 5, p. 866–874, 2015.

URIBE-VELÁSQUEZ, LUIS FERNANDO; LENZ SOUZA, MARIA INÊS; NARVÁEZ-SOLARTE, W. Follicular development in Alpine goats during the mating season. **Ces Medicina Veterinaria y Zootecnia**, v. 10, n. 1, p. 38–44, 2015.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1717–1751, 2005.

VEGA, A. et al. Treatment of Knee Osteoarthritis With Allogeneic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. **Transplantation**, v. 99, n. 8, p. 1681–1690, 2015.

WALLACE, W. H. B.; KELSEY, T. W. Human Ovarian Reserve from Conception to the Menopause. **PLoS ONE**, v. 5, n. 1, p. e8772, 2010.

WANG, D. et al. Allogeneic mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus: 4 years of experience. **Cell Transplantation**, v. 22, n. 12, p. 2267–2277, 2013.

WANG, D. C. et al. Sonic Hedgehog promotes in vitro oocyte maturation and term development of embryos in Taiwan native goats. **Theriogenology**, v. 103, p. 52–58, 2017.

- WANG, X. et al. Successful in vitro culture of pre-antral follicles derived from vitrified murine ovarian tissue: Oocyte maturation, fertilization, and live births. **Reproduction**, v. 141, n. 2, p. 183–191, 2011.
- WANG, Y. et al. Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. **Nature Immunology**, v. 15, n. 11, p. 1009–1016, 2014.
- WU, J.; EMERY, B. R.; CARRELL, D. T. In vitro growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. **Biology of reproduction**, v. 64, n. 1, p. 375–81, 2001.
- WU, Y. et al. BIM EL-mediated apoptosis in cumulus cells contributes to degenerative changes in aged porcine oocytes via a paracrine action. **Theriogenology**, v. 76, n. 8, p. 1487–1495, 2011.
- XIA, X. et al. Mesenchymal Stem Cells Facilitate In Vitro Development of Human Preantral Follicle. **Reproductive Sciences**, v. 22, n. 11, p. 1367–1376, 2015.
- XU, J. et al. Secondary follicle growth and oocyte maturation during encapsulated three-dimensional culture in rhesus monkeys: Effects of gonadotrophins, oxygen and fetuin. **Human Reproduction**, v. 26, n. 5, p. 1061–1072, 2011.
- YOON, J. D. et al. Effects of coculture with cumulus-derived somatic cells on invitro maturation of porcine oocytes. **Theriogenology**, v. 83, n. 2, p. 294–305, 15 jan. 2015.