



REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

SISTEMA DE CO-CULTIVO DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIS
CAPRINOS COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS

RENATA PATRÍCIA SOUSA

TERESINA-PI

2019

RENATA PATRÍCIA SOUSA

**SISTEMA DE CO-CULTIVO DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIS
CAPRINOS COM CÉLULAS- TRONCO MESENQUIMAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - RENORBIO como requisito para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia

Área de concentração: Biotecnologia em Agropecuária

Orientadora: Profa. Dra. Maria Acelina Martins de Carvalho

Coorientador: Prof. Dr. Cleidson Manoel Gomes da Silva

TERESINA-PI

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade Federal do Piauí

Biblioteca Comunitária Jornalista Carlos Castello Branco

Serviço de Processamento Técnico

S725s Sousa, Renata Patrícia.
 Sistema de co-cultivo de folículos ovarianos pré-antrais
 caprinos com células- tronco mesenquimais / Renata Patrícia
 Sousa. – 2019.
 93 f.

 Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Rede Nordeste de
 Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2019.
 “Orientadora: Profa. Dra. Maria Acelina Martins de
 Carvalho”.
 “Coorientador: Prof. Dr. Cleidson Manoel Gomes da Silva”.

 1. Cabra. 2. Complexos cumulus-oócito. 3. Cultivo in vitro.
 4. Foliculogênese. 5. Geleia de Wharton. I. Título.

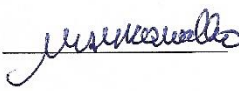


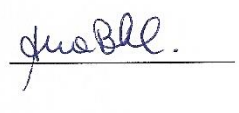

CDD 636.39

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNA: Renata Patrícia Sousa

TÍTULO DO PROJETO: “SISTEMA DE CO-CULTIVO DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS COM CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS.”

PROFESSORA ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria Acelina Martins de Carvalho

BANCA EXAMINADORA:	CONCEITO	ASSINATURA
Profa. Dra. Maria Acelina Martins de Carvalho - UFPI (Presidente)	<u>Satisfatório</u>	
Prof. Dr. Napoleão Martins Argolo Neto - UFPI (Examinador)	<u>SATISFATORIO</u>	
Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa - UFPI (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	
Profa. Dra. Ana Beatriz Graça Duarte – UFC (Examinadora)	<u>Satisfatório</u>	
Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo - UECE (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	

DATA DA AVALIAÇÃO: 04 de setembro de 2019.

HORÁRIO: 08h30

LOCAL: Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisas com Células-tronco -
NUPCelt/UFPI

Dedico,

*Aos meus pais **Irenilde e Francisco**, meus maiores exemplos de integridade, amor, honestidade. Obrigada pelos ensinamentos, por valorizarem a educação, incentivarem os meus estudos e apoiarem as minhas escolhas.*

*Às minhas irmãs **Fernanda e Juliana** pelo apoio e incentivo.*

*À minha sobrinha **Clarisse**, por me transmitir, com toda a sua pureza, o amor, carinho, alegria e por me fazer querer ser cada dia melhor para lhe dar bom exemplo.*

*À minha avó **Alzira**, por me ensinar, com atitudes, lições valiosas da vida como: agir com honestidade e amor ao próximo.*

Mensagem

Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana seja apenas outra alma humana.

(Carl G. Jung)

Agradecimentos

*Acima de tudo, agradeço a **Deus**, por guiar a minha vida e por todos os desafios que me ajudou a enfrentar e as bênçãos recebidas ao longo dessa jornada.*

*À **Universidade Federal do Piauí**, instituição onde obtive formação acadêmica, pela oportunidade de qualificação e por propiciar a estrutura fundamental para o desenvolvimento científico.*

*Ao **Programa de Pós Graduação em Biotecnologia**, pela oportunidade de realizar este curso de pós-graduação.*

*Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq**, pelo auxílio financeiro para a realização deste trabalho.*

*À profa **Dr^a. Maria Acelina Martins de Carvalho**, pela seriedade com que conduz os seus trabalhos, por sua dedicação à pesquisa e à formação de pesquisadores comprometidos com a vida acadêmica e o avanço da ciência. Obrigada por ter me aceitado desde o mestrado, me fornecendo direcionamento para a realização do doutorado. Por me estimular a querer ser cada dia melhor como profissional e como pessoa me dando a oportunidade de crescer na pesquisa científica junto a todos que fazem o **Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisas com Células-Tronco (NUPCelt)**.*

*Ao Prof. **Dr. José Ricardo Figueiredo** o qual tenho imenso carinho, admiração e respeito pela sua ética profissional, por formar além de grandes pesquisadores, profissionais cidadãos cientes do seu papel social. Sou muito grata por ter me recebido da melhor forma possível, pelo apoio acadêmico e incentivo profissional. Por suas valiosas contribuições durante a realização desta pesquisa agindo sempre com serenidade, otimismo, competência e dedicação. Muito obrigada!*

*Ao professor **Dr. Cleidson Manoel** pelas orientações e disponibilidade para ajudar sempre que foi solicitado.*

*Aos amigos, pós-graduandos do grupo de pesquisa **NUPCelt**: Elis Rosélia, Yago, Lorena, Huanna, Ronielli, Constantino pelo excelente convívio profissional e pessoal. Em especial, à **Camila Ernanda** pela disponibilidade de tempo, preocupação, atenção, motivação e amizade e ao **Gustavo Cardoso** pela fundamental colaboração para a realização desta pesquisa, pelos ensinamentos e amizade. E aos queridos alunos de Iniciação científica Larissa, Letycia, Marina e Wanderson. Muito obrigada!*

Ao **Prof. Dr. Napoleão Martins Argôlo Neto**, pela atenção, as valiosas contribuições, sabedoria compartilhada e suporte constante.

A **Dra. Lucilene dos Santos Silva**, pela gentileza, disponibilidade e atenção dispensadas durante esse processo.

Aos integrantes do Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-antrais LAMOFOPA da UECE, em particular, aos membros da minha equipe: **Ana Normélia e Ana Flávia**, que deram o seu melhor na realização da segunda etapa, sempre preocupadas e solidárias para que tudo desse certo, obrigada pelo suporte e amizade. **Yago Pinto** que foi fundamental em importantes etapas desta pesquisa, obrigada pela colaboração e pelos ensinamentos; **Renato Felix**, sempre disponível para ajudar no que fosse preciso, fornecendo além de suporte científico, incentivo e amizade; **Naíza Sá** com quem tive muitos momentos de aprendizado, obrigada pelo apoio e disponibilidade; **Francisca Geovânia** pelo carinho, preocupação e cuidado, por me transmitir segurança e tranquilidade e **Anna Clara** pela colaboração e ensinamento.

À **Dra Ana Beatriz Graça Duarte**, por ter aceitado enfrentar o desafio desta pesquisa, pelas suas valiosas contribuições, pelos ensinamentos, a paciência, o incentivo e principalmente pela amizade. Meus sinceros agradecimentos, admiração e respeito.

Aos demais colaboradores desta pesquisa **Prof^ª Dra Francielli Cibin**, **Prof Dr. Benner Alves** e a **Prof^ª Dra. Ana Paula Rodrigues** pela grande ajuda em etapas importantes durante a realização desta pesquisa. Muito obrigada!

Ao **Prof Isaac Neto Goes** e ao residente **Wesley** do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da UECE, pela disponibilidade, atenção, paciência e gentileza com que me trataram durante as análises de dosagem hormonal. Quem eu vou guardar da memória sempre com muito carinho e gratidão!

À **Dra Josyane Cristophe e Me. Lucianny Lima** do NEMPI (Núcleo de Ensino e Pesquisa em Microscopia e Processamento de Imagens) da UFC pelas orientações e pela disponibilidade em contribuir com a realização das análises de GSH.

À **Dra Valdevâne Rocha** pela gentileza e atenção sempre que precisei tirar dúvidas ou alguma orientação.

Ao **Sr João**, querido funcionário do LAMOFOPA, quem cuidava de mim como um pai, sempre preocupado com o meu bem estar. Seus gestos atenciosos e carinhosos tornavam os meus dias melhores durante a realização desta pesquisa.

À **Me Samara Silva Sousa** pela disponibilidade, preocupação e atenção dadas especialmente durante a fase final desta pesquisa.

*Aos funcionários do NUPCelt: Hermínio José (Médico Veterinário), Leiliane, Maria do Carmo e Flávia Gomes pela cooperação e disponibilidade. Especialmente à **Janete Martins**, exemplo de dedicação, sinceridade e honestidade. Obrigada por ter me oferecido além do suporte técnico, pela atenção e carinho, por sempre me incentivar da maneira mais singela e amorosa. E à **Fabiana Sampaio**, por fazer de tudo que estava ao seu alcance para me ajudar, pela preocupação, incentivo, sabedoria para resolver situações, paciência e principalmente pela amizade e carinho.*

*A todos que fazem o Educandário Santa Maria Goretti, especialmente à **D. Tércia Leal** (Diretora Geral), por todo apoio e incentivo, permitindo a liberação das minhas atividades para realização dos experimentos, por acreditar no meu trabalho e pela oportunidade de crescimento profissional e pessoal.*

*Aos meus amigos **Késsia Almeida, Juelina Oliveira, Ana Rayonnara, Juliana Alves, Lyndon Johnson, Silvana Aragão, Marlúcia, Tia Fátima, Claucenira, Lucinha e Jéssica** aos quais não tenho palavras para agradecer pela motivação, incentivo, confiança e pela amizade sincera. Em especial à minha querida **Prof^a Teresa Lapa**, por todos os gestos de carinho e amizade, por me transmitir paz nos momentos de ansiedade, pelo incentivo, as orações, os conselhos... A sua positividade, carisma e principalmente a sua fé são únicos e contagiantes. Por mais que a palavra obrigada signifique tanto, não é suficiente mais expressar o quanto seus gestos atenciosos e gentis representam.*

Aos demais amigos e familiares que foram testemunhas de todo o meu processo de formação e torceram pelo meu sucesso, os meus mais sinceros agradecimentos pelo apoio incondicional, pela força e pelo amor.

Muito obrigada!

SOUSA, Renata Patrícia. **Sistema de co-cultivo de folículos ovarianos pré-antrais caprinos com células-tronco mesenquimais**. 2019. 93p. Tese (Pós-graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO), Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina.

RESUMO

O aprimoramento de sistemas de cultivo de folículos ovarianos pré-antrais tem sido objeto de investigação em diferentes espécies. As células-tronco mesenquimais (CTM) surgem como uma importante ferramenta para a realização de técnicas de cultivo associadas aos folículos ovarianos pré-antrais, devido ao seu potencial de induzir a proliferação e a sobrevivência de vários tipos de células bem como a facilidade de obtenção e sua expansibilidade *in vitro*. Esta pesquisa tem por objetivo avaliar o uso de células-tronco mesenquimais da Geleia de Wharton (CTM-GW) no desenvolvimento de folículos ovarianos pré-antrais caprinos, por meio de dois sistemas de cultivo, com folículos inclusos no córtex ovariano ou isolados deste. Na primeira etapa, os fragmentos foram fixados imediatamente, (controle não-cultivado) ou distribuídos em quatro tratamentos: tecido ovariano cultivado em meio essencial mínimo (α -MEM⁺) para o controle; tecido ovariano cultivado em α -MEM⁺ suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) (α -MEM⁺ + SFB); tecido ovariano co-cultivado com células-tronco (CT) em α -MEM⁺ (α -MEM⁺ + CT); e finalmente tecido ovariano co-cultivado com célula-tronco em α -MEM⁺ e SFB (α -MEM⁺ + CT + SFB). Após o cultivo, foram analisadas as taxas de sobrevivência, a ativação e o diâmetro folicular e a taxa de proliferação celular. Já, na segunda etapa, os folículos secundários foram isolados e distribuídos em dois tratamentos: folículos ovarianos cultivados em meio essencial mínimo (α -MEM⁺), na ausência (controle) ou presença de células-tronco. Os folículos foram cultivados em placas de 24 poços durante 18 dias, sendo 2 folículos por poço, com troca parcial do meio a cada dois dias e nos dias 6 e 18, coletados para dosagem hormonal. Após cultivo, foram avaliadas a morfologia e taxas de crescimento folicular, formação de antro, produção de estradiol (E2), progesterona (P4) e Glutathiona reduzida (GSH) no meio proveniente das trocas, bem como as taxas de viabilidade e de maturação oocitária. Foi observado, na primeira etapa, que após 7 dias, o tratamento co-cultivo com células-tronco apresentou um percentual de folículos pré-antrais morfologicamente normais superior ($P < 0,05$) quando comparado aos demais tratamentos bem como uma maior ($P < 0,05$) taxa de ativação em relação ao controle cultivado. Ademais, o diâmetro folicular foi maior no tratamento co-cultivo com células-tronco em relação ao co-cultivo com células-tronco acrescido de SFB. Na segunda etapa, o tratamento com células-tronco foi o único que apresentou um aumento significativo e progressivo no diâmetro folicular ao longo do cultivo bem como mostrou maior ($P < 0,05$) taxa de crescimento folicular diário. As taxas de retomada da meiose e maturação oocitária foram semelhantes entre os tratamentos. Neste estudo, observou-se pela primeira vez que as CTM-GW têm potencial de utilização como suporte para o crescimento dos folículos pré-antrais. O sistema de co-cultivo de folículos inclusos no córtex ovariano com CTM contribuiu para melhorar a taxa de ativação, manteve a sobrevivência folicular e desenvolvimento folicular *in vitro* e na forma isolada influenciou no crescimento folicular.

Palavras-Chaves: Cultivo *in vitro*. Geleia de Wharton. Foliculogênese. Complexos cumulus-oócito. Cabra.

SOUSA, Renata Patrícia. **Co-cultivation system of goat preantral ovarian follicles with mesenchymal stem cells**. 2019. 93p. Thesis (Pós-graduate in Biotechnology, Northeast Biotechnology Network - RENORBIO), Federal University of Piauí (UFPI), Teresina.

ABSTRACT

Improvement of pre-antral ovarian follicle cultivation systems has been investigated in different species. Mesenchymal stem cells (MSC) have emerged as an important tool for performing pre-antral ovarian follicle associated cultivation techniques because of their potential to induce proliferation and survival of various cell types, as well as their ease of obtaining and their expandability *in vitro*. The objective of this research is to evaluate the use of Wharton jelly mesenchymal stem cells (WJ-MSC) in the development of goat pre-antral ovarian follicles, by means of two culture systems, with follicles included in or isolated from the ovarian cortex. In the first stage, the fragments were either fixed immediately (uncultivated control) or distributed into four treatments: ovarian tissue cultivated in minimal essential medium (α -MEM⁺) for control; ovarian tissue cultured in α -MEM⁺ supplemented with Fetal Bovine Serum (FBS) (α -MEM⁺ + FBS); stem cell (SC) co-cultured ovarian tissue in α -MEM⁺ (α -MEM⁺ + SC); and finally stem cell co-cultured ovarian tissue in α -MEM⁺ and FBS (α -MEM⁺ + SC + FBS). After cultivation, survival rates, activation and follicular diameter and cell proliferation rate were analyzed. In the second stage, secondary follicles were isolated and distributed in two treatments: ovarian follicles cultivated in minimal essential medium (α -MEM⁺), in the absence (control) or presence of stem cells. The follicles were cultured in 24-well plates for 18 days, with 2 follicles per well, with partial medium change every two days and on days 6 and 18, collected for hormonal dosing. After cultivation, the morphology and rates of follicular growth, antrum formation, estradiol production (E2), progesterone (P4) and reduced glutathione (GSH) in the medium were evaluated, as well as viability and oocyte maturation rates. In the first stage, it was observed that after 7 days, the co-cultivation treatment with stem cells presented a higher percentage of morphologically normal preantral follicles ($P < 0.05$) when compared to the other treatments as well as a larger one ($P < 0.05$) activation rate in relation to the cultivated control. In addition, follicular diameter was higher in co-cultivation with stem cells compared to co-cultivation with FBS. In the second stage, the treatment with stem cells was the only one that showed a significant and progressive increase in follicular diameter throughout the culture and showed a higher ($P < 0.05$) daily follicular growth rate. The rates of meiosis resumption and oocyte maturation were similar between treatments. In this study, it was observed for the first time that WJ-MSC have potential use as support for the growth of preantral follicles. The co-cultivation system of follicles included in the ovarian cortex with MSC contributed to improve the activation rate, maintained follicular survival and follicular development *in vitro* and in isolated form influenced follicular growth.

Keywords: *In vitro* culture. Wharton Jelly. Folliculogenesis. Cumulus-oocyte complexes. Goat.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Imagem ilustrativa da organização do ovário, mostrando suas principais estruturas.

Fonte: Carlson, 2014.....25

Figura 2. Representação esquemática das fases da foliculogênese dos mamíferos, tipos de folículos e destacando atresia e gonadotrofina dependência. Fonte: Adaptado de Findlay et al., 2019.....27

CAPÍTULO I

Figura 1. Fotomicrografias de folículos pré-antrais caprinos analisados por microscopia óptica. No dia 0 (controle não cultivado), A) e após co-cultivo *in vitro* por 1 ou 7 dias nos tratamentos α -MEM⁺ (B), α -MEM⁺ + CT (C e D), α -MEM⁺ + SFB (E, F e G) e α -MEM⁺ + CT + SFB (H e I). Folículos pré-antrais degenerados com núcleos picnóticos (G e I, seta). Barras de escala de 25 μ m. O: oócito, Nu: núcleo de oócito, GC, células da granulosa, *células da granulosa pavimentosas, R: retração do citoplasma. Ampliação 400x. Coloração com ácido periódico de Schiff-hematoxilina.....45

Figura 2. Percentual (média \pm DP) de folículos (A) primordiais e em (B) desenvolvimento (intermediário, primário e secundário) no controle não cultivado (tecido não cultivado) e após 1 ou 7 dias nos tratamentos: tecido ovariano cultivado em α -MEM⁺ suplementado com SFB (α -MEM⁺ + SFB); tecido ovariano co-cultivado com células-tronco em α -MEM⁺ (α -MEM⁺ + CT); e tecido ovariano co-cultivado com célula-tronco em α -MEM⁺ + SFB (α -MEM⁺ + CT + SFB). *Os valores diferem significativamente dos controles não cultivados (P < 0,05). ^{a, b} Diferem entre dias de cultivo dentro do mesmo tratamento (P < 0,05). ^{A, B, C} Diferem entre os tratamentos dentro do mesmo dia (P < 0,05)48

Figura 3. Imunomarcção para PCNA no tecido ovariano. Secções transversais representativas do controle não cultivado (tecido não-cultivado) (A) e tecido cultivado por 7 dias nos tratamentos: tecido ovariano cultivado em meio controle (α -MEM⁺) (B); tecido ovariano co-cultivado com células-tronco em α -MEM⁺ (α -MEM⁺ + CT) (C); tecido ovariano cultivado em α -MEM⁺ suplementado com SFB (α -MEM⁺ + SFB) (D); tecido ovariano co-cultivado com

célula-tronco em α -MEM⁺ + SFB (α -MEM⁺ + CT + SFB) (E) e controle negativo (F). Células da granulosa marcadas em marrom representam marcação positiva para PCNA. Barras de 50 μ m.....50

CAPÍTULO II

Figura 1. Morfologia de folículos ovarianos após 18 dias de cultivo *in vitro* (A) Folículo antral normal e (B) Folículo antral extruso cultivados na presença de células-tronco (CT); (C) Folículo degenerado cultivado na ausência de células-tronco (controle)68

Figura 2. Percentagem de folículos pré-antrais morfologicamente intactos, degenerados e extrusos cultivados na ausência (controle) ou na presença de células-tronco por 18 dias. Barra 50 μ m.....68

Figura 3. Produção média (\pm SEM) de E2 (pg / mL) e P4 (ng / mL) no meio de cultivo de folículos pré-antrais cultivados com e sem células-tronco. (A) ^{a, b}Diferem entre os tratamentos dentro do mesmo período de cultivo (P < 0,05). ^ANão difere entre os tratamentos dentro no mesmo períodos de cultivo (P > 0,05). (B) ^{a, b}Diferem entre os tratamentos dentro do mesmo período de cultivo (P < 0,05). ^{A, B}Diferem entre os períodos de cultivo dentro do mesmo tratamento (P < 0,05)71

Figura 4. Concentração de Glutathiona Reduzida no meio de cultivo após cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais de caprinos associados ou não com CTM-GW. Não difere entre os tratamentos entre os períodos de cultivo (P > 0,05)72

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Porcentagem de folículos pré-antrais morfológicamente normais de caprinos. Dados do controle (não cultivado) e após cultivo *in vitro* por 1 ou 7 dias nos tratamentos: tecido ovariano cultivado em meio controle (α -MEM⁺); tecido ovariano cultivado em α -MEM⁺ suplementado com SFB (α -MEM⁺ + SFB); tecido ovariano co-cultivado com células-tronco em α -MEM⁺ (α -MEM⁺ + CT); e tecido ovariano co-cultivado com célula-tronco em α -MEM⁺ + SFB (α -MEM⁺ + CT + SFB). *Diferem significativamente do controle não cultivado (P < 0,05). ^{AB}Diferem significativamente entre os tratamentos dentro do mesmo período de cultivo (P < 0,05). ^{ab}Diferem significativamente entre os períodos de cultivo dentro do mesmo tratamento (P < 0,05).....46

Tabela 2. Estimativa de folículos pré-antrais normais após 7 dias de cultivo no tratamento tecido ovariano co-cultivado com células-tronco em α -MEM⁺ (α -MEM⁺ + CT) em relação aos demais tratamentos: tecido ovariano cultivado em meio controle (α -MEM⁺); tecido ovariano cultivado em α -MEM⁺ suplementado com SFB (α -MEM⁺ + SFB); e tecido ovariano co-cultivado com célula-tronco em α -MEM⁺ + SFB (α -MEM⁺ + CT + SFB). IC (95%)= Intervalo de Confiança 95%.....46

Tabela 3. Estimativa de folículos pré-antrais normais após 7 dias de cultivo no tratamento tecido ovariano co-cultivado com células-tronco em α -MEM⁺ (α -MEM⁺ + CT) em relação aos demais tratamentos: tecido ovariano cultivado em meio controle (α -MEM⁺); tecido ovariano cultivado em α -MEM⁺ suplementado com SFB (α -MEM⁺ + SFB); e tecido ovariano co-cultivado com célula-tronco em α -MEM⁺ + SFB (α -MEM⁺ + CT + SFB). IC (95%)= Intervalo de Confiança 95%.....49

Tabela 4. Diâmetro folicular e oocitário de cabras (média±DP) no controle não cultivado (tecido não-cultivado) e após 1 ou 7 dias de cultivo nos tratamentos: tecido ovariano cultivado em meio controle (α -MEM⁺); tecido ovariano cultivado em α -MEM⁺ suplementado com SFB (α -MEM⁺ + SFB); tecido ovariano co-cultivado com células-tronco em α -MEM⁺ (α -MEM⁺ + CT); e tecido ovariano co-cultivado com célula-tronco em α -MEM⁺ + SFB (α -MEM⁺ + CT + SFB). Diâmetro folicular: A,B diferem entre os tratamentos dentro do mesmo dia de cultivo (P < 0,05) a,b diferem entre os dias de cultivo dentro do mesmo tratamento (P > 0,05); Diâmetro

do oócito: A,B diferem entre os tratamentos dentro do mesmo dia de cultivo ($P < 0,05$); a,b diferem entre os dias dentro do mesmo tratamento ($P < 0,05$) * Difere do controle não cultivado ($P < 0,05$).....49

Tabela 5. Percentual de marcação para PCNA em folículos pré-antrais no tecido ovariano não cultivado (tecido não-cultivado) e tecido cultivado por 7 dias nos tratamentos: tecido ovariano cultivado em meio controle (α -MEM⁺), tecido ovariano co-cultivado com células-tronco em α -MEM⁺ (α -MEM⁺ + CT), tecido ovariano cultivado em α -MEM⁺ suplementado com SFB (α -MEM⁺ + SFB); e tecido ovariano co-cultivado com célula-tronco em α -MEM⁺ + SFB (α -MEM⁺ + CT + SFB). ^{ABCD} na coluna ($P < 0,05$)51

CAPÍTULO II

Tabela 1. Diâmetro (\pm SEM) médio (μ m) e taxa de crescimento folicular (dia) de folículos pré-antrais caprinos cultivados na ausência ou presença de CTM-GW por 18 dias. * ^{a,b,c,d} Diferem entre os dias ($P < 0,05$); ^{AB}Diferem entre os tratamentos ($P < 0,05$). Um total de 113 folículos secundários foram distribuídos nos diferentes tratamentos (n=3 repetições)69

Tabela 2. Média (\pm SEM) da taxa de crescimento (μ m) de folículos pré-antrais de cabras cultivadas na ausência (controle) ou presença de CTM-GW em diferentes intervalos de cultivo folicular *in vitro*. * ^{a,b} Diferem entre os dias ($P < 0,05$); ^{AB}Diferem entre os tratamento ($P < 0,05$). Um total de 113 folículos secundários foram distribuídos nos diferentes tratamentos (n = 3 repetições)69

Tabela 3. Percentual de formação de antro de folículos pré-antrais cultivados na ausência (controle) ou presença de CMTGW por 18 dias. ^{a,b} Diferem entre os dias ($P < 0,05$); ^ANão difere entre os tratamentos ($P > 0,05$). Um total de 113 folículos secundários foram distribuídos nos diferentes tratamentos (n = 3 repetições)69

Tabela 4. Diâmetro médio (\pm SEM) (μ m) de oócitos maturados *in vitro* e taxa de recuperação de oócitos, e estágios meióticos de oócitos de folículos pré-antrais caprinos cultivados com e sem CTM durante 18 dias. ^{AB}Diferem entre colunas ($P < 0,05$)70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BMPs	Proteínas Morfogenéticas Ósseas
BSA	Albumina sérica bovina
CTM-GW	Células-tronco mesenquimais da Geleia de Wharton
CTM	Células-tronco mesenquimais
α -MEM	Meio de cultivo - Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modification
iPSCs	Células-tronco pluripotentes induzidas
MO	Medula óssea
MCI	Massa celular interna
PBS	Solução tampão fosfato salina
SFB	Soro fetal bovino
SCF	Fator de células-tronco
c-kit	Receptor tyrosine kinase (Receptor de tirosina quinase)
FOPA	Folículo ovariano pré-antral
α -MEM ⁺	Meio de cultivo - Essential Medium Eagle Alpha Modification (suplementado)
CCOs	Complexos cumulus-oócitos
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
E2	Estradiol
P4	Progesterona
GSH	Glutationa reduzida

IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
GDF-9	Growth Differentiation Factor-9 (Fator de Crescimento e Diferenciação-9)
VG	Vesícula germinativa
QVG	Quebra da vesícula germinativa
IA	Inseminação artificial
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
CTE	Células-tronco embrionárias
CTA	Células-tronco adultas
SFB	Soro Fetal Bovino
FSH	Follicle Stimulating Hormone (Hormônio Folículo Estimulante)
DCHF-DA	2 '7'- dihidrodiclorofluoresceína diacetato
MOIFOPA	Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais
MI	Metáfase I
MII	Metáfase II
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
SITC	Sociedade Internacional de Terapia Celular
TCA	Ácido tricloroacético

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 O ovário dos mamíferos	24
2.2 Foliculogênese	25
2.3. Caracterização da população folicular e atresia.....	27
2.4 Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais (MOIFOPA).....	28
2.5 Cultivo <i>in vitro</i> de folículos ovarianos pré-antrais	29
2.6 Sistemas de co-cultivo <i>in vitro</i> utilizando células-tronco mesenquimais	30
2.7 Células-tronco.....	31
2.8 O cordão umbilical como fonte de células-tronco mesenquimais.....	33
2.9 Uso da espécie caprina como modelo experimental	33
3 CAPÍTULO I	35
Co-cultivo com células-tronco mesenquimais melhora a sobrevivência e o desenvolvimento <i>in vitro</i> de folículos pré-antrais caprinos inclusos em tecido ovariano	36
4 CAPÍTULO II	58
Crescimento de folículos pré-antrais isolados de ovários caprinos em sistema de co-cultivo <i>in vitro</i> com células-tronco mesenquimais.	59
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
REFERÊNCIAS	81
ANEXOS	90
Anexo I: Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal.....	91
Anexo II: Submissão dos artigos.....	92

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A otimização do potencial reprodutivo de rebanhos depende do emprego de biotécnicas da reprodução que visem o incremento da sua produtividade e rentabilidade. Diversas tecnologias reprodutivas, incluindo a criopreservação de gametas, inseminação artificial (IA), transferência de embriões, fertilização *in vitro* (FIV) e clonagem tem sido realizadas com sucesso em várias espécies (BERTOLINI; BERTOLINI, 2009; PARAMIO, 2010; HEIDARI, 2011; MANDAWALA et al., 2016; THOMAS et al., 2017). No entanto, para a sua execução é necessária uma grande quantidade de complexos cumulus-oócito (CCOs) competentes, capazes de suportar a maturação dos oócitos e permitir que eles sejam fertilizados e se tornem embriões viáveis e, conseqüentemente, maximizar a produção dos rebanhos (FIGUEIREDO et al., 2007; UHDE et al., 2018).

A maior parte dos oócitos presentes nos ovários dos mamíferos é armazenada em folículos pré-antrais (FOPA). Entretanto, muitos desses folículos se tornam atrésicos durante a fase de crescimento e desenvolvimento (FIGUEIREDO et al., 2007; ARAÚJO, et al., 2014). Desse modo, é altamente desejado um sistema de cultivo *in vitro* de FOPA que mantenha a viabilidade e amplie a taxa de crescimento e a competência de maturação, aumentando a eficiência de produção de gametas femininos (SILVA et al., 2018).

Sistemas de cultivo *in vitro* de folículos em estágios iniciais são importantes para estudar o desenvolvimento dos oócitos, especialmente porque estes folículos são uma fonte potencial de oócitos que poderiam ser utilizados *in vitro* para produção de embriões. Contudo, os fatores que controlam o desenvolvimento de folículos primordiais, sua ativação e posterior crescimento a folículos primários, não são bem compreendidos. A região cortical do ovário em que folículos primordiais estão localizados é pouco vascularizada e o desenvolvimento destes folículos provavelmente é regulada por fatores de crescimento produzidos localmente (ARAÚJO et al., 2010; MATOS et al., 2007; HSUEH et al., 2015).

O sucesso do cultivo *in vitro* de FOPA depende do emprego de métodos eficazes que mantenham a integridade estrutural folicular garantindo a sua sobrevivência. Entretanto, para que estes folículos se desenvolvam *in vitro* é de extrema importância a utilização de sistemas de cultivo capazes de manter a sobrevivência e suportar o crescimento dos oócitos inclusos nos folículos pré-antrais até sua completa maturação (RAMESH et al., 2010, ARAÚJO et al., 2014). Assim, torna-se possível potencializar a reprodução assistida de animais geneticamente superiores através do fornecimento de milhares de oócitos para a produção *in vitro* de embriões, bem como para as demais biotécnicas reprodutivas (ROSSETTO et al., 2011).

Dessa forma, a necessidade de aproveitamento dos oócitos de ovários que seriam condenados ao descarte, pela sua retirada ou por morte da doadora, estimula o desenvolvimento de diferentes técnicas para minimizar a perda de folículos ovarianos existentes. Dentre estas, destaca-se a Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais (MOIFOPA), que consiste na recuperação de grande número de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais, a fim de promover o crescimento, maturação e fecundação por meio de sistemas de cultivo *in vitro* (BEZERRA et al., 2011; FIGUEIREDO; RODRIGUES; SANTOS, 2013). A MOIFOPA vem ganhando cada vez mais espaço na pesquisa apresentando resultados promissores que dão suporte, para melhorar a eficiência reprodutiva em várias espécies (AGUIAR et al., 2017; DIPAZ-BERROCAL et al., 2017; SILVA, 2017).

As células-tronco mesenquimais são células somáticas multipotentes que favorecem a reparação de tecidos (ROHBAN; PIEBER, 2017). Estudos relatam a existência de uma população de células-tronco mesenquimais na medula óssea (SILVA FILHO et al., 2014; ARGÔLO NETO et al., 2016; SANTOS, 2017), no cordão umbilical (SILVA, 2016; MARTINS et al., 2017) e no tecido adiposo (COSTA et al., 2017) de caprinos, que podem ser potencialmente exploradas em estudos pré-clínicos. Experimento utilizando CTM derivadas de tecido adiposo de rato demonstrou que essas células podem melhorar a função ovariana e a taxa de sucesso da fertilização *in vitro*, apresentando-se mais eficientes do que as células-tronco embrionárias (CTE) ou células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC) no campo da medicina regenerativa (TAKEHARA et al., 2013).

Avanços no campo da biologia de células-tronco tem mostrado que estas células interagem com as células residentes formando nichos, podendo apoiar a sobrevivência e proliferação de vários tipos de células, por mecanismo parácrino (ZHANG et al., 2017). Essa interação célula-célula pode ser aproveitada para fins terapêuticos, combinando diferentes tipos de células (XIA et al., 2015). Estudos realizados por Albrecht et al. (2006) constataram que um alto grau de interações entre células é crucial para aumentar a proliferação e diferenciação de células-tronco embrionárias durante os eventos morfológicos que acompanham a embriogênese *in vivo*, bem como durante o cultivo *in vitro*. Além de contribuir para a proliferação celular, Zhang et al. (2017) demonstraram a expressão de marcadores angiogênicos em um sistema de cocultivo tridimensional (3D) constituído por células-tronco mesenquimais do cordão umbilical humano e células endoteliais da veia umbilical. Essa interação entre células, também foi estudada por Heidari (2011), utilizando co-cultivo de FOPA de rato em fibroblastos embrionários, resultando no aumento da taxa crescimento dos folículos e a sua sobrevivência de forma significativa pelo aumento de proliferação de células da granulosa. Ademais, Itoh e

Hoshi (2000), co-cultivaram FOPA com células mesenquimais de ovário de bovinos, fibroblastos fetais da pele e células granulosa bovina o que resultou em 50,7%, 46,6% e 21,4% folículos morfológicamente viáveis, evidenciando o grande potencial das células-tronco mesenquimais no co-cultivo de FOPA.

Assim, essa pesquisa tem como objetivo investigar a utilização de CTM no desenvolvimento de folículos pré-antrais de caprinos, por meio de dois sistemas de cultivo, *in situ*, folículos inclusos em fragmentos de ovário, e em folículos secundários isolados. Espera-se, fornecer condições necessárias para promover a ativação, crescimento completa maturação de folículos pré-antrais contribuindo para incrementar os sistemas de cultivo *in vitro* de FOPA. Ademais, poderá fornecer possibilidades de utilização desses sistemas em ovários humanos, e o aperfeiçoamento de outras biotecnologias da reprodução.

Este trabalho apresenta-se estruturado, com uma introdução ao assunto pesquisado; revisão de literatura, com fundamentação teórica de projeção nacional e internacional e dois capítulos na forma de artigos: Capítulo I: **Co-cultivo com células-tronco mesenquimais reduz o estresse oxidativo e melhora a sobrevivência e desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos inclusos em tecido ovariano**, submetido ao Periódico: Animal Reproduction Science. O Capítulo II: **Crescimento de folículos pré-antrais isolados de ovários caprinos em sistema de co-cultivo *in vitro* com células-tronco mesenquimais**, que será submetido ao periódico Journal of Ovarian Reseach. Seguem as considerações finais e a lista de referências utilizadas.

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O ovário dos mamíferos

Os ovários são as gônadas femininas responsáveis pela produção de células germinativas chamadas oócitos e pela produção de hormônios esteroides e fatores de crescimento. Estas funções ocorrem no interior do folículo, a unidade morfológica e funcional do ovário que sustenta o crescimento e a maturação dos oócitos. Dentro do ovário de todas as espécies de mamíferos, o folículo é uma unidade morfológica e funcional que sustenta o crescimento e a maturação dos oócitos. O folículo consiste em um oócito envolvido por uma ou mais camadas de células especializadas constituídas por células da granulosa e da teca, situado na região cortical do ovário, no seio de um tecido conjuntivo (SANTOS, 2009, JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). O tecido ovariano é constituído pela medula onde se encontram tecido conjuntivo denso, vasos sanguíneos, nervos e o córtex, onde estão o tecido conjuntivo frouxo e os folículos ovarianos (Fig. 1) (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

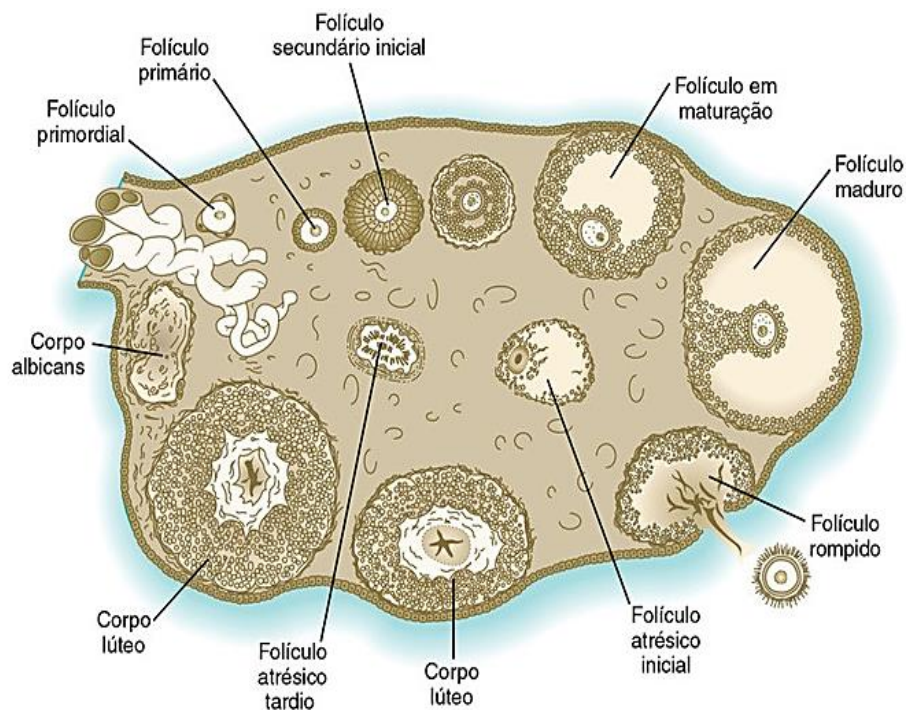


Figura 1. Imagem ilustrativa da organização do ovário, mostrando suas principais estruturas. Fonte: Carlson, 2014.

Localizados em ambos os lados do útero, os ovários apresentam a forma e o tamanho variáveis conforme a espécie animal e com a fase estral. Na vaca, na ovelha e na cabra, têm forma de amêndoa; na porca, parecem cachos de uva em decorrência dos folículos salientes e dos corpos lúteos, na égua, têm formato de rim, contendo a fossa de ovulação. Nas gatas, os

ovários têm tamanho e formato semelhantes a um grão de arroz, parcialmente cobertos por uma bursa (PRESTES et al., 2014, DYCE, 2010)

Por muito tempo tem-se relatado que o ovário humano, desde o nascimento, apresenta um número fixo de folículos primordiais que declinam constantemente ao longo da vida em consequência da atresia e recrutamento para ovulação. Entretanto, estudos mais recentes apresentam evidências de que pode ocorrer uma pequena renovação na população folicular através da diferenciação das células-tronco de linhagem germinativa extra e intraovariana, a chamada neofoliculogênese (JOHNSON et al., 2004; SILVA-SANTOS et al., 2013).

2.2 Foliculogênese

A foliculogênese pode ser definida como conjunto das transformações que o folículo sofre desde o momento em que sai da reserva inerte de células germinativas para iniciar o seu crescimento e maturação, culminando com o folículo maturado ou pré-ovulatório. Diferentes fases de crescimento e diferenciação, que são refletidas na aparência morfológica e na resposta endócrina, caracterizam a foliculogênese. O processo de transição de oócitos imaturos a oócitos completamente maduros, prontos para serem fertilizados, depende do crescimento e do desenvolvimento da estrutura folicular. Existe uma interação complexa entre hipófise-trato reprodutivo que coordena o desenvolvimento folicular, a ovulação e a gravidez (CORTVRINDT; SMITZ, 2001).

A foliculogênese pode ser dividida em duas fases, pré-antral e antral, considerando o grau de evolução dos folículos. A primeira fase, denominada fase pré-antral é caracterizada pela presença de folículos não cavitários na qual ocorre a ativação dos folículos primordiais e crescimento dos folículos primários e secundários, bem como o crescimento e diferenciação do oócito. Esta, é frequentemente chamada de fase independente de gonadotrofina porque os folículos podem se desenvolver para o estágio antral em animais ou humanos, com concentrações de FSH circulante mínimas ou receptores de FSH defeituosos (WILLIAMS; ERICKSON, 2012; ARAÚJO, 2013). Entretanto, embora o desenvolvimento para o estágio antral não seja dependente do FSH, os folículos pré-antrais são responsivos ao tratamento com FSH, ou seja, o desenvolvimento de folículos precoces é influenciado por gonadotrofinas (MCGREE e HSUEH 2000; HSUEH et al., 2015). Já a segunda fase, denominada fase antral ou gonadotrofina-dependente, é caracterizada pelo aumento do tamanho do folículo terciários, formação da cavidade antral preenchida com fluido produzido pela proliferação das células da granulosa, dando origem aos folículos pré-ovulatórios sendo controlada principalmente por fatores de crescimento produzidos localmente através de mecanismos endócrinos, autócrinos e

parácrinos. A segunda fase é regulada por FSH e LH, bem como por fatores de crescimento (Fig. 2) (WILLIAMS; ERICKSON, 2012; ARAÚJO, 2013).

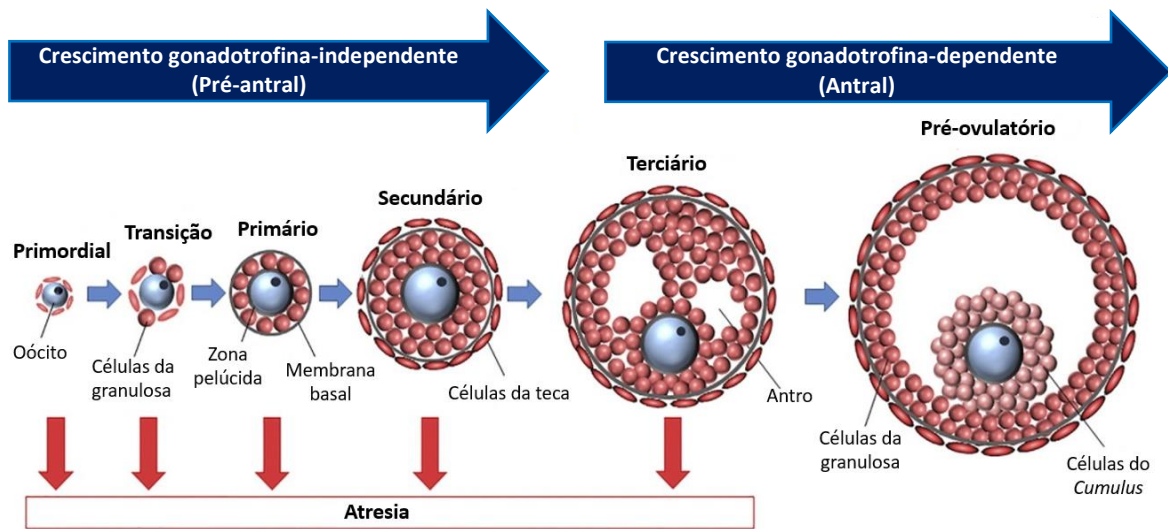


Figura 2. Representação esquemática das fases da foliculogênese dos mamíferos, tipos de folículos e destacando atresia e gonadotrofina dependência. Fonte: Adaptado de Findlay et al., 2019.

Estudos têm mostrado que nos estágios iniciais da foliculogênese, fatores de crescimento produzidos localmente, tais como a Ativina, o Kit Ligand, o Fator de Crescimento Epidermal (EGF) e as Proteínas Morfogenéticas Ósseas (BMPs), exercem um papel determinante na manutenção da viabilidade e do crescimento folicular (FORTUNE, 2003; COSTA et al., 2012). Este crescimento resulta, em grande parte, devido à proliferação das células da granulosa por meio de estímulo direto da ativina que tem a sua ação aumentada pelo FSH (CARLSON, 2014). Após a formação do antro, espaço preenchido com fluido que aparecem entre as células da granulosa, os folículos tornam-se progressivamente dependentes das gonadotrofinas, e os fatores de crescimento locais atuam inibindo ou potencializando a ação destes hormônios (FORTUNE, 2003).

Oócitos com capacidade de ovulação residem em grandes folículos antrais que são formados predominantemente por dois subtipos de células da granulosa, sendo denominadas células do *cúmulo*, as que exercem comunicação direta com o oócito e as células murais da granulosa, aquelas posicionadas entre o antro e a membrana basal (CARLSON, 2014).

2.3 Caracterização da população folicular e atresia

A população folicular dos ovários é bastante heterogênea, sendo predominantemente encontrados folículos pré-antrais ou não cavitários que representam cerca de 90 a 95% de toda a população folicular, e em menor número, folículos antrais ou cavitários (Figueiredo et al.,

2008). Os folículos pré-antrais são constituídos pelos folículos primordiais, intermediários ou de transição, primários e secundários. Destes, os primordiais constituem a reserva ovariana de oócitos durante toda a vida reprodutiva da fêmea (BEZERRA, 1998) e são os menores folículos presentes nos ovários com diâmetro aproximado de 33µm em caprinos e consistem em um oócito imaturo circundado por uma camada de células da pré-granulosa em formato pavimentoso. O crescimento destes folículos caracteriza o processo de ativação folicular, onde são originados folículos com uma camada de células que variam entre cúbicas e pavimentosas, chamados folículos intermediários ou folículos de transição. Em caprinos, os diâmetros destes folículos é de 40,7 µm aproximadamente. Quando o oócito imaturo é circundado por uma camada completa de células da granulosa cúbicas são formados os folículos primários, com diâmetro médio de 49,8 µm em caprino. Já os folículos secundários, são caracterizados pela presença de duas ou mais camadas completas de células cúbicas e oócito imaturo com diâmetro de 83 µm em caprino. A medida que ocorre a proliferação das células da granulosa e o acúmulo de fluido folicular, são formados os folículos antrais, que podem atingir 130 µm em caprino (Fig. 2) (FIGUEIREDO et al., 2008).

Uma série de fatores como raça, idade, níveis hormonais e estado reprodutivo podem influenciar tanto na população folicular quanto na distribuição dos diferentes tipos de folículo no ovário (FIGUEIREDO et al., 2008). Em caprinos, a população folicular dos ovários ao nascimento é de aproximadamente 37.000 folículos (LUCCI; AMORIM; RODRIGUES, 1999), sendo o surgimento dos primeiros folículos primordiais verificado aos 62 dias de gestação nesta espécie (CORTVRINDT; SMITZ, 2001).

Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento folicular nos estágios pré-antrais, especialmente, de folículos primordiais e primários têm sido alvo de investigações. Este interesse nos estágios iniciais aumentou à medida que se reconheceu a importância da reserva primordial como recurso potencial a ser aproveitado para aumentar a eficiência reprodutiva de espécies domésticas e silvestres e para melhorar a fertilidade em mulheres expostas à radiação ou quimioterapias (FORTUNE, 2003). Estudos mostraram que existem inúmeros fatores intraovarianos envolvidos no controle da foliculogênese inicial. Entre estes fatores pode-se destacar a proteína morfogenética óssea 15 (BMP-15), o fator de crescimento e diferenciação-9 (GDF-9), o Kit Ligand (KL) e o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (LIMA et al., 2010; SILVA et al., 2017; DIPAZ-BERROCAL et al., 2017).

Estudo da dinâmica folicular ovariana mostrou que esta pode ser caracterizada por mudanças bruscas à medida que o ovário envelhece. Assim, é observado no ovário jovem a ocorrência de altas taxas de crescimento folicular e baixas taxas de atresia, enquanto que na

senescência ovariana o crescimento da população folicular é reduzido e os índices de atresia aumentam drasticamente. Esta redução na funcionalidade do ovário à medida que este envelhece culmina na perda da capacidade reprodutiva pela insuficiência ovariana, fato que ocorre relativamente cedo na vida das mulheres (FADDY, 2000; NICOLA, 2017).

Em mamíferos, a fertilidade da fêmea é regulada por um mecanismo fisiológico de degeneração folicular denominado atresia, sendo esta uma característica contínua no panorama histológico do ovário, a qual pode ser identificada em folículos de diferentes estágios de desenvolvimento, em qualquer plano de corte, até a interrupção da função ovariana. As células foliculares podem exibir núcleo picnótico acompanhado ou não de retração citoplasmática ou desorganização da zona pelúcida e/ou das células das granulosa (ROSS; PAWLINA; BARNASH, 2012). Com isso, acredita-se que mais 99% dos folículos são perdidos através deste amplo processo degenerativo que limita o número de ovulações (SHARMA; BHARDWAJ, 2007). No entanto, o controle desta condição pode ser melhor aproveitado para aumentar fertilidade das espécies, diminuindo a frequência de atresia (BHARDWAJ; SHARMA, 2012).

2.4 Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais (MOIFOPA)

Diferentes biotecnologias reprodutivas vêm sendo estudadas com perspectivas promissoras para as futuras demandas do agronegócio de pequenos ruminantes, contribuindo para aumento do potencial da Caprino-Ovinocultura (DANTAS; NEGRÃO, 2010; GUERRA et al., 2011; AYBAZOV; MAMONTOVA; SEITOV 2014; YOTOV; VELISLAVOVA; DIMOVA, 2016). Dentre as biotécnicas que visam a otimização da utilização do potencial reprodutivo das fêmeas, pode-se destacar a Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais (MOIFOPA) também conhecida como “ovário artificial”, que consiste em recuperar pequenos oócitos inclusos em FOPA a partir dos ovários, promovendo o seu crescimento, sobrevivência, maturação e fecundação *in vitro*, prevenindo-os da atresia que ocorre largamente nos ovários e recuperando, assim, grande quantidade de oócitos que seriam perdidos (FIGUEIREDO; RODRIGUES; SANTOS, 2013).

Em associação a outras tecnologias reprodutivas, como a fecundação *in vitro* e a transferência de embriões, esta biotécnica tem potencial, não somente para otimizar, como também conservar o material genético de animais valiosos e de espécies em vias de extinção, inclusive após sua morte, uma vez que possibilita a conservação dos milhares de oócitos inclusos nos FOPA presentes no córtex do ovário, permitindo a implantação de bancos de germoplasma (GONÇALVES, 2012; ARAÚJO, 2013).

Com o aprimoramento de métodos de cultivo *in vitro* que apoiam o desenvolvimento dos folículos pré-antrais, foram registrados importantes resultados na produção de oócitos meioticamente competentes (MAGALHÃES-PADILHA et al., 2012, SÁ et al., 2017) e produção de embriões na espécie caprina (SARAIVA et al., 2010; MAGALHÃES et al 2011). Além disso, foram relatados melhores índices de crescimento e maturação folicular em camundongos (RAJABI et al., 2018), e o nascimento de crias vivas, apenas em murinos (O'BRIEN et al., 2003, HIGUCHI et al., 2015).

2.5 Sistemas de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais

Com o advento de técnicas de reprodução assistida, a possibilidade de regulação do desenvolvimento folicular *in vivo* e *in vitro* ganhou relevância clínica (MCGEE e HSUEH 2000). No entanto, a partir dos estudos *in vitro*, foi possível conhecer uma série de substâncias e fatores envolvidos na viabilidade, ativação, crescimento e morte folicular o que tem contribuído para a maximização do potencial reprodutivo (BRUNO et al. 2008).

Para desenvolvimento de um sistema ideal para o cultivo de FOPA os pesquisadores buscam atender três requisitos principais: manutenção da viabilidade dos folículos, integridade da sua morfologia de modo semelhante ao padrão *in vivo*, garantia do crescimento e da maturação folicular (FIGUEIREDO et al., 2008). Para isto, os tipos de sistemas cultivo *in vitro* disponíveis para FOPA mais comumente utilizados são o cultivo *in situ*, que utiliza pequenos fragmentos do córtex ovariano ou de folículos isolados, sendo este último realizado nas formas bi ou tridimensional (ROSSETO et al., 2011; CHAVES et al., 2011).

O sistema de cultivo *in situ* tem sido objeto de investigação em diferentes espécies como caprinos (SILVA, 2017), ovinos (MENEZES et al., 2018), babuínos (AMORIM et al. 2016), bovinos (JIMENEZ et al., 2016) entre outras e apresenta como vantagem o contato direto entre as células foliculares e as células do estroma ovariano (ABIR et al., 2006). Além disso, com esse tipo de cultivo é possível analisar o efeito de diferentes substâncias sobre a ativação e crescimento folicular. No entanto, esta avaliação só é possível até o estágio secundário do desenvolvimento folicular (PENG, 2010). Por outro lado, no cultivo de folículo isolado os efeitos dos fatores adicionados no meio podem ser analisados individualmente, facilitando a determinação das melhores condições para o seu desenvolvimento além de permitir o cultivo do folículo até o estágio antral (QU et al., 2000; ABIR et al., 2006).

Nos atuais sistemas de cultivo *in vitro* de folículos, vários autores vêm tentando minimizar os efeitos tóxicos causados pela produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) por meio da utilização de diferentes tensões de O₂, uma vez que as ERO podem comprometer

o desenvolvimento folicular, a maturação oocitária e a posterior produção *in vitro* de embriões (SILVA et al., 2010; MENEZES et al., 2018)

Entre os meios de base frequentemente utilizados para promover o desenvolvimento de folículos pré-antrais, Jimenez et al., (2016) compararam a eficácia do α -Meio Essencial Mínimo (α -MEM), meio de cultivo de tecidos 199 (TCM-199) e meio de McCoy (McCoy) suplementados com glutamina, insulina, transferrina, selênio, ácido ascórbico, albumina sérica bovina (BSA), penicilina, estreptomicina e tampão HEPES em cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais inclusos no córtex ovariano bovino, e constataram que o meio α -MEM mostrou ser o meio mais eficaz preservando a morfologia, a morfometria e a ultraestrutura dos FOPA bovinos, garantindo sua viabilidade e crescimento após o cultivo *in situ*. Embora esses meios de base tenham em sua composição diferentes substâncias essenciais para as células como sais inorgânicos, aminoácidos, vitaminas e nucleosídeos (JIMENEZ et al., 2016), estudos têm testado diferentes substâncias, tais como hormônios, antioxidantes e fatores de crescimento, na tentativa de enriquecer o meio de cultivo para manter a viabilidade celular (SILVA, 2017; AGUIAR et al., 2016; CHAVES et al., 2011; MENEZES et al., 2018).

Entretanto, o custo elevado e muitas vezes o atraso na importação destes meios de cultivo e da suplementação rotineiramente utilizada tem levado os pesquisadores a buscarem alternativas para a substituição dos suplementos comerciais. Nesse sentido, Bezerra et al., (2018) investigaram a influência do meio condicionado de CTM da geleia de Wharton sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos secundários ovinos isolados. Estes autores constataram que folículos cultivados somente em meio condicionado apresentaram maior diâmetro folicular quando comparado ao α -MEM, sugerindo que o meio em que estas células são cultivadas tem potencial para ser utilizado como um meio alternativo para manter a sobrevivência, promover o crescimento e reduzir níveis de ERO de folículos secundários isolados nesta espécie.

Além disso, sistemas de co-cultivo com outros tipos celulares foram apontados como alternativa para o desenvolvimento folicular na fase pré-antral. Conforme Malekshah et al. (2014), em camundongos a co-cultivo de fibroblastos com FOPA foi mais eficiente que a Ativina A na taxa de crescimento e sobrevivência folicular *in vitro*.

2.6 Sistemas de co-cultivo *in vitro* utilizando células-tronco mesenquimais

Evidências sugerem que as CTM têm o potencial de induzir a proliferação e aumentar a taxa de sobrevivência de vários tipos de células por meio da secreção de diferentes fatores,

além das suas propriedades imunomoduladoras (LI et al., 2015; SEO; JUNG, 2016; EGGER et al., 2018).

As interações físicas e bioquímicas entre células progenitoras endoteliais da medula óssea e CTM de mesma origem foram investigadas em um sistema de co-cultivo *in vitro* para esclarecer melhor seus papéis na vascularização. Neste estudo, foi constatado que estas células co-cultivadas se desenvolveram em estruturas semelhantes a tubos, mesmo na ausência de fatores de crescimento exógenos, destacando a importância da sinalização parácrina (AGUIRRE, PLANELL e ENGEL 2010).

A capacidade das CTM de estimular diretamente proliferação de células epiteliais tubulares proximais lesadas por cisplatina, foi investigada por Imbert et al. (2007), em modelos murinos em um sistema de co-cultivo. Nesta pesquisa, foi relatado que a liberação de Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) por CTM pode atuar como um poderoso agente regenerativo, induzindo a proliferação e inibindo a apoptose de células tubulares endógenas.

Na área da reprodução, Moshkdanian et al. (2011) observaram que CTM obtidas do cordão umbilical humano tem potencial para melhorar a taxa de clivagem dos embriões e proteger os mesmos contra danos celulares que normalmente resultam de excesso de ERO, apresentando efeito análogo ao observado com a adição dos antioxidantes β -mercaptoethanol (β -ME) e o ácido ascórbico. Além disso, em co-cultivo com FOPA, Rajabi et al. (2018) relataram que as CTM obtidas do sangue menstrual humano poderiam ser usadas como uma ferramenta de suporte para o crescimento e maturação folicular de camundongos através de contatos diretos ou fatores de crescimento parácrinos.

2.7 Células-tronco

As células-tronco podem ser definidas como células com prolongada proliferação, capacidade de autorrenovação, diferenciação em diferentes linhagens e capacidade de repopular o tecido de origem danificado quando transplantadas (PEREIRA, 2008). De acordo com a origem, elas podem ser divididas em dois grupos básicos: células-tronco embrionárias (CTE) e as células-tronco adultas (CTA) também denominadas células-tronco somáticas (HOU et al., 2013). Tanto as células-tronco embrionárias quanto as adultas são fontes potenciais de células para aplicações clínicas futuras.

Conforme a sua plasticidade, as células-tronco podem ser classificadas em totipotentes, pluripotentes e multipotentes. Sendo as totipotentes aquelas capazes de formar todas as células do organismo, além dos anexos embrionários que sustentam o desenvolvimento

do embrião no útero, como é o caso do zigoto. As pluripotentes, obtidas a partir da massa celular interna (MCI) do blastocisto, podem se diferenciar em qualquer célula dos três folhetos germinativos (endoderma: originando, por exemplo, o trato gastrointestinal e os pulmões; mesoderma: originando por exemplo, músculos, ossos, sangue e sistema urogenital; ectoderma: originando, por exemplo, tecidos epidermais e sistema nervoso). E, as multipotentes, que são células-tronco adultas com potencial limitado de diferenciação, podem originar linhagens de células relacionadas ao seu tecido de origem, como exemplo deste tipo de células-tronco podemos citar as hematopoiéticas, mesenquimais e neurais (WOBUS; BOHELER, 2005; VISINTIN et al., 2013).

Em contraste com as células-tronco embrionárias, cuja pluripotência foi amplamente comprovada, as células-tronco adultas eram tradicionalmente tidas como restritas, em seu potencial de diferenciação, a somente células do tecido de origem. Porém, estudos têm mostrado um potencial de diferenciação muito mais amplo, sendo capazes de dar origem a tecidos diferentes daqueles onde elas residem (PEREIRA, 2008; SILVA, 2016). A exemplo disso, as células-tronco mesenquimais (CTM), são capazes de se diferenciar em vários tipos celulares como osteoblastos, condroblastos e adipócitos e possuem diversos sítios de coleta em indivíduos adultos, podendo ser obtidas da poupa dentária (CARVALHO et al., 2015), do tecido adiposo (COSTA et al., 2017), do cordão umbilical (SILVA, 2016), da medula óssea (SANTOS, 2017), dentre outros. Estas células se tornaram atraentes na pesquisa científica no campo da terapia celular por causa da relativa facilidade de isolamento, potencial de alta expansão, baixa imunogenicidade, capacidade de modificação e multipotência. Além disso, as CTM aceleram o processo de reparo tecidual pela secreção de fatores parácrinos, sejam eles agentes angiogênicos, mitogênicos, antiapoptóticos, fatores anti-inflamatórios ou antioxidantes o que aumenta a sua gama de potenciais aplicações clínicas (PANKAJAKSHANE; AGRAWAL, 2014).

Com o crescente interesse biológico e clínico por CTM, muitas controvérsias foram geradas entre os pesquisadores, uma vez que as características definidoras das mesmas eram inconsistentes. Assim, a Sociedade Internacional de Terapia Celular, estabeleceu três critérios principais, baseados nos melhores dados disponíveis, para caracterizar CTM, sendo eles: aderência ao plástico quando mantidas em condições de cultivo padrão; expressão positiva de antígenos de superfície específicos CD105, CD73 e CD90 e negativa para CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 α ou CD19 e HLA-DR; e potencial de diferenciação multipotente, devendo ser capazes de se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condroblastos, sendo esta a propriedade biológica que mais singularmente identifica CTM. Estes critérios contribuiram

para assegurar que estudos de populações heterogêneas de CTM não fossem confundidos por outros tipos celulares e que o uso dessas células em estudos pré-clínicos e no desenvolvimento subsequente de terapias clínicas avançassem mais rapidamente (DOMINICI et al., 2006).

2.8 O cordão umbilical como fonte de células-tronco mesenquimais

O cordão umbilical é uma estrutura helicoidal que permite a conexão entre o feto e a placenta, sendo portanto, responsável pelo desenvolvimento e manutenção da vida intrauterina (NAIDON, 2012). Apresenta basicamente uma membrana amniótica externa, duas artérias e uma veia cercadas por uma bainha de tecido conjuntivo especializado, chamada geleia de Wharton. Os diferentes tecidos do cordão umbilical contêm células-tronco hematopoéticas e mesenquimais. O sangue de cordão umbilical é uma fonte rica em células-tronco hematopoiéticas, já as células-tronco mesenquimais podem ser encontradas no endotélio e subendotélio da veia do cordão umbilical, que é revestido por epitélio amniótico, e na geleia de Wharton, o principal elemento do cordão umbilical, rico em células tronco mesenquimais (MALHEIROS; ABREU, 2016).

Por se tratar de um material que é descartado após o nascimento, a obtenção das células-tronco mesenquimais presentes no cordão umbilical é um método não invasivo e livre de considerações éticas, pois não interfere no parto e não prejudica a mãe ou o bebê, podendo ser uma alternativa viável e mais vantajosa para uma variedade de propostas terapêuticas (BAPTISTELLA, 2016).

2.9 Uso da espécie caprina como modelo experimental

A criação de pequenos ruminantes, sobretudo da espécie caprina, tem grande representatividade no Brasil, especialmente na região Nordeste, que concentra 90% do rebanho caprino nacional. Apresenta grande importância socioeconômica, em função do seu importante papel na produção de carne, de leite e de pele. Por serem animais de menor porte e mais adaptados, estes animais respondem com mais eficiência e menores custos quando comparados aos bovinos (EMBRAPA, 2017).

Os avanços da caprinocultivo têm estimulado o interesse dos pesquisadores para o estudo dos aspectos reprodutivos de machos e fêmeas, uma vez que o entendimento da morfofisiologia da reprodução destes animais pode possibilitar um melhor aproveitamento reprodutivo dos mesmos (RICARTE; SILVA, 2010).

Os mecanismos envolvidos na foliculogênese têm sido alvo de estudos em várias espécies de mamíferos. Muitos deles têm como modelos experimentais espécies de animais que oferecem grandes contribuições para pesquisas em humanos como roedores (DEMEESTERE et al., 2005; MCGEE et al., 2001), babuínos (AMORIM et al., 2016), caprinos (MAHAJAN et al., 2017) e ovinos (BEZERRA et al., 2019).

Haja vista que o uso de oócitos humanos para fins de pesquisa é severamente limitado, a espécie caprina representa um ótimo modelo experimental e destaca-se devido à semelhança, em certos aspectos, com a morfologia e fisiologia de órgãos humanos. Algumas características reprodutivas como a consistência fibrosa do ovário, o tempo de ativação, crescimento e maturação dos folículos ovarianos tornam estes animais excelentes modelos para a espécie humana (FIGUEIREDO; RODRIGUES; SANTOS, 2013; DANTAS; NEGRÃO, 2010). Dessa forma, estudos nesta espécie podem servir de parâmetro para o aperfeiçoamento de biotécnicas reprodutivas, visando maximizar o potencial reprodutivo de animais domésticos de alto valor zootécnico ou em processo de extinção, bem como subsidiar pesquisas relacionadas ao tratamento de mulheres com problemas de infertilidade (JADOUN et al., 2012; FERREIRA et al., 2016).

CAPÍTULO I

Manuscrito submetido ao periódico Animal Reproduction Science (Print) – ISSN: 0378-4320,
Fator de Impacto: **1.817** (2018)

CAPÍTULO I

Co-cultivo com células-tronco mesenquimais melhora a sobrevivência e desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos inclusos em tecido ovariano

R.P. Sousa, M.A.M. Carvalho

Resumo

O desenvolvimento de sistemas de cultivo capazes de manter o crescimento folicular a partir do estágio pré-antral tem sido alvo de investigações. As células-tronco mesenquimais (CTM) apresentam potencial para utilização em ampla gama de aplicações incluindo pesquisas com vista à preservação da fertilidade. Este estudo teve como objetivo investigar a utilização das células-tronco mesenquimais da geleia de Wharton (CTM-GW) na sobrevivência e desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos inclusos em fragmentos de tecido ovariano cultivados por 1 e 7 dias. Para tanto, fragmentos do córtex ovarianos foram fixados imediatamente (controle não-cultivado) e distribuídos em quatro tratamentos: tecido ovariano cultivado em meio controle (α -MEM⁺); tecido ovariano cultivado em α -MEM⁺ suplementado com soro fetal bovino (α -MEM⁺ + SFB); tecido ovariano co-cultivado com células-tronco em α -MEM⁺ (α -MEM⁺ + CT); e tecido ovariano co-cultivado com células-tronco em α -MEM⁺ + SFB (α -MEM⁺ + CT+ SFB). Foram avaliadas as taxas de sobrevivência, ativação e diâmetro folicular, os níveis de espécies reativas de oxigênio no meio de cultivo e a taxa de proliferação celular. Foi observado que após 7 dias, o tratamento co-cultivo com células-tronco apresentou um percentual de folículos pré-antrais morfologicamente normais superior ($P < 0,05$) quando comparado aos demais tratamentos, bem como uma maior ($P < 0,05$) taxa de ativação em relação ao controle cultivado. Além disso, o diâmetro folicular foi maior no tratamento co-cultivo com células-tronco em relação ao co-cultivo com células-tronco acrescido de SFB. Este estudo demonstra pela primeira vez que o co-cultivo de CTM-GW com folículo ovariano pré-antral, incluso em tecido ovariano caprino, melhora a sobrevivência e o desenvolvimento folicular inicial *in vitro*.

Palavras-chave: Co-cultivo *in situ*. Células-tronco; Folículo pré-antral. Cabras. Foliculogênese.

Abstract

The development of culture systems capable of maintaining follicular growth from the preantral stage has been the target of investigations. Mesenchymal stem cells (MSC) present potential for use in a wide range of applications, including research aimed at preserving fertility. This study aimed to investigate the use of Wharton's jelly Mesenchymal Stem Cells (WJ-MSC) in the survival and *in vitro* development of goat preantral follicles enclosed in fragments of ovarian tissue cultured for 1 and 7 days. Therefore, fragments of the ovarian cortex were immediately fixed (non-cultured control) or distributed in four treatments: ovarian tissue cultured in control medium (α -MEM⁺); Ovarian tissue cultured in α -MEM⁺ supplemented with SFB (α -MEM⁺ + FBS); Ovarian tissue co-cultured with stem cells in α -MEM⁺ (α -MEM⁺ + SC); And ovarian tissue co-cultured with stem cell in α -MEM⁺ + FBS (α -MEM⁺ + SC + FBS). The rates of cell proliferation, follicular survival and activation as well as follicular diameter were evaluated. It was observed that after 7 days, the treatment co-cultured with stem cells presented a higher ($P < 0.05$) percentage of morphologically normal preantral follicles when compared to the other treatments as well as a higher ($P < 0.05$) activation rate in relation to cultured control. Moreover, the follicular diameter was higher in the treatment co-cultured with stem cells in relation to the co-cultured with stem cells plus FBS. This study demonstrates for the first time that co-cultivation of WJ- MSC with preantral ovarian follicle included in goat ovarian tissue improves survival and early follicular development *in vitro*.

Key-words: *In situ* co-culture. Stem cells. Preantral follicles. Goats. Folliculogenesis

1. Introdução

Os folículos ovarianos pré-antrais constituem a maioria da população nos ovários de mamíferos, portanto, representa fonte potencial de oócitos para uso em biotécnicas reprodutivas e, ainda, como excelentes modelos experimentais para estudo da foliculogênese (Gupta et al., 2008; Heidari, 2011). Dessa forma, diversos sistemas de cultivo *in vitro* em animais e humanos têm sido desenvolvidos visando à produção de oócitos competentes a partir de folículos ovarianos em estágios iniciais de desenvolvimento (Herta et al., 2008)

Atualmente vários grupos de pesquisa têm buscado o aprimoramento das biotécnicas voltadas para preservação da fertilidade como a criopreservação, transplante e métodos de cultivo *in vitro* (Rodriguez-Wallberg et al., 2016; Hikabe et al., 2016; Menezes et al., 2008). Este interesse se deve, em parte, pelo entendimento dos mecanismos envolvidos na perda natural (atresia) de folículos pré-antrais *in vivo* bem como para tratamento da infertilidade em humanos por diversos fatores, com atenção especial para pacientes diagnosticados com câncer e a consequente infertilidade por insuficiência gonadal resultante de tratamento quimioterápico e/ou radioterápico (Rodriguez-Wallberg and Oktay, 2010). Entre as biotécnicas da reprodução,

o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais visa recuperar folículos ovarianos antes de se tornarem atresícos, aumentando o número de oócitos capazes de serem maturados e fertilizados. Este fato tem grande importância tanto na pesquisa básica quanto para a reprodução animal, além de servir de parâmetro para o aprimoramento de técnicas aplicadas à medicina humana (Figueiredo et al., 2011). Basicamente, os folículos pré-antrais podem ser cultivados “*in situ*”, ou seja, inclusos em fragmentos de tecido ovariano (Chaves et al., 2011) ou na forma isolada (Bezerra et al., 2019).

Estudos com as células-tronco mesenquimais (CTM) têm atraído um número cada vez maior de pesquisadores, em parte, pelo seu vasto campo de aplicações e por estarem livres de implicações éticas e legais na sua manipulação. Essas células podem ser isoladas, com relativa facilidade, de múltiplos sítios, expandidas em cultivo, apresentam alta plasticidade e importantes propriedades biológicas. Além disso, as CTM possuem capacidade de migrar para locais lesionados onde elas podem exercer efeitos terapêuticos através da secreção de moléculas bioativas que desempenham papéis antiapoptóticos, imunomoduladores, anti-cicatrizante, angiogênicos e quimioativos o que contribui para o aumento das taxas de sobrevivência após transplante (Seo and Jung, 2016; Egger et al 2018).

Em relação à aplicação de CTM com vista à preservação da fertilidade, os dados da literatura ainda são muito limitados. No entanto, existem relatos de sistemas de co-cultivo de folículo ovariano pré-antral utilizando CTM em humanos e em algumas espécies animais. Rajabi et al. (2018) co-cultivaram CTM do sangue menstrual humano com folículos pré-antrais de camundongos, resultando no aumento nas taxas de crescimento, sobrevivência e formação de antro folicular, bem como na taxa de maturação *in vitro* (MIV). Ademais, foi relatado que as CTM da medula óssea humana estabelecem um microambiente regenerativo, secretando moléculas bioativas benéficas aos folículos (Xia et al., 2015). Apesar desses avanços, ainda pouco se sabe sobre o papel das CTM no crescimento folicular.

A geleia de Wharton do cordão umbilical é uma importante fonte de CTM, ainda não testada em co-cultivo com folículos pré-antrais. Estas têm sido utilizadas para uma gama de aplicações, como no tratamento da doença de Parkinson (Yan et al., 2013), degeneração da retina (Leow et al., 2015), reparação de tecido cutâneo lesionado (Arno et al., 2014), neurologia (Drela et al., 2016) entre outras. Sua capacidade proliferativa e o potencial imunológico privilegiado durante as fases da gestação, foram demonstrados por Cardoso et al. (2017), e resultados promissores quanto a sua totipotência após a transferência nuclear foi citado por Silva et al. (2016). Diante disso, supõe-se que este tipo celular pode apresentar potencial para uso, como suporte no crescimento de folículos ovarianos pré-antrais.

Dessa forma, este estudo tem por objetivo investigar o efeito da suplementação com SFB e/ou do co-cultivo de folículos ovarianos pré-antrais caprinos com células-tronco mesenquimais da geleia de Wharton (CTM-GW) na sobrevivência, ativação, crescimento e proliferação celular de folículos pré-antrais inclusos em fragmentos de tecido ovariano.

2. Materiais e métodos

Este estudo foi conduzido conforme autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Piauí, sob o protocolo 117/15.

2.1. Obtenção das CTM-GW de caprino

As CTM-GW foram isoladas e caracterizadas conforme previamente descrito por Silva (2016). Resumidamente, as células foram isoladas do explante da geleia de Wharton do cordão umbilical de fetos caprinos, submetidas a ensaio de plasticidade, caracterizadas por citometria de fluxo para os anticorpos (CD14, CD90 e CD105) e, posteriormente, congeladas. Atendendo aos critérios da Sociedade Internacional de Terapia Celular (SITC), as células apresentaram aderência ao plástico, crescimento celular com fases bem definidas, diferenciação celular em linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica, além de expressão CD90 e CD105 e ausência de expressão de CD14 Silva (2016). As amostras de células foram criopreservadas na terceira passagem, com 80% de viabilidade e compunham o banco de células-tronco do Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisas com Células-Tronco (NUPCelt) da Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI, Brasil.

As amostras criopreservadas foram transportadas para o Laboratório de Manipulação de Oócitos e Foliculo Pré-antrais (LAMOFOPA - Fortaleza/CE - Brasil) onde foram descongeladas em temperatura ambiente, ressuspensas em meio de cultivo α -MEM (Gibco®, Waltham, MA, USA) contendo SFB a 20%, 1% de L-glutamina (Invitrogen®) e 1% de penicilina-estreptomicina, 1% aminoácidos não-essenciais (Gibco® Life Technologies™ MEM NEAA- 100X) e centrifugadas por 10 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspensado em 3ml de meio de cultivo para expansão celular em garrafas de 25cm² e incubadas a 38.5 °C e 5% de CO₂. Após atingirem a confluência de aproximadamente 80%, as células foram tripsinizadas e repicadas para duas placas de 24 poços na concentração de 1x10⁴ CTM-GW por poço, cultivadas no mesmo meio descrito acima.

2.2. Coleta e transporte dos ovários

Ovários de 5 cabras (n=10) adultas sem padrão racial definido (SPRD) foram coletados em abatedouros locais do município de Fortaleza-CE. Imediatamente *post mortem*, os ovários

foram lavados uma vez em álcool 70% e duas vezes em MEM com tampão HEPES e 10% de antibiótico penicilina-estreptomicina. Os ovários foram transportados em até 1h para o laboratório em MEM a 4°C (Chaves et al., 2011).

2.3 Delineamento experimental

O córtex de cada par ovariano (n=5) foi dividido em fragmentos de aproximadamente 3 x 3 x 1 mm. De cada animal, foram retirados 18 fragmentos de tecido ovariano, sendo selecionados aleatoriamente 2 fragmentos para o controle não cultivado, sendo imediatamente fixados em Carnoy por 12 horas para análise histológica. Os demais fragmentos (n=16) foram distribuídos individualmente em placas de 24 poços, contendo 1 mL do meio de cultivo *in vitro* constituído por α -MEM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) suplementado com 1.25 mg / ml de BSA, 10 ng/ml de insulina recombinante humana, 5.5 ug / ml de transferrina, 5.0 ng / ml de selênio, 2 mM glutamina e 2 mM de hipoxantina, 10 μ g/ml de antibiótico gentamicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Este meio foi denominado aqui de α -MEM⁺ (adaptado de Chaves et al. [9]). Como as células-tronco foram previamente cultivadas em meio contendo SFB, o delineamento experimental compreendeu tratamentos contendo meios de cultivo sem ou com 10% de SFB. Assim, os fragmentos do córtex (n=16) foram distribuídos em quatro diferentes tratamentos: 1) tecido ovariano cultivado em meio controle (α -MEM⁺); 2) tecido ovariano cultivado em α -MEM⁺ suplementado com SFB (α -MEM⁺ + SFB); 3) tecido ovariano co-cultivado com células-tronco em α -MEM⁺ (α -MEM⁺ + CT); e finalmente 4) tecido ovariano co-cultivado com célula-tronco em α -MEM⁺ + SFB (α -MEM⁺ + CT + SFB).

Nos tratamentos com células-tronco após 24h, período adequado para a sua aderência, o meio de crescimento das células foi substituído por 1mL de α -MEM⁺ com ou sem SFB conforme o tratamento. As placas de cultivo foram incubadas na temperatura de 38,5 °C e atmosfera de 5% de CO₂ por um período de 1 a 7 dias. O meio de cultivo foi parcialmente (500 μ L) substituído a cada dois dias.

2.4. Análise morfológica e avaliação do crescimento folicular

Os fragmentos ovarianos de todos os tratamentos (controle não cultivado e cultivado após 1 e 7 dias) foram fixados em solução de Carnoy por 12h, para processamento histológico. Os fragmentos foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizados em xilol, embebidos em parafina e seccionados em série a 7 μ m. As secções foram montadas em lâminas de vidro e coradas com ácido periódico-Schiff e hematoxilina (PAS-H). As amostras foram identificadas em código para análise cega e examinadas em microscopia de luz

(Nikon, Tóquio, JP) com aumento de 400x por único observador.

Para cada tratamento, foram contados no mínimo 40 folículos pré-antrais de cada animal. Apenas os folículos contendo oócitos com núcleo visível foram considerados para as análises. Foram classificados como morfológicamente normais, os folículos que apresentavam oócito intacto e células da granulosa, bem organizadas em uma ou mais camadas e não continham núcleo picnótico. Os folículos foram considerados atrésicos, aqueles que apresentavam retração citoplasmática oocitária, núcleo picnótico e/ou células da granulosa, desorganizadas, destacadas da membrana basal.

Os estágios de desenvolvimento folicular foram avaliados de acordo com Silva et al. (2004), sendo classificados como primordiais quando apresentavam uma camada de células granulosas pavimentosas ao redor do oócito; folículos em desenvolvimento intermediário ou de transição, quando apresentavam uma camada de células da granulosa pavimentosas, com pelo menos, duas células cuboides; primários com uma camada de células da granulosa cuboidal, e folículos secundários com duas ou mais camadas de células da granulosa cubóides ao redor do oócito.

Para calcular a taxa de ativação e de crescimento folicular, apenas folículos morfológicamente normais com um núcleo oocitário visível foram considerados, e a proporção de folículos primordiais e em crescimento foi calculada no dia 0 (controle não cultivado), 1 e 7 de cultivo em todos os tratamentos. Os diâmetros foliculares e oocitários foram obtidos a partir da mensuração dos eixos maior e menor usando um microscópio ótico acoplado a um analisador de imagens (NIS-Elements) em aumento de 400x (Nikon NIS-Elements 3.0, 2008, Nikon, Tokyo, Japan).

2.5 Avaliação da proliferação celular pela detecção do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) por imuno-histoquímica

Com base nos resultados da morfologia e do desenvolvimento folicular foi realizada a imunomarcagem para PCNA para avaliar a influência das células-tronco na proliferação das células da granulosa dos folículos cultivados *in vitro*. Para tanto, repetições adicionais com 3 pares de ovários (n=3) foram realizadas. Os fragmentos do córtex ovariano foram fixados imediatamente (controle não-cultivado) em paraformaldeído (PAF) a 4% em tampão salina-fosfato (PBS, pH 7.2) ou distribuídos entre os tratamentos nas mesmas condições descritas anteriormente e fixados em PAF após 7 dias de cultivo *in vitro*.

Os fragmentos fixados foram desidratados e embebidos em parafina, seccionados (5µm), montados em lâminas (Knittel Glass, Bielefeld, NW, Germany), e reidratados com

concentrações crescentes de etanol. A recuperação antigênica foi realizada incubando-se as secções em solução de recuperação antigênica (EnVision FLEX Target Retrieval Solutin, Ref: K8005) por 5 min, em uma panela de pressão. Para o bloqueio endógeno da peroxidase, as lâminas foram incubadas com 3% de peróxido de hidrogênio em metanol por 15 min e lavadas (Dako Wash Buffer). Após a ativação dos epítomos, as lâminas foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente com anti-PCNA (1:3000, AB2426, ABCAN, Inc., EUA). Posteriormente, lavadas em tampão de lavagem (Dako Wash Buffer 20x, Ref: K8000) e incubadas com anticorpo secundário de imunoglobulina G (IgG) biotilado anti-coelho (1:200, AB97049, ABCAN, Inc., EUA). Em seguida, as lâminas foram lavadas, e a revelação da proteína foi realizada com diaminobenzidina (DAB; 1 gota de DAB para 1 mL de substrato, K346811-2; Dako, Inc., EUA). Finalmente, as secções foram contrastadas com hematoxilina. Os controles negativos foram realizados substituindo o anticorpo primário. Depois de montadas, as lâminas foram visualizadas sob um microscópio de luz.

A proliferação celular foi avaliada contando-se o total de células positivas para imunomarcção com PCNA nos folículos morfologicamente normais de todas as categorias e em todos os tratamentos. O grau de expressão do PCNA foi calculado como percentual de células marcadas com o anticorpo do total de células contadas.

2.6 Viabilidade celular

A viabilidade das CTM-GW foi avaliada após 7 dias de co-cultivo utilizando Azul de Trypan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). As CTM-GW foram submetidas à tripsinização com 1,0 mL de tripsina (Gibco® by Life Technologies™, 0,05% Trypsin-EDTA) e incubados a 38,5°C durante três minutos, sendo inativada com acréscimo de 2,0mL de meio α -MEM suplementado. A solução foi centrifugada à temperatura de 20°C e 1.500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado, o pellet ressuspendido em 1,0mL de meio. As células suspensas foram coradas com Azul de Trypan. Após adição de 30 μ L da suspensão celular em 30 μ L da solução de Azul de Trypan (50 μ L de cloreto de sódio 4,25% em 200 μ L de Azul de Trypan), uma alíquota de 10 μ L em Câmara de Neubauer foi observada em microscópio óptico (objetiva de 10x). A porcentagem de viabilidade foi calculada dividindo o número de células viáveis (translúcidas) pelo número total de células e multiplicado por 100.

2.7 Análise estatística

Os dados foram analisados usando a versão 11 do Sigma Plot (Systat Software Inc., EUA). A comparação das médias foi realizada por ANOVA unidirecional seguida de teste post-

hoc de Student-Newman-Keuls (entre tratamentos) ou teste t de Student (entre dias de cultivo). Dados para folículos normais e ativação folicular foram analisados entre os tratamentos pelo teste do qui-quadrado. Além disso, *odds ratio* e intervalo de confiança de 95% (IC) foram calculados para determinar o efeito de células-tronco na porcentagem de folículos normais e ativação folicular após 7 dias de cultivo *in vitro*. Os dados foram apresentados como média (\pm erro padrão médio) ou porcentagem e uma probabilidade de $P < 0,05$ indicou que a diferença foi significativa (bilateral).

3. Resultados

3.1 Morfologia folicular

Folículos morfolologicamente normais ou degenerados antes do cultivo *in vitro* (controle não cultivado) ou após cultivo por 1 ou 7 dias nos diferentes tratamentos são mostrados na Figura 1. Independente do tratamento e do período de cultivo foi observada uma redução ($P < 0,05$) do percentual de folículos morfolologicamente normais quando comparado ao controle não cultivado. Entretanto, o tratamento α -MEM⁺ + CT foi o único que manteve o percentual de folículos morfolologicamente normais do dia 1 para dia 7. Além disso, no dia 7 de cultivo, o referido tratamento apresentou uma taxa de folículos morfolologicamente normais superior aos demais tratamentos cultivados (Tabela 1). Ademais, pela análise da razão de chances (*odds ratio*), os folículos ovarianos pré-antrais cultivados no tratamento α -MEM⁺ + CT durante 7 dias, apresentam maiores chances de sobrevivência (morfolologicamente normais) do que aqueles cultivados nos demais grupos $P < 0,05$ (Tabela 2).

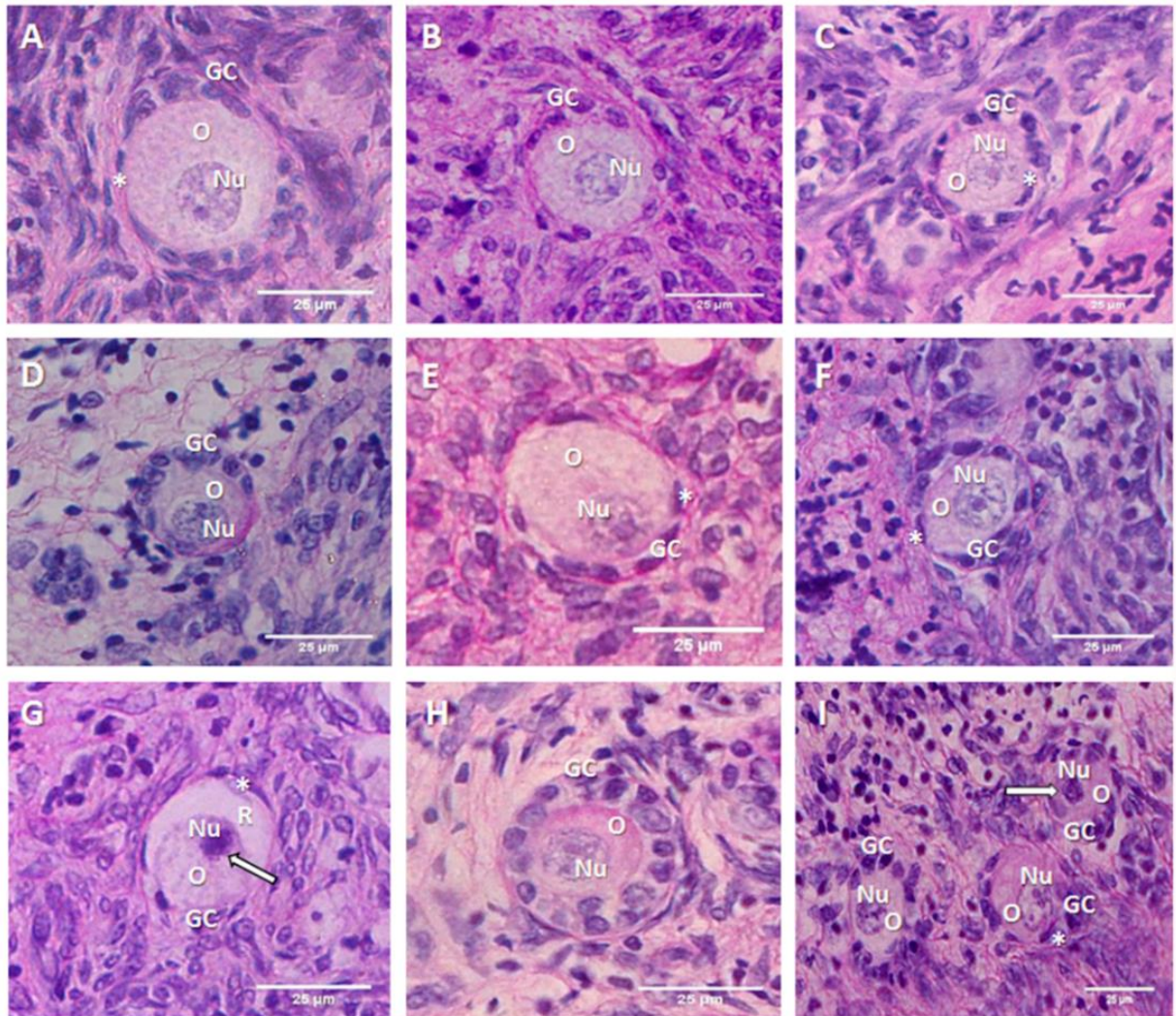


Figura 1. Fotomicrografias de folículos pré-antrais caprinos analisados por microscopia óptica. No dia 0 (controle não cultivado), A) e após co-cultivo *in vitro* por 1 ou 7 dias nos tratamentos α -MEM⁺ (B), α -MEM⁺ + CT (C e D), α -MEM⁺ + SFB (E, F e G) e α -MEM⁺ + CT + SFB (H e I). Folículos pré-antrais degenerados com núcleos picnóticos (G e I, seta). Barras de escala de 25 μ m. O: oócito, Nu: núcleo de oócito, GC, células da granulosa, *células da granulosa pavimentosas, R: retração do citoplasma. Ampliação 400x. Coloração com ácido periódico de Schiff-hematoxilina.

Tabela 1. Porcentagem de folículos pré-antrais morfológicamente normais de caprinos. Dados do controle (não cultivado) e após cultivo *in vitro* por 1 ou 7 dias nos tratamentos: tecido ovariano cultivado em meio controle (α -MEM⁺); tecido ovariano cultivado em α -MEM⁺ suplementado com SFB (α -MEM⁺ + SFB); tecido ovariano co-cultivado com células-tronco em α -MEM⁺ (α -MEM⁺ + CT); e tecido ovariano co-cultivado com célula-tronco em α -MEM⁺ + SFB (α -MEM⁺ + CT + SFB).

Tratamentos	Folículos normais (%)	
Controle (Dia 0)	83,1 ± 3,3 (182/219)	
	Dia 1	Dia 7
α -MEM ⁺	62,0 ± 6,1 (129/208) ^{Aa*}	49,0 ± 4,5 (103/210) ^{Ab*}
α -MEM ⁺ + CT	66,3 ± 3,7 (154/232) ^{Aa*}	69,1 ± 2,1 (142/204) ^{Ba*}
α -MEM ⁺ + SFB	68,0 ± 3,8 (170/250) ^{Aa*}	48,1 ± 5,9 (106/220) ^{Ab*}
α -MEM ⁺ + CT + SFB	65,6 ± 6,9 (153/233) ^{Aa*}	54,4 ± 8,3 (116/213) ^{Ab*}

*Diferem significativamente do controle não cultivado (P < 0,05). ^{AB} Diferem entre os tratamentos dentro do mesmo período de cultivo (P < 0,05). ^{ab}Diferem entre os períodos de cultivo dentro do mesmo tratamento (P < 0,05).

Tabela 2. Estimativa de folículos pré-antrais normais após 7 dias de cultivo no tratamento tecido ovariano co-cultivado com células-tronco em α -MEM⁺ (α -MEM⁺ + CT) em relação aos demais tratamentos: tecido ovariano cultivado em meio controle (α -MEM⁺); tecido ovariano cultivado em α -MEM⁺ suplementado com SFB (α -MEM⁺ + SFB); e tecido ovariano co-cultivado com célula-tronco em α -MEM⁺ + SFB (α -MEM⁺ + CT + SFB).

Normais (Dia 7)	Odds Ratio (IC 95%)	Valor de P
α -MEM ⁺ +CT x α -MEM ⁺ 69,1% x 49,0%	2,3 (1,5-1,4)	0,0001
α -MEM ⁺ +CT x α -MEM ⁺ +SFB 69,1% x 48,1%	2,4 (1,6-3,5)	0,0001
α -MEM ⁺ +CT x α -MEM ⁺ +CT+SFB 69,1% x 54,45%	1,8 (1,2-2,7)	0,0029

IC (95%)=Intervalo de confiança 95%.

3.2 Desenvolvimento folicular

As porcentagens de folículos pré-antrais primordiais e em desenvolvimento (transição, primário e secundário) no controle não cultivado e nos tratamentos cultivados por 1 e 7 dias estão indicados na Figura 2. Após 7 dias de cultivo o percentual de folículos primordiais foi significativamente reduzido em todos os tratamentos (Figura 2A) concomitante com o aumento do percentual de folículos em desenvolvimento em relação ao controle não cultivado (Figura

2B). Além disso, a adição de SFB na ausência ou presença de células-tronco não afetou o percentual de folículos em desenvolvimento. Entretanto o tratamento α -MEM⁺ + CT apresentou uma taxa de folículos em desenvolvimento maior que o α -MEM⁺ + CT + SFB. A estimativa dada pela análise *odds ratio* evidenciou que a chance de folículos pré-antrais co-cultivados no tratamento α -MEM⁺ + CT apresentarem maior taxa de ativação foi significativamente superior em relação ao tratamento α -MEM⁺ ($P < 0,05$), não apresentando diferença em relação aos tratamentos α -MEM⁺ + SFB e α -MEM⁺ + CT + SFB ($P > 0,05$) (Tabela 3).

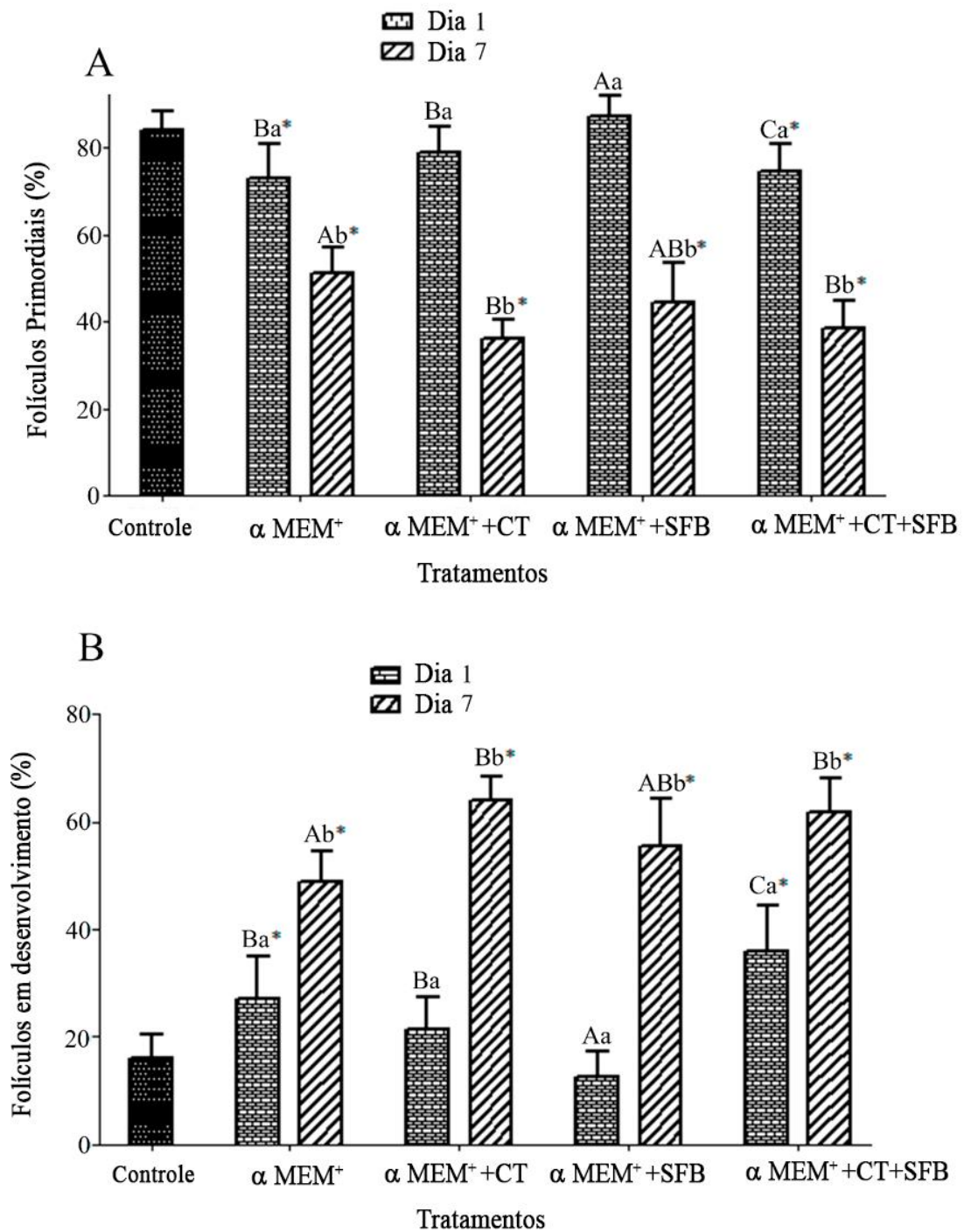


Figura 2. Percentual (média \pm DP) de folículos (A) primordiais e em (B) desenvolvimento (intermediário, primário e secundário) no controle não cultivado (tecido não cultivado) e após 1 ou 7 dias nos tratamentos: tecido ovariano cultivado em α -MEM⁺ suplementado com SFB (α -MEM⁺ + SFB); tecido ovariano co-cultivado com células-tronco em α -MEM⁺ (α -MEM⁺ + CT); e tecido ovariano co-cultivado com célula-tronco em α -MEM⁺ + SFB (α -MEM⁺ + CT + SFB). *Os valores diferem significativamente dos controles não cultivados ($P < 0,05$). ^{a, b} Diferem entre dias de cultivo dentro do mesmo tratamento ($P < 0,05$). ^{A, B, C} Diferem entre os tratamentos dentro do mesmo dia ($P < 0,05$).

Tabela 3. Estimativa de folículos pré-antrais ativados após 7 dias de cultivo no tratamento tecido ovariano co-cultivado com células-tronco em α -MEM⁺ (α -MEM⁺ + CT) em relação aos demais tratamentos: tecido ovariano cultivado em meio controle (α -MEM⁺); tecido ovariano cultivado em α -MEM⁺ suplementado com SFB (α -MEM⁺ + SFB); e tecido ovariano co-cultivado com célula-tronco em α -MEM⁺ + SFB (α -MEM⁺ + CT + SFB).

% Ativação (Dia 7)		Odds Ratio (IC 95%)	Valor de P
α -MEM ⁺ +CT	x α -MEM ⁺	2,0 (1,2-1,3)	0,010
63,8%	46,6%		
α -MEM ⁺ +CT	x α -MEM ⁺ +SFB	1,2 (0,7-2,0)	0,567
63,8%	59,4%		
α -MEM ⁺ +CT	x α -MEM ⁺ +CT+SFB	1,2 (0,7-1,9)	0,558
63,8%	59,5%		

IC (95%)= Intervalo de Confiança 95%

Os resultados dos diâmetros foliculares e oocitários estão mostrados na Tabela 4. Não houve diferenças significativas nos diâmetros dos folículos cultivados em todos os tratamentos testados, quando comparados ao controle não cultivado. Após 7 dias de cultivo, foi observado que o tratamento α -MEM⁺ + CT + SFB reduziu o diâmetro folicular em relação ao tratamento α -MEM⁺ + CT. Com relação ao diâmetro oocitário, apenas o tratamento α -MEM⁺ + CT + SFB apresentou aumento significativo entre o dia 1 e o dia 7.

Tabela 4. Diâmetro folicular e oocitário de cabras (média±DP) no controle não cultivado (tecido não-cultivado) e após 1 ou 7 dias de cultivo nos tratamentos: tecido ovariano cultivado em meio controle (α -MEM⁺); tecido ovariano cultivado em α -MEM⁺ suplementado com SFB (α -MEM⁺ + SFB); tecido ovariano co-cultivado com células-tronco em α -MEM⁺ (α -MEM⁺ + CT); e tecido ovariano co-cultivado com célula-tronco em α -MEM⁺ + SFB (α -MEM⁺ + CT + SFB).

Tratamentos	Diâmetro folicular (μ m)		Diâmetro oocitário (μ m)	
	Day 1	Day 7	Day 1	Day 7
Controle (D0)	33,97±0,81		25,05± 0,53	
α -MEM ⁺	35,44±1,01 ^{Aa}	33,16±0,84 ^{ABa}	25,56±0,71 ^{Ba}	25,32±0,51 ^{Aa}
α -MEM ⁺ +CT	33,99±0,84 ^{Aa}	35,09±0,93 ^{Ba}	24,63±0,56 ^{Ba}	25,61±0,60 ^{Aa}
α -MEM ⁺ +SFB	33,54±0,89 ^{Aa}	34,08±0,92 ^{ABa}	25,58±0,65 ^{Ba}	24,97±0,51 ^{Aa}
α -MEM ⁺ +CT+SFB	33,56±0,90 ^{Aa}	31,64±0,79 ^{Aa}	22,51±0,54 ^{Aa*}	24,34±0,45 ^{Ab}

Diâmetro folicular: ^{A,B} diferem entre os tratamentos dentro do mesmo dia de cultivo (P < 0,05) ^{a,b} diferem entre os dias de cultivo dentro do mesmo tratamento (P > 0,05); Diâmetro do oócito: ^{A,B} diferem entre os tratamentos dentro do mesmo dia de cultivo (P < 0,05); ^{a,b} diferem entre os dias dentro do mesmo tratamento (P < 0,05)

* Difere do controle não cultivado (P < 0,05)

3.4 Detecção de proliferação celular por marcador PCNA

A proliferação das células da granulosa foi confirmada por imunolocalização de antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). Os dados mostraram marcação positiva de PCNA em células da granulosa de folículos primordiais e em desenvolvimento (Fig. 3). Independente do tratamento cultivado, observou-se uma redução ($p < 0,05$) no percentual de células da granulosa PCNA-positivas quando comparado ao controle não cultivado (Tabela 6). Entretanto, quando os grupos cultivados foram comparados entre si, a porcentagem de proliferação de células granulosas PCNA-positivas foi significativamente maior no tratamento α -MEM⁺ + CT (41,5%). Vale salientar que a adição de SFB ao meio de cultivo contendo células-tronco reduziu ($p < 0,05$) o percentual de células da granulosa PCNA-positivas.

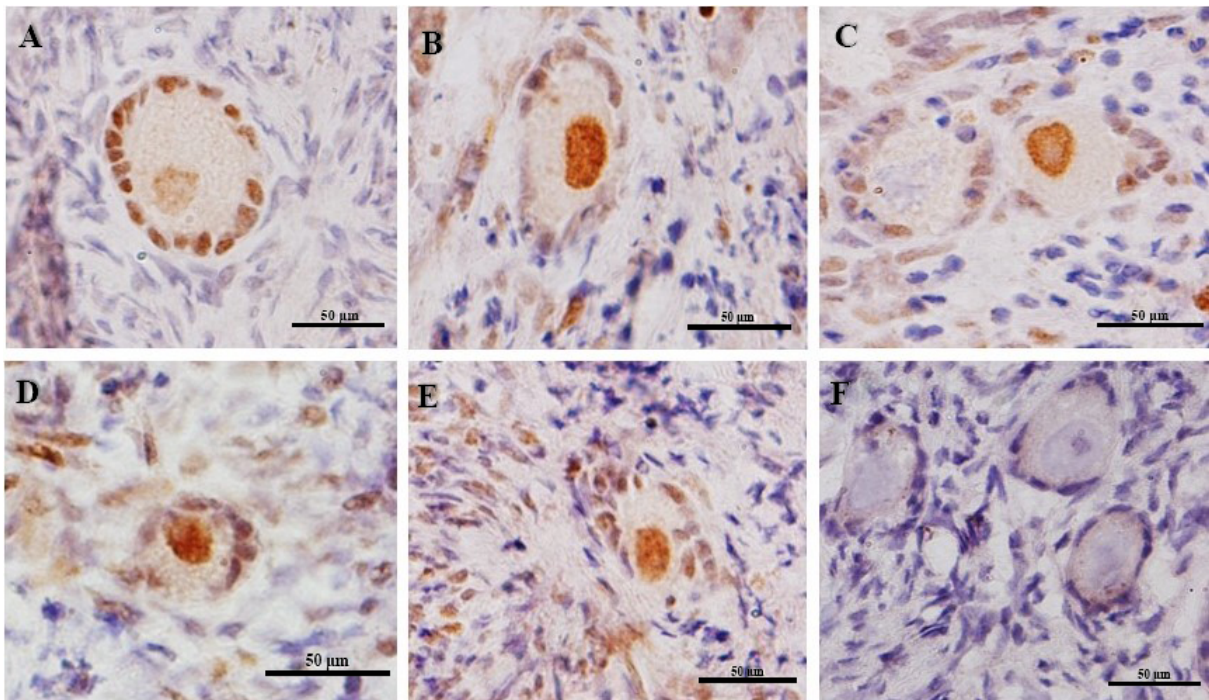


Figura 3. Imunomarcção para PCNA no tecido ovariano. Secções transversais representativas do controle não cultivado (tecido não-cultivado) (A) e tecido cultivado por 7 dias nos tratamentos: tecido ovariano cultivado em meio controle (α -MEM⁺) (B); tecido ovariano co-cultivado com células-tronco em α -MEM⁺ (α -MEM⁺ + CT) (C); tecido ovariano cultivado em α -MEM⁺ suplementado com SFB (α -MEM⁺ + SFB) (D); tecido ovariano co-cultivado com célula-tronco em α -MEM⁺ + SFB (α -MEM⁺ + CT + SFB) (E) e controle negativo (F). Células da granulosa marcadas em marrom representam marcação positiva para PCNA. Barras de 50 μ m.

Tabela 5. Percentual de marcação para PCNA em folículos pré-antrais no tecido ovariano não cultivado (tecido não-cultivado) e tecido cultivado por 7 dias nos tratamentos: tecido ovariano cultivado em meio controle (α -MEM⁺), tecido ovariano co-cultivado com células-tronco em α -MEM⁺ (α -MEM⁺ + CT), tecido ovariano cultivado em α -MEM⁺ suplementado com SFB (α -MEM⁺ + SFB); e tecido ovariano co-cultivado com célula-tronco em α -MEM⁺ + SFB (α -MEM⁺ + CT + SFB).

Tratamentos	Marcação positiva para PCNA (%)
Controle não cultivado	56.2 (309/549) ^D
α -MEM ⁺	12.1 (10/82) ^A
α -MEM ⁺ + CT	41.5 (101/243) ^C
α -MEM ⁺ + SFB	20.2 (18/89) ^{AB}
α -MEM ⁺ + CT + SFB	24.1 (22/91) ^B

^{ABCD} na coluna (P < 0,05).

3.5 Viabilidade das CTM-GW após co-cultivo

As médias de viabilidade celular após 7 dias de co-cultivo nos tratamentos α -MEM⁺ + CT e α -MEM⁺ + CT + SFB foram respectivamente de 82,06% e 77,34%, não apresentando diferença estatística.

4. Discussão

Neste estudo, foi avaliado pela primeira vez o efeito das CTM-GW sobre o cultivo *in vitro* de folículo ovariano pré-antral de cabra, na presença e ausência de SFB. Esse componente é frequentemente utilizado na suplementação do meio de cultivo de CTM e outras aplicações em cultivo celular (Van der Valk et al., 2018). O SFB já foi relatado como opção de suplementação de meio de cultivo para melhoria da sobrevivência e desenvolvimento *in vitro* de folículo ovariano pré-antral (Rodrigues et al., 2010). No entanto, Telfer et al. (2000) e Park et al. (2016) citam que o SFB possui composição complexa, ainda não totalmente compreendida, e os efeitos da sua adição aos meios de cultivo de folículo ovariano pré-antral são controversos, o que dificulta a otimização e padronização dos sistemas de cultivo folicular.

A adição de SFB no meio de cultivo não influenciou positivamente o percentual de folículos morfológicamente normais e a ativação folicular de cabras. Por outro lado, as CTM-GW permaneceram viáveis, independente da adição deste ao final do co-cultivo, não interferindo, portanto, na sua sobrevivência. Thomas et al. (2001), demonstraram que o SFB não

influenciou na qualidade dos folículos pré-antrais bovinos e sua sobrevivência foi melhorada em um sistema de cultivo livre de soro.

Em relação à morfologia folicular, foi constatado que, ao final de 7 dias, o co-cultivo com as CTM-GW em meio livre de soro (α -MEM⁺ + CT), aumentou o percentual de folículos morfologicamente normais em relação aos demais tratamentos. Xia et al. (2015) ao investigarem o efeito das CTM da medula óssea no crescimento de folículo ovariano pré-antral humano também observaram um aumento no percentual de sobrevivência folicular após um cultivo de 8 dias com alta ($0,5 \times 10^5$) densidade de CTM da medula óssea. Os dados apresentados neste estudo reforçam que as CTM-GW influenciam positivamente na sobrevivência folicular em caprinos promovendo a sua integridade em fragmentos de tecido ovariano após 7 dias de cultivo.

Os percentuais de folículos primordiais e em desenvolvimento foram avaliados em conjunto, haja vista que estes parâmetros são complementares. Neste estudo, após 7 dias de cultivo todos os tratamentos aumentaram a taxa de ativação folicular em relação ao controle, pois houve redução na porcentagem de folículos primordiais com concomitante aumento de folículos em desenvolvimento. No tratamento α -MEM⁺ + CT, a presença das CTM-GW melhorou a ativação em relação ao tratamento α -MEM⁺ ($P > 0,05$). A manutenção da dormência e a ativação de folículos primordiais, são controladas por ações coordenadas de biomoléculas supressoras ou ativadoras, em uma comunicação bidirecional entre as células somáticas e as vias de sinalização no oócito. Muitos fatores de crescimento e vias de sinalização têm sido identificados e a superfamília TGF-B exerce uma importante função na foliculogênese inicial (kim, 2012). Foi relatado que as CTM secretam moléculas bioativas como fator de crescimento transformante $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) e fator de crescimento de hepatócitos (HGF) (Uccelli et al., 2008). Xia et al. (2015) observaram que a expressão de GDF9 e BMP15 em oócitos, bem como TGF-b1 em células da granulosa foi maior em co-cultivo com alta densidade de célula-tronco, indicando que estes fatores podem ser secretados pelas células-tronco, e desempenham papel importante no desenvolvimento de folículos pré-antrais. Neste estudo, a análise *odds ratio* reforça que a presença de células-tronco contribui de maneira positiva na ativação de folículos ovarianos pré-antrais caprinos.

Em relação ao diâmetro, os tratamentos testados, mantiveram os diâmetros folicular e oocitário de forma semelhantes ao controle. Entretanto, após 7 dias, o co-cultivo com CTM resultou em um diâmetro folicular superior ao co-cultivo de CTM na presença de SFB. Itoh e Hoshi (2000), mostraram que folículos ovarianos pré-antrais isolados de vacas, cultivados por mais de 30 dias, aumentaram o diâmetro folicular quando co-cultivados com CTM derivadas

do ovário em meio isento de soro. Com relação à suplementação com SFB no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, Bruno et al. (2008) não constataram aumento no diâmetro folicular na presença de 10% SFB no meio de cultivo com relação ao controle. Estes autores verificaram que a suplementação de SFB ou de outras origens, como da cabra em estro, foi prejudicial ao desenvolvimento folicular, com alterações ultraestruturais no oócito, indicando sinais de atresia. Este fato, pode estar relacionado às concentrações inadequadas de substâncias envolvidas na regulação do desenvolvimento folicular presentes no SFB.

A imunomarcação do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) é comumente utilizada em estudos relacionados ao desenvolvimento folicular *in vitro* (Rocha et al., 2016; Sá et al., 2018). Nesta análise, a porcentagem de células da granulosa PCNA-positivas no tratamento α -MEM⁺ + CT foi superior aos demais tratamentos. No entanto, em relação ao controle não cultivado, todos os tratamentos reduziram a porcentagem de células da granulosa PCNA-positivas. Esta redução na proliferação celular, não afetou as taxas de ativação folicular observadas nos tratamentos cultivados. O co-cultivo com células-tronco mesenquimais pode ter influenciado positivamente na proliferação das células da granulosa através da ativação do Fator de células-tronco (FCT) e o receptor de tirosina quinase (c-kit) concomitante a ativação folicular. Assim como observado por Thuwanut *et al.*(2017) o FCT promove o desenvolvimento folicular aumentando a expressão do mRNA para o c-kit em gatas. Além disso, estudos demonstraram que células-tronco mesenquimais da polpa dentária humana expressam FCT e/ou cKit contribuindo para prevenir a apoptose destas células aumentando a chance de expansão (Gagari et al., 2006) e que células-tronco mesenquimais derivadas de placas coriônicas da placenta expressam mais FCT, sob condições de baixo nível de oxigênio o que pode ajudar a manter sua capacidade de autorrenovação (Lee et al., 2013). Assim, é notório que coexpressão do FCT/ c-kit promove a proliferação celular, diferenciação e recrutamento de células progenitoras em vários sistemas biológicos podendo contribuir para a proliferação das células da granulosa foliculares em sistema de co-cultivo *in vitro*.

Atualmente várias pesquisas vêm sendo realizadas na tentativa de desenvolver sistemas de cultivo capazes de mimetizar *in vitro* as condições ideais para o cultivo de folículos ovarianos pré-antrais em diferentes espécies (menezes et al., 2018; Dipaz-Berrocal et al., 2017; Aguiar et al., 2016). De acordo com Rajabi et al. (2018), o cultivo de folículo ovariano pode ajudar os pesquisadores a avaliar vários aspectos do crescimento e desenvolvimento folicular e o efeito de diferentes componentes e suplementações do meio, podendo subsidiar estudos voltados à preservação da fertilidade. Entretanto, muitas vezes os efeitos desses fatores isoladamente são insuficientes para garantir a integridade folicular, haja vista que os

mecanismos envolvidos na foliculogênese são complexos e envolvem uma série de fatores, o que torna o custo do aprimoramento das técnicas de cultivo elevado (Xu et al., 2011). Assim o uso de CTM surge como uma alternativa viável no campo da tecnologia do ovário artificial podendo oferecer aos folículos um microambiente favorável ao seu desenvolvimento *in vitro*.

Este estudo demonstra pela primeira vez o co-cultivo de CTM-GW com folículo ovariano pré-antral caprino, como alternativa para melhorar a viabilidade folicular, apresentando efeito positivo na ativação, possibilitando sua utilização como agentes de suporte na manutenção de folículos pré-antrais morfológicamente intactos. Há relatos que a utilização do meio condicionado derivado de CTM-GW de ovinos, especialmente quando associado a α -MEM, melhora o crescimento de folículos secundários isolados após cultivo de curto prazo, sem afetar a retomada da meiose *in vitro* (Bezerra et al., 2019). Diante disso, é notório que as CTM-GW têm potencial para melhorar as condições de cultivos foliculares, contribuindo para preservação da fertilidade de cabras. Ademais, apresentam importantes aplicações biotecnológicas devido ao seu potencial de utilização em ovários humanos e para o aperfeiçoamento de outras biotécnicas reprodutivas.

5. Conclusão

O sistema de co-cultivo de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano associado a CTM-GW caprino, melhora a taxa de ativação e mantém a sobrevivência folicular, exercendo uma influência positiva na proliferação de células da granulosa após 7 dias em cultivo.

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., Rodrigues, A.P.R., Gastal, M.O., Gastal, E.L., Figueiredo, J.R., 2016. Insulin improves *in vitro* survival of equine preantral follicles enclosed in ovarian tissue and reduces reactive oxygen species production after culture. *Theriogenology*. 85:1063-1069.

Arno, A.I., Amini-Nik, S., Blit, P.H., Al-Shehab, M., Belo, C., Herer, E., Tien, C.H., Jeschke, M.G., 2014. Human Wharton's jelly mesenchymal stem cells promote skin wound healing through paracrine signaling. *Stem Cell Research & Therapy*. 5:1-28.

Bezerra, M.E.S., Monte, A.P.O., Barberino, R.S., Lins, T.L.B.G., Oliveira Junior, J.L., Santos, J.M.S., Bezerra, D.O., Neves, C.A., Silva, G.C., Carvalho, M.A.M., Matos, M.H.T., 2019. Conditioned medium of ovine Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells improves growth and reduces ROS generation of isolated secondary follicles after shorter term *in vitro* culture *Theriogenology*. 125:56-63.

Bruno, J.B., Lima-Verde, I.B., Martins, F.S., Matos, M.H.T., Lopes, C.A.P., Maia-Jr, J.E, Bao, 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 histologica, ultra-estrutural e produção de nitrito de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro* na ausência ou presença de soro. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 60:1329-1337.

Cardoso, T.C., Okamura, L.H., Baptistella, J.C., Gameiro, R., Ferreira, H.L., Marinho, M. Flores, E.F., 2017. Isolation, characterization and immunomodulatory-associated gene transcription of Whartons jelly-derived multipotent mesenchymal stromal cells at different trimesters of cow pregnancy. Cell Tissue Res. 367:243-256.

Chaves, R.N., Alves, A.M.C.V., Faustino, L.R., Oliveira, K.P.L., Campello, C.C., Lopes, C.A.P., Bao, S.N., Figueiredo, J.R., 2011. How the concentration of insulin affects the development of preantral follicles in goats. Cell and tissue research. 346:451-456.

Dipaz-Berrocal, D.J., Sa, N.A.R., Guerreiro, D.D., Celestino, J.J.H., Leiva-Revilla, J., Alves, B.G., Alves, K.A., Santos. R.R., Cibind, F.W.S., Rodrigues, A.P.R., Figueiredo, J.R., 2017. Refining insulin concentrations in culture medium containing growth factors BMP15 and GDF9: An *in vitro* study of the effects on follicle development of goats. Animal Reproduction Science. 185:118–127.

Drela, K., Lech, W., Figiel-Dabrowska, A., Zychowicz, M., Mikula, M., Sarnowska, A., Domanska-Janik, k., 2016. Enhanced neuro-therapeutic potential of Wharton’s Jelly-derived mesenchymal stem cells in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells culture. Cytotherapy. 18:497–509.

Egger, D., Tripisciano, C., Weber, V., Dominici, M., Kasper, C., 2018. Review Dynamic Cultivation of Mesenchymal Stem Cell Aggregates. Bioengineering. 5:1-15.

Figueiredo, J.R., Celestino, J.J.H., Faustino, L.R., Rodrigues, A.P.R., 2011. *In vitro* culture of caprine preantral follicles: advances, limitations and prospects. Small Ruminant Res. 98:192-195.

Gagari, E., Rand, M.K., Tayari, L., Vastardis, H., Sharma, P., Hauschka, P.V., Damoulis, P.D., 2006. Expression of stem cell factor and its receptor, c-kit, in human oral mesenchymal cells. European journal of oral sciences. 114:409-415.

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*. *In vitro Cellular e Developmental Biology - Animal*, 36: 235-240.

Heidari, M., 2011. Effect of Fibroblast Co-culture on *In vitro* Maturation and Fertilization of Mouse Preantral Follicles. Royan Institute. Int J Fertili Steril; 5:1-8.

Herta, A.C., Lolicato, F., Smitz, J. E. J., 2018. *In vitro* follicle culture in the context of IVF. Reproduction. 156:59–73.

Hikabe, O., Hamazaki, N., Nagamatsu, G., Obata, Y., Hirao, Y., Hamada, N., Hayashi, K., 2016. Reconstitution *in vitro* of the entire cycle of the mouse female germ line. Nature. 539:7628-299.

Kim, J. Y. 2012. Control of ovarian primordial follicle activation. *Clinical and experimental reproductive medicine*, 39(1), 10-14.

Lee, Y., Jung, J., Cho, K.J., Lee, S.K., Park J.W., Oh, I.H., Kim, G.J., 2013. Increased SCF/c-kit by hypoxia promotes autophagy of human placental chorionic plate-derived mesenchymal stem cells via regulating the phosphorylation of mTOR. *Journal of cellular biochemistry*. 114:79-88.

Leow, S.N., Luu, C.D., Nizam, M.H., Mok, P.L., Ruhaslizan, R., Wong, H.S., Bastion, M.L.C., 2015. Safety and efficacy of human Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells therapy for retinal degeneration. *Plos One*.10: 1-20.

Loetchutinat, C., Kothan, S., Dechsupa, S., Meesungnoen, J., Jaygerin, J.P., Mankhetkorn, S., 2005. Spectrofluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate assay. *Radiation Physics and Chemistry*. 72:323–31.

Menezes, V.G., Barberino, R.S., Gouveia, B.B., Gonçalves, R.J.S., Almeida, J.R.G.S., Matos, M.H.T., 2018. Extract of *Amburana cearensis* maintains the survival of ovine preantral follicles during long-term ovarian tissue transport and promotes primordial follicle activation after *in vitro* culture. *Semina: Ciências Agrárias*. 39:2001-2016.

Park, Y.H., Gong, S.P., Kim, H., Young, K., Gil, A., Choi, J.H., Ahn, J.Y., Lim, J.M. 2013. Development of a Serum-Free Defined System Employing Growth Factors for Preantral Follicle Culture. *Molecular Reproduction e Development*, 80:725–733.

Rajabi, Z., Yazdekhashti, H., Mugahi, S.M.H.N., Abbasi, M., Kazemnejad, S., Shirazi, A., Zarnani, A.H., 2018. Mouse preantral follicle growth in 3D co-culture system using human menstrual blood mesenchymal stem cell. *Reproductive biology*. 18:122-131.

Rocha, R.M.P., Lima, L.F., Carvalho, A.A., Chaves, R.N., Bernuci, M.P., Rosa-e-Silva, A.C.J.S., Rodrigues, A.P.R., Campello, C.C., Figueiredo, J.R., 2016. Immunolocalization of the Anti-Mullerian Hormone (AMH) in Caprine Follicles and the Effects of AMH on *In vitro* Culture of Caprine Pre-antral Follicles Enclosed in Ovarian Tissue. *Reprod Dom Anim* 51, 212–219.

Rodrigues, G.Q., Silva, C.M.G., Faustino, L.R., Bruno, J.B., Magalhães, D.M., Campello, C.C., Figueiredo, J.R. 2010. Bovine serum albumin improves *in vitro* development of caprine preantral follicles. *Animal Reproduction*; 7:382-388.

Rodriguez-Wallberg, K.A., Tanbo, T., Tinkanen, H., Thurin-Kjellberg, A., Nedstrand, E., Kitlinski, M.L., Macklon, K.T., Ernst, E., Fedder, J., Tiitinen, A., Morin-Papunen, L., Einarsson, S., Jokimaa, V., Hippelainen, M., Lood, M., Gudmundsson, J., Olofsson, J.I., Andersen, C.Y., 2016. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation among alternatives for fertility preservation in the Nordic Countries—compilation of 20 years of multicenter experience. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 95:1015–1026.

Rodriguez-Wallberg, K.A., Oktay, K., 2010. Fertility preservation medicine: options for young adults and children with cancer. *J Pediatr Hematol Oncol*. 32:390-6.

Seo, B.F., Jung, S.N., 2016. The Immunomodulatory Effects of Mesenchymal Stem Cells in Prevention or Treatment of Excessive Scars Hindawi Publishing Corporation Stem Cells International. 2016:1-8.

Sá, N.A.R., Bruno, J.B., Guerreiro, D.D., Cadenas, J., Alves, B.G., Cibin, F.W.S., Leal-Cardoso, J.H., Gastal, E.L., Figueiredo, J.R., 2018. Anethole reduces oxidative stress and improves *in vitro* survival and activation of primordial follicles. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 51(8): e 7129.

Silva, C.G.D., Martins, C.F., Cardoso, T.C., Cunha, E.R.D., Bessler, H.C., McManus C.M., Pivato, I., Bão, S.N., 2016. Isolation and characterization of mesenchymal stem cells derived from bovine Wharton's jelly and their potential for use in cloning by nuclear transfer. Ciência Rural. 46: 1830-1837.

Silva, G.C., 2016. Células tronco da geléia de wharton do cordão umbilical de caprinos (*Capra hircus*): protocolos de isolamento e caracterização. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Coordenadoria de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí. 1-49.

Silva, J.R.V., Hurk, V.D., Costa, S.H.F., Andrade, E.R., Nunes, A.P.A., Ferreira, F.V.A., Lôbo, R.N.B., Figueiredo, J.R., 2004. Survival and growth of goat primordial follicles after *in vitro* culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. Anim Reprod Sci. 81: 273–86.

Telfer, E.E., Binnie, J.P., McCaffery, F.H., Campbell, B.K., 2000. *In vitro* development of oocytes from porcine and bovine primary follicles. Molecular and cellular endocrinology. 163:117-123.

Thomas, F.H., Leask, R., Srsen, V., Riley, S.C., Spears, N., Telfer E.E., 2001. Effect of ascorbic acid on health and morphology of bovine preantral follicles during long-term culture. Reproduction. 122:487–495.

Thuwanut, P., Comizzoli, P., Wildt, D.E., Keefer, C.L., Songsasen, N., 2017. Stem cell factor promotes *in vitro* ovarian follicle development in the domestic cat by upregulating c-kit mRNA expression and stimulating the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway. Reproduction, Fertility and Development. 29: 1356-1368.

Uccelli, A., Moretta, L., Pistoia, V., 2008. Mesenchymal stem cells in health and disease. Nature reviews immunology. 8: 726.

Van der Valk, J., Bieback, K., Buta, C., Cochrane, B., Dirks, W.G., Fu, J., Hickman, J.J., Hohensee, C., Kolar, R., Liebsch, M., Pistollato, F., Schulz, M., Thieme, D., Weber, T., Wiest, J., Winkler, S., Gstraunthaler, G., 2018. Fetal bovine serum (FBS): past–present–future. ALTEX-Alternatives to animal experimentation. 35: 99-118.

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. Reproductive Sciences. 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. *Human Reproduction*. 26:1061-1072.

Yan, M., Sun, M., Zhou, Y., Wang, W., He, Z., Tang, D., Lu, S., Wang, X., Li, S., Wang, W., Li, H. 2013. Conversion of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Wharton's Jelly to Dopamine Neurons Mediated by the Lmx1a and Neurturin *In vitro*: Potential Therapeutic Application for Parkinson's Disease in a Rhesus Monkey Model. *PlosOne*. 8:1-17.

CAPÍTULO II

Manuscrito a ser submetido ao periódico Journal of Ovarian Research – ISSN: 0093-691X,
Fator de Impacto: 2.136 (2017)

CAPÍTULO II

Crescimento de folículos pré-antrais isolados de ovários caprinos em sistema de co-cultivo *in vitro* com células-tronco mesenquimais

R.P. Sousa, M.A.M. Carvalho

Resumo

O cultivo de folículos isolados é atualmente o principal método usado para desenvolver folículos maduros *in vitro*. Fatores secretados por células-tronco mesenquimais (CTM) já foram apontados como promotores do crescimento de folículos pré-antrais. Este estudo tem como objetivo avaliar o efeito das células-tronco mesenquimais da geleia de Wharton (CTM-GW) em folículos pré-antrais secundários e na maturação *in vitro* de oócitos caprinos. Os folículos secundários foram isolados e distribuídos em dois tratamentos: folículos ovarianos cultivados na ausência (controle) ou presença de células-tronco. Os folículos foram cultivados em placas de 24 poços com *insert* durante 18 dias, sendo 2 folículos por poço, com troca parcial do meio a cada dois dias e nos dias 6 e 18 coletados para dosagem hormonal. Após cultivo, foram avaliadas a morfologia e taxas de crescimento folicular, formação de antro, produção de estradiol (E2), progesterona (P4) e Glutathiona reduzida (GSH), bem como as taxas de viabilidade e de maturação oocitária. O tratamento com células-tronco foi o único que apresentou um aumento significativo e progressivo no diâmetro folicular ao longo do cultivo bem como mostrou maior ($P < 0,05$) taxa de crescimento folicular diário. Além disso, embora o diâmetro oocitário tenha sido inferior no tratamento com células-tronco, as taxas de retomada da meiose e maturação oocitária foram semelhantes entre os tratamentos. Em conclusão, as CTM-GW tiveram influência positiva na proliferação das células da granulosa contribuindo para o crescimento folicular e o aumento na produção de hormônios esteroides.

Palavras-chave: co-cultivo *in vitro*, folículo pré-antral secundário, células-tronco, caprino

Abstract

Cultivation of isolated follicles is currently the main method used to develop mature follicles *in vitro*. Factors secreted by mesenchymal stem cells (MSC) have been reported as promoters of preantral follicle growth. This study aims to evaluate the effect of Wharton jelly mesenchymal stem cells (WJ-MSC) on secondary preantral follicles and *in vitro* maturation of

goat oocytes. Secondary follicles were isolated and distributed into two treatments: ovarian follicles cultured in the absence (control) or presence of stem cells. The follicles were cultivated in 24-well plates with insert for 18 days, 2 follicles per well, with partial medium change every two days and on days 6 and 18 collected for hormonal dosing. After cultivation, the morphology and rates of follicular growth, antrum formation, estradiol production (E2), progesterone (P4) and reduced glutathione (GSH) were evaluated, as well as viability and oocyte maturation rates. The treatment with stem cells was the only one that showed a significant and progressive increase in follicular diameter throughout cultivation as well as showed higher ($P < 0,05$) daily follicular growth rate. In addition, although oocyte diameter was lower in stem cell treatment, rates of meiosis resumption and oocyte maturation were similar between treatments. In conclusion, WJ-MSC had a positive influence on granulosa cell proliferation contributing to follicular growth and increased production of steroid hormones.

1. Introdução

O crescente interesse pelo desenvolvimento de sistemas de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, evidencia a necessidade de aproveitamento do potencial reprodutivo das espécies e a busca pelo entendimento fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos envolvidos na regulação da foliculogênese [1]. Avanços significativos foram registrados no uso de métodos de cultivo *in vitro* que apoiam o desenvolvimento dos folículos pré-antrais resultando na produção de oócitos capazes de retomar a meiose [2, 3] e a produção de embriões na espécie caprina [4, 5], apresentando melhores índices de crescimento e maturação folicular em camundongos [6], e o nascimento relatado apenas nesta espécie [7, 8]. No entanto, as condições ideais para a manutenção da integridade folicular e conseqüentemente o fornecimento de um grande número oócitos que possam ser utilizados na produção *in vitro* de embriões, ainda são pouco compreendidas.

A grande maioria da população folicular presente nos ovários dos mamíferos é composta por folículos pré-antrais, que embora sejam considerados incompetentes meioticamente, têm potencial para produzir oócitos com capacidade para a utilização em diferentes biotecnias reprodutivas. Entretanto, *in vivo*, esses folículos são frequentemente perdidos por atresia, processo que acomete folículos independente do estágio de desenvolvimento ocasionando a sua morte por degeneração ou apoptose. Haja vista que as taxas de sucesso de oócitos provenientes de folículos antrais são baixas, uma vez que os ovários fornecem um número limitado dessas estruturas, a recuperação folicular a partir do estágio pré-

antral objetiva diminuir a frequência da atresia e, assim, produzir maior número de oócitos capazes de gerar embriões [9]. Assim, dois sistemas de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais são frequentemente utilizados: *in situ*, no qual os folículos permanecem inclusos no tecido ovariano ou o isolado, sendo empregados métodos mecânicos ou enzimáticos de isolamento [10]. O cultivo de folículos isolados é atualmente o principal método usado para desenvolver folículos maduros *in vitro* e destaca-se por permitir uma melhor perfusão dos nutrientes e o acompanhamento individual dos folículos sendo possível estudar principalmente a fase pré-antral tardia da foliculogênese, incluindo o desenvolvimento folicular secundário e antral [3, 7, 11, 12, 13,14)

Na tentativa de buscar alternativas mais eficientes para a substituição de meios de cultivo convencionais, bem como, a suplementação adequada para a manutenção do desenvolvimento folicular e oocitário *in vitro*, as células-tronco mesenquimais (CTM) tem sido testadas para descobrir o possível efeito de suporte destas células no crescimento e desenvolvimento dos folículos pré-antrais, tanto através do desenvolvimento de sistemas de co-cultivo [6], quanto pelo uso de meio condicionado [12]. Estas células são atraentes para a pesquisa devido à sua capacidade de auto-renovação, suas propriedades imunomoduladoras e potencial regenerativo tecidual [15, 16]. Além disso, têm sido utilizadas em uma ampla gama de aplicações e podem ser facilmente obtidas de diferentes fontes como a medula óssea, o tecido adiposo, placenta e o cordão umbilical [17]. Já foi relatado que as CTM podem restaurar a função ovariana e resgatar a fertilidade de camundongos fêmeas após quimioterapia [16] além de contribuir para o desenvolvimento folicular e oocitário o que representa uma estratégia útil para otimização dos sistemas de cultivo *in vitro* [18].

Dentre os fatores secretados pelas CTM, o fator de células-tronco (FCT) já foi apontado como promotor do crescimento de folículos pré-antrais, contribuindo para o aumento médio no diâmetro, formação de antro, extrusão de oócitos e retomada meiótica de oócitos [9]. Além disso, foi constatado que estas células fornecem moléculas anti-apoptóticas, como o inibidor da proteína de apoptose ligado ao X, Bcl-xL, Bcl-2 e proteína de choque térmico-32 [19] e antioxidantes como as Peroxirredoxinas (PRDXs) [20]. Adicionalmente, os exossomos (vesículas de membrana) que podem ser derivados de várias linhagens de células-tronco, incluindo CTM são reconhecidos por exercerem efeito parácrino, mediando a microcomunicação célula-célula. Através das suas moléculas como nucleotídeos, proteínas e lipídios bioativos, os exossomos exercem um efeito terapêutico na angiogênese e atividade anti-inflamatória [21] bem como contribuem para o aumento da produção de ATP e diminuição do estresse oxidativo [22].

Considerando o potencial das CTM bem como a sua vasta aplicabilidade, este estudo objetiva investigar o efeito das células-tronco mesenquimais da geleia de Wharton (CTM-GW) na morfologia, crescimento folicular, formação de antro, produção de estradiol (E2), progesterona (P4) e Glutathione reduzida (GSH), bem como as taxas de viabilidade e de maturação oocitária.

2. Materiais e métodos

Este estudo foi conduzido conforme autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Piauí, sob o protocolo 117/15.

2.1. Obtenção das CTM-GW de caprino

As CTM-GW foram isoladas e caracterizadas conforme previamente descrito por Silva [20]. Resumidamente, as células foram isoladas do explante da geleia de Wharton do cordão umbilical de fetos caprinos, submetidas a ensaio de plasticidade, caracterizadas por citometria de fluxo para os anticorpos (CD14, CD45, CD90 e CD105) e, posteriormente, congeladas. Atendendo aos critérios da Sociedade Internacional de Terapia Celular (SITC), as células apresentaram aderência ao plástico, crescimento celular com fases bem definidas, diferenciação celular em linhagens osteogênica, adipogênica e condrogênica, além de expressão CD90 e CD105 e ausência de expressão de CD14 Silva [23]. As amostras de células foram criopreservadas na terceira passagem, com 80% de viabilidade e compunham o banco de células-tronco do Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisas com Células-Tronco (NUPCelt) da Universidade Federal do Piauí, Teresina-PI, Brasil.

As amostras criopreservadas foram transportadas para o Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículo Pré-antrais (LAMOFOPA - Fortaleza/CE - Brasil) onde foram descongeladas em terceira passagem a temperatura ambiente, ressuspensas em meio de cultivo α -MEM (Gibco®, Waltham, MA, USA) contendo SFB a 20%, 1% de L-glutamina (Invitrogen®) e 1% de penicilina-estreptomicina, 1% aminoácidos não-essenciais (Gibco® Life Technologies™ MEM NEAA-100X) e centrifugadas por 10 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspensado em 3ml de meio de cultivo para expansão celular em garrafas de 25cm² e incubadas a 38.5 °C e 5% de CO₂. Após atingirem a confluência de aproximadamente 80%, as células foram tripsinizadas e repicadas para duas placas de 24 poços na concentração de 5x10³ CTM-GW por poço, cultivadas no mesmo meio descrito acima.

2.2 Coleta e transporte dos ovários

Ovários de vinte e cinco cabras adultas cruzadas ($n = 25$) foram coletadas de matadouros locais num total de cinco repetições. Imediatamente após a morte, os ovários foram lavados uma vez em álcool a 70% e duas vezes em MEM com tampão HEPES e 10% de antibiótico penicilina-estreptomicina. Os ovários foram transportados para o laboratório dentro de 1h, em MEM a 4°C [24].

2.3 Delineamento experimental

No laboratório, em condições estéreis, o tecido adiposo e conjuntivo ao redor dos ovários foram removidos. O córtex de cada par ovariano foi dividido em fragmentos de aproximadamente 1 a 2 mm de espessura com lâmina cirúrgica e colocado num meio de suporte consistindo em MEM tamponado com HEPES e antibióticos. Folículos pré-antrais, com aproximadamente 200 μm de diâmetro, visualizados sob um estereomicroscópio (SMZ 64538 Nikon, Tóquio, Japão) foram dissecados manualmente usando agulhas de calibre 26 G. Após o isolamento, os folículos foram transferidos para gotas de 100 μL contendo meio de cultivo sob óleo mineral para avaliar a qualidade folicular. Foram selecionados para cultivo, folículos com um oócito visível que estavam rodeados por duas ou mais camadas de células da granulosa e tinham uma membrana basal intacta e sem cavidade antral. Após a seleção, os folículos foram cultivados em placa de 24 poços com insert, 2 folículos por poço, sendo adicionado 600 μL de meio no poço e 100 μL no insert (6.5 mm, Corning Incorporated, Corning, NY, EUA). O meio de cultivo básico era constituído por α -MEM (pH 7,2-7,4) (Gibco; Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha) suplementado com 3 mg / mL de albumina sérica bovina (BSA), 10 μg / mL de insulina recombinante humana, 5,5 μg / mL de transferrina, 5 ng / mL selênio, 2 mM glutamina, 2 mM hipoxantina, 50 μg /mL ácido ascórbico e 50 μg / mL de gentamicina. Este meio foi denominado aqui de α -MEM⁺ (adaptado de Ferreira et al., [13]). Assim, os folículos ($n=113$) foram distribuídos em dois diferentes tratamentos: folículos ovarianos cultivados na ausência (controle) ou presença de células-tronco (CT). No tratamento com células-tronco após 24h, período adequado para a sua aderência, o meio de crescimento das células foi substituído por 1mL de α -MEM⁺.

O meio foi preparado e pré-equilibrado overnight antes do uso. A cultivo foi realizada a 38,5 ° C, em 5% de CO₂ ao ar durante 18 dias. A cada dois dias, o meio era parcialmente substituído (420 μL) em cada poço e nos dias 6 e 18 o meio era coletado para dosagem hormonal. O experimento foi repetido três vezes em cada tratamento.

2.4 Avaliação do desenvolvimento folicular

Durante e após a cultivo, os folículos foram classificados em três tipos de acordo com suas características morfológicas: folículos extrusados foram caracterizados por terem uma membrana basal rompida; folículos degenerados exibiram um contorno irregular, células escurecidas de oócitos e / ou granulosa e diâmetro reduzido; folículos íntegros e intactos, foram caracterizados como translúcidos com uma membrana basal intacta e rodeados de forma homogênea e brilhante células da granulosa sem sinais de degeneração e extrusão. O diâmetro folicular foi medido apenas nos folículos intactos e calculado a partir da membrana basal, utilizando a média de duas medidas perpendiculares de cada folículo sob um estereomicroscópio (ampliação X100; SMZ 645 Nikon, Tóquio, Japão;) a cada seis dias de cultivo (nos dias 0, 6, 12 e 18). A taxa de crescimento foi calculada dividindo o diâmetro folicular (diâmetro dos folículos viáveis após 18 dias de cultivo menos diâmetro no dia 0) pelo período de cultivo. A formação do antro foi definida como uma cavidade translúcida visível dentro de camadas de células da granulosa [25].

2.5 Ensaio hormonal

Para avaliar a relação entre o desenvolvimento folicular e a produção de estradiol (E2) e progesterona (P4), o meio de cultivo proveniente das trocas dos dias 6 e 18 do cultivo *in vitro* foi coletado e armazenado a -80 °C. A concentração de estradiol e progesterona foi quantificada por imunensaio de quimiluminescência (Immulite 1000-Produtos Diagnósticos, Los Angeles, CA). Resultados altos ou baixos foram repetidos com diluição apropriada de E2 (1:10), (1:30) e (1:100) dependendo do intervalo de calibração. Para P4, não foi necessário fazer diluições.

2.6 Determinação dos níveis de glutathiona reduzida (GSH)

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 [26], em um tubo foi adicionado 100 µL do meio de cultivo e adicionado 80 µL de água destilada e mais 80 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 10%. O material foi agitado e 37 centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos. Em seguida, foi recolhido 100 µL do sobrenadante e acrescido de 200 µL de tampão Tris-HCl 0,4 M, pH 8,9 e mais 5 µL de DTNB 0,01 M e, após 1 minuto de reação, foi feita a leitura em um leitor de placa Elisa (modelo 550, Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). A concentração foi expressa em mg/g de proteína.

2.7 Maturação *in vitro* (MIV)

Após cultivo, folículos viáveis foram cuidadosamente e mecanicamente abertos com agulhas de 26G sob um estereomicroscópio para a recuperação do oócito. Apenas oócitos com citoplasma homogêneo que foram envolvidos por pelo menos uma camada compacta de células do cumulus foram selecionados para MIV. Os complexos cumulus oócitos (CCOs) selecionados para uso neste estudo foram lavados três vezes em meio MIV composto de meio de cultivo de tecidos 199 (TCM 199) suplementado com 1 µg / mL de 17β-estradiol, 5 µg / mL de hormônio luteinizante (LH), 0,5 µg / mL de rFSH, 10 ng / mL de fator de crescimento epidérmico (EGF), 1 mg / mL de BSA, 22 µg / mL de piruvato, 50 ng / mL de fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-I) e 100 µM / L de cisteamina. Após a lavagem, os oócitos foram colocados em 100 µL de meio de maturação sob óleo mineral e incubados durante 32 h a 39 com 5% CO₂ em ar. A taxa de recuperação oocitária foi calculada da seguinte forma: o número total de oócitos além (≥ 110 µm) dividido pelo número total de oócitos selecionados para maturação *in vitro*.

2.8. Avaliação da viabilidade e maturação de oócitos

A avaliação da viabilidade e maturação de oócitos foi realizada por microscopia de fluorescência. Os oócitos foram incubados em 100 µL de PBS suplementado com 2 µM de Ethidium homodímero -1, 4 µM de Calcein-AM (Molecular Probes - LIVE / DEAD Viability / Kit de Citotoxicidade para células de mamífero - L3224, Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha), 5,5 / mL Hoechst 33342 e glutaraldeído a 1%, seguido de incubação a temperatura ambiente durante 30 min. Após incubação, os oócitos foram lavados três vezes em PBS e montados com meio de montagem contendo 5 µg / mL Hoechst 33342. Posteriormente, os oócitos foram examinados sob um microscópio de fluorescência (Nikon, Eclipse 80i, Tóquio, Japão) para análise de coloração fluorescente viva / morta e configuração de cromatina. Os sinais fluorescentes emitidos de calceína-AM e 41 de Etídio Homodímero-1 foram recolhidos a 488 e 568 nm, respectivamente. Oócitos foram considerados vivos se o citoplasma fosse corado positivamente com calceína-AM (verde) e se a cromatina não fosse marcada com etídio homodímero-1 (vermelho). A configuração da cromatina foi avaliada como vesícula germinativa (GV), quebra da vesícula germinativa (GVBD), metáfase I (MI) ou metáfase II (MII). A retomada meiótica foi definida quando um GV estava ausente ou núcleo estava em MII.

2.9 Viabilidade celular

A viabilidade das CTM-GW foi avaliada após 8 e 18 dias de co-cultivo utilizando Azul

de Trypan (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). As CTM-GW foram submetidas à tripsinização com 1,0 mL de tripsina (Gibco® by Life Technologies™, 0,05% Trypsin-EDTA) e incubados a 38,5°C durante três minutos, sendo inativada com acréscimo de 2,0mL de meio α -MEM suplementado. A solução foi centrifugada à temperatura de 20°C e 1.500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado, o pellet ressuscitado em 1,0mL de meio. As células suspensas foram coradas com Azul de Trypan. Após adição de 30 μ L da suspensão celular em 30 μ L da solução de Azul de Trypan (50 μ L de cloreto de sódio 4,25% em 200 μ L de Azul de Trypan), uma alíquota de 10 μ L em Câmara de Neubauer foi observada em microscópio óptico (objetiva de 10x). A porcentagem de viabilidade foi calculada dividindo o número de células viáveis (translúcidas) pelo número total de células e multiplicado por 100.

3.0 Análises estatística

As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa Sigma Plot versão 11 (Systat Software Inc., USA). As variáveis porcentagem de folículos intactos, extrusão, degeneração, formação de antro e retomada de meiose foram analisadas pelos testes qui-quadrado ou exato de Fisher. A comparação de médias (diâmetro folicular e ovocitário, taxa de crescimento, estradiol, progesterona e GSH) foi avaliada pela ANOVA seguido do post-hoc teste de Student-Newman-Keuls ou teste t quando apropriado. Os dados foram apresentados na forma de porcentagem ou média (\pm erro padrão da média) e considerados significativos quando $P < 0,05$ (bilateral).

3. Resultados

3.1 Efeito das CTM-GW na morfologia, degeneração e extrusão dos folículos pré-antrais

Durante o cultivo (dia zero ao dia 18), independente do tratamento, foi observada uma diminuição na porcentagem de folículos intactos (Fig 1A e 2A) e um aumento do percentual de folículos degenerados (Fig 1C e 2B) ($P < 0,05$). A taxa de folículos morfologicamente intactos reduziu de forma significativa no controle do dia 6 ao dia 18, embora não haja diferença estatística comparando os tratamentos dentro do mesmo dia (Fig 2A). Entretanto, maiores percentuais de folículos degenerados foram observados no terceiro terço de cultivo no tratamento com células tronco. Neste caso, observou-se, contudo, uma tendência numérica ($P = 0,06$) de aumento no número de folículos degenerados após 18 dias (Fig 2B). Além disso, menores ($P < 0,05$) taxas de extrusão foram obtidas no tratamento no dia 18 de cultivo (Fig 1B e 2C).

Fig. 1 Morfologia de folículos ovarianos após 18 dias de cultivo *in vitro* (A) Folículo antral normal e (B) Folículo antral extruso cultivados na presença de células-tronco (CT); (C) Folículo degenerado cultivado na ausência de células-tronco (controle).

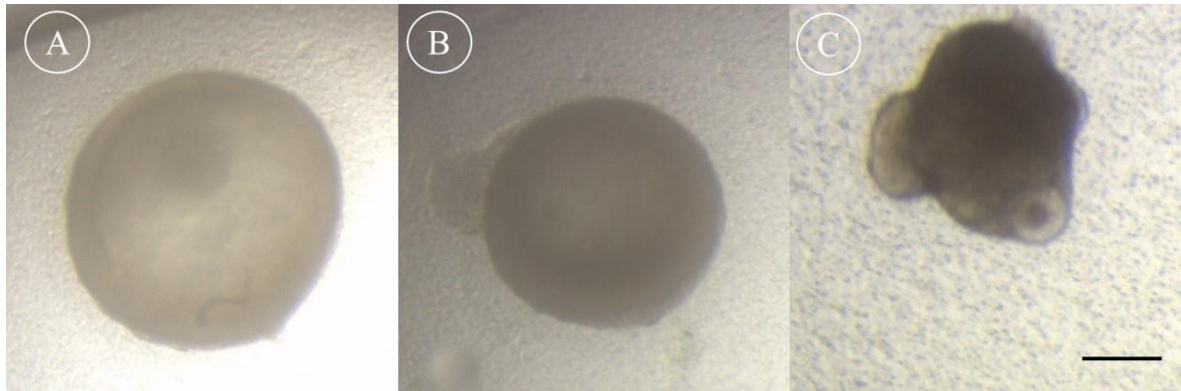
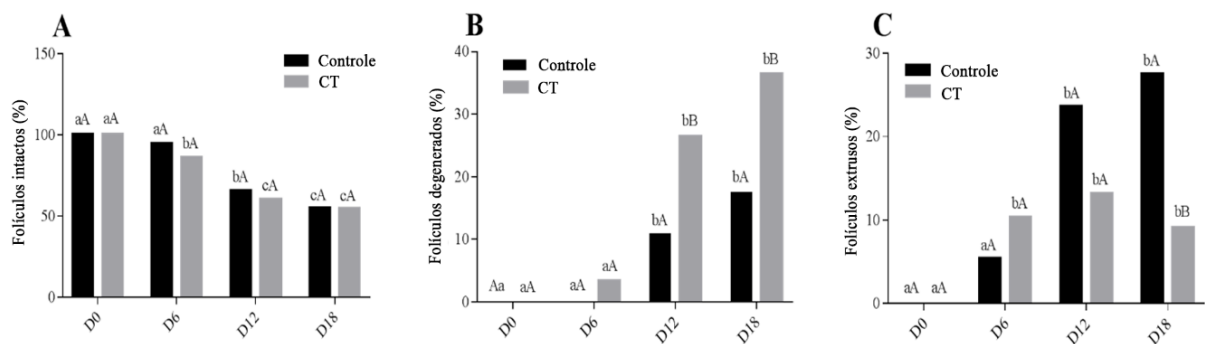


Fig. 2. Percentagem de folículos pré-antrais morfologicamente intactos, degenerados e extrusos cultivados na ausência (controle) ou na presença de células-tronco por 18 dias. Barra 50µm.



A. Folículos morfologicamente intactos ^{a,b,c}Diferem entre os dias ($P < 0,05$); ^AValores indicam que não houve diferença entre tratamentos ($P > 0,05$); **B.** Folículos degenerados ^{a,b}Diferem entre dias ($P < 0,05$); ^{AB}Diferem entre os tratamentos no D12 ($P > 0,05$); ^{A,B} Tendência a diferir no D18 ($P = 0,06$); e **C.** Folículos extrusos ^{a,b}Diferem entre os dias ($P < 0,05$); ^{A,B}Diferem entre os tratamentos ($P < 0,05$). CT: células-tronco e D: dia. Um total de 113 folículos secundários foram distribuídos nos diferentes tratamentos ($n = 3$ repetições).

3.2 Efeito das CTM-GW no crescimento folicular e formação de antro

A tabela 1 mostra os valores médios de diâmetro taxa de crescimento dos folículos cultivados em ambos os tratamentos. O tratamento CT foi o único que apresentou um aumento significativo e progressivo no diâmetro folicular ao longo do cultivo bem como mostrou maior ($P < 0,05$) taxa de crescimento folicular diário. Vale salientar que a taxa de crescimento folicular diária reduziu significativamente do primeiro para o segundo terço de cultivo no tratamento controle. Entretanto, tal redução não foi observada no tratamento CT que apresentou taxas de crescimento semelhante entre os três terços de cultivo (Tabela 2). Além disso, somente no

segundo terço maiores taxas de crescimento folicular foram observadas no CT quando comparado ao controle ($P < 0,05$). Independente do tratamento foi observado um aumento da taxa de formação de antro do dia 0 para ao dia 6 permanecendo inalterada até o dia 18 de cultivo (Tabela 3).

Tabela 1. Diâmetro (\pm SEM) médio (μm) e taxa de crescimento folicular (dia) de folículos pré-antrais caprinos cultivados na ausência ou presença de CTM-GW por 18 dias.

Tratamentos	D0	D6	D12	D18	Taxa de crescimento
Controle (55)	272,9 \pm 5,7 ^{aA}	368,4 \pm 14,4 ^{bA}	380,5 \pm 18,5 ^{bA}	410,1 \pm 25,5 ^{bA}	11,1 \pm 1,5 ^A
CT (58)	300,5 \pm 7,0 ^{aA}	406,1 \pm 18,3 ^{bA}	485,5 \pm 23,9 ^{cB}	598,6 \pm 33,3 ^{dB}	15,3 \pm 2,0 ^B

* a,b,c,d Diferem entre os dias ($P < 0,05$); ^{AB}Diferem entre os tratamentos ($P < 0,05$). Um total de 113 folículos secundários foram distribuídos nos diferentes tratamentos (n=3 repetições)

Tabela 2. Média (\pm SEM) da taxa de crescimento (μm) de folículos pré-antrais de cabras cultivadas na ausência (controle) ou presença de CTM-GW em diferentes intervalos de cultivo folicular *in vitro*.

Tratamentos	Média de crescimento folicular (%)		
	D0-D6	D6-D12	D12-D18
Controle	16,6 \pm 2,6 ^{aA}	1,5 \pm 3,4 ^{bA}	9,2 \pm 3,4 ^{abA}
CT	17,2 \pm 2,8 ^{aA}	19,9 \pm 4,6 ^{aB}	13,9 \pm 3,5 ^{aA}

* a,b Diferem entre os dias ($P < 0,05$); ^{AB}Diferem entre os tratamento ($P < 0,05$). Um total de 113 folículos secundários foram distribuídos nos diferentes tratamentos (n = 3 repetições).

Tabela 3. Percentual de formação de antro de folículos pré-antrais cultivados na ausência (controle) ou presença de CMTGW por 18 dias.

Tratamentos	Formação de antro (%)			
	D0	D6	D12	D18
Controle	(0) 0/55 ^{aA}	(80,0) 44/55 ^{bA}	(87,3) 48/55 ^{bA}	(87,3) 48/55 ^{bA}
CT	(0) 0/58 ^{aA}	(84,5) 49/58 ^{bA}	(86,2) 50/58 ^{bA}	(86,2) 50/58 ^{bA}

^{a,b} Diferem entre os dias ($P < 0,05$); ^ANão difere entre os tratamentos ($P > 0,05$). Um total de 113 folículos secundários foram distribuídos nos diferentes tratamentos (n = 3 repetições)

3.3 Efeito das CTM-GW no crescimento e retomada da meiose de oócitos obtidos dos folículos cultivados *in vitro*

O diâmetro e a configuração da cromatina após MIV de oócitos caprinos oriundos de folículos pré-antrais cultivados por 18 dias estão mostrados na Tabela 9. Embora o diâmetro oocitário tenha sido inferior no tratamento CT, as taxas de retomada da meiose e maturação oocitária foram semelhantes entre os tratamentos.

Tabela 4. Diâmetro médio (\pm SEM) (μ m) de oócitos maturados *in vitro* e taxa de recuperação de oócitos, e estágios meióticos de oócitos de folículos pré-antrais caprinos cultivados com e sem CTM durante 18 dias.

Tratamentos	Nº oócitos maturados <i>in vitro</i>	Média diâmetro oocitário	(%) Retomada da meiose (n/viáveis)	(%) VG (n/viáveis)	(%) QVG (n/viáveis)	(%) MI (n/viáveis)	(%) MII (n/viáveis)
Controle	N=30	94,4 \pm 3,3 ^A	(13,3) 4/30 ^A	(86,6) 26/30 ^A	(0) 0/30 ^A	(10,0) 3/30 ^A	(3,3) 1/30 ^A
CT	N=28	81,2 \pm 1,8 ^B	(14,3) 4/28 ^A	(85,7) 24/28 ^A	(0) 0/28 ^A	(7,1) 2/28 ^A	(7,1) 2/28 ^A

^{AB}Diferem entre colunas ($P < 0,05$).

3.4 Concentrações de estradiol e progesterona no meio de cultivo após cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais de caprinos associados ou não com CTM-GW

Os níveis de produção de E2 no meio de cultivo a partir de folículos ovarianos cultivados com e sem células-tronco estão representadas na Figura 3. Do dia 6, para o dia 18 de cultivo, ambos os tratamentos aumentaram a produção de E2 sendo o aumento mais expressivo no tratamento CT ($P < 0,05$). No entanto, quando comparamos os tratamentos entre si dentro do mesmo dia de cultivo os níveis de produção de E2 foram estatisticamente semelhantes. Além disso, foi observada uma associação positiva na produção diária de E2 em ambos os tratamentos (Figura 3A).

Na figura 3B estão representados os dados da produção de P4 no meio de cultivo a partir de folículos ovarianos cultivados com e sem células-tronco. Após 18 dias de cultivo o tratamento CT foi o único que aumentou significativamente a produção de P4 no meio. Enquanto o controle apresentou redução no intervalo de 6 a 18 dias o tratamento CT influenciou positivamente para o aumento de P4 durante esse intervalo.

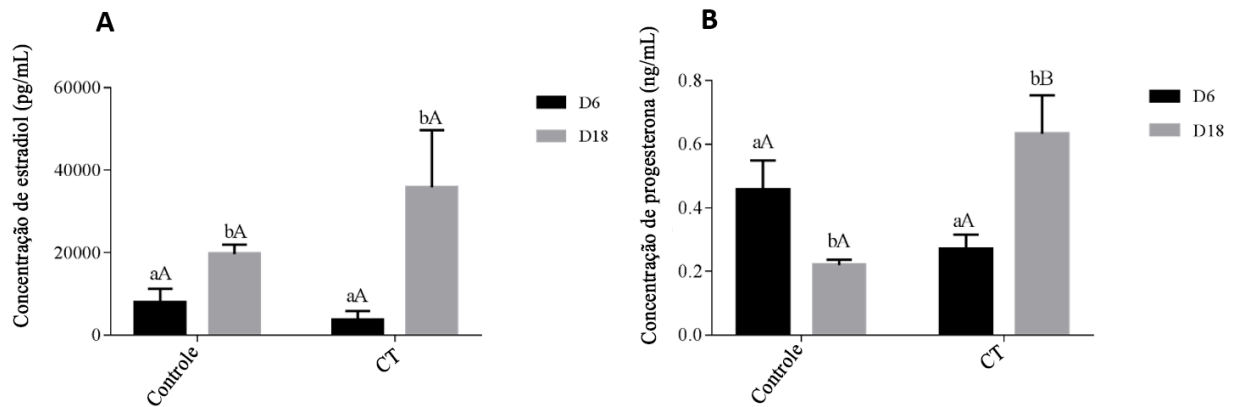


Figura 3. Produção média (\pm SEM) de E2 (pg / mL) e P4 (ng / mL) no meio de cultivo de folículos pré-antrais cultivados com e sem células-tronco. (A) ^{a,b} Difere entre os tratamentos dentro do mesmo período de cultivo ($P < 0,05$). ^A Não difere entre os tratamentos dentro no mesmo períodos de cultivo ($P > 0,05$). (B) ^{a,b} Difere entre os tratamentos dentro do mesmo período de cultivo ($P < 0,05$). ^{A,B} Difere entre os períodos de cultivo dentro do mesmo tratamento ($P < 0,05$).

3.5 Concentração de Glutaciona Reduzida no meio após cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais de caprinos associados ou não com CTM-GW

As concentrações de GSH no meio de cultivo foram semelhantes estatisticamente independente do tratamento e do dia de cultivo (Figura 4).

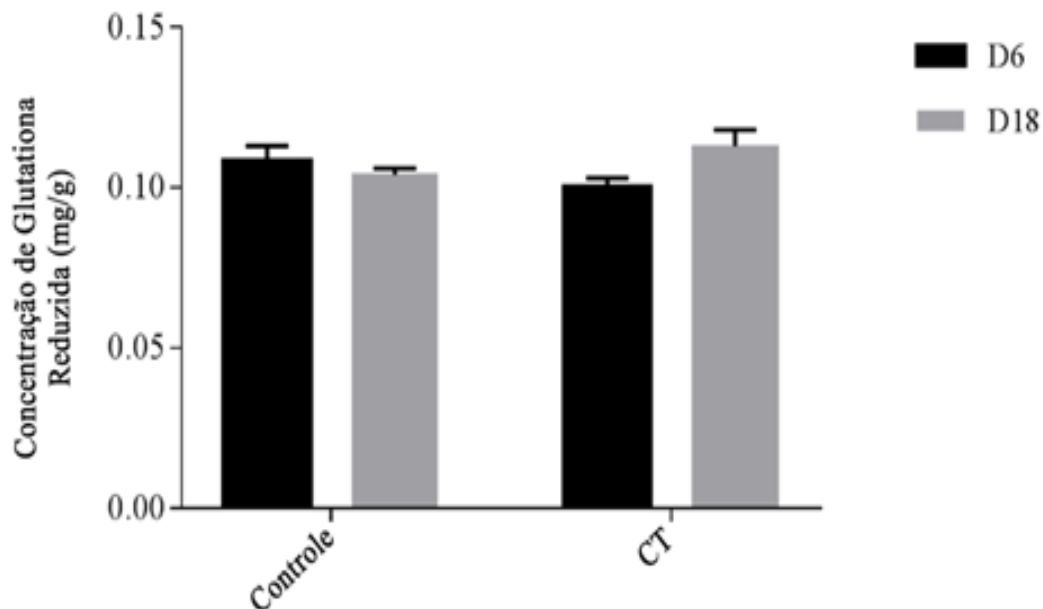


Figura 4. Concentração de Glutaciona Reduzida no meio de cultivo após cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais de caprinos associados ou não com CTM-GW. Não difere entre os tratamentos entre os períodos de cultivo ($P > 0,05$)

3.6 Viabilidade das CTM-GW após co-cultivo

Após 8 e 18 dias de co-cultivo com folículos pré-antrais secundários, as CTM-GW foram avaliadas e apresentaram viabilidade entre 73% e 91%, não sendo, portanto, afetadas pelas condições de cultivo.

4. Discussão

Este estudo constitui o primeiro relato de um sistema de co-cultivo *in vitro* em que células-tronco mesenquimais derivadas da Geleia de Wharton foram utilizadas para apoiar o desenvolvimento de folículos secundários isolados do córtex ovariano caprino por longo período de cultivo. Recentemente, analisamos o efeito do co-cultivo de folículos pré-antrais de cabra envoltos em fragmentos de tecido ovariano com células-tronco mesenquimais de Wharton (CTM-GW) e observamos que esse sistema melhora a taxa de ativação, mantém a sobrevivência de folículos ovarianos pré-antrais iniciais exercendo uma influência positiva na proliferação de células da granulosa após 7 dias de cultivo [27].

Importantes contribuições para o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais foram dadas com o aprimoramento de sistemas em duas dimensões (2D ou sistemas não-esféricos) [4, 5] e tridimensionais (3D ou esféricos) [6, 28,29]. As aplicações dessas técnicas *in vitro* incluem a preservação da fertilidade para humanos, a conservação de animais raros e o desenvolvimento de bancos de oócitos para fins de pesquisa [30]. Nesses estudos, diferentes substâncias, associações e concentrações são frequentemente testadas no meio, na tentativa de resgatar uma grande quantidade de oócitos dos ovários, preservando as estruturas foliculares e a manutenção da competência oocitária. No entanto, os efeitos desses fatores isoladamente são insuficientes para garantir a integridade folicular, bem como a produção de grande número de oócitos capazes de produzir embriões, o que torna o custo do aprimoramento das técnicas de cultivo elevado [31]. Assim, introduzimos um sistema de co-cultivo inovador, que permite a mediação dos produtos secretados entre os tipos celulares sem contato direto célula-célula.

Diferentes linhagens de células-tronco já foram utilizadas como suporte em sistemas tridimensionais de co-cultivo de folículos pré-antrais como as células-tronco mesenquimais do sangue menstrual humano [6], células-tronco mesenquimais da medula óssea humana [18], células-tronco mesenquimais adipoderivadas de camundongos [29]. No entanto, pouco se sabe sobre a real influência dessas células no desenvolvimento folicular bem sucedido.

Quanto a morfologia folicular, as porcentagens de folículos morfologicamente intactos diminuíram no final do período de cultivo, independentemente do tratamento assim como descrito por Sá et al., [3] e Mbemya et al. [14]. Nas nossas condições de cultivo, o percentual de folículos morfologicamente intactos no grupo CT após 12 dias, foi superior (60,4%) ao relatado por Xia et al., [18] que observaram, após 8 dias de co-cultivo com células-tronco, um percentual de sobrevivência folicular de 58,8% e 42,9% em grupos de alta e baixa densidade de CTM. É provável que as CTM-GW tenham secretado fatores de crescimento e / ou proteínas de matriz extracelular que contribuíram para a manutenção do percentual de folículos morfologicamente intactos no terceiro terço de cultivo, no entanto, investigações mais aprofundadas são necessárias para identificar esses fatores e suas funções fisiológicas.

Em relação ao crescimento folicular, os resultados desta pesquisa, sugerem que as células-tronco mesenquimais contribuem para a proliferação das células da granulosa e da teca e conseqüentemente para o crescimento folicular assim como constatado por Green et al. [29], Tomaszewski et al. [32] e por Ramesh et al [33]. É importante destacar que na composição do meio base utilizado, não incluía o FSH e este, tem papel estabelecido na modulação da proliferação de células da granulosa [34]. Outros estudos também mostraram o impacto positivo das células-tronco mesenquimais da medula óssea [18] e do sangue menstrual humano [6] no aumento progressivo do diâmetro folicular, durante o cultivo *in vitro* e conseqüentemente no aumento da sua taxa de crescimento, quando cultivados em matrizes. Com base em estudos anteriores, as CTM podem secretar uma série de fatores, como o kit ligante (KL), ativina A, TGF- β , fator de crescimento endotélio vascular e fator de crescimento de fibroblastos que ativam mecanismos relacionados ao crescimento do folículo pré-antral [9, 18, 31, 35].

O aumento na porcentagem de formação da cavidade antral observado em ambos os tratamentos logo nos seis primeiros dias de cultivo, representa um bom indicativo de funcionalidade folicular [36]. Nos estudos feitos por Rajabi et al. [6], a formação da cavidade antral iniciou por volta do dia 8 de cultivo e a taxa de formação de antro foi maior ($p \leq 0,001$) quando os folículos foram co-cultivados com células-tronco do sangue menstrual humano tanto em esferas de colágeno quanto alginato sugerindo que as matrizes possam ter influenciado positivamente para a manutenção da arquitetura folicular pela ação parácrina das CTM entre as células em sistema de co-cultivo tridimensional (3D). No entanto, alguns autores já relataram que tanto o sistema de cultivo de folículos pré-antrais 2D quanto 3D suportaram de forma similar e satisfatória o desenvolvimento folicular em suas condições de cultivo [37, 38].

Nas condições de cultivo utilizadas, o tratamento com células-tronco, embora tenha promovido o crescimento folicular, não teve efeito sobre crescimento e retomada da meiose dos oócitos. Esse dado pode ser justificado por uma possível quebra da ligação metabólica entre as células da granulosa e o oócito considerando a ausência de fatores importantes no meio base de crescimento folicular, como as gonadotrofinas (FSH e LH) que exercem uma ação sinérgica no crescimento oocitário e na proliferação de células da granulosa. Além disso, a intensa proliferação das células-tronco que demandam maior disponibilidade de nutrientes podem ter influenciado na qualidade dos oócitos. Tomaszewski, et al., [32] observaram que os folículos que sobreviveram até 10º dia de cultivo nos grupos de co-cultivo e meio condicionado de células adipoderivadas, aumentaram o diâmetro folicular alcançando tamanhos entre 190 e 215 µm, apresentando taxa de crescimento comparável o que não foi suficiente para produzir oócitos.

Quanto à produção dos hormônios esteroides, nas condições de cultivo utilizadas, o aumento de estradiol e progesterona observado no intervalo de 6 a 18 dias de cultivo no tratamento CT sugere que as células da granulosa estavam metabolicamente ativas. Esse dado reforça que o crescimento folicular de fato ocorreu pela proliferação das células da granulosa, descartando a hipótese de turgidez celular, pois quanto maior a produção de estradiol maior será a estimulação para a divisão das células da granulosa. Xia et al. [18] também relataram aumento na produção de estradiol após 4 dias de cultivo tanto em grupo de alta quanto baixa densidade de células ($0,5 \times 10^3$) sendo significativamente maior no grupo de alta densidade ($0,5 \times 10^5$). Observamos ainda, que as CTM-GW estimulam a secreção de progesterona por folículos pré-antrais após 18 dias de cultivo assim como observado por Rajabi et al [6] após 12 dias. Esse hormônio tem importante papel atua na regulação dos níveis de gonadotrofinas e pode ser capaz de inibir a apoptose de células da granulosa e da teca em camundongos fêmeas [39].

O indicativo de aumento na produção de GSH no meio no tratamento com células-tronco durante os dias de cultivo sugere uma possível redução na proporção de células apoptóticas. Esse aumento, embora não seja estatisticamente significativo, se torna relevante considerando a existência de uma variedade maior de células em co-cultivo que poderiam competir e gerar maior estresse oxidativo. Assim, a produção de GSH no tratamento CT pode ter contribuído para proteger as células de radicais livres reduzindo a morte celular apoptótica através da regulação de muitas funções vitais como a síntese e reparação do DNA, síntese de proteínas e ativação e regulação de enzimas [40].

A viabilidade das CTM-GW observada após o co-cultivo demonstra que o sistema desenvolvido para o cultivo folicular mantém a viabilidade celular assim como foi constatado por Green et al. [28] após 14 dias. Dessa forma, sugere-se esta linhagem celular como potencial fonte para a pesquisa científica no tocante ao desenvolvimento de novos sistemas de cultivo de folículos ovarianos pré-antrais com vistas à preservação da fertilidade. Além disso, o uso de CTM-GW tem sido de crescente interesse na pesquisa por se tratar de um material que pode ser facilmente obtido por meio de procedimentos não invasivos, que seria descartado e, portanto, é livre de considerações éticas e legais [41].

Takehara et al. [42] comprovaram que as CTM adipoderivadas secretaram níveis elevados de fator de crescimento endoteliais vasculares (VEGF), fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) e factor de crescimento de hepatócitos (HGF). Esses fatores têm papel essencial no desenvolvimento folicular e oocitário, sendo que o VEGF contribui para a ativação e desenvolvimento de folículos primordiais e aumento da porcentagem de folículos secundários saudáveis em crescimento [43] e reduz a apoptose [44]. Já o IGF-1 tem efeito modulador local contribuindo para o desenvolvimento folicular precoce aumentando as taxas de folículos normais e formação de antro [2] além de suprimir a apoptose e induzir a proliferação de células do *cumulus* [45]. Enquanto o HGF controla funções que regulam o crescimento e a diferenciação de folículos ovarianos [46].

5. Conclusão

Neste estudo, observou-se pela primeira vez, que as CTM-GW têm potencial para utilização como suporte parácrino no crescimento dos folículos ovarianos pré-antrais isolados. Nossos achados sugerem que as CTM-GW são capazes de aumentar a taxa de crescimento folicular e a produção de estradiol e progesterona, mesmo na ausência de fatores de crescimento ou hormônios no meio base e após longo período de cultivo *in vitro*. Embora este sistema de cultivo não tenha aumentado a frequência de maturação oocitária, o crescimento folicular e o aumento na produção de hormônios esteroides, sugerem que as CTM-GW tiveram influência positiva na proliferação das células da granulosa. O sistema de cultivo utilizado pode abrir caminho para outros estudos que visem o seu aprimoramento para futuras aplicações clínicas.

Referências

1. Figueiredo, J. R., de Lima, L. F., Silva, J. R. V., & Santos, R. R. (2018). Control of growth and development of preantral follicle: insights from *in vitro* culture. *Animal Reproduction (AR)*, 15 (Supplement 1), 648-659.
2. Magalhães-Padilha, D. M., Duarte, A. B. G., Araújo, V. R., Saraiva, M. V. A., Almeida, A. P., Rodrigues, G. Q., ... & Gastal, E. L. (2012). Steady-state level of insulin-like growth factor-I (IGF-I) receptor mRNA and the effect of IGF-I on the *in vitro* culture of caprine preantral follicles. *Theriogenology*, 77(1), 206-213.
3. Sá, N. A. R., Araújo, V. R., Correia, H. H. V., Ferreira, A. C. A., Guerreiro, D. D., Sampaio, A. M., ... & Ceccatto, V. M. (2017). Anethole improves the *in vitro* development of isolated caprine secondary follicles. *Theriogenology*, 89, 226-234.
4. Saraiva, M. V. A., Rossetto, R., Brito, I. R., Celestino, J. J. H., Silva, C. M. G., Faustino, L. R., ... & Campello, C. C. (2010). Dynamic medium produces caprine embryo from preantral follicles grown *in vitro*. *Reproductive Sciences*, 17(12), 1135-1143.
5. 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) Produção *in vitro* de embrião caprino de folículo pré-antral cultivado em meio suplementado com hormônio do crescimento *Theriogenology* 75 (1), 182-188.
6. Rajabi Z, Yazdekhashti H, Mugahi SMHN, Abbasi M, Kazemnejad S, Shirazi A, Zarnani AH. Mouse preantral follicle growth in 3D co-culture system using human menstrual blood mesenchymal stem cell. *Reproductive biology* 2018; 18:122-131.
7. 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. *Biology of reproduction*, 68(5), 1682-1686.
8. Higuchi, C. M., Maeda, Y., Horiuchi, T., & Yamazaki, Y. (2015). A simplified method for three-dimensional (3-D) ovarian tissue culture yielding oocytes competent to produce full-term offspring in mice. *PloS one*, 10(11), e0143114.
9. Divya, V., G. Arunakumari, And K. Sadasivarao. "EFFECT OF STEM CELL FACTOR ON CAPRINE PREANTRAL FOLLICLE CULTURE." *International Journal of Agriculture Sciences* 8, no. 50 (2016):2154-2157.
10. Chiti, M. C., Dolmans, M. M., Hobeika, M., Cernogoraz, A., Donnez, J., & Amorim, C. A. (2017). A modified and tailored human follicle isolation procedure improves follicle recovery and survival. *Journal of ovarian research*, 10(1), 71.
11. Rodrigues G.Q., Silva C.M.G., Faustino L.R., Bruno J.B., Magalhães D.M., Campello C.C., Figueiredo J.R. Bovine serum albumin improves *in vitro* development of caprine preantral follicles. *Animal Reproduction* 2010; 7:382-388.
12. Bezerra, M. E. S.; Monte, A. P. O.; Barberino, R.S.; Lins, T.L.B.G.; Oliveira Junior, J.L.; Santos, J. M. S. , Bezerra, D. O., Neves, C.A., Silva, G.C., Carvalho, M. A. M., Matos, M.H.T. Conditioned medium of ovine Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells

improves growth and reduces ROS generation of isolated secondary follicles after shorter term *in vitro* culture **Theriogenology**, 125:56-63. 2019.

13. Ferreira, A. C. A., Cadenas, J., Sá, N. A., Correia, H. H., Guerreiro, D. D., Lobo, C. H., ... & Figueiredo, J. R. (2018). *In vitro* culture of isolated preantral and antral follicles of goats using human recombinant FSH: Concentration-dependent and stage-specific effect. *Animal reproduction science*, 196, 120-129.
14. Mbemba, G. T., Cadenas, J., de Sá, N. A. R., Guerreiro, D. D., Donfack, N. J., Vieira, L. A., ... & Pinto, F. D. C. L. (2018). Supplementation of *in vitro* culture medium with FSH to grow follicles and mature oocytes can be replaced by extracts of *Justicia insularis*. *PLoS one*, 13(12), e0208760.
15. Mizukami, A., & Swiech, K. (2018). Mesenchymal stromal cells: from discovery to manufacturing and commercialization. *Stem cells international*, 2018.
16. Lai, D., Wang, F., Yao, X., Zhang, Q., Wu, X., & Xiang, C. (2015). Human endometrial mesenchymal stem cells restore ovarian function through improving the renewal of germline stem cells in a mouse model of premature ovarian failure. *Journal of translational medicine*, 13(1), 155.
17. Heo, J. S., Choi, Y., Kim, H. S., & Kim, H. O. (2016). Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue. *International journal of molecular medicine*, 37(1), 115-125.
18. Xia X, Wang T, Yin T, Yan L, Yan J, Lu C, Zhao L, Li M, Zhang Y, Jin H et al. Mesenchymal stem cells facilitate *in vitro* development of human preantral follicle. *Reproductive Sciences* 2015; 22:1367-1376
19. Asgharzadeh, S., Mirshokraei, P., Hassanpour, H., Ahmadi, E., & Nazari, H. (2015). The effect of mesenchymal stem cells as co-culture in *in vitro* nuclear maturation of ovine oocytes. *Animal Science Papers and Reports*, 33(3).
20. Lee, S. E., Moon, J. J. M., Kim, E. Y., & Park, S. P. (2015). Stem cell-derived bioactive materials accelerate development of porcine *in vitro*-fertilized embryos. *Cellular Reprogramming (Formerly "Cloning and Stem Cells")*, 17(3), 181-190.
21. Teng, X., Chen, L., Chen, W., Yang, J., Yang, Z., & Shen, Z. (2015). Mesenchymal stem cell-derived exosomes improve the microenvironment of infarcted myocardium contributing to angiogenesis and anti-inflammation. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 37(6), 2415-2424.
22. Arslan, F., Lai, R. C., Smeets, M. B., Akeroyd, L., Choo, A., Aguior, E. N., ... & Lim, S. K. (2013). Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem cell research*, 10(3), 301-312.7777
23. Silva GC. Células-tronco da geleia de Wharton do cordão umbilical de caprinos (*capra hircus*): protocolos de isolamento e caracterização. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal).

Coordenadoria de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí 2016, 1-49.

24. Chaves RN, Alves AMCV, Faustino LR, Oliveira KPL, Campello CC, Lopes CAP, Bão SN & Figueiredo, JR. How the concentration of insulin affects the development of preantral follicles in goats. *Cell and tissue research* 2011; 346:451-456.

25. Luz VB, Araujo VR, Duarte AB, Celestino JJ, Silva TF, Magalhaes-Padilha DM, et al. Eight-cell parthenotes originated from *in vitro* grown sheep preantral follicles. *Reprod Sci* 2012; 19:1219–1225. [https:// doi.org/10.1177/1933719112446072](https://doi.org/10.1177/1933719112446072) PMID: 22562971

26. Sedlak, J. and Lindsay, R.H. (1968) Estimation of Total, Protein-Bound, and Nonprotein Sulfhydryl Groups in Tissue with Ellman's Reagent. *Analytical Biochemistry*, 25, 192-205. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(68\)90092-4](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(68)90092-4)

27. Sousa, R. P. Sistema de co-cultivo de folículos pré-antrais caprinos com linhagens de células-tronco mesenquimais. 2019. 89p. Tese (Pós-graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO), Universidade Federal do Piauí (UFPI), Teresina. (Dados não publicados).

28. Brito, I. R., Silva, G. M., Sales, A. D., Lobo, C. H., Rodrigues, G. Q., Sousa, R. F., ... & Smitz, J., Figueiredo, JR. (2016). Fibrin–alginate hydrogel supports steroidogenesis, *in vitro* maturation of oocytes and parthenotes production from caprine preantral follicles cultured in group. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(6), 997-1009.

29. Green, L. J., Zhou, H., Padmanabhan, V., & Shikanov, A. (2019). Adipose-derived stem cells promote survival, growth, and maturation of early-stage murine follicles. *Stem cell research & therapy*, 10(1), 102.

30. Smitz, J. E., & Cortvrindt, R. G. (2002). The earliest stages of folliculogenesis *in vitro*. *Reproduction*, 123(2), 185-202.

31. Xu J, Lawson MS, Yeoman RR, Pau K Y, Barrett S L, Zelinski MB, Stouffer RL. Secondary follicle growth and oocyte maturation during encapsulated three-dimensional culture in rhesus monkeys: effects of gonadotrophins, oxygen and fetuin. *Human Reproduction* 2011. 26:1061-1072.

32. Tomaszewski, C. E., Constance, E., Lemke, M. M., Zhou, H., Padmanabhan, V., Arnold, K. B., & Shikanov, A. (2019). Adipose-derived stem cell-secreted factors promote early stage follicle development in a biomimetic matrix. *Biomaterials science*, 7(2), 571-580.

33. Ramesh, H. S., Gupta, P. S. P., Nandi, S., Manjunatha, B. M., Kumar, V. G., & Ravindra, J. P. Co-culture of buffalo preantral follicles with different somatic cells. *Reproduction in domestic animals*, 43(5), 520-524. 2008.

34. Richards JS, Russell DL, Ochsner S, Hsieh M, Doyle KH, Falender AE, et al. Novel signalling pathways that control ovarian follicular development, ovulation and luteinization. *Rec Prog Horm Res* 2002; 57:195–220. PMID: 12017544

35. Sassoli, C., Pini, A., Chellini, F., Mazzanti, B., Nistri, S., Nosi, D., ... & Formigli, L. (2012). Bone marrow mesenchymal stromal cells stimulate skeletal myoblast proliferation through the paracrine release of VEGF. *PloS one*, 7(7), e37512.

36. Rossetto R, Santos RR, Silva GM, Duarte ABG, Silva CMG, Campello CC, et al. Comparative study on the *in vitro* development of caprine and bovine preantral follicles. *Small Rumin Res* 2012; 113:167–170. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.03.004>
37. Zhou, H.M.; Zhang, Y. Impact of growth factors on *in vitro* development of caprine oocytes at pre-antral stage. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 40, p. 161-165, 2005.
38. Arunakumari, G., Shanmugasundaram, N., Rao, V.H. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles *Theriogenology* 2010; 74: 884–894.
39. Peluso JJ. Multiplicity of progesterone's actions and receptors in the mammalian ovary. *Biol Reprod*, v.75, p.2- 8, 2006.
40. Tapiero, H., Tew, K.D. (2003) The importance of glutathione in human disease. *Elsevier, Biomedicine & Pharmacotherapy*, 57(3-4), pp. 145-155
41. Baptistella, J. C. Caracterização das células-tronco oriundas da geleia de Wharton do cordão umbilical de bovinos (*Bos indicus*) nos três trimestres de gestação. (Tese) Doutorado-Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Araçatuba: [s.n], 81f. 2016.
42. Takehara, Y.; Yabuuchi, A.; Ezoe, K.; Kuroda, T.; Yamadera, R.; Sano, C.; Murata, N. Aida, T.; Nakama, K.; Aono, F.; Aoyama, N.; Kato, K.; Kato, O. The restorative effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on damaged ovarian function. *Laboratory Investigation*, v.93: 181–193, 2013.
43. Asadi, E., Najafi, A., Moeini, A., Pirjani, R., Hassanzadeh, G., Mikaeili, S., ... & Barati, M. (2017). Ovarian tissue culture in the presence of VEGF and fetuin stimulates follicle growth and steroidogenesis. *J Endocrinol*, 232, 205-219.
44. Araújo. V.R.; Gastal, M.O.; Figueiredo, J.R.; Gastal, E.G. *In vitro* culture of bovine preantral follicles: a review. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 12:78. 2014.
45. Mao, J., Smith, M. F., Rucker, E. B., Wu, G. M., McCauley, T. C., Cantley, T. C., ... & Day, B. N. (2004). Effect of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on porcine preantral follicular growth, antrum formation, and stimulation of granulosa cell proliferation and suppression of apoptosis *in vitro*. *Journal of Animal Science*, 82(7), 1967-1975.
46. Enriquez-Cortina, C., Almonte-Becerril, M., Clavijo-Cornejo, D., Palestino-Domínguez, M., Bello-Monroy, O., Nuño, N., ... & Muñoz, L. (2013). Hepatocyte growth factor protects against isoniazid/rifampicin-induced oxidative liver damage. *toxicological sciences*, 135(1), 26-36.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo demonstra sua contribuição com o desenvolvimento de dois sistemas de co-cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais com CTM-GW, isto é, com os folículos inclusos em tecido ovariano e na forma isolada. Pela primeira vez, esta linhagem celular foi utilizada como suporte parácrino para o desenvolvimento folicular na fase pré-antral, tendo como modelo animal a espécie caprina.

As CTM-GW, apresentam potencial para apoiar o desenvolvimento folicular *in vitro* exercendo efeito positivo na ativação, sobrevivência e proliferação de células da granulosa após 7 dias em cultivo, bem como, no crescimento de folículos secundários e no aumento da produção de hormônios esteroides pelas células da granulosa.

Outras investigações são necessárias, para otimizar esses sistemas de cultivo, de modo que possam assegurar o crescimento e a maturação de um grande número de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré- antrais. Dessa forma, contribuindo para melhoria nas abordagens de preservação da fertilidade com vistas a aplicações clínicas futuras, e no aperfeiçoamento de outras biotécnicas reprodutivas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, F.L.N.; LUNARDI, F.O.; LIMA, L.F.; BRUNO, J. B., ALVES, B. G., MAGALHÃES-PADILHA, D. M., CIBIN, F. W. S., BERIONI, L., APGAR, G. A., L. O., TURCO, E. G., GASTAL, E. L., FIGUEIREDO, J. R. Role of EGF on in situ culture of equine preantral follicles and metabolomics profile. **Research in Veterinary Science**. v. 115, p. 155-164, 2017.
- AGUIRRE, A.; PLANELL, J.A.; ENGEL, E. Dynamics of bone marrow-derived endothelial progenitor cell/mesenchymal stem cell interaction in co-culture and its implications in angiogenesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 400, p. 284-291, 2010.
- ALBRECHT, D.R.; UNDERHILL, G. H.; WASSERMANN, T. B., SAH, R. L., BHATIA, S. N. Probing the role of multicellular organization in three-dimensional microenvironments. **Nature Methods**. v.3, n. 5, p. 369, 2006.
- AMORIM, C. A., MOYA, C. F., DONNEZ, J., DOLMANS, M. M. 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, 2016.
- ARAÚJO, V. R.; ALMEIDA, A. P.; MAGALHÃES, D. M.; MATOS, M. H. T.; TAVARES, L. M. T.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Papel das proteínas morfogenéticas ósseas-6 e-7 (BMP-6 e-7) na regulação da foliculogênese inicial em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 34, n. 2, p. 69-78, 2010.
- ARAÚJO, V.R. **Estudo dos fatores que afetam a eficiência do cultivo in vitro de folículos pré-antrais caprinos e bovinos: efeito do regime de troca, meios de cultivo de base e suplementos**. (Tese) Doutorado-Universidade Estadual do Ceará. Faculdade de Veterinária. Fortaleza. 290 p., 2013.
- ARAÚJO, V.R.; GASTAL, M.O.; FIGUEIREDO, J.R.; GASTAL, E.G. *In vitro* culture of bovine preantral follicles: a review. **Reprod. Biol. Endocrinol**. v.12, n. 1, p.78, 2014.
- BERTOLINI M.; BERTOLINI L.R. Advances in reproductive technologies in cattle: from artificial insemination to cloning. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e de Zootecnia**. v. 56, p. 184-194, 2009.
- BAPTISTELLA, J. C. **Caracterização das células-tronco oriundas da geleia de Wharton do cordão umbilical de bovinos (*Bos indicus*) nos três trimestres de gestação**. (Tese) Doutorado—Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho. Araçatuba: [s.n], 81f. 2016.

BEZERRA, M. B.; PACHECO, M. R.; MINGOTI, G. Z.; MACEDO, M. F.; VICENTE, W. R. R. Potencial do cultivo *in vitro* e do xenotransplante na sobrevida e no desenvolvimento de folículos ovarianos pré-antrais em matrizes de ruminantes domésticos em risco de morte: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v.35, n. 4, p. 483-489, 2011.

BEZERRA, M. E. S.; MONTE, A. P. O.; BARBERINO, R.S.; LINS, T.L.B.G.; OLIVEIRA JUNIOR, J.L.; SANTOS, J. M. S.; BEZERRA, D. O.; NEVES, C.A.; SILVA, G.C.; CARVALHO, M. A. M.; MATOS, M.H.T. Conditioned medium of ovine Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells improves growth and reduces ROS generation of isolated secondary follicles after shorter term *in vitro* culture. **Theriogenology**. v. 125, p. 56-63, 2019.

BEZERRA, M. B.; RONDINA, D.; LIMA, A. K. F.; OLIVEIRA, L. C.; CECCHI, R.; LUCCI, C. M.; GIORGETTI, A.; de FIGUEIREDO, J. R. Aspectos quantitativos e qualitativos da foliculogênese pré-natal na espécie caprina. **Ciência Animal**. v. 8, n. 2, p. 47-56. 1998.

BHARDWAJ, J. K.; SHARMA, R. K. Apoptosis and Ovarian Follicular Atresia in Mammals. In: **Zoology**. Intech Open, p.185-206, 2012.

CARVALHO, Y.K.P.; ARGÔLO-NETO, N. M.; AMBRÓSIO, C.E.; OLIVEIRA, L. J.; ROCHA, A.R.; SILVA, J.B.; CARVALHO, M.A.M. ALVES, F.R. Isolation, expansion and differentiation of cellular progenitors obtained from dental pulp of agouti (*Dasyprocta prymnolopha* Wagler, 1831). **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 35, n.6, 2015.

COSTA, C.R.M; FEITOSA, M.L.T.; BEZERRA, D.O.; CARVALHO, Y.K.P.; OLIVINDO, R.F.G.; FERNANDO, P.B.; SILVA, G.C.; SILVA, M.L.G.; AMBRÓSIO, C.E.; CONDE JÚNIOR, A.M.; ARGOLO NETO, N.M.; COSTA SILVA, L.M., CARVALHO, M.A.M. Labeling of adipose-derived stem cells with quantum dots provides stable and long-term fluorescent signal for ex vivo cell tracking. **In vitro Cellular & Developmental Biology – Animal**, v.53, n. 4, p. 363-370, 2017.

COSTA, J. J. N.; PASSOS, M. J.; REBOUÇAS, E. L.; SILVA, J. R. V. Proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e seu papel na regulação da oogênese e da foliculogênese ovariana em mamíferos. **Revista Brasileira de reprodução animal**, v.36, n. 4, 2012.

CORTVRINDT, R.; SMITZ, J. *In vitro* follicle growth: achievements in mammalian species. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 36, n. 1, p. 3-9, 2001.

DANTAS, C.C.O.; NEGRÃO, F.M. Biotecnologias na reprodução de caprinos. **PubVet**, Londrina, v. 4, n. 29, Ed. 134, Art. 907, 2010.

CHAVES, RN; ALVES, AMCV; FAUSTINO, LR; OLIVEIRA, KPL; CAMPELLO, CC; LOPES, CAP; BÁO, SN & FIGUEIREDO, JR. How the concentration of insulin affects the

development of preantral follicles in goats. **Cell and tissue research**, v. 346, n. 3. p. 451-456, 2011.

DEMEESTERE, I.; CENTNER, J.; GERVY, Y.; E DELBAERE, A. Impact of various endocrine and paracrine factors on culture of preantral follicles in rodents. **Reproduction**, v. 130, n. 2, p. 147-156, 2005.

EMBRAPA, Boletim do Centro de Inteligência e Mercado de Caprinos e Ovinos [recurso eletrônico]. n. 2, (dez. 2017) – Dados eletrônicos. Sobral, CE: **Embrapa Caprinos e Ovinos**, 2017.

EGGER, D.; TRIPISCIANO, C.; WEBER, V.; DOMINICI, M.; KASPER, C. Review Dynamic Cultivation of Mesenchymal Stem Cell Aggregates. **Bioengineering** (Basel). v. 5, n. 2, p. 48, 2018.

FADDY, M.J. Follicle dynamics during ovarian ageing. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 163, n. 1-2, p. 43-48, 2000.

FIGUEIREDO, J.R.; CELESTINO, J. J. H.; RODRIGUES, A. P. R.; SILVA, J. R. V. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção *in vitro* de embriões em larga escala. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v. 31, n. 2, p. 143-152, 2007.

FERREIRA, A. C. A.; MASIDE, C.; SÁ, N. A. R.; GUERREIRO, D. D.; CORREIA, H. H. V.; LEIVA-REVILLA, J.; LOBO, C.H.; ARAÚJO, V.R.; APGAR, G.A.; BRANDÃO, F.Z.; FIGUEIREDO, J.R.; CAMPELLO, C.C. Balance of insulin and FSH concentrations improves the *in vitro* development of isolated goat preantral follicles in medium containing GH. **Animal reproduction science**. v. 165, p. 1-10, 2016.

FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P.R.; AMORIM, C. A.; SILVA, J. R. V. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. In: **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Roca, 2^a. ed. p. 303-327, 2008.

FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P.R.; SANTOS, R.R. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais: MOIFOPA. In: Oliveira, Teixeira e Vicente. **Biotécnicas reprodutivas em ovinos e caprinos**. Editora MedVet. p. 211-233, 2013.

FIGUEIREDO, J.R.; CELESTINO, J.J.H.; FAUSTINO, L.R.; RODRIGUES, A.P.R. *In vitro* culture of caprine preantral follicles: advances, limitations and prospects. **Small Ruminant Research**. v.98, p. 192 e 195, 2011.

FINDLAY, J. K.; DUNNING, K. R.; GILCHRIST, R. B.; HUTT, K. J.; RUSSELL, D. L.; WALTERS, K. A. Follicle Selection in Mammalian Ovaries. In: **The Ovary**. (p. 3-21). Academic Press, 2019.

GONÇALVES, R. F. B. **Avaliação da morfologia e viabilidade de folículos pré-antrais ovinos após criopreservação e cultivo *in vitro* de curta duração.** Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Medicina Veterinária, Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias, Fortaleza, 62f, 2012.

HEIDARI, M. Effect of Fibroblast Co-culture on *In vitro* Maturation and Fertilization of Mouse Preantral Follicles. Royan Institute. **International Journal of Fertility and Sterility.** v. 5, n. 1, 1-8. 2011.

HOU, P.; LI, Y.; ZHANG, X.; LIU, C.; GUAN, J.; LI, H.; ZHAO, T.; YE, J.; YANG, W.; LIU, K.; GE, J.; XU, J.; ZHANG, Q.; ZHAO, Y.; DENG, H. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds. **Science.** v. 341, n. 6146, p. 651-654, 2013.

HSUEH, A. J.; HSUEH, A. J.; KAWAMURA, K.; CHENG, Y.; FAUSER, B. C. Intraovarian control of early folliculogenesis. **Endocrine Reviews.** v. 36, p. 1–24, 2015.

IMBERTI, B.; MORIGI, M.; TOMASONI, S.; ROTA, C.; CORNA, D.; LONGARETTI, L.; ROTTOLI, D.; VALSECCHI, F.; BENIGNI, A.; WANG, J.; ABBATE, M.; ZOJA, C.; REMUZZI, G. Insulin-like growth factor-1 sustains stem cell-mediated renal repair. **Journal of the American Society of Nephrology.** v. 18, n. 11, p. 2921-2928, 2007.

ITOH, T.; HOSHI, H. Efficient isolation and long-term viability of bovine small preantral follicles *in vitro*. **In vitro Cellular e Developmental Biology-Animal.** v. 36, n. 4, p. 235-240, 2000.

JADOUN, Y. S., BHADARIA, P., GUPTA, V. K., & LATHWAL, S. S. Reproductive biotechnology in small ruminants-a review. **Agricultural Reviews.** v. 33, n. 2, p. 159 – 164, 2012.

JOHNSON, J.; CANNING, K.; KANEKO, T.; PRU, J. K.; TILLY, J. L. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. **Nature.** v. 428, p. 145-150, 2004.

JIMENEZ, C. R.; ARAÚJO, V. R.; PENITENTE-FILHO, J. M.; DE AZEVEDO, J. L.; SILVEIRA, R. G.; TORRES, C. A. A. The base medium affects ultrastructure and survival of bovine preantral follicles cultured *in vitro*. **Theriogenology.** v.85, n. 6, p.1019-1029, 2016.

LI, C.; WU, X.; TONG, J.; YANG, X.; ZHAO, J.; ZHENG, Q.; ZHAO, G.; MA, Z. Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy. **Stem Cell Research e Therapy.** v. 6, n. 1, p. 55, 2015.

- MALHEIROS, G. C.; ABREU, A. M.O.W. Características morfológicas do cordão. **Revista Científica da FMC**. v. 11, n. 1, 2016.
- MANDAWALA, A. A.; HARVEY, S. C.; ROY, T. K.; FOWLER, K. E. Cryopreservation of animal oocytes and embryos: Current progress and future prospects. **Theriogenology**. v. 86 n. 7, p. 1637-1644, 2016.
- MAHAJAN, M.; NAGOORVALI, D.; RAWAT, N., CHAUHAN, M. S.; MANIK, R. S.; SINGLA, S. K.; PALTA, P.; SINGH, M.K. 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, G.R.; MARINHO, R.C.; BEZERRA-JUNIOR, R. Q.; CÂMARA, L. M. C.; ALBUQUERQUE-PINTO, L. C.; TEIXEIRA, M. F.S. Isolation, culture and characterization of multipotent mesenchymal stem cells from goat umbilical cord blood. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 37, n. 6, p. 643-649, 2017.
- MALEKSHAH, A. K.; HEIDARI, M.; PARIVAR, K.; E AZAMI, N. S. The effects of fibroblast co-culture and activina on *in vitro* growth of mouse preantral follicles. **Iranian Biomedical Journal**. v.18, n.1, p. 49. 2014.
- MATOS, M.H.T.; LIMA-VERDE, I.B.; LUQUE, M.C.A.; MAIA JR, J.E.; SILVA, J.R.V; CELESTINO, J.J.H.; MARTINS, F.S.; BÁO, S.N., LUCCI, C.M.; FIGUEIREDO, J.R. Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability *in vitro*. **Zygote**. v.15, p. 173-182, 2007.
- MCGEE E.A.; SMITH, R.; SPEARS, N.; NACHTIGAL, M.W.; INGRAHAM, H.; HSUEH, AJW. Mullerian inhibitory substance induces growth of rat preantral ovarian follicles. **Biol Reprod**. v. 64, n. 1. p. 293-98, 2001.
- MEIRELLES, L. S.; NARDI, N. B. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. **Frontiers in Bioscience**. v.14, n. 1. p. 4281-4298, 2009.
- MENEZES, V. G.; BARBERINO, R. DE S.; GOUVEIA, B. B.; GONÇALVES, R. J. DE SOUZA; ALMEIDA, J. R. G. DA S.; MATOS, M. H. T. DE. Extract of *Amburana cearensis* maintains the survival of ovine preantral follicles during long-term ovarian tissue transport and promotes primordial follicle activation after *in vitro* culture. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 39, n. 5, p. 2001-2016, 2018.
- MOSHKDANIAN, G.; NEMATOLLAHI-MAHANI, S. N.; POUYA, F.; NEMATOLLAHI-MAHANI, A. 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**, p. 28, n. 4, p. 343-349, 2011.

NAIDON, D. Índice de espiralamento do cordão umbilical e possível repercussão nos resultados perinatais imediatos. 2012. 62f., Dissertação mestrado. Universidade Federal de Santa Maria. 2012.

NICOLA, AC. Atuação das proteínas do relógio na senescência reprodutiva de fêmeas Wistar. 2017. 114f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2017.

PANKAJAKSHAN, D.; AGRAWAL, D. K. Mesenchymal Stem Cell Paracrine Factors in Vascular Repair and Regeneration. **J Biomed Technol Res**, v. 1. n. 1. p. 1-21. 2014.

PARAMIO, M.T. *In vivo* and *in vitro* embryo production in goats. **Small Ruminant Res.** v.89, p. 144-148, 2010.

PENG, L. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Cartilage, and Adipose Tissue. **Stem cells dev.** v.17, p.761-774, 2008.

PEREIRA, L. V. Células-tronco. In. ULRICH, H.; COLLI, W.; HO, P.L.; FARIA, M.; TRUJILLO, C A. **Bases moleculares da Biotecnologia**. São Paulo: Roca, p.73-86, 2008.

QU, J.; GODIN, P.A.; NISOLLE, M.; DONNEZ, J. Distribution and epidermal growth factor receptor expression of primordial follicles in human ovarian tissue before and after cryopreservation. **Hum. Reprod.** v.15, p. 302-310, 2000.

RAMESH, H. S.; GUPTA, P. S. P.; NANDI, S.; MANJUNATHA, B. M.; KUMAR, V. G.; RAVINDRA, J. P. Co-culture of buffalo preantral follicles with different somatic cells. **Reproduction in domestic animals**. v. 43, n. 5, p. 520-524, 2008.

RAMESH, H. S.; PALURU, S. P. G.; NANDI, S.; MANJUNATHA, B. M. *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.

RODRIGUES, G.Q.; SILVA, C.M.G.; FAUSTINO, L.R.; BRUNO, J.B.; MAGALHÃES, D.M.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R. Bovine serum albumin improves *in vitro* development of caprine preantral follicles. **Animal Reproduction**. v. 7, p. 382-388, 2010.

ROSS, M. H.; WOJCIECH, P.; TODD, B.A. **Atlas de histologia descritiva**. Porto Alegre: Artmed, 2012.

ROSSETO, R., LIMA, I. M. T.; SARAIVA, M. V. A.; LIMA VERDE, I. B., SALES, E. T.; FIGUEIREDO, J. R. Avanços no isolamento e sistemas de cultivo de folículos pré-antrais. **Acta Vet. Brasilica**. v. 5, n. 1, p. 15-23, 2011.

ROHBAN, R.; PIEBER, T. R. Mesenchymal Stem and Progenitor Cells in Regeneration: Tissue Specificity and Regenerative Potential. **Stem Cells International**. v. 2017, 16 p., 2017.

SANTOS, T. A. Fisiologia do ovário e da Fecundação. *In*: OLIVEIRA C. F. (Ed.). **Manual de Ginecologia**. Lisboa: Permanyer Portugal, cap. 3, v. 1, p. 39-56, 2009.

SEO, B. F.; JUNG, S. N. The immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in prevention or treatment of excessive scars hindawi publishing corporation **Stem Cells International**, v.2016, 2016.

SILVA FILHO, O. F.; ARGÔLO NETO, N.M.; CARVALHO, M.A.M.; CARVALHO, Y.K.; DINIZ, A. N.; MOURA, L.S.; AMBRÓSIO, C.E.; MONTEIRO, J. M.; ALMEIDA, H. M.; MIGLINO, M. A.; ALVES, J.J.R.P., MACEDO, K.V.; ROCHA, A. R.; FEITOSA, M.L.T.; ALVES, F.R. Isolation and characterization of mesenchymal progenitors derived from the bone marrow of goats native from northeastern Brazil. **Acta Cirúrgica Brasileira**. v. 29, n. 8, 2014.

SILVA, G. C. **Células-tronco da geleia de wharton do cordão umbilical de caprinos (capra hircus): protocolos de isolamento e caracterização**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Coordenadoria de Pós-Graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Piauí. 75f, 2016.

SILVA, R. F. **Utilização do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos inclusos em tecido ovariano**. (Dissertação de mestrado) Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, 2017.

SHARMA, R.K.; BHARDWAJ, J.K. Granulosa cell apoptosis in situ in caprine. **Journal of Cell and Tissue Research**. v. 7, n. 2. p.1111-1114, 2007.

SILVA, T. F. D.; COSTA, S. L. D.; COSTA, E. P. D.; GUIMARÃES, J. D. Effect of somatotropin and thyroxine on the *in vitro* development of bovine preantral follicles. **Ciência Animal Brasileira**. v.19, p.1809-6891, 2018.

TACHIBANA, M.; AMATO, P.; SPARMAN, M. GUTIERREZ, N. M.; TIPPNER-HEDGES, R.; MA, H.; KANG, E.; FULATI, A. LEE, H.; SRITANAUDOMCHAI, H.; MASTERSON, K.; LARSON, J.; EATON, D.; SADLER-FREDD, K.; BATTAGLIA, D.; LEE, D.; WU, D.; JENSEN, J.; PATTON, P.; GOKHALE, S.; STOUFFER, R. L.; WOLF, D.; MITALIPOV, S. Human Embryonic Stem Cells Derived by Somatic Cell Nuclear Transfer. **Cell**, v. 153, n. 6, p. 1228-1238. 2013.

TAKEHARA, Y.; YABUUCHI, A.; EZOE, K.; KURODA, T.; YAMADERA, R.; SANO, C.; MURATA, N. AIDA, T.; NAKAMA, K.; AONO, F.; AOYAMA, N.; KATO, K.; KATO, O.

The restorative effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on damaged ovarian function. **Laboratory Investigation**. v. 93, n. 2, p. 181-193, 2013.

THOMAS, J.M.; LOCKE, J.W.C.; VISHWANATH, R.; HALL, J.B.; ELLERSIECK, M.R.; SMITH, M.F.; PATTERSON, D.J. Effective use of Sexed ULTRA™ sex-sorted semen for timed artificial insemination of beef heifers, **Theriogenology**. v. 98, p. 88 e 93, 2017.

UHDE, K.; VAN TOL, H. T.; STOUT, T. A.; ROELEN, B. A. Metabolomic profiles of bovine cumulus cells and cumulus-oocyte-complex-conditioned medium during maturation *in vitro*. **Scientific reports**. v.8, 2018.

VISINTIN, J. A.; MENDES, C. M.; GOISSIS, M. D.; KERKIS, I. Diferenciação de gametas *in vitro* a partir de células-tronco. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v. 37. n. 2, p. 140-144, 2013.

WILLIAMS, C. J.; ERICKSON, G. F. Morphology and physiology of the ovary. In: **Endotext [Internet]**. MDText. com, Inc., 2012.

WOBUS, A. M.; BOHELER, K. R. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. **Physiological reviews**. v. 85, n. 2, p. 635-678, 2005.

YOTOV, S. A.; VELISLAVOVA, D. V.; DIMOVA, L. R. Pregnancy rate in Bulgarian White milk goats with natural and synchronized estrus after artificial insemination by frozen semen during breeding season. **Asian Pacific Journal of Reproduction**. v. 5, n. 2, p. 144-147, 2016.

ZHANG, X.; LI, J.; YE, P.; GAO, G.; HUBBELL, K.; CUI, X. Coculture of mesenchymal stem cells and endothelial cells enhances host tissue integration and epidermis maturation through AKT activation in gelatin methacryloyl hydrogel-based skin model. **Acta Biomater**. v. 59, p. 317-326, 2017.

Anexo I: Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
 Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
 Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “**Avaliação do potencial de utilização de células-tronco no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos e na regeneração *in vivo* de tecido ovariano lesionado**”, protocolo nº **117/15**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. MARIA ACELINA MARTINS DE CARVALHO- CCA/UFPI** que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **15/03/2016**.

Vigência do Projeto	Abril/ 2016 à Dezembro/ 2018
Espécie/Linhagem	Caprinos/ Sem raça
Nº de Animais	20
Peso/ Idade	35-45 kg/ 2 anos
Sexo	fêmeas
Origem	Abatedouros credenciados à inspeção sanitária regional e fazendas de caprinos.

Teresina, 15 de Março de 2016.


Prof.ª Estete L. de Mendonça
 Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
 Coordenadora

Anexo II: Submissão dos artigos

07/11/2019 Email – Renata Patricia – Outlook

Outlook Pesquisar

Nova mensagem Responder Excluir Arquivar Lixo Eletrônico Limpar ...

Favoritos

Lixo Eletrôni... 47

Adicionar aos fa...

Pastas

Caixa de Entrada

Lixo Eletrôni... 47

Rascunhos 68

Itens Enviados

Itens Excluid... 44

Arquivo Morto

Anotações

Histórico de Co...

OUTROS

trat. visão

viagem

Nova pasta

Grupos

Novo grupo

Your co-authored submission

Traduzir a mensagem para Português | Nunca traduzir do Inglês

AS **Animal Reproduction Science** <Evisesupport@elsevier.com> ↶ ↷ → ...

Quá, 07/11/2019 11:26
Você

Dear Dr. Sousa,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Animal Reproduction Science

Title: Co-culture with mesenchymal stem cells improves survival and in vitro development of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue

Corresponding Author: Maria Acelina Martins de Carvalho

Co-Authors: Renata Patricia Sousa, Ana Beatriz Graça Duarte, Yago Pinto, Naiza Sá, Francieli W. S. Cibin, Benner Alves, Camila Carvalho, Gustavo Cardoso da Silva Neves, Napoleão Argôlo, Ana Paula Rodrigues, Cleudson Silva, José Ricardo Figueiredo

Maria Acelina Martins de Carvalho submitted this manuscript via Elsevier's online submission system, EVISE®. If you are not already registered in EVISE®, please take a moment to set up an author account by navigating to http://www.elsevier.com/elsevierfaces/pages/navigation/NavController.jsp?JRNL_ACR=ANIREP.

If you already have an ORCID, we invite you to link it to this submission. If the submission is accepted, your ORCID will be transferred to ScienceDirect and CrossRef and published with the manuscript.

To link an existing ORCID to this submission, or sign up for an ORCID if you do not already have one, please click the following link: [Link ORCID](#).

What is ORCID?

ORCID is an open, non-profit, community-based effort to create and maintain a registry of unique researcher identifiers and a transparent method of linking research activities and outputs to these identifiers.

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our ORCID help page: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923.

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author directly at mcelina@ufpl.edu.br.

Thank you,
Animal Reproduction Science

This message was sent automatically. Please do not reply

Atualizar para o Office 365 com Recursos premium do Outlook

Atualizar para o Office 365 com Recursos premium do Outlook

Your co-authored submissi... (Sem assunto) X

14/08/2019

Email – Renata Patrícia – Outlook

Outlook

Journal of Ovarian Research Editorial Office x

+ Nova mensagem Responder Excluir Arquivo Morto Lixo Eletrônico Mover para

Favoritos

Lixo Eletrônico 37

Adicionar aos favoritos

Pastas

Caixa de Entrada

Lixo Eletrônico 37

Rascunhos 47

Itens Enviados

Itens Excluídos 35

Arquivo Morto

Anotações

Histórico de Co...

OUTROS

trat. visão

viagem

Nova pasta

Notification to co-authors of submission to Journal of Ovarian Research JOVR-D-19-00233

Journal of Ovarian Research Editorial Office <em@editorialmanager.com>
 Seg, 29/07/2019 15:28
 Você

JOVR-D-19-00233
 Mesenchymal stem cells infusion effect in goat ovaries subjected to follicular aspirations by laparoscopy
 Felipe Pereira da Silva Barçante, PhD; Renata Patrícia Sousa; Lucilene dos Santos Silva; Camila Emanada Sousa de Carvalho; Napoleão Martins Argôlo Neto; Hermínio José da Rocha Neto; Maria Acelina Martins de Carvalho; Antônio de Sousa Júnior; Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco; Jefferson Hallisson Lustosa da Silva; Micherlene da Silva Carneiro Lustosa; José Adalmir Torres de Souza

Dear author:

You are receiving this email because you have been listed as an author on a manuscript recently submitted to Journal of Ovarian Research. The manuscript details are below.

Title: Mesenchymal stem cells infusion effect in goat ovaries subjected to follicular aspirations by laparoscopy
 Authors: Felipe Pereira da Silva Barçante, PhD; Renata Patrícia Sousa; Lucilene dos Santos Silva; Camila Emanada Sousa de Carvalho; Napoleão Martins Argôlo Neto; Hermínio José da Rocha Neto; Maria Acelina Martins de Carvalho; Antônio de Sousa Júnior; Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco; Jefferson Hallisson Lustosa da Silva; Micherlene da Silva Carneiro Lustosa; José Adalmir Torres de Souza
 Corresponding author: Dr Felipe Pereira da Silva Barçante

If you are not aware of the submission, or if you should not be listed as contributing author, please notify the Editorial Office. Contact details for the Editorial Office are available under "Contact Us" on the journal website.

Kind regards,

Editorial Office
 Journal of Ovarian Research
<https://ovarianresearch.biomedcentral.com/>

Recipients of this email are registered users within the Editorial Manager database for this journal. We will keep your information on file to use in the process of submitting, evaluating and publishing a manuscript. For more information on how we use your personal details please see our privacy policy at <https://www.springernature.com/production-privacy-policy>. If you no longer wish to receive messages from this journal or you have questions regarding database management, please contact the Publication Office at the link below.

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/jovr/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.

Atualizar para o Office 365 com Recursos premium do Outlook

