

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

LUCIENE APARECIDA BATISTA

**Avaliação do impacto do cultivo in vitro de folículos pré-antrais bovinos isolados sobre a
qualidade dos oócitos recuperados**

Ribeirão Preto

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

LUCIENE APARECIDA BATISTA

**Avaliação do impacto do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais bovinos isolados sobre a
qualidade dos oócitos recuperados**

Tese apresentada ao Departamento de Ginecologia e
Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão
preto para obtenção do título de doutora em Ciências
Médicas.

Área de concentração: Biologia da Reprodução

Orientador: Profa. Dra. Ana Carolina Japur de Sá
Rosa e Silva

Ribeirão Preto

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

BATISTA, Luciene Aparecida

Avaliação do impacto do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais bovinos isolados sobre a qualidade dos oócitos recuperados, 2018

80 p.13il., 30cm

Tese de doutorado, apresentada ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão/USP. Área de concentração: Biologia da Reprodução

Orientador: Profa. Dra. Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva

1.Cultivo *in vitro*; 2. folículo ovariano; 3. mitocôndria; 4.*bus taurus*

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: **BATISTA**, Luciene Aparecida

Título: Avaliação do impacto do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais bovinos isolados sobre a qualidade dos oócitos recuperados

Tese apresentada ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de doutora em ciências médicas.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____

DEDICATÓRIA

A minha família que sempre esteve comigo em todos os momentos

AGREDECIMENTO

Todos sabem que um trabalho como este não se faz sozinho. Ainda que a responsabilidade pelos erros e omissões seja minha, uma vez que sou o redator desta dissertação e boa parte do que está aqui escrito seja fruto das minhas reflexões, há pessoas que colaboraram com sua elaboração de tal forma que preciso creditar um pouco do resultado, do melhor resultado diga se de passagem, a elas. De alguma forma, tenho que organizar as menções, por isso uns virão à frente de outros, no entanto, agradeço a todos com o mesmo sentimento.

A minha orientadora Prof^ª Dr^ª Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva, agradeço por mais uma vez, abrir as portas do seu laboratório e por acreditar no meu trabalho.

A Lisandra, obrigada pela parceria, orientação e paciência.

A Caroline Pitangui, Thais Tiemi, Deize e Iara pela ajuda nos experimentos e por não me deixarem desanimar. Este trabalho não sairia se não fosse pela ajuda de vocês. Espero que nossa parceria ainda continue durante bons e longos anos. Obrigada pela amizade de vocês e colaboração.

A professora Ester e ao biólogo Reginaldo, que me permitiram realizar parte dos experimentos no laboratório de genética, melhoramento animal e computação e utilizar toda infra-estrutura para que meus experimentos fossem realizados de maneira eficiente.

A professora Luciane e ao Anderson Souza pela colaboração, disponibilidade e amizade.

A Maria Aparecida eu agradeço por toda ajuda nos experimentos, pelas conversas, paciência e consideração.

A Cris Padovan, Reinado e a Lilian, funcionários do laboratório multiusuário que me auxiliaram nos experimentos de molecular.

A todos os amigos da pós-graduação, obrigada pelos momentos de descontração, pelas risadas no corredor e pelos cafezinhos.

A todas as funcionárias e amigas do laboratório de GO: Marilda, Marisa, Océlia, Gisele, Fabiana, Camila, Cris, Albina, Tati, Cris Brent, Alce, Sandra e Adriana, agradeço pelo carinho de todas.

A minha família que mesmo longe torcem por mim e que me enchem de mimos.

Ao meu pai Deraldo e minha mãe Elma por acreditarem em mim, se preocuparem com o meu trabalho. Aos meus irmãos pelo carinho e força.

Ao meu marido Carlos Couto, obrigada pela colaboração e ajuda neste trabalho. Obrigada por compartilhar o seu enorme conhecimento comigo. Você é o melhor exemplo de pesquisador que eu poderia ter, o mais dedicado e inteligente que eu conheço. Eu não conseguiria sem você. Te admiro muito.

A Fapesp, Capes, CNPq, Faepa, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e Departamento de Ginecologia e Obstetrícia por fornecerem todo o suporte financeiro e de infraestrutura para que essa dissertação fosse realizada.

A todos os que eu possa ter me esquecido, meu muito obrigada.

Os grandes feitos são conseguidos não pela força, mas pela perseverança.
Samuel Johnson

BATISTA, Luciene Aparecida. **Avaliação do impacto do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais bovinos isolados sobre a qualidade dos oócitos recuperados**. 2018. 78f. Tese (Doutorado em Ciências médicas) – Departamento de ginecologia e obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Os programas de preservação de fertilidade baseados na criopreservação de gametas e tecido ovariano têm sido amplamente empregados para salvaguardar o potencial reprodutivo de mulheres em idade reprodutiva. Entretanto, o risco de reintrodução de células malignas após o reimplante do tecido e a dificuldade de aplicação dos protocolos de estimulação ovariana em pacientes estrogênio dependentes, dificultam o acesso destas pacientes aos programas de preservação de fertilidade já estabelecidos. O cultivo de folículos isolados vem se mostrando uma técnica promissora capaz de atender a essas pacientes, com resultados bastante satisfatórios. A recuperação de oócitos fertilizáveis tem se mostrado bem sucedida em camundongos resultando em nascidos vivos; já em outros mamíferos de grande porte, como primatas não humanos e humanos, há escassos relatos da obtenção de oócitos em estágio MII.

OBJETIVO: Este estudo teve como objetivo analisar a eficiência do cultivo tridimensional *in vitro* no desenvolvimento de folículos ovarianos bovinos e a sua influência sobre o metabolismo oxidativo, a geração de estresse oxidativo celular e os níveis de transcritos de genes ligados atividade mitocondrial, apoptose e crescimento e desenvolvimento oocitário.

MATERIAL E MÉTODOS: Foi realizado o cultivo *in vitro* tridimensional de folículos secundários bovinos por 16 dias em meio α -MEM suplementado, em atmosfera de 5% de CO₂ e 20% de O₂ (Grupo *in vitro* - Gvt). Como controles foram incluídos dois grupos: um de folículos secundários isolados frescos não submetidos a cultivo (Grupo imaturos- GI) e outro de folículos extraídos já em estágios pré-antrais mais avançados do desenvolvimentos (Grupo *in vivo*- Gvv). Para a avaliação do desenvolvimento folicular, foram realizadas análises morfológica e testes de viabilidade, além da expressão por RT- qPCR de genes alvos para a atividade mitocondrial e estresse oxidativo.

RESULTADOS: As análises do desenvolvimento dos folículos *in vitro* mostraram que 81,1% dos folículos secundários apresentaram crescimento, com uma taxa de viabilidade em torno de 84%. Cerca de 50% de oócitos recuperados após o cultivo estavam viáveis pela avaliação morfológica, embora nenhum deles tenha atingido o estágio final de maturação (MII). Além disso, o cultivo não promoveu aumento da expressão de genes ligados a apoptose o que também sugere uma boa viabilidade dos folículos cultivados. O mesmo não ocorreu com o sistema Kit Ligand e c-Kit, considerados como marcadores da capacidade global de crescimento e desenvolvimento folicular, verificou-se uma menor expressão de *KL* nas células somáticas da parede folicular. Com relação ao metabolismo oxidativo, embora o estado redox, marcado pela produção de NAD e FAD, estivesse bastante aumentado nos folículos produzidos *in vitro* quando comparado com o controle imaturo fresco e maturado *in vivo*, não se observou aumento das espécies reativas de oxigênio em oócitos obtidos destes mesmos folículos, podendo sugerir a manutenção da capacidade de controlar o balanço oxidativo por parte destas células. Também não houve alteração na expressão de genes ligados à biogênese mitocondrial entre os grupos estudos.

CONCLUSÃO: O método de cultivo proposto neste estudo, utilizando o sistema 3D em matriz de gel de alginato,

permitiu a maturação parcial de folículos secundários isolados, mantendo a viabilidade e características do metabolismo oxidativo semelhantes a folículos maturados *in vivo* de mesmo tamanho. Entretanto, há algum grau de comprometimento na saúde global do folículo, especialmente em relação às células somáticas da parede folicular.

Palavras-chave: Cultivo *in vitro*; folículo ovariano; mitocôndria; *bos taurus*

BATISTA, Luciene Aparecida. **Evaluation of the impact of in vitro culture of isolated bovine preantral follicles on the quality of recovered oocytes** 2018. 80 f. Thesis Department of gynecology and obstetrics of the Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeiro Preto, 2018.

ABSTRACT

The fertility preservation programs based on oocyte and ovarian tissue cryopreservation has been widely employed to safeguard the reproductive potential of these patients. However, the risk of reintroducing malignant cells after ovarian tissue transplantation and the difficulty of applying ovarian stimulation protocols in patients with estrogen dependent diseases hinder the access of these patients to already established fertility preservation programs. Isolated follicle culture appears as a promising technique for these cases, with satisfactory results. The recovery of fertilizable oocytes has been shown to be successful in mice resulting in live births; in other large mammals, such as non-human primates and humans, there are a few reports of the obtention of oocytes in the MII stage. **OBJECTIVE:** This study aimed to analyze the efficiency of in vitro three-dimensional culture in the development of bovine ovarian follicles and their influence on oxidative metabolism, on cellular oxidative stress generation and on the transcript levels of genes linked to mitochondrial activity, apoptosis and oocyte growth and development. **MATERIAL AND METHODS:** Three-dimensional *in vitro* culture of bovine secondary follicles was carried out for 16 days in supplemented α -MEM medium, in an atmosphere of 5% CO₂ and 20% O₂ (In vitro Group - Gvt). As controls, two groups were included: one of the fresh none cultured isolated secondary follicles (GI-immature group) and one of follicles isolated in a more advanced preantral stage (*in vivo* Group-Gvv). For the evaluation of the follicular development, morphological analysis and viability tests were performed, besides the expression by RT-qPCR of target gene for mitochondrial activity and oxidative stress were also evaluated. **RESULTS:** Analysis of the *in vitro* follicle development showed that 81.1% of the secondary follicles have grown, with a viability rate of 84%. About 50% of oocytes recovered after culture were viable by morphological evaluation, although none of them had reached the final maturation stage (MII). In addition, the culture did not promote increased on the expression of apoptosis-linked genes which also suggests good viability of the cultured follicles. The same was not observed with the Kit Ligand and c-Kit, considered as markers of the global capacity of follicular growth and development; there was a lower expression of KL in the somatic cells from the follicular wall. In relation to the oxidative metabolism, although the redox state, marked by the production of NAD and FAD, was greatly increased in follicles produced *in vitro* when compared to the immature controls and the *in vivo* matured group, there was no increase on the production of reactive oxygen species in the oocytes obtained from these follicles, suggesting that these cells were able to control their oxidative imbalance. Also, there was no alteration in the expression of genes linked to mitochondrial biogenesis between the studied groups. **CONCLUSION:** The culture method proposed in this study, using the 3D system in an alginate gel matrix, allowed the partial maturation of isolated secondary follicles, maintaining the viability and oxidative metabolism characteristics similar to follicles of the same size matured *in vivo*. However, there is some

degree of impairment in overall health, especially in relation to the somatic cells from the follicular wall.

Key words: In vitro culture; ovarian follicle; mitochondria; *bos taurus*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Representação esquemática dos estágios da foliculogênese. 10

Figura 2: Ilustração da via de sinalização mediada por KL e seu receptor c-kit. 11

Figura 3: As vias de morte celular intrínseca e extrínseca: 17

Figura 4: Produção de espécies reativas de oxigênio e seu controle pelo sistema anti-oxidante. . 19

Figura 5: Produção e eliminação de EROS: 20

Figura 6: Fluxograma do estudo desenvolvido..... 28

Figura 7: Análise da viabilidade folicular com Calceína e Homodímero de Etídio..... 31

Figura 8: Perfil do crescimento folicular *in vitro*. 38

Figura 9: Avaliação morfológica entre os grupos. 39

Figura 10: Análise da quantificação relativa dos mRNAs, em oócitos através de RT-qPCR. 41

Figura 11: Análise da expressão de mRNA nas células da granulosa e da parede folicular através de RT-qPCR 42

Figura 12: Avaliação da produção de EROs em folículos frescos, maturados *in vivo* e *in vitro* utilizando o marcador DCFH. 43

Figura 13: Quantificação de fluorescência endógena de NAD(P) 44

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT	1
LISTA DE FIGURAS.....	1
1.INTRODUÇÃO	8
1.1 Preservação da Fertilidade.....	8
1.2. Foliculogênese	9
1.2.1 Fatores associados à formação e recrutamento de folículos primordiais.....	10
1.2.2 Transição folículos primários para secundários e o seu desenvolvimento.....	11
1.2.3 Desenvolvimento dos folículos antrais, seleção do dominante e ovulação.....	13
1.2.4 Maturação dos oócitos.....	14
1.2.5 Apoptose.....	15
1.2.6 Papel da mitocondrial na maturação dos oócitos.....	17
1.3 Cultivo in vitro de folículos secundários isolados	21
2.JUSTIFICATIVA	24
3. HIPÓTESES CIENTÍFICAS	8
4. OBJETIVOS	27
4.1. Objetivo geral	27
4.2 Objetivos específicos	27
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
5.1 Desenho do estudo.....	27
5.2 Métodos:	28
5.2.1. Cultivo de Folículos Ovarianos Isolados:.....	28
5.2.1.1. Isolamento dos folículos secundários.....	28

5.2.2. Encapsulamento dos folículos pré-antrais em hidrogel de alginato	29
5.2.3. Cultivo in vitro dos folículos pré-antrais	29
5.2.2. Avaliação do Desenvolvimento e Viabilidade Folicular	30
5.2.2.1. Avaliação morfológica dos folículos	30
5.2.2.2. Avaliação da viabilidade folicular -DEAD-ALIVE	30
5.2.3. Análise da expressão gênica por RT-qPCR.....	31
5.2.4. Avaliação de metabolismo Oxidativo.....	34
5.2.4.1. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio intracelular	34
5.2.4.2. Detecção de Nicotinamida Reduzida Dinucleótido de Adenina (Fosfato) (NAD[P]) e Flavina Oxidada Dinucleótido de Adenina (FAD).....	35
5.3. Aspectos éticos	36
5.4. Análise estatística	36
6 RESULTADOS	37
6.1 Avaliação do crescimento folicular e classificação de acordo com o crescimento.	37
6.2 Avaliações morfológicas do cultivo de folículos secundários bovinos: formação de antro, viabilidade Folicular, recuperação de oócitos e viabilidade oocitária.....	38
6.2 Avaliação dos níveis de transcritos dos genes TFAM, XIAP, PGC1 α , c-KIT, KL e CAS9 em folículos fresco, maturados in vivo e in vitro.	39
6.3 Avaliação de espécies reativas de oxigênio intracelular por DCFH em oócitos maturados in vivo e in vitro.....	42
6.4 Avaliação de metabolismo oxidativo (NAD e FAD).....	43
7- DISCUSSÃO	45

1.INTRODUÇÃO

1.1 Preservação da Fertilidade

Enquanto melhorias no diagnóstico e tratamento do câncer têm levado a uma taxa de sobrevivência de 75% em pacientes jovens, os efeitos colaterais devastadores da quimioterapia ou radioterapias podem levar a inúmeras alterações físicas em médio e longo prazo em consequência ao efeito tóxico das drogas e da radiação. Com ferramentas de detecção avançadas, os pacientes são agora diagnosticados e tratados para o câncer em estágios iniciais e por isso apresentam maior chances de sobreviver. A taxa de sobrevivência nos últimos anos para as mulheres com menos de 45 anos diagnosticado com câncer é de 83%, e a taxa de sobrevivência para as crianças, adolescentes e adultos jovens é de quase 80%. (HOWLADER et al., 2012, 2014).

Dentre os efeitos deletérios das terapias contra o câncer, quimioterapia, radioterapia e / ou transplante de medula óssea, está o esgotamento da população de folículos ovarianos, levando a um quadro de falência ovariana prematura, infertilidade e riscos para a saúde a longo prazo associados com a menopausa (SCHMIDT et al., 2010). Assim, considerando-se que a cada ano, 650 mil mulheres são atingidas por algum tipo de câncer invasivo e 8% delas estão em idade reprodutiva e por trazer impacto tão significativo na qualidade de vida destas pacientes, os efeitos tardios do tratamento tem suscitado a atenção de pesquisadores por todo o mundo. Estima-se ainda que uma a cada 52 mulheres terá câncer antes dos 39 anos, número que vem aumentando a cada ano. Portanto existe uma grande preocupação na preservação do potencial reprodutivo destas mulheres (DITTRICH et al., 2012).

Apesar de existirem algumas opções para a preservação da fertilidade como a criopreservação de oócitos, de embriões e a transposição de ovário, a única opção disponível para crianças e adolescentes pré-púberes, é a criopreservação de tecido ovariano, com a esperança de reimplantar este tecido posteriormente ou de se utilizar este tecido para a extração de gametas com finalidade de aplicá-los em ciclos de reprodução assistida após maturação de folículos ou oócitos. Além disso, em algumas situações em que não é possível se proceder a indução da

ovulação, a exérese de tecido ovariano para criopreservação de gametas torna-se uma opção rápida e de mais baixo custo para a paciente. Outra vantagem deste procedimento é que o auto enxerto de tecido ovariano criopreservado pode restaurar tanto a função endócrina ovariana quanto a fertilidade, já foram reportados mais de 60 nascimentos por esta técnica (DONNEZ; DOLMANS, 2015). Apesar dos resultados promissores o enxerto de tecido ovariano deve ser evitado em situações em que este reimplante do tecido poderá causar a recorrência da doença de base por conter micro metástases não identificadas (HOWLADER et al., 2012).

Portanto novos estudos são necessários para o melhoramento das técnicas de preservação da fertilidade feminina e disponibilização de técnicas alternativas. Recentemente, avanços em criobiologia e bioengenharia do ambiente folicular vêm permitindo a realização de cultura de folículos pré-antrais isolados de maneira experimental, com resultados satisfatórios (XU et al., 2006a, 2013; ARAUJO et al., 2011; SALAMA; WOODRUFF, 2015; JAKUS et al., 2017; RIOS et al., 2018). O melhoramento desta técnica se faz necessário a fim de disponibilizar às pacientes uma alternativa para a preservação da fertilidade que atenda a crianças e mulheres jovens e não ofereça riscos para a saúde da paciente.

1.2. Foliculogênese

Em mamíferos a foliculogênese tem início durante a vida fetal, nesta fase ocorre a formação da folículos primordiais que constituem a reserva ovariana (Monniaux et al., 2014). Estas células permanecem em quiescência até o período pós-puberal, aonde, sob estímulos de fatores de crescimento e inibição ou ativação de fatores locais, um pool de folículos primordiais será ativado a cada ciclo e entrarão em desenvolvimento. Após esta ativação, os folículos se desenvolvem em folículos primários, secundários, antrais e pré-ovulatórios ou sofrem atresia durante este trajeto. Este processo de desenvolvimento folicular até a ovulação ou atresia é dependente da sinalização celular, fatores locais e hormonais. (Monniaux et al., 2014; Skinner, 2005).

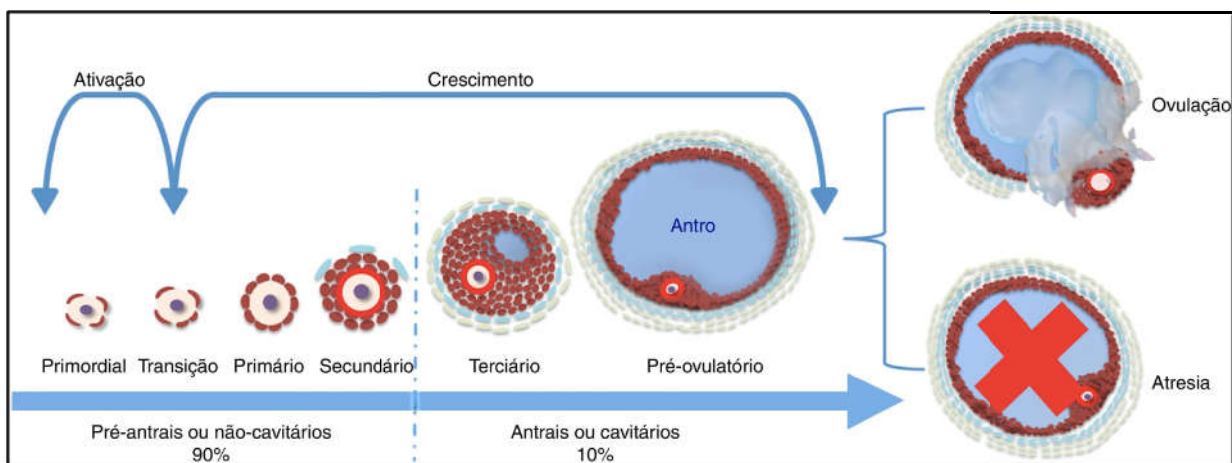


Figura 1 Representação esquemática dos estágios da foliculogênese. (Extraído de: LIMA et al., 2016)

1.2.1 Fatores associados à formação e recrutamento de folículos primordiais

Os folículos primordiais originam-se das células germinativas primordiais, que migram do saco vitelínico para as gônadas primitivas sob a ação de sinais quimiotáticos (BRISTOL-GOULD AND WOODRUFF, 2006), envolvimento de integrinas e a sinalização de vias como *kit ligante/c-kit*, também denominado fator de células tronco (*SCF*) (BUEHR ET AL., 1993).

A ativação destes folículos inicia-se durante a vida fetal, porém continua durante toda a vida fértil até o esgotamento total da reserva ovariana. Esse período é regulado unicamente por fatores intra-ovarianos, não havendo ação hormonal (FORTUNE, 2003). Segundo alguns estudos, a ativação de folículos primordiais é controlada por um delicado balanço entre fatores inibitórios e estimulatórios (ALBERTINI et al., 2001; FORTUNE, 2003).

A transição para folículo primário é dependente da comunicação bidirecional entre as células mesenquimais, oócitos, células da granulosa circundantes e das células da teca-intersticiais derivadas do estroma e do mesênquima (EPPIG, 2001; SKINNER, 2005).

Inicialmente há a ativação do gene *Mammalian Target of Rapamycin Complex 1* (*mTORC1*) nas células da pré-granulosa, resultando em sua diferenciação para células cubóides e no aumento de sua proliferação (ADHIKARI et al., 2010). A diferenciação promovida por *mTORC1*, leva a expressão do fator peptídico *Kit Ligand* (*KL*), o qual exerce influência nas

células-alvo por meio de sua ligação ao *receptor tirosina-quinase*, conhecido como *c-kit* (expresso pelo oócito).

Estudos tem demonstrado o papel do *KL* e do *c-kit* no desenvolvimento e crescimento oocitário. A via de sinalização mediada por *KL* e seu receptor, ativa fosfatidilinositol 3-quinase (*PI3K*), dando início ao processo de maturação oocitário e disparando fatores responsáveis pela síntese protéica, sobrevivência e proliferação celular e também induz a expressão dos genes *GDF9* e *BMP15*, que mantém a proliferação e a diferenciação das células da granulosa através da sinalização de *SMAD* (JOYCE et al., 1999; TUCK et al., 2015; MONNIAUX, 2016).

O fator *KL*, mencionado anteriormente também tem sido associado a uma série de eventos relativos à formação dos folículos secundários, incluindo a proliferação das células da granulosa, regulação da esteroidogênese e o recrutamento de células da teca (REYNAUD et al., 2000). Sendo assim, poderíamos dizer que o complexo *KL* e *c-kit* seriam marcadores da capacidade global de crescimento e desenvolvimento do folículo, uma vez que estão envolvidos em inúmeros processos ao longo da foliculogênese.

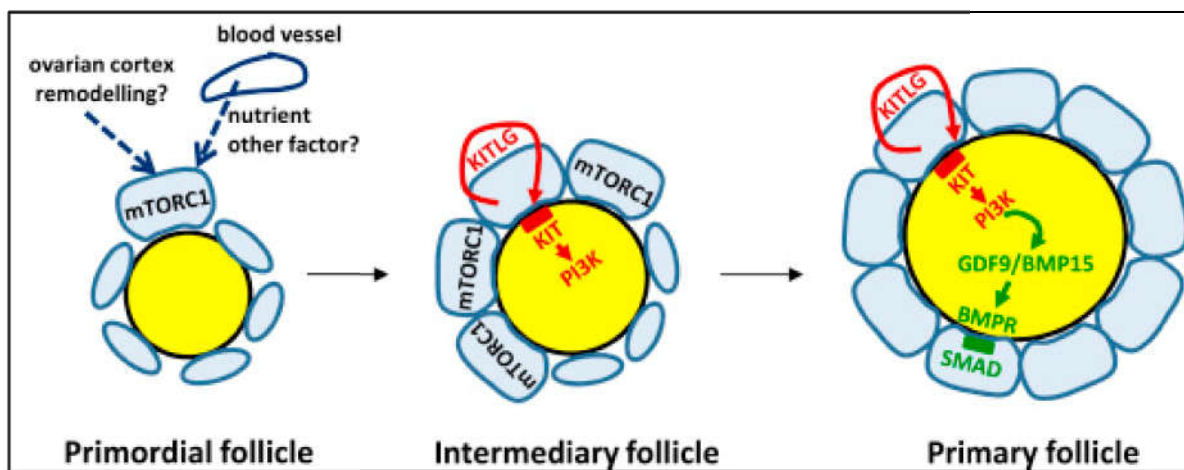


Figura 2: Ilustração da via de sinalização mediada por *KL* e seu receptor *c-kit*. A ligação de *KL* ao seu receptor leva a ativação de *PI3k* induz a expressão de *GDF9* e *BMP15*. *SDMAD* é ativado mediante aumento da expressão de *BMPR* por *GDF9* e *BMP15* (MONNIAUX, 2016)

1.2.2 Transição folículos primários para secundários e o seu desenvolvimento

Com a manutenção da proliferação celular, mediata pelos genes *GDF9* e *BMP15* novas camadas de células da granulosa são formadas em torno do oócito, caracterizando a transição do folículo primário para secundário. Esta fase é impulsionada por fatores produzidos no ovário, além de neurotransmissores e parece ser independente da ação hormonal, embora tenha sido detectada a presença de receptores para o hormônio folículo estimulante (FSH) nas células da granulosa neste estágio (MONNIAUX et al., 2014).

Sendo assim, os folículos secundários, são caracterizados morfológicamente por um oócito com diâmetro aumentado, zona pelúcida visível rodeada por múltiplas camadas de células da granulosa cuboides (duas ou mais camadas) e formação de uma camada de células da teca em torno da membrana basal. À medida que o folículo cresce, a camada de células da teca se estratifica e se diferencia em duas partes distintas: a região mais periférica, denominada de teca externa é composta por células não diferenciadas e as células localizadas mais internamente, teca interna, se diferenciam e passam a secretar esteroides (MAGOFFIN, 2005; KNIGHT; GLISTER, 2006).

Neste estágio secundário do desenvolvimento folicular a interação entre o oócito e as células da granulosa é imprescindível para o crescimento e desenvolvimento dos folículos. Já é descrito a existência de uma rede de junções do tipo *gap* ou junções intercomunicantes que permitem a passagem de nutrientes, íons, moléculas mensageiras e pequenos metabólitos entre as células (EPPIG et al., 1997; ORISAKA et al., 2009). Estudos mostram que quando a conexão oócito-granulosa é perdida, as células da granulosa começam a aderir e sofrer apoptose, levando a morte do folículo (LIU et al., 2006; MATSUDA et al., 2012).

O desenvolvimento de folículos pré-antrais compreende a fase mais longa de todo o processo de maturação, podendo durar meses, é nesse período que ocorre o maior crescimento oocitário, o qual por uma reorganização citoplasmática. Além disso, novos produtos gênicos e organelas são sintetizados (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Tem sido proposto que a competência de desenvolvimento do oócito é determinada, em parte, pela quantidade de transcritos armazenados durante esta fase (EICHENLAUB-RITTER; PESCHKE, 2002; KLINGER; DE FELICI, 2002; SIRARD et al., 2006).

1.2.3 Desenvolvimento dos folículos antrais, seleção do dominante e ovulação

A transição do folículo secundário para antral geralmente é correlacionada com a aquisição da competência do oócito para retomar a primeira divisão meiótica. A grande proliferação das células da granulosa e da teca, o aumento da vascularização folicular e a formação da cavidade antral marcam o início desta fase (van den Hurk and Zhao, 2005). As células da granulosa sofrem diferenciação e são então classificadas em duas classes distintas de células: granulosa mural, que revestem a parede folicular e a granulosa do cúmulo, que estão associados ao oócito. Geralmente, as células do cúmulo atuam no processo de desenvolvimento do oócito, enquanto as células murais estão relacionadas a função endócrina e arquitetura folicular(WIGGLESWORTH et al., 2015).

Embora a formação do antro folicular não seja compreendida completamente, sabe-se que há a participação de componentes liberados pelas células da granulosa, fatores de crescimento e ainda a ação dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante(LH) (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). O FSH contribui positivamente para a manutenção do crescimento folicular, estimulando a expressão dos receptores para os fatores de crescimento fibroblásticos (FGFs) em células da granulosa e sensibilizando as células de folículos recém-recrutados à ação mitogênica dos FGFs(BURATINI et al., 2005). Além disso, o FSH auto regula receptores próprios, tornando-o mais sensível à sua própria ação.

Sob o estímulo do FSH, por um mecanismo ainda não esclarecido, um folículo irá se destacar em relação aos outros folículos antrais, tornando-se dominante. A seleção do folículo dominante leva à atresia dos demais folículos em crescimento por ação da secreção de inibina (FORTUNE, 1994).E a redução da secreção de FSH em consequência ao alto nível de estradiol produzido pelo folículo dominante. Com o final do desenvolvimento se aproximando, o folículo antral dominante continua o seu crescimento, tornando-se um folículo pré-ovulatório. Neste momento há uma mudança no padrão de dependência de FSH para LH, seguida de uma diminuição dos níveis de FSH e aumento de LH. O aumento do LH é a sinalização para o término

da replicação e especialização das células da granulosa. Com o pico pré-ovulatório de LH, o oócito retoma a meiose e progride da prófase I para a metáfase II, proporcionando a ovulação de um oócito maduro (GINTHER et al., 2003).

1.2.4 Maturação dos oócitos

A maturação do oócito compreende transformações nucleares e citoplasmáticas ligadas a uma série de mudanças estruturais e bioquímicas que habilitam o gameta a ser fecundado, este processo ocorre concomitante ao desenvolvimento folicular. Na maturação nuclear há modificações na configuração da cromatina, incluindo a quebra da vesícula germinativa, passagem pelas fases da meiose: metáfase I, anáfase I, telófase I e metáfase II; separação dos cromossomos homólogos, extrusão do primeiro corpúsculo polar (CP) e formação do fuso meiótico, que será reativado com a fecundação ou ativação artificial (HYTTEL et al., 1997) Já a maturação citoplasmática começa desde a formação dos folículos primordiais, sendo os processos mais observados: o surgimento das junções intercomunicantes (*gaps*) entre oócito e granulosa, o desenvolvimento e a migração de organelas, o desenvolvimento do retículo endoplasmático liso e das gotas lipídicas, a formação e migração dos grânulos corticais para a periferia, a síntese de proteínas e formação da zona pelúcida, a diferenciação das mitocôndrias, a desorganização dos centríolos, a transcrição e proteção dos mRNA maternos para síntese de proteína do oócito e do desenvolvimento embrionário inicial (VAN BLERKOM, 1991; SIRARD, 2001). Além da maturação nuclear e citoplasmática a célula sofre também maturação molecular, que embora não seja bem esclarecida, sabe-se que ela tem uma importante função durante o período de crescimento do oócito.

Também durante o processo de maturação, o metabolismo oxidativo do oócito e das células da granulosa são intensificados. Maiores concentrações de glicose, oxigênio e piruvato são requeridos nesta fase para a geração de energia. A glicose é o principal carboidrato utilizado para geração de ATP, o seu metabolismo é realizado pelas células da granulosa, por via glicolítica. Desta maneira o oócito recebe das células da granulosa os substratos necessários

para o seu metabolismo, já que apresentam baixa capacidade de absorver a glicose (SUTTON; GILCHRIST; THOMPSON, 2003; GUTNISKY et al., 2013)

Todos estes eventos levam à aquisição da competência oocitária, que torna a célula germinativa capaz de ser fecundada e de iniciar o desenvolvimento do novo organismo até a ativação do genoma embrionário (SIRARD et al., 2006). Outro fator chave para a competência oocitária é a qualidade do complexo cúmulo oócito (COC), as células da granulosa que rodeiam os oócitos se comunicam entre si e com o oócito durante todo o processo de maturação celular até o seu recrutamento, por meio de junções comunicantes do tipo GAP (*gap junctions*). O COC também é responsável pela indução da tradução das proteínas que formam a zona pelúcida, a estrutura que reveste o oócito delimitando-o das células da granulosa e formando uma membrana externa (MATZUK et al., 2002; ALBERTINI; BARRETT, 2003).

1.2.5 Apoptose

A cada ciclo menstrual em mamíferos, para que haja a extrusão de um oócito maduro, centenas de folículos primordiais são ativados. Ao longo do processo de desenvolvimento e maturação folicular milhares de folículos são perdidos por processo de atresia, de maneira que apenas um completará o ciclo (MONNIAUX, 2016). Sendo assim, a morte celular programada ou apoptose é um dos processos de grande importância em um ciclo menstrual normal e representa um caminho importante para eliminação de células danificadas durante o desenvolvimento em mamíferos (BETTS; KING, 2001)

Um dos fatores importantes na progressão de folículos não dominantes para a atresia é a queda da secreção de FSH na segunda metade do ciclo. Neste contexto, em um cultivo folicular ou em um ciclo de indução de ovulação para procedimento de Reprodução Assistida com doses constantes de FSH objetiva-se minimizar esta atresia e fazer maturar mais de um folículos ao mesmo tempo, por isso a avaliação da apoptose dos folículos cultivados tem por finalidade verificar a viabilidade folicular e a qualidade do cultivo.

A sinalização para início do processo de apoptose pode ocorrer de duas maneiras: a via extrínseca, mediada por receptores de superfície celular (receptores de morte) e a via intrínseca por meio da mitocôndria (JOZA; KROEMER; PENNINGER, 2002; ELMORE, 2007). Entre os

eventos que levam à apoptose podemos destacar uma série de estímulos incluindo remoção de fatores essenciais de crescimento, estresse oxidativo, ativação de receptores específicos e agressão celular por diferentes fatores. Independente da via, duas famílias importantes regulam o processo apoptótico: a das caspases e a da *Bcl-2*, porém a família das caspases é considerada a executora principal da via apoptótica (ELMORE, 2007).

Após ocorrência de um estímulo, a cascata de sinalização das caspases é ativada levando a destruição de uma variedade de proteínas resultando nas modificações morfológicas observadas nas células apoptóticas (ELMORE, 2007). A família da caspase compreende vários membros, que são divididos de acordo com o seu papel, são eles: as **iniciadoras** (caspase-2, caspase-8, caspase-9 e caspase-10) e as **executoras** (caspase-3, caspase-7) (BOATRIGT; SALVESEN, 2003b, 2003a).

A ativação das caspases pode ocorrer pela via extrínseca, na qual sinais externos ativam receptores específicos da membrana plasmática (Fas, TNF), disparando uma sinalização que resulta na ativação das caspases 8 a 10. Já a ativação da via intrínseca é disparada por sinais intracelulares. Esses dois caminhos aparentemente convergem para pro-caspase 3, que uma vez ativada, executa a clivagem de proteínas específicas que desencadeiam a morte celular (BOATRIGT; SALVESEN, 2003a).

Em mamíferos, as caspases podem ser inibidas e degradadas via ubiquitina-proteassoma e pela atuação de proteínas anti-apoptóticas. Estudos tem mostrado a capacidade de uma proteína da família das IAP (inibidoras da apoptose) de inibir diretamente as caspases, tanto na fase de iniciação (caspase-9) quanto na fase de execução (caspases-3 e 7) de apoptose (ECKELMAN; SALVESEN, 2006). As IAPs compreendem uma família com oito proteínas identificadas até o momento, que apresentam várias funções celulares, incluindo o controle da apoptose e o controle do ciclo celular (PHILLIPPS; HURST, 2012).

Dentre as IAPs , a mais conhecida é a proteína inibidora de apoptose ligada ao X (*XIAP*). Estudos recentes identificaram a proteína em todos os tipos celulares do ovário de mamíferos (PHILLIPPS; HURST, 2012). A expressão generalizada também nas diferentes fases do desenvolvimento folicular sugerem que *XIAP* e, possivelmente, as demais IAPs estão envolvidas na regulação do ambiente ovariano, embora *XIAP* seja a única da família

comprovadamente capaz de inibir diretamente as vias intrínseca e extrínseca de ativação das caspases (ECKELMAN; SALVESEN, 2006). Estudos em ratos e ruminantes mostraram o seu papel na atresia folicular. Além disso, ela é identificada juntamente com a *Casp3* em células da granulosa de folículos antrais, o que contribui para suposto papel de *XIAP* como inibidor direto da caspase (PHILLIPPS et al., 2011a; PHILLIPPS; HURST, 2012)

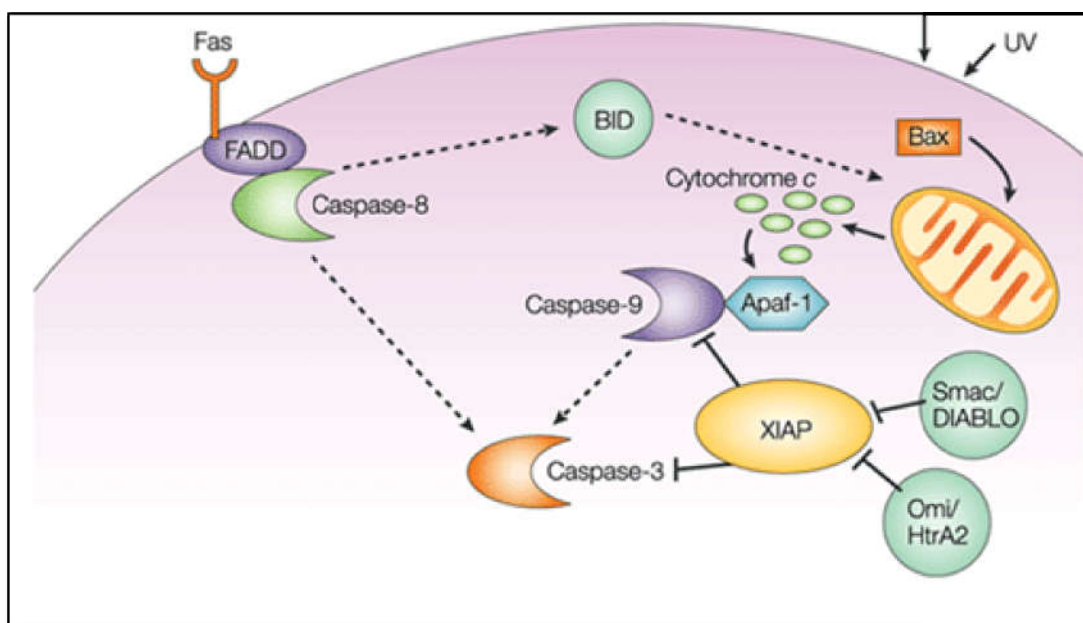


Figura 3: As vias de morte celular intrínseca e extrínseca: A apoptose mediada por receptores é iniciada com o recrutamento e ativação de caspase-8. Caspase-8 pode clivar diretamente a caspase-3. A via intrínseca envolve a translocação para mitocôndrias de membros da família pró-apoptótica Bcl-2, como Bax, que resulta na liberação de citocromo c no citosol, oligomerização de Apaf-1 em um complexo com caspase-9 (o apoptossoma) e a subsequente ativação da caspase-3. Em alguns casos, iniciado pelo receptor os sinais podem ser transduzidos através da via mitocondrial; por exemplo, através da clivagem e ativação do lance. FADD, proteína do domínio de morte associado a Fas; UV, luz ultravioleta; *XIAP*, *IAP* ligado ao X (Modificado de SALVESEN; DUCKETT, 2002).

1.2.6 Papel da mitocondrial na maturação dos oócitos

As mitocôndrias são as organelas mais abundantes no oócito e são responsáveis pelo metabolismo energético, homeostase do cálcio e apoptose. Varias alterações mitocondriais estão sendo relacionadas à infertilidade (GHAFFARI NOVIN et al., 2015). Tem sido descrito que

alterações no movimento citoplasmático mitocondrial, mediada pelo citoesqueleto, pode afetar a qualidade oocitária (VAN BLERKOM, 1991; TORNER et al., 2004), uma vez que, a distribuição incorreta de mitocôndrias pela rede de microtúbulos leva à alteração na distribuição de ATP, o que acarreta em retardo ou parada do desenvolvimento oocitário (NAGAI et al., 2006). Entretanto, do ponto de vista respiratório, a maturação dos oócitos em mamíferos depende não apenas de um alto nível de ATP para a quebra do envelope nuclear, mas também da presença de concentrações adequadas de cálcio intracelular, o qual é derivado do retículo endoplasmático (ER) e das mitocôndrias (KRISHER, 2004).

Não só a localização mitocondrial, mas a estreita relação de genes que participam da sua manutenção, estão sendo correlacionados com o desenvolvimento folicular, no que se diz respeito a manutenção da sobrevivência das células da granulosa e diminuição da apoptose (DONG et al., 2016). Nesse aspecto, baixos níveis da expressão dos genes *TFAM*, *NRF1* e *COXI* em oócitos bovinos estão associados a baixa capacidade em se desenvolver (OPIELA et al., 2010). Corroborando estes dados, Ghaffari Novin e colaboradores (2015), demonstraram que *TFAM* e *NRF1*, genes relacionados com a biogênese mitocondrial, são fatores críticos para a maturação do oócito humano *in vivo*. Entretanto, pouco se sabe sobre as alterações mitocondriais ocorridas durante o desenvolvimento folicular *in vitro* (GHAFARI NOVIN et al., 2015).

Ainda neste contexto, outro gene que vem ganhando destaque ao correlacionar as mitocôndrias ao desenvolvimento oocitário, é o *Peroxisome Proliferation activated Receptor γ Coactivator 1 α* (*PGC1 α*), considerado regulador positivo da biogênese mitocondrial, termogênese adaptativa e da gliconeogênese (AUSTIN; ST-PIERRE, 2012) .

Imaginava-se que o aumento da atividade de *PGC1 α* e o aumento do metabolismo oxidativo poderiam estar correlacionados com a elevação de espécies reativas de oxigênio (EROS), geradas principalmente pela mitocôndria. Entretanto, a *PGC1 α* também atua como um regulador de vários componentes antioxidantes que controlam o balanço oxidativo dentro intracelular (VALLE; OLIVER; ROCA, 2010; AUSTIN; ST-PIERRE, 2012)

A produção de EROS ocorre principalmente na cadeia de transporte de elétrons localizada na membrana interna mitocondrial durante o processo de fosforilação

oxidativa (OXPHOS)(DEVINE; PERREAULT; LUDERER, 2012). O vazamento de elétrons no complexo I e no complexo III leva à redução parcial de oxigênio para formar o ânion superóxido que, por sua vez, é o precursor de outras EROS. O superóxido é rapidamente convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) espontaneamente ou enzimaticamente catalisado pela superóxido dismutase (SOD)(SASTRE et al., 2000).

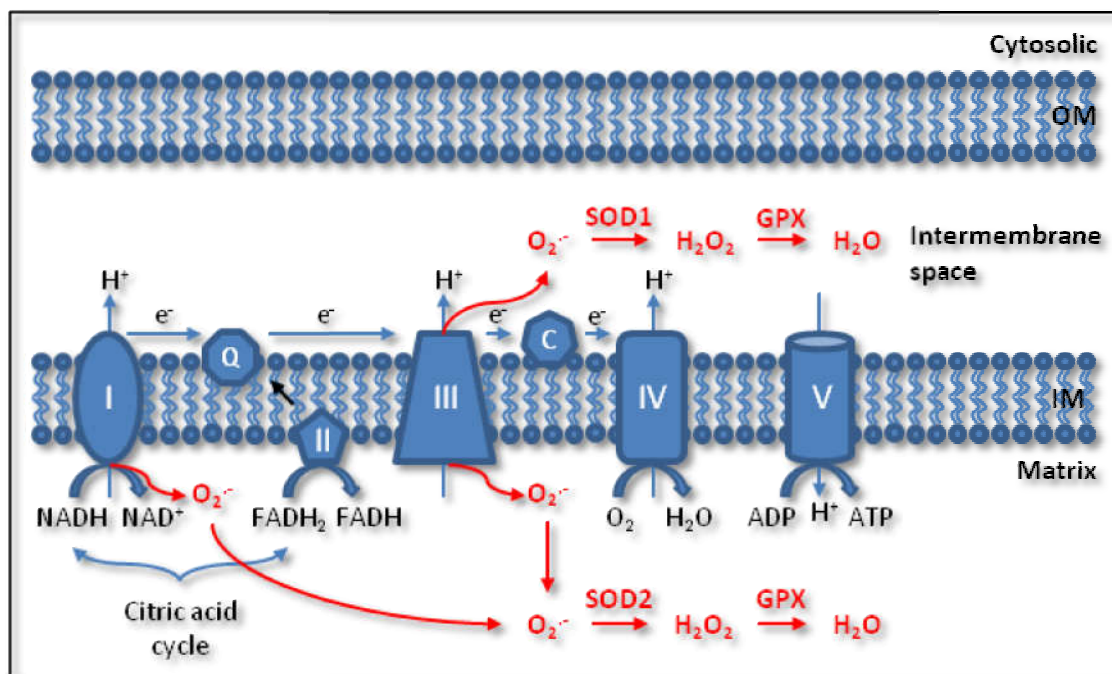


Figura 4: Produção de espécies reativas de oxigênio e seu controle pelo sistema anti-oxidante. Elétrons (e^-) doados pelo NADH e pelo $FADH_2$ passam pela cadeia de transporte de elétrons e reduzem o O_2 para formar H_2O no complexo IV. O EROS mitocondrial são produzidos a partir do vazamento de e^- para formar superóxido (O_2^-) no complexo I e complexo III. O_2^- é produzido dentro da matriz no complexo I, no complexo III e O_2^- é liberado na matriz e no espaço intermembranar. Uma vez gerado, O_2^- é dismutado a H_2O_2 pela superóxido dismutase 1 (SOD1) no espaço intermembranar e por SOD2 na matriz. Em seguida, o H_2O_2 é totalmente reduzido a água pela glutatona peroxidase (GPX). Ambos O_2^- e H_2O_2 produzidos neste processo são considerados como mtEROS. OM: membrana externa; IM: membrana interna (LI et al., 2013)

Neste contexto, as células apresentam um elaborado sistema de defesa antioxidante para se proteger do ataque de EROS. Este sistema inclui enzimas como superóxido dismutase, catalase e várias peroxidases, bem como compostos antioxidantes (vitaminas C, E, glutatona), que, independentemente ou em cooperação, contribuem para neutralizar as EROS (Figura 5). Por

exemplo, a enzima glutatona redutase (GR) está envolvida na redução da glutatona oxidada(GSSG), usando NADPH ou NADH como co-fator, para produzir glutatona reduzida (GSH) (CHANCE et al., 1979) que é sintetizada a partir das células do cúmulo e representa uma importante molécula de defesa contra o estresse oxidativo (CURNOW et al., 2010).Vários estudos demonstraram o benefício de aumentar os níveis de GSH intra-ocitário durante o desenvolvimento (DE MATOS; FURNUS; MOSES, 1997; DE MATOS et al., 2002a, 2002b; CURNOW et al., 2010)

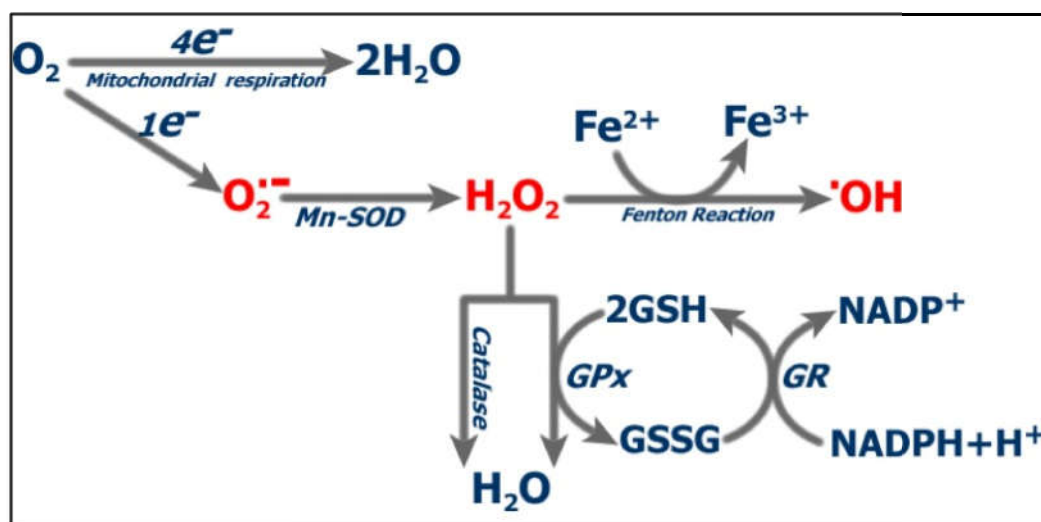


Figura 5: Produção e eliminação de EROS:SOD: Superóxido dismutase; GPx: glutatona peroxidase; GR: glutatona redutase. Retirada de (VALLE; OLIVER; ROCA, 2010)

Quando a produção celular de EROs supera as defesas antioxidantes gerais, os radicais livres ficam exacerbados e passam a produzir seus efeitos deletérios na célula. Essa situação, denominada estresse oxidativo, deve ser responsável pelo acúmulo de dano celular durante a vida, desempenhando um papel na etiogênese e no curso de numerosas patologias e no envelhecimento celular(SASTRE et al., 2000; DEVINE; PERREAULT; LUDERER, 2012). Macromoléculas dentro das mitocôndrias são mais propensas a danos induzidos por EROs devido à sua proximidade física à fonte de EROs.

Em bovinos, a produção de EROs em baixas concentrações desempenham papéis fisiológicos importantes como maturação oocitária e aquisição de competência (BLONDIN; COENEN; SIRARD, 1997; COMBELLES; GUPTA; AGARWAL, 2009), entretanto o seu acúmulo pode ter efeitos deletérios sobre a função celular induzindo dano oxidativo de componentes intracelulares e levando apoptose (CHAO et al., 2005; SUGINO, 2005).

1.3 Cultivo in vitro de folículos secundários isolados

O cultivo *in vitro* de folículos isolados vem se tornando uma importante ferramenta tanto para o estudo dos fatores que controlam a foliculogênese, quanto para permitir o estabelecimento de sistemas eficientes para a produção de oócitos maduros com fins reprodutivos nas mais diversas espécies. A elucidação dos mecanismos e fatores que a regulam é essencial para o desenvolvimento de uma cultura *in vitro* com sucesso na recuperação de oócitos fertilizáveis, oferecendo condições para a preservação da fertilidade humana e animal (XU et al., 2011).

Essa técnica de cultivo apresenta como vantagem a possibilidade do acompanhamento dos folículos, permitindo a investigação morfológica, estrutural e molecular de cada um individualmente, possibilitando o entendimento de quais fatores nutricionais, hormonais e genéticos estão envolvidos no desenvolvimento e a identificação de fatores diferenciados que determinam sua qualidade (ABIR et al., 2006; MATSUDA et al., 2012).

O estabelecimento de um sistema de cultivo *in vitro* de folículos primários e pré-antrais vem sendo estudado em diferentes espécies de mamíferos (rato, hamster, porco, cabra, bovino e humano), mas até o momento a recuperação de oócitos fertilizáveis só foi possível em camundongos, macacos, suínos e caprinos (EPPIG; O'BRIEN, 1996; WU; EMERY; CARRELL, 2001; XU et al., 2011). Prole viva foi gerada em ratos após a cultura 3D em alginato (XU et al., 2006a) e estudos demonstraram a potencial aplicação desta abordagem em humanos (XU et al., 2009; SMITZ et al., 2010; LERER-SERFATY et al., 2013), embora ainda seja considerado um procedimento experimental.

Uma das grandes dificuldades do estudo em mamíferos é determinar o ambiente ideal para manutenção *in vitro* desses folículos durante um período suficiente para o crescimento e maturação do oócito. São muitas as variáveis que precisam ser controladas, tais como: a escolha do meio de cultivo base, os componentes proteicos e hormonais que devem ser adicionados, a opção de cultivo tradicional bidimensional (2D) ou tridimensional (3D), nas suas diferentes matrizes, a temperatura e concentrações gasosas aplicadas ao sistema (XU et al., 2011; GOOK et al., 2014). Neste sentido, o meio de cultivo onde o folículo isolado será mantido deve garantir o fornecimento de nutrientes, eletrólitos, antioxidantes, aminoácidos, substratos energéticos, vitaminas, fatores de crescimento, hormônios e outros componentes importantes para a manutenção do oócito e do folículo em desenvolvimento (FORTUNE, 2003; PICTON et al., 2008).

Embora o uso de meio de cultivo tradicional 2D suporte o crescimento e diferenciação completa de folículos imaturos de camundongos, bem como de oócitos meioticamente competentes (EPPIG; O'BRIEN, 1996), este sistema não tem obtido o mesmo sucesso em outras espécies de mamíferos. O grande desafio está em conseguir manter a estrutura do folículo de mamíferos de grande porte, arredondada e cavitada, semelhante à encontrada *in vivo* (ABIR et al., 1997; GUTIERREZ et al., 2000; SUN; LI, 2013), já que a arquitetura folicular é importante para o processo de crescimento e diferenciação do oócito *in vivo* e *in vitro* (MATZUK et al., 2002).

Nos últimos anos o sistema de cultivo 3D em alginato vem sendo utilizado há para o cultivo folicular (XU et al., 2006b) de caprinos, bovinos, primatas não humanos e humanos (MAGALHÃES et al., 2011; SUTTON-MCDOWALL et al., 2012; XU et al., 2013; MCLAUGHLIN et al., 2018), permite a manutenção da arquitetura tridimensional folicular, garantindo o melhor crescimento e condições para a formação de cavidade antral e obtenção de oócitos meioticamente competentes (XU et al., 2009; SMITZ et al., 2010).

Apesar de grande número de protocolos propostos para o cultivo de folículo ovariano serem capazes de induzir o crescimento do folículo, a formação de cavidade antral e a recuperação de oócitos saudáveis do ponto de vista morfológico, os desfechos reprodutivos são ainda limitados (ARAUJO et al., 2014) e a geração de prole saudável a partir destes gametas se

limita a algumas poucas espécies. Provavelmente as características metabólicas, genéticas e funcionais deste oócito não está sendo adequadamente desenvolvida, sendo assim além de avaliar crescimento e morfologia é necessário analisar o maquinário celular nas suas características moleculares e funcionais a fim de identificar as falhas e, com base nisso, aprimorar os sistemas de cultivo.

2.JUSTIFICATIVA

O cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais isolados para recuperação de oócitos viáveis é uma solução rápida para a preservação de fertilidade feminina, com a vantagem de não demandar atraso do tratamento da paciente e tão pouco oferecer risco de reintrodução de células cancerígenas quando realizado o reimplante do tecido ovariano criopreservado. O cultivo em si já é feito com relativo sucesso em algumas espécies de macacos e roedores, porém, na maioria das espécies a manutenção do folículo em cultivo até os estágios antrais ainda é um desafio. Por isso, o cultivo de folículos desde os estágios iniciais até sua completa maturação ainda é uma técnica considerada experimental dentre os procedimentos de preservação de fertilidade e devido à escassez de material humano para fins de pesquisa e padronização de técnicas de cultivo, torna-se necessário o estudo em modelos experimentais, tais como o bovino, a fim de melhor compreender o desenvolvimento folicular e melhorar dos protocolos de cultivo *in vitro*. Ao mesmo tempo, avaliar apenas a morfologia e o crescimento da unidade folicular não garante a recuperação de um oócito saudável e fertilizável, por isso as análises dos transcritos gênicos e outros parâmetros metabólicos e funcionais destes folículos desenvolvidos *in vitro* poderão acrescentar informações importantes relativas à qualidade do gameta obtido, visando o aperfeiçoamento das técnicas hoje realizadas a fim de viabilizar o emprego clínico do tecido ovariano criopreservado sem riscos para a paciente.

3. HIPÓTESES CIENTÍFICAS

Diante do exposto, formulou-se a seguinte hipótese:

I - O cultivo de folículos pré-antrais bovinos *in vitro*, proposto neste estudo, permitirá o seu crescimento e desenvolvimento, com um balanço metabólico, energético e transcricional semelhantes a folículos de mesmo diâmetro maturados *in vivo*, o que permitirá a maturação de um oócito saudável e com processos como apoptose e balanço oxidativo semelhantes.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Analisar a eficiência do cultivo tridimensional *in vitro* no desenvolvimento de folículos ovarianos bovinos secundários e a sua influência o metabolismo oxidativo, na geração de estresse oxidativo celular e nos níveis de transcritos de genes ligados atividade mitocondrial, apoptose e desenvolvimento oocitário.

4.2 Objetivos específicos

- I. Avaliar a taxa de crescimento, formação de antro e viabilidade dos folículos ovarianos bovinos secundários cultivados por 16 dias.
- II. Avaliar a taxa de recuperação de oócitos e a viabilidade dos mesmos
- III. Verificar o perfil de produção de EROS e o metabolismo oxidativo.
- IV. Avaliar os níveis de transcritos através de RT-qPCR dos genes relacionados ao crescimento e desenvolvimento oocitário (receptores de *KL* e *c-kit*), biogênese mitocondrial (*TFAM*, *PGC1 α*) e apoptose (*XIAP*, *CASP9*) em diferentes compartimentos de folículos bovinos secundários cultivados (parede folicular e oócito).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo experimental animal utilizando-se o modelo bovino.

Folículos extraídos de tecido ovariano bovino fresco foram classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento e diâmetro médio, e subdividido entre os grupos de estudo. Folículos isolados com diâmetro médio entre 100 e 200 μ m, com oócitos visíveis, cercados por células da granulosa, apresentando uma membrana basal intacta e ausência de cavidade antral, foram em parte selecionados para o cultivo *in vitro* previamente às avaliações (Grupo maturados *in vitro*- GVT) e em parte diretamente submetidos às análises propostas ainda na forma imatura não cultivada (Grupo Imaturo- GI). Folículos isolados com diâmetro entre 300 e 400 μ m foram considerados maturados *in vivo* (considerando-se o diâmetro esperado para os folículos do GVT após o cultivo) e foram selecionados para compor o Grupo maturados *in vivo* (GVV) (Figura 6). Todos os grupos foram submetidos à avaliação de produção de EROS, metabolismo oxidativo e expressão de genes ligados a estes processos. Além disso, o grupo GVT foi submetido a avaliação do desenvolvimento e viabilidade folicular

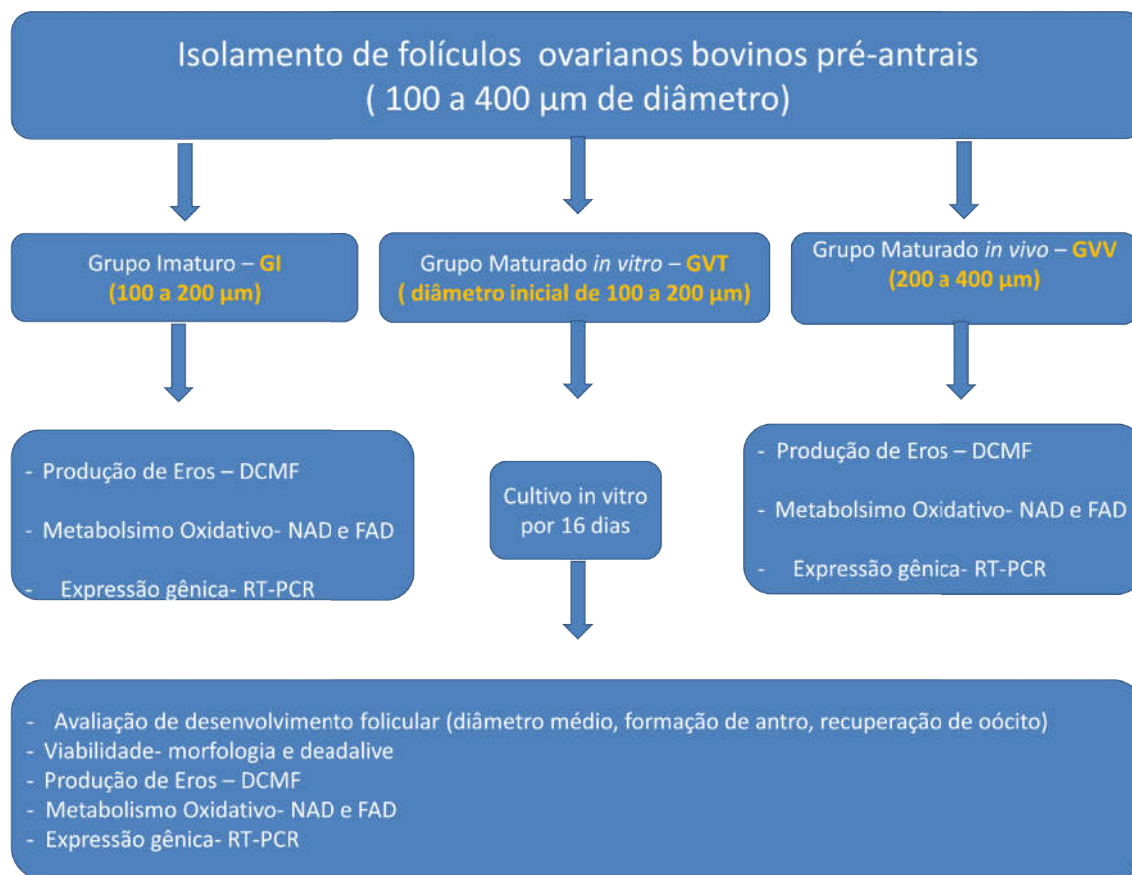


Figura 6: Fluxograma do desenho do estudo.

5.2 Métodos:

5.2.1. Cultivo de Folículos Ovarianos Isolados:

5.2.1.1. Isolamento dos folículos secundários.

Os folículos colocados em cultivo foram obtidos a partir de ovários de vacas abatidas em matadouro. Imediatamente após o abate, os ovários foram removidos e imersos em solução fisiológica a 38,5°C acrescida de antibiótico (Sirard et al., 2006). Posteriormente, foram levados ao laboratório, lavados em solução fisiológica acrescida de 25 mg/ml de sulfato de estreptomicina (Sigma ChemicalCo., St Louis, MO, USA) pré-aquecida na temperatura de 38,5°C e mantidos nesta mesma solução, em banho-maria, durante a aspiração folicular.

Para o isolamento folicular, os ovários foram submetidos a um procedimento de microdissecção, como previamente descrito por Hulshof e colaboradores (Hulshof et al., 1994). Finos fragmentos do córtex ovariano (0,5 mm de espessura) foram obtidos por meio de um cortador de tecido (TissueSlicer, Thomas Scientific, USA), e as fatias foram divididas em pequenos fragmentos de 3x3 mm, sendo estes submetidos a isolamento mecânico sob um estereó microscópio, com auxílio de agulhas com bisel de 30G. Os folículos isolados foram distribuídos nos grupos conforme já descrito no item *Desenho do Estudo*.

O meio de manutenção utilizado para preservação da viabilidade tecidual durante toda a manipulação foi o TCM199 com Hank's Salts (Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA) suplementado com 1 mg/ml de Albumina Sérica Bovina (BSA) (MP Biomedicals, Solon - EUA), 1mg/ml de piruvato (Sigma ChemicalCo., St Louis, MO, USA), 100UI/ml de penicilina (Sigma ChemicalCo., St Louis, MO, USA) e 100ug/ml de estreptomicina (Sigma ChemicalCo., St Louis, MO, USA).

5.2.2. Encapsulamento dos folículos pré-antrais em hidrogel de alginato

Para encapsulamento dos folículos para o cultivo alginato de sódio (60% de ácido glucurônico - PRONOVA, FMC BioPolymer AS d/b/a NovaMatrix, Sandivika, Norway) foi dissolvido em PBS estéril 1X livre de cálcio (Invitrogen, GibcoLaboratories Life Technologies Inc., Grand Island, NY, EUA) a uma concentração de 0,25%. Os folículos selecionados foram transferidos individualmente para gotas de 8 µl de alginato e imerso numa solução de encapsulação (50 mM de CaCl₂, 140 mM de NaCl) durante 2 min.

5.2.3. Cultivo in vitro dos folículos pré-antrais

Os folículos encapsulados foram cultivados individualmente por 16 dias em placas de 96 poços (Corning Life Sciences - Califórnia, EUA) contendo 300 µL de meio de cultivo/poço a 38,5 °C com 5% de CO₂. O meio de cultivo utilizado foi o α -MEM suplementado com 3 mg/ml de albumina de soro bovino (BSA), 10 µg/ml insulina, 5,5 µg/ml transferrina, 6,7 ng/ml selenito

de sódio (MediatechCellgro, Inc., Manassas, VA), 2 mM de glutamina e hipoxantina, 50 µg/ml de ácido ascórbico, 100g/mL de hormônio folículo-estimulante recombinante (rFSH; BioVision, Inc., Milpitas, CA), 0,05 mg/ml de gentamicina (Sigma-Aldrich Brasil Ltda) de acordo com o protocolo de Araújo e colaboradores (ARAÚJO et al., 2014). A cada dois dias 150 µl de meio foi retirado e a mesma quantidade de meio fresco e equilibrado foi repostado.

5.2.2. Avaliação do Desenvolvimento e Viabilidade Folicular

5.2.2.1. Avaliação morfológica dos folículos

Os folículos selecionados para o cultivo (*GVT*) foram avaliados a cada dois dias e classificados como viáveis quando apresentaram oócito esférico envolto por células da granulosa, limitados por membrana basal intacta e uma camada de células da teca. Já os folículos que apresentaram oócito ou células foliculares com sinais de atresia, como cor escura, vacúolos citoplasmáticos ou rupturas da membrana celular foram considerados inviáveis. A porcentagem de formação de antro foi avaliada de acordo com a constatação da presença ou ausência de uma cavidade antral, definida como uma cavidade translúcida visível dentro das camadas de células granulosas.

Ao final do cultivo, os folículos foram mecanicamente rompidos e os COCs avaliados quanto à presença de oócitos viáveis. Além disso, os oócitos foram medidos utilizando-se a média de dois diâmetros perpendiculares com um micrometro ocular inserido no estereomicroscópio (ampliação de 50x).

O crescimento folicular foi calculado subtraindo-se o diâmetro inicial (D_0) pelo diâmetro final (D_{16}), dividido pelo número de dias de cultivo, conforme Araujo et al. (2014). Finalmente os folículos foram classificados em: *No Grow* (NG), quando não apresentaram crescimento; *SlowGrow* (SG) quando apresentaram um crescimento diário menor que 1 µm; *Median Grow* (MG), quando apresentaram crescimento diário de 1 até 5 µm; e *FastGrow* (FG) quando apresentaram crescimento diário superior a 5 µm (Araujo et al., 2014).

5.2.2.2. Avaliação da viabilidade folicular -DEAD-ALIVE

Para uma avaliação mais precisa da integridade folicular após a cultura foi realizada a técnica de DEAD-ALIVE (CORTVRINDT; SMITZ, 2001; DOLMANS et al., 2006). Os folículos foram colocados em gotas de TCM-HEPES com 4 μ M de calceína-AM e 2 μ M de homodímero de etídio (Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha), seguido por incubação à temperatura de 38,5 ° C durante 30 minutos. Finalmente, os folículos foram examinados utilizando um microscópio de fluorescência (Zeiss, Axiovert 10, Nova Iorque, EUA). Os sinais fluorescentes emitidos de calceína-AM e homodímero de etídio foram coletados em comprimentos de onda de 488 (verde) e 568nm (vermelho), respectivamente. A sonda detecta a atividade da esterase intracelular de células viáveis que metaboliza a calceína e emite a fluorescência verde; em células aonde há perda da integridade da membrana plasmática há entrada de homodímero de etídio, que tem alta afinidade pelo DNA e se liga a ele emitindo fluorescência vermelha (Dolmans et al., 2006). Os folículos foram considerados vivos se o citoplasma apresentasse marcação positiva com calceína-AM (verde) ou mortos se cromatina celular fosse marcada com homodímero de etídio (vermelho)

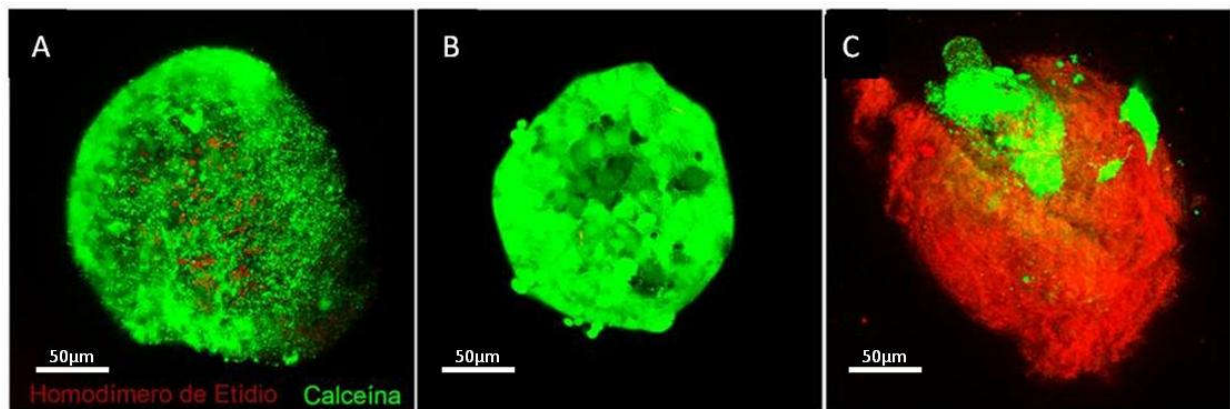


Figura 7:Análise da viabilidade folicular com Calceína e Homodímero de Etídio. (A)Folículo fresco com algumas células da granulosa mortas (B) Folículo cultivado completamente viável(C) Folículo cultivado (com mais de 50% das células mortas).

5.2.3. Análise da expressão gênica por RT-qPCR

As amostras com bom padrão de crescimento (MG, FG) foram organizadas em pools de seis a dez amostras para a extração de RNA total. Considerando-se que ao longo do desenvolvimento folicular oócito e células somáticas ovarianas (granulosa e teca) se

intercomunicam para estabelecer uma homeostase tecidual foram analisados separadamente os oócito e as células da parede folicular (granulosa e teca).

Inicialmente, as amostras foram lavadas em solução de PBS (1X) para retirada do criopreservador, seguindo-se a centrifugação a 5000g por 5 minutos. Na sequência, o RNA das amostras foi extraído com o RNeasy Micro Kit (QIAGEN), de acordo com as instruções do fabricante. O material permaneceu armazenado à -80°C para procedimentos posteriores. Para prevenir a amplificação de possíveis traços de DNA genômico que ainda tenham resistido ao tratamento com DNase integrante do RNeasy Micro kit, um novo tratamento enzimático com o kit DNA free (Ambion®) foi realizado, conforme protocolo do fabricante.

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada utilizando-se o High Capacity DNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems®), segundo especificações do fabricante. Foram utilizados em 25 μl de reação, 2,5 μl de tampão da transcriptase reversa, 1 μl de mix de dNTP 10mM, 0,5 pmol de random primers, 20U de RNase out, 78U de transcriptase reversa, juntamente com 5 μl de RNA total extraído previamente. A reação foi incubada no termociclador por 10 minutos a 25°C , seguidos por 120 minutos a 37°C , completando o ciclo com 5 minutos a 85°C . O cDNA foi quantificado utilizando-se o Nanodrop ND-2000 (Thermo Fisher Scientific®) e os valores obtidos com razão de absorbâncias 260/280 igual a 1,8 e 260/230 de 2,2 foram considerados adequados para as reações posteriores e o material foi devidamente estocado a menos 20°C .

Baseado em resultados prévios de nosso laboratório, a análise de níveis de transcritos em oócito único ou em pools de poucos oócitos (≤ 10) não se mostra eficiente para a análise por RT-qPCR (PITANGUI, CP, 2016; CAETANO et al., 2018). Assim, foi realizada a pré-amplificação de todas as amostras com o kit Preampli Master Mix (Applied Biosystems), em volume final de 20 μl , conforme adaptações do nosso laboratório, respeitando as proporções indicadas pelo fabricante: 10 μl de Taqman Preampl Master Mix, 5 μl de pool de Taqman assays (0,02X) e 5 μl de cDNA, submetidos a ciclagem de 95°C por 15min, seguido por 20 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos.

O sistema *TaqMan*® *Gene Expression Assays* (*TaqMan*® *MGB probes*) da *Applied Biosystems* foi utilizado para a confecção das sondas (Tabela 1), e as quantificações foram realizadas no aparelho *Viiia-7* (*Applied Biosystems, Warrington, UK*).

Para avaliar as mudanças nos níveis de expressão dos genes relacionados a processos fundamentais para a manutenção folicular, principalmente o impacto do procedimento de maturação *in vitro* sobre a qualidade do folículo desenvolvido, analisamos os genes relacionados a biogênese mitocondrial (*TFAM*, *PGC1 α*), crescimento e desenvolvimento oocitário (KL, c-Kit) e apoptose (*XIAP*, *CASP9*) em oócitos dos diferentes grupos experimentais: GI - folículos frescos imaturos (pré-cultivo), *GVV*- folículos maturados *in vivo* e *GVT* folículos maturados *in vitro* (*medium e fast grow*) (Tabela 2).

Tabela 1: Genes escolhidos para análise do RNAm e seus respectivos ensaios.

Gene	Nome	Gene Bank	TaqmanAssay
<i>B2M</i>	beta-2-microglobulin	NM_173893.3	Bt03251628_m1
<i>GAPDH</i>	glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase	NM_001034034.2	Bt03210913_g1
<i>KITLG</i>	Kit ligand	NM_174375.2	Bt03213958_m1
<i>KIT</i>	C-kit	NM_001166484.1	Bt04298911_m1
<i>PPARGC1A</i>	PPARG coactivator 1 alpha	NM_177945.3	Bt01208835_m1
<i>XIAP</i>	X-linked inhibitor of apoptosis	NM_001205592.1	Bt04283414_m1
<i>CASP9</i>	caspase 9	NM_001205504.1	Bt04282449_m1
<i>TFAM</i>	transcriptionfactor A, mitochondrial	NM_001034016.2	Bt03260078_m1

O teste de eficiência de cada uma das sondas Taqman® foi realizado conforme instruções do fabricante. Para tanto, uma curva padrão relativa (*Quantitation- Relative Standard Curve*) foi construída utilizando seis diluições seriadas de 1:2 de uma mesma amostra, partindo da concentração inicial de material pré-amplificado e diluído 20X (diluição 1). Todas as sondas apresentaram eficiência de 90 a 110%, valores considerados ideais pelo fabricante.

Todas as reações de RT-qPCR foram realizadas com volume final de 10 μ l que continham 1X *TaqManAssay*, 1X *TaqMan Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e 2,5 μ l do cDNA préamplificado e diluído (1:20). O valor médio do ciclo de quantificação (Ct ou Cq) foi calculado das triplicatas técnicas por amostra. As condições de ciclagem foram: ciclo inicial de 95°C por 15 min, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 min. O nível de expressão para os genes analisados foi calculado para cada amostra

de acordo com o método de $2^{-\Delta\Delta CT}$ (ou 2-Ct) (Livak and Schmittgen, 2001), descrito previamente no *Applied Biosystems User Bulletin# 2* (PN 4303859) (*Applied Biosystems, Warrington, UK*). Os genes referência para esta análise foram o *B2M* e *GAPDH*, que em análise prévia de nosso grupo de pesquisa demonstraram ser adequados ao desenho experimental (Caetano et al, 2018- dados não publicados) (Tabela 1).

Amostras calibradoras foram escolhidas para cálculo da quantificação relativa dentre as amostras de oócitos (*pools* 60 e 61) e parede (*pools* 102 e 103), os quais apresentavam níveis quantificáveis de RNAm para todos os genes analisados, a média aritmética dos Cts dos genes referência foi utilizado para cálculo da quantificação relativa (Livak and Schmittgen, 2001).

Tabela 2: Principais funções dos genes escolhidos para a análise do RNAm.

Gene	Função
<i>KL</i>	Sinalização, diferenciação e proliferação celular
<i>c-kit</i>	Sinalização, diferenciação e proliferação celular
<i>TFAM</i>	Biogênese mitocondrial
<i>PGC1α</i>	Biogênese mitocondrial
<i>XIAP</i>	Inibidor das vias de apoptose
<i>CASP9</i>	Ativador da via de apoptose

5.2.4. Avaliação de metabolismo Oxidativo

5.2.4.1. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio intracelular

A produção de espécies reativas de oxigênio intracelular (EROs) foi realizada por diacetato de 2,7-diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA), uma sonda não fluorescente para a detecção de EROs intracelular, que é convertida na 2,7-diclorofluoresceína de polímero fluorescente quando oxidada na presença de ROS (ROSENKRANZ et al., 1992). A sonda é altamente reativa com o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e tem sido utilizada na avaliação da

geração de EROs em células de mamíferos (DEVINE; PERREAULT; LUDERER, 2012). Os oócitos cultivados e frescos foram desnudados e expostos a 10 μ m de DCFH-DA durante 30 min. A intensidade de fluorescência foi medida em comprimentos de excitação e emissão de 500 e 529 nm, respectivamente. As análises de fluorescência foram realizadas no software ImageJ (SCHINDELIN et al., 2015).

5.2.4.2. Detecção de Nicotinamida Reduzida Dinucleótido de Adenina (Fosfato) (NAD[P]H) e Flavina Oxidada Dinucleótido de Adenina (FAD)

Considerando-se a produção de NAD^+ e FAD um marcador do metabolismo oxidativo, utilizamos a capacidade de FAD e NAD serem autofluorescentes (CHANCE et al., 1962), para avaliar o estado redox mitocondrial e citoplasmático dos oócitos. Além disso, para avaliar a relação redox do espaço da matriz mitocondrial, é realizada a razão da intensidade de fluorescência do FAD pela intensidade de fluorescência do NADH (SKALA; RAMANUJAM, 2010). Esta proporção é capaz de determinar o estado redox celular sem a necessidade de corantes exógenos (CHANCE et al., 1979). A relação redox é sensível a mudanças na taxa metabólica celular e no suprimento vascular de oxigênio (RAMANUJAM et al., 2001).

Oócitos obtidos de folículos cultivados (GVT), frescos imaturos (G1) e maturados in vivo (GVV) foram transferidos para placas com fundo de vidro (Cell E & G) em gotas de 10 μ l de meio TCM-199 (Gibco/BRL, Grand Island, NY, USA). As intensidades fluorescentes de FAD e NAD [P] H, foram determinados em microscópio confocal Leica SP5 usando os comprimentos de onda de excitação e emissão 473 nm/490-590 nm para as análises de FAD e 405 nm/420-520 nm para NAD[P], respectivamente (AUBIN; WEBER; OSBORN, 1979). As configurações do microscópio e imagem foram mantidas constantes em todos os experimentos replicados. As intensidades médias de fluorescência nas imagens dos oócitos foram quantificadas usando o software Image J (SCHINDELIN et al., 2015)

5.3.Aspectos éticos

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP (CETEA- Processo nº165/2013) e à Comissão de Pesquisa do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP.

5.4.Análise estatística

Uma análise exploratória de dados foi realizada através de medidas de posição central e de dispersão. O teste não paramétrico de Kruskal Wallis foi aplicado para verificar se existe diferença estatística em relação aos grupos de estudo. Quando necessário foi aplicado o pós-teste de Dunn. Este teste foi aplicado devido a assimetria na distribuição das amostras selecionadas. O teste foi implantado no programa R versão 3.3.3.

6 RESULTADOS

Para o desenvolvimento deste estudo foram realizadas 22 baterias de experimento totalizando um n amostral de (n=548). Destes um total de 309 folículos foram colocados em cultivo e analisados para o estudo quanto a formação de antro, viabilidade, crescimento e recuperação de oócitos e a outra parte (n= 120 folículos) foi dividido de acordo com o tamanho entre os grupos GI e GVV para as análise de expressão, DCFH e NAD e FAD. Ao fim do cultivo, parte do material foi separado para avaliação dos níveis de transcritos gênicos (136), parte (60 folículos) foram utilizados para imunomarcção (DCFH e NAD e FAD) e o restante (n=119 folículos) foram usados para teste de respiração em oxígrafo (OROBOROS O2k), entretanto os níveis de respiração celular não foram detectados devido a pequena quantidade de material e a análise excluída do estudo).

6.1 Avaliação do crescimento folicular e classificação de acordo com o crescimento.

As análises do crescimento folicular médio diário mostraram que 81,1% dos folículos secundários expostos a este ambiente de cultivo definido apresentaram crescimento. Observamos que os folículos tendem na maioria (52,27%) apresentar um crescimento de 1 até 5 μm por dia (*Medium grow-MG*). Seguido por uma taxa de 21,10% de folículos que apresentaram crescimento maior que 5 μm por dia (*Fast grow-FG*). Apenas uma pequena porcentagem (9%) dos folículos cultivados apresentam crescimento lento, menor que 1 μm por dia (*Slow grow - SG*) e 16,88% não apresentaram nenhum crescimento diário (*No grow-NG*)(Fig 8 A).

A análise das medidas de D0, D8 e D16 do cultivo, mostraram que o grupo FG manteve o crescimento durante os 16 dias de cultivo. Já o grupo MG apresentou crescimento significativo apenas nos primeiros 8 dias, após esse período não foi observado crescimento significativo. Os outros grupos, SG e no NG não apresentaram crescimento significativo entre as semanas(Fig 8 B)..

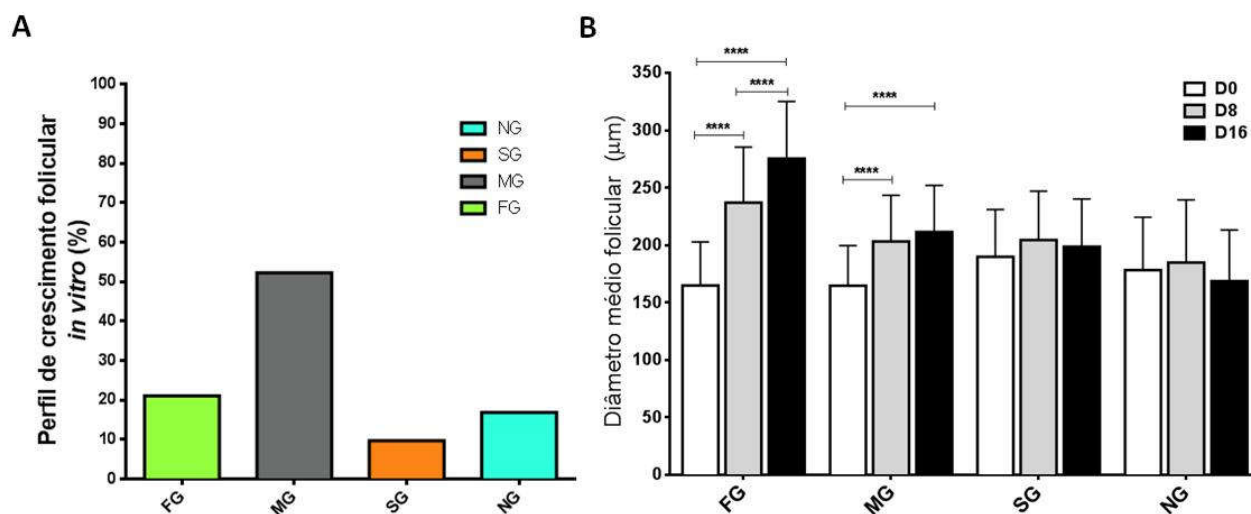


Figura 8: Perfil do crescimento folicular in vitro.(A) Porcentagem foliculos com diferentes padrões de crescimento: *fast grow* ($>5 \mu\text{m}/\text{dia}$), *medium grow* ($1 \text{ a } 5 \mu\text{m}/\text{dia}$), *slow grow* ($< 1 \mu\text{m}/\text{dia}$) e *no grow* ($< 0 \mu\text{m}$). (B)Diâmetro médio folicular nos dias 0,8 e 16 no grupo *Fast* ($p<0.0001$),*medium* ($p<0.0001$), *slow e no grow* ($p>0,05$).

6.2 Avaliações morfológicas do cultivo de foliculos secundários bovinos: formação de antro, viabilidade Folicular,recuperação de oócitos e viabilidade oocitária

A viabilidade folicular foi avaliada por análise de morfologia sob microscópio de campo claro.Após 16 dias de cultivo observamos a viabilidade pela análise morfológica era 91,07%no grupo FG, 91,53% no grupo MG, 85,48% no grupo SG e de 69,86% no grupo NG. (Fig. 9A).Estes foliculos mantiveram suas características padrão de coloração clara das células foliculares e os oócitos visíveis durante todo o cultivo.

A capacidade de desenvolvimento destes foliculos também foi analisada pela formação da cavidade antral. Observamos que apenas uma pequena parcela dos oócitos em cultivo progrediram para o estágio antral, sendo esta progressão semelhante entre os foliculos com diferentes padrões de crescimento (FG: 21,43%; MG: 14,41%; SG:17,74%; NG:12,33%; $p>0.05$) (Fig. 9).

Ao término do cultivo todos os foliculos foram rompidos mecanicamente e os oócitos recuperados foram classificados em oócitos ou complexo cúmulo oócito(COCs). A recuperação

total de oócitos foi semelhante entre os grupos *FG*, *MG*, *SG* e *NG* ($p > 0.05$); bem como a recuperação de COCs ($p > 0.05$) (Fig. 9 A e B). Os oócitos recuperados foram classificados quanto a morfologia observada sob estéreio microscópio em degenerados ou saudáveis. Todos os grupos foram capazes de manter a viabilidade de aproximadamente 50% dos oócitos inclusos nos folículos secundários colocados em cultivo *in vitro* para desenvolvimento. Deste modo não houve diferença significativa na recuperação de oócitos saudáveis e degenerados entre os diferentes perfis de crescimento ($p > 0,05$) (Figura 9A e B). Destes oócitos recuperados todos eram imaturos (100%) e foram fotografados e posteriormente mensurados. Verificamos um aumento no tamanho do oócito (80 μm) ao fim de 16 dias de cultivo comparado ao tamanho medido no dia zero (40 μm).

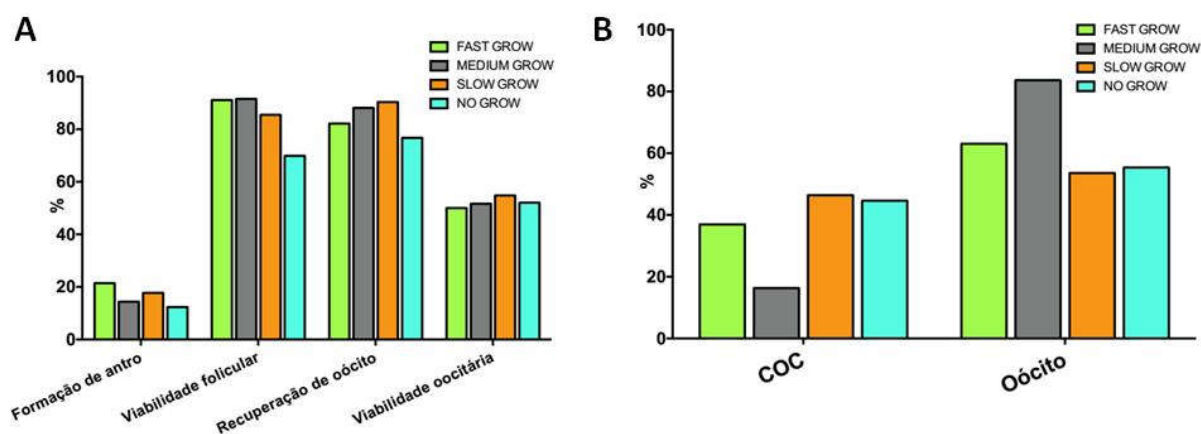


Figura 9: Avaliação morfológica entre os grupos. (A) Porcentagem de formação de antro, viabilidade folicular, recuperação de oócitos e viabilidade oocitária nos diferentes grupos separados pelo perfil de crescimento: *fast grow* ($>5 \mu\text{m}/\text{dia}$), *medium grow* (1 a $5 \mu\text{m}/\text{dia}$), *slow grow* ($< 1 \mu\text{m}/\text{dia}$) e *no grow* ($< 0 \mu\text{m}$); $p > 0.05$. (B) Porcentagem da recuperação de oócitos em forma de COC e desnudo (oócito); $p > 0.05$.

6.2 Avaliação dos níveis de transcritos dos genes *TFAM*, *XIAP*, *PGC1 α* , *c-KIT*, *KL* e *CAS9* em folículos fresco, maturados *in vivo* e *in vitro*.

A fim de verificar o impacto do procedimento de maturação *in vitro* sobre a qualidade do folículo com relação aos níveis de transcritos gênicos em oócitos e nas demais células do folículo (parede e células da granulosa), alguns marcadores de biogênese mitocondrial

(*TFAM*, *PGC1 α*), de apoptose (*XIAP*, *CASP9*) e decrescimento e desenvolvimento oocitário (*KIT* em oócitos e *KL* nas demais células) foram avaliados.

Tabela 3: Níveis de transcritos dos genes TFAM, XIAP, PGC1 α , c-KIT, KL e CAS9

Amostra	Grupo	N Obs	Genes	N	Média	Desvio padrão	Mediana	Quartil inferior	Quartil Superior	Mínimo	Máximo
Oócito	GI	7	CASP9	5	0.56	0.48	0.50	0.25	0.58	0.14	1.36
			c-Kit	6	0.75	0.47	0.79	0.52	0.97	0.03	1.40
			PGC1 α	6	1.20	1.01	0.93	0.66	1.72	0.02	2.94
			TFAM	4	0.97	0.75	0.68	0.54	1.40	0.42	2.08
			XIAP	6	0.69	0.46	0.67	0.39	1.14	0.04	1.22
	GVT	6	CASP9	1	0.44	.	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44
			c-Kit	5	0.39	0.25	0.36	0.30	0.58	0.03	0.65
			PGC1 α	4	0.97	1.00	0.66	0.27	1.67	0.16	2.39
			TFAM	1	0.62	.	0.62	0.62	0.62	0.62	0.62
			XIAP	4	0.43	0.21	0.47	0.26	0.59	0.15	0.60
	GVV	7	CASP9	5	0.21	0.10	0.18	0.16	0.24	0.10	0.37
			c-Kit	7	0.65	0.31	0.72	0.39	0.91	0.09	0.99
			PGC1 α	7	0.97	0.70	1.07	0.33	1.34	0.17	2.14
			TFAM	6	0.49	0.42	0.39	0.24	0.42	0.17	1.33
			XIAP	7	0.61	0.32	0.54	0.39	0.85	0.19	1.10
Amostra	Grupo	N Obs	Genes	N	Média	Desvio padrão	Mediana	Quartil inferior	Quartil Superior	Mínimo	Máximo
Parede	GI	6	CAS9	3	1.56	0.75	1.75	0.74	2.19	0.74	2.19
			TFAM	6	0.68	0.47	0.61	0.25	1.16	0.20	1.24
			XIAP	6	0.98	0.23	0.92	0.81	1.05	0.80	1.40
			KL	6	1.09	0.34	1.12	0.76	1.33	0.66	1.55
			PGC1 α	6	1.30	0.48	1.26	0.88	1.54	0.76	2.09
	GVT	6	CAS9	6	0.67	0.39	0.61	0.28	1.05	0.27	1.17
			TFAM	6	0.53	0.21	0.49	0.35	0.73	0.30	0.82
			XIAP	6	0.64	0.23	0.68	0.46	0.84	0.29	0.87
			KL	3	0.32	0.18	0.22	0.21	0.53	0.21	0.53
			PGC1 α	6	0.78	0.33	0.71	0.57	0.98	0.39	1.30
	GVV	6	CAS9	6	1.00	0.34	0.96	0.69	1.33	0.64	1.44
			TFAM	6	0.84	0.34	0.90	0.60	0.96	0.32	1.32
			XIAP	6	0.85	0.42	0.71	0.55	1.19	0.44	1.53
			KL	6	1.11	0.10	1.11	1.04	1.18	0.99	1.26
			PGC1 α	6	0.88	0.46	0.71	0.52	1.30	0.47	1.59

A análise estatística (Tabela 3) demonstrou não haver alterações significativas para os transcritos dos genes analisados no oócito. Entretanto, observamos uma variação nos valores obtidos em cada grupo, demonstrando uma grande heterogeneidade de transcritos presentes nos grupos (FIG 10 A-E).

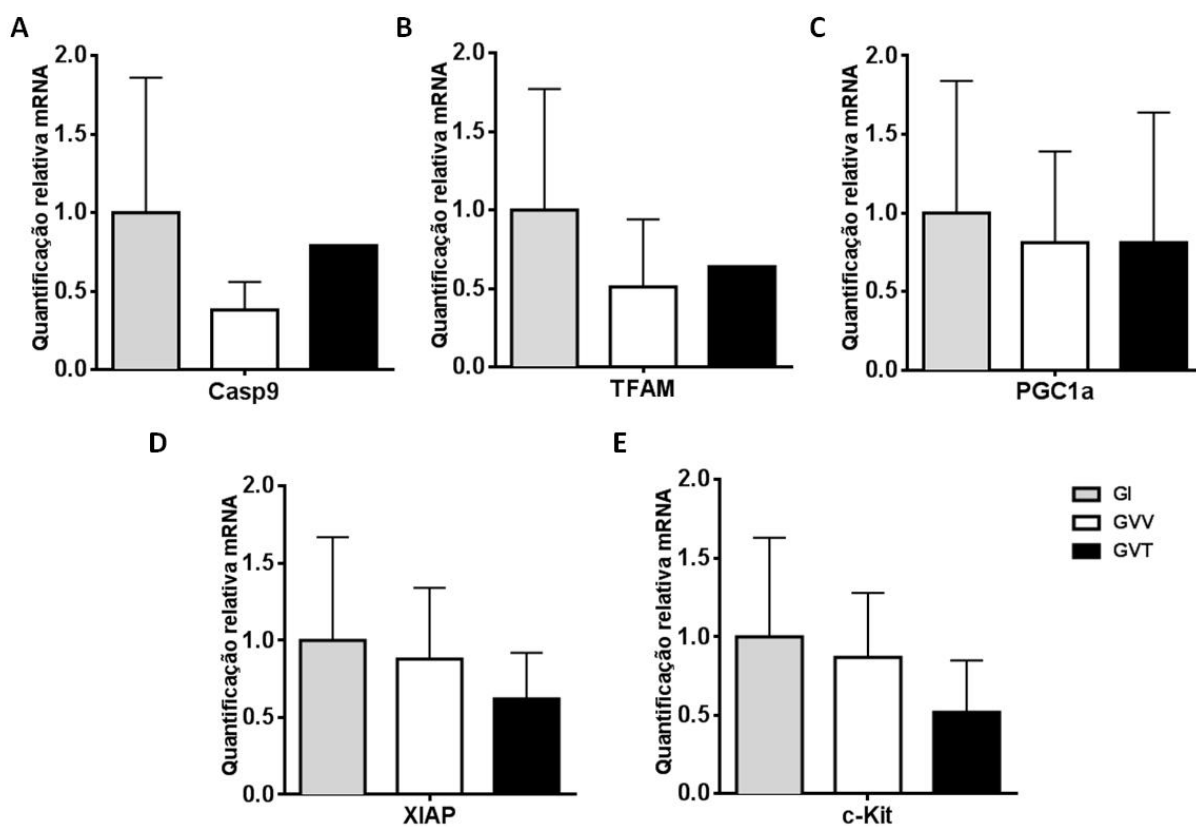


Figura 10: Análise da quantificação relativa dos mRNAs, em oócitos através de RT-qPCR.(A-E) Análise da quantificação relativa dos genes relacionados a biogênese mitocondrial (*TFAM*, *PGC1 α*), apoptose (*XIAP*, *CASP9*) e crescimento e desenvolvimento oocitário (*c-kit*) não relatou diferenças significativas entre os grupos GI, GVT e GVV, ($p > 0,05$)

A quantificação relativa dos transcritos de *TFAM*, *PGC1 α* , *XIAP*, *CASP9* nas células da parede folicular demonstrou não haver diferença entre os grupos, $p > 0,05$ (Fig. 11), exceto por KL que apresentou níveis diminuídos no grupo GVT comparado com os grupos GI e GVV, $p = 0,03$ (Fig. 11 E). Observa-se, entretanto, uma grande variação em cada grupo nos níveis de transcritos.

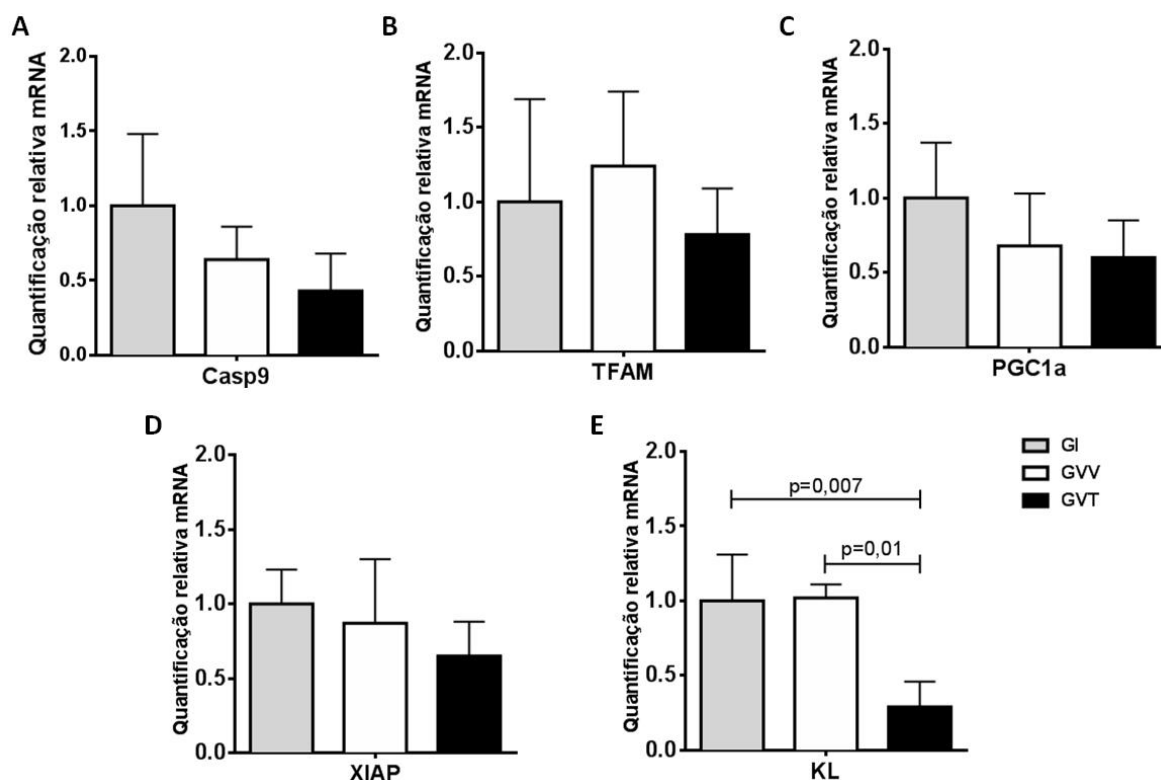


Figura 11: Análise da expressão de mRNA nas células da parede folicular através de RT-qPCR. (A-E) Análise da quantificação relativa dos genes relacionados a biogênese mitocondrial (*TFAM*, *PGC1 α*) e apoptose (*XIAP*, *CASP9*) não apresentaram diferenças entre os grupos analisados ($p > 0,05$). Em E, observamos uma significativa diminuição da expressão de KL no grupo GVT em relação aos grupos GI e GVV.

6.3 Avaliação de espécies reativas de oxigênio intracelular por DCFH em oócitos maturados *in vivo* e *in vitro*.

No grupo GVT a Intensidade de Fluorescência (IF) emitida pelo DCFH, indicando a produção de EROs, foi significativamente inferior a dos grupos GI ($p < 0,0065$) e GVV ($p < 0,001$). Da mesma maneira, o grupo GI, apresentou menores resultados de fluorescência que o GVV ($p = 0,04$).

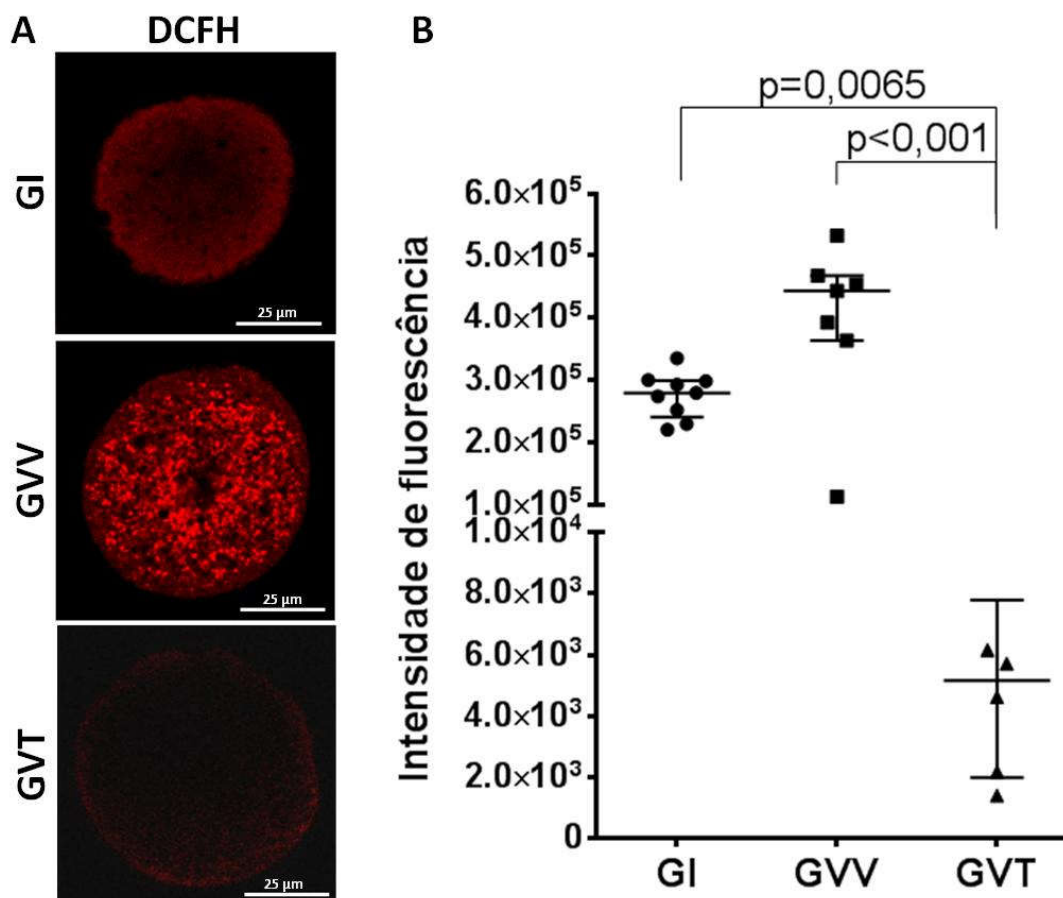


Figura 12: Avaliação da produção de EROs em folículos frescos, maturados e *in vitro* utilizando o marcador DCFH. (A) As imagens demonstram a fluorescência obtida com a utilização de DCFH (10 μM) nos folículos dos diferentes grupos analisados. (B) Produção relativa de espécies reativas de oxigênio (EROs). Os valores são expressos como média ± SEM. Diferenças significativas quando $p < 0.05$.

6.4 Avaliação de metabolismo oxidativo (NAD e FAD)

Verificamos que a autofluorescência de NAD foi significativamente menor no grupo de oócitos que passaram pela maturação *in vitro* durante os 16 dias de cultivo folicular (GVT) do que no GI e oócitos obtidos do desenvolvimento folicular *in vivo* (GVV). Por outro lado, a autofluorescência de FAD foi significativamente maior nos oócitos maturados *in vitro* quando comparado com o maturado *in vivo*. Na relação entre FAD/NAD, que representa uma medida do estado redox da mitocôndria e do citoplasma dos oócitos, verificamos que os oócitos obtidos do GVT apresentaram maiores valores de fluorescência do que os GVV e GI (Figs. 9 e 10)

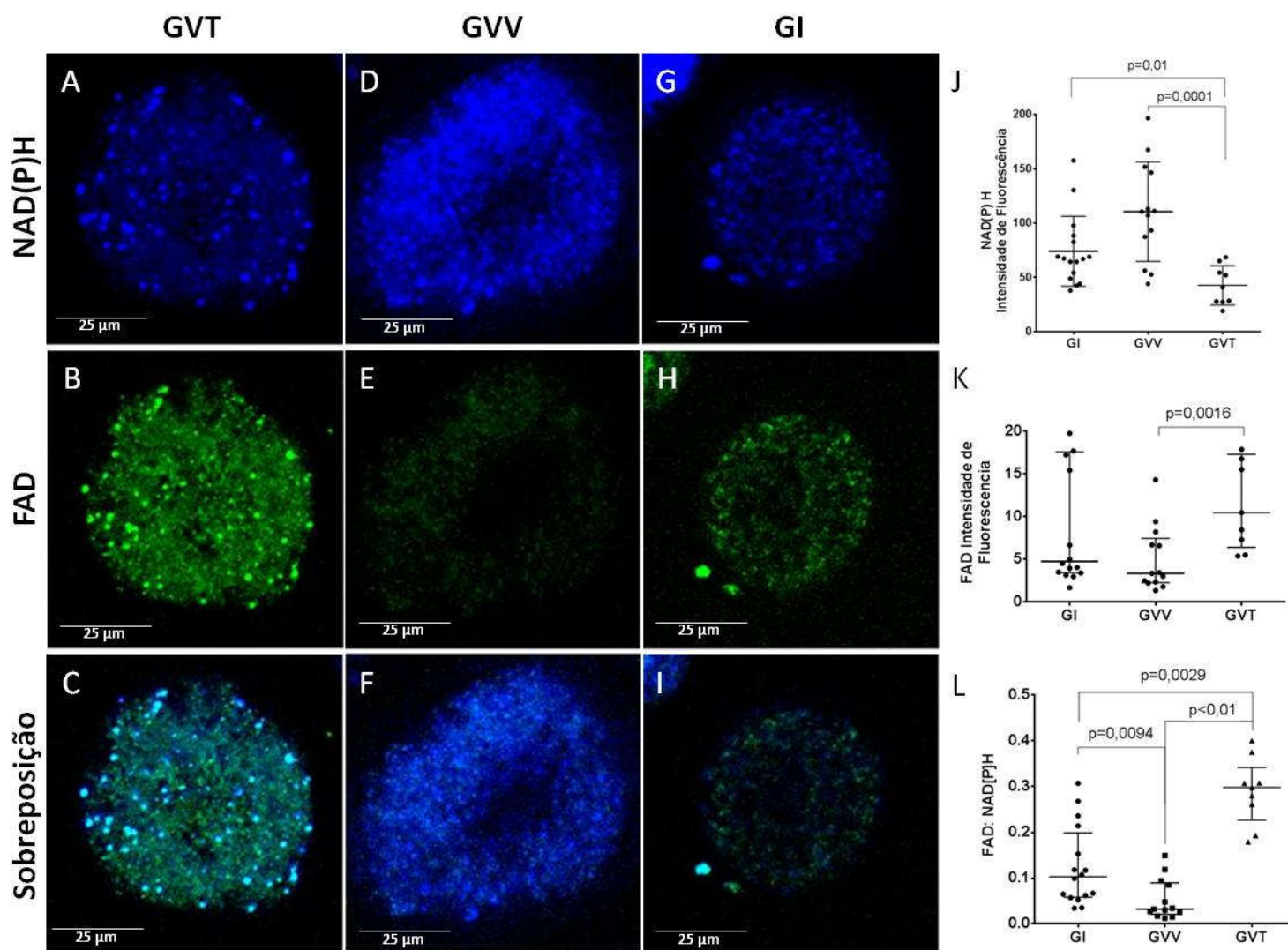


Figura 13: Quantificação de fluorescência endógena de NAD(P)H(A), FAD nos grupos GVT(A-C), GVV(D-F) e GI (G-I); (J) análise da intensidade de fluorescência de NAD(P)H; (K) análise da intensidade de fluorescência FAD; (L) relação de fluorescência de FAD: NAD(P)H. Imagens realizadas em microscópio confocal SP5, objetiva de 60X; NAD(P)H(Ex: 473nm EM:490-590nm) FAD(Ex405 nm/ Em 420-520)

7- DISCUSSÃO

No presente estudo, foi analisado o crescimento e desenvolvimento em cultivo *in vitro* tridimensional de folículos secundários iniciais bovinos. Também foi analisado neste modelo o efeito deste cultivo prolongado (16 dias) no metabolismo respiratório dos folículos avaliado pelo estado redox e pela produção de EROs. Além disso, avaliamos o impacto do cultivo sobre a expressão de genes relacionados a processos no metabolismo mitocondrial (*TFAM*, *PGC1 α*), apoptose (*CASP9*, *XIAP*) e crescimento e desenvolvimento oocitário (*c-kit/KL*).

Inicialmente foi avaliado se as condições empregadas eram adequadas para o bom crescimento folicular. Embora o cultivo tenha sido realizado em um longo período de tempo (16 dias), verificamos que estas condições permitiram o desenvolvimento folicular, uma vez que mais de 80% dos folículos analisados obtiveram crescimento; estes dados corroboram os achados de outros autores (XU et al., 2006b; GUPTA et al., 2008; MAGALHÃES et al., 2011). Além disso, o emprego da matriz de gel de alginato para mimetizar o microambiente estromal do ovário, com baixa resistência do meio ao mesmo tempo permitindo o crescimento tridimensional e a manutenção do formato original do folículo, certamente colabora para o seu crescimento e a aquisição de novas camadas de células da granulosa (PANGAS et al., 2003). Embora o estágio folicular alcançado durante o cultivo, classificando-se estes folículos pelo número de camadas e pela formação de antro, apresente diâmetro inferior ao mesmo estágio em folículos cultivados *in vivo*, isso não parece estar relacionado com menor maturação e tampouco com capacidade funcional do oócito. Estes achados também têm sido observado por vários autores em diferentes espécies animais, inclusive com a recuperação de oócitos em alguns casos (KREEGER et al., 2005; XU et al., 2006b; ARUNAKUMARI; SHANMUGASUNDARAM; RAO, 2010; FIGUEIREDO et al., 2011).

Interessantemente, outro aspecto referente ao crescimento é que a menor velocidade de crescimento folicular não está necessariamente relacionada com a sua sobrevivência, uma vez que folículos que apresentaram pequeno crescimento (<1 μ m- *no grow* e *slowgrow*) também permaneceram viáveis, tiveram formação de cavidade antral e permitiram a recuperação de oócitos em estágios intermediários de desenvolvimento. A adição de hormônios, antioxidantes, proteínas e condições estáveis de CO₂, O₂ e temperatura assim como sistema tridimensional, atuam juntos para a manutenção da viabilidade das células foliculares.

In vivo, a formação da cavidade antral é iniciada em folículos bovinos com 200 µm de diâmetro (MOSS; WRENN; SYKES, 1954; LUSSIER; MATTON; DUFOUR, 1987; MCNATTY et al., 2000). Entretanto, no presente estudo não verificamos alta taxa de formação de antro, apesar das boas taxas de viabilidade e crescimento. Trabalhos que utilizam o mesmo modelo experimental, obtiveram taxas de formação de antro semelhantes as relatadas aqui (GUTIERREZ et al., 2000; ITOH et al., 2002). Cabe ressaltar que a baixa taxa de formação de antro foi observada tanto em folículos com crescimento lento quanto rápido.

Neste sentido destaca-se a importância de outros aspectos do desenvolvimento folicular que contribuem para a formação do antro além do crescimento.

Vários estudos tem sugerido a ação de fatores chave para formação de antro em outras espécies (KATAYAMA; SHIOTA; TAKAHASHI, 1990; ZHAO et al., 2001). Em roedores foi verificado que fatores como GDF-9, kit-ligante e a conexina 37 são necessários para iniciar a formação de antro (LI; PHILLIPS; MATHER, 1995; SIMON et al., 1997; YOSHIDA et al., 1997; CARABATSOS et al., 1998). No cultivo de folículos pré-antrais bovinos Mc Laughline colaboradores (2010), verificaram um aumento no início da cavitação quando a activina era adicionada ao meio de cultivo, principalmente associada a altas doses de FSH (MCLAUGHLIN et al., 2010). Desta maneira, melhorias no sistema de cultivo são necessárias para garantir a transição dos folículos secundários até fases antrais.

Além do diâmetro ao final do cultivo, da velocidade de crescimento e características morfológicas, outro parâmetro muito importante no cultivo folicular *in vitro* é a qualidade dos oócitos recuperados, estes precisam apresentar potencial para a fertilização e desenvolvimento embrionário. Neste trabalho observamos a recuperação apenas de oócitos ainda em processo de maturação (MI); oócitos maduros e com potencial de fertilização ainda não foram obtidos a partir do cultivo de folículos pré-antrais bovinos (GUTIERREZ et al., 2000; ITOH et al., 2002), embora tenha sido relatados em outros mamíferos de grande porte (GUPTA et al., 2008; SARAIVA et al., 2010; XU et al., 2011). Além disso, os resultados aqui apresentados demonstraram que houve uma taxa considerável de recuperação de COCs (36%) após os 16 dias de cultivo, neste estado há possibilidade de se dar sequência ao processo de maturação através do cultivo destes complexos, é o chamado cultivo multi-step (SMITZ et al., 2010), partindo de folículos primordiais e primários *in situ* (cultivados ainda no tecido), seguido de isolamento folicular e cultivo de folículos secundários isolados e finalmente completando sua maturação pelos cultivos dos COCs

na chamada maturação *in vitro* convencional de oócitos. A preservação da integridade dos COCs garante que a interação entre as células da granulosa com o oócito foi mantida, esta interação é importante para a manutenção da estrutura folicular, do seu desenvolvimento, da formação de antro e finalmente para a maturação oocitária, uma vez que o transporte de nutrientes e metabólitos para o oócito é mediado, na sua maioria, pelas células da granulosa (MONNIAUX, 2016).

Já é sabido que os COCs preferencialmente usam glicose como substrato energético (DONAHUE; STERN, 1968). Os oócitos têm baixa capacidade de absorção de glicose e, portanto, dependem do metabolismo da glicose pelas células do cúmulo, que fornecem ao oócito substratos energéticos, como o piruvato e o lactato, por meio de junções comunicantes (SUTTON-MCDOWALL; GILCHRIST; THOMPSON, 2010). Assim, a interrupção prematura da comunicação juncional entre o oócito e granulosa provavelmente afeta sua atividade metabólica. Há evidências abundantes de que o metabolismo do COC é um importante fator que contribui para a aquisição de competência pelo oócito (EPPIG, 1976).

A avaliação específica das várias organelas e células que compõem a estrutura folicular é também de total relevância para a compreensão das diversas mudanças sofridas pelo folículo ao longo do processo de maturação, bem como a análise da expressão gênica e de aspectos metabólicos (SUTTON; GILCHRIST; THOMPSON, 2003; XIE et al., 2016). Neste sentido, a análise de genes ligados à esta comunicação entre oócitos e células somáticas foliculares (granulosa e teca) tem um papel importante no estabelecimento de protocolos ideais para sistemas de cultivo. O sistema *Kit*, composto por *Kit ligand (KL)* e seu receptor de tirosina quinase- *cKit* tem sido bem caracterizado em mamíferos (MONNIAUX, 2016) e parece estar envolvido na sinalização entre as células somáticas e oócito durante o processo de maturação folicular (JOYCE et al., 1999), desta maneira ao analisarmos a expressão de RNAs mensageiros de *c-Kit* nos oócitos e de *KL* nas células da parede folicular, observamos que em oócitos a expressão de *c-Kit* após o cultivo é semelhante à de folículos maturados *in vivo*, entretanto o *KL* está bastante reduzido nas células da granulosa dos folículos pós-cultivo em relação aos folículos imaturos não cultivados e aos maturados *in vivo*, sugerindo dano no compartimento somático no que se refere à capacidade de intercomunicação entre estas células.

Estes resultados poderiam explicar o restrito crescimento folicular apresentado pelos folículos em cultivo, uma vez que o sistema *KL/c-kit* é um intermediário no efeito de outros

fatores de crescimento BMP15 e GDF-9 (MONNIAUX, 2016). A via de sinalização mediada por *BMP15* (fator de transcrição oocitário relacionado à proliferação celular) pode estar prejudicada, uma vez que *BMP15* se liga ao seu receptor nas células da granulosa promovendo a ativação de *KL* e posteriormente de *c-Kit* no oócito. Segundo alguns autores, a inibição de *BMP15* poderia levar ao comprometimento folicular e perda de sua capacidade de crescimento e desenvolvimento (OTSUKA; SHIMASAKI, 2002a).

Além da capacidade de crescer e maturar, a unidade folicular precisa desenvolver a chamada competência nuclear e citoplasmática, que resumidamente seria a aquisição de características que permitirão que o oócito fecundado tenha capacidade de manter o desenvolvimento nos estágios embrionários iniciais (pré-implantação) de maneira independente do organismo materno. Faz parte deste processo de aquisição de competência a organização de organelas celulares que variam ao longo dos diferentes estágios de maturação oocitária (FERREIRA et al., 2009; RACEDO; RAWE; NIEMANN, 2012; DADARWAL et al., 2015). Entre as organelas citoplasmáticas consideradas cruciais para a aquisição da competência oocitária, as mitocôndrias e as gotículas lipídicas são críticas para a produção de energia (ATP) (DUNNING et al., 2010). Além disso, as mitocôndrias e o retículo endoplasmático liso (SER) são a principal as principais organelas responsivas a alterações de cálcio intracelular e que governam eventos como maturação nuclear, fertilização e ativação do desenvolvimento embrionário (MACHACA, 2007; FERREIRA et al., 2009).

Devido a esta ampla participação mitocondrial no desenvolvimento folicular, analisou-se a expressão dos genes *TFAM* e *PGC1 α* , que estão correlacionados com a biogênese mitocondrial. Os resultados encontrados demonstraram que a expressão gênica não se alterou no grupo dos oócitos cultivado *in vitro* comparada com os oócitos frescos e maturados *in vivo*. Isso pode indicar uma adequada manutenção da biogênese mitocondrial, uma vez que são comparáveis ao controle. Este fato contribui para acharmos que o cultivo *in vitro* tem potencial para a recuperação de oócitos viáveis. A diminuição da expressão *TFAM*, *PGC1 α* e outros genes relacionados à função mitocondrial já foram associados a uma diminuição da fertilidade em vacas durante o verão (FERREIRA et al., 2016).

Além disso, a mitocôndria está no centro da ativação da apoptose medida pela liberação de citocromo C e a ativação de caspases (SANDERS; PARKER, 2002). Neste estudo, o cultivo *in vitro* não elevou a expressão do *XIAP* e da *caspase-9* em oócitos e na parede folicular, indicando

a manutenção da viabilidade ao longo do com o cultivo, ao menos não parece haver maior atividade apoptótica pelas vias estudadas. Apesar de o processo apoptótico estar presente em folículos que estão evoluindo para atresia, sabe-se que a inibição da caspase-9 leva a uma dificuldade no desenvolvimento de folículos e embriões bovinos (BRAD; HENDRICKS; HANSEN, 2007), portanto, há um papel fundamental desta cascata na foliculogênese e desenvolvimento embrionário como um todo, que está preservada nos folículos cultivados neste estudo. Além disso, a expressão aumentada de *XIAP* em folículos grandes viáveis foi relatado em cabras, enquanto a expressão do mesmo gene se apresentava diminuída em folículos atrésicos (HAN et al., 2017). Outros estudos também descrevem a presença de altos níveis de *XIAP* em folículos viáveis e sua importância para a sobrevivência das células da granula. Além disso foi constatado que a diminuição de *XIAP* pode acarretar no aumento de caspase, indicando o importante papel deste gene no controle da sobrevivência folicular (LI et al., 1998; LAI et al., 2003; CHENG et al., 2008; PHILLIPPS et al., 2011b)

Sabe-se que durante o processo respiratório as mitocôndrias produzem EROs que tem potencial de dano celular e, por isso, são fisiologicamente equilibradas por antioxidantes naturais. O estresse oxidativo celular é caracterizado por um desequilíbrio entre a ação dos antioxidantes e a produção de EROs (Bondin et al. 1997). Nos cultivos foliculares estes antioxidantes naturais estão reduzidos, uma vez que os folículos encontram-se fora do tecido estromal e de outras estruturas vizinhas, sendo assim seria esperado um aumento do estresse oxidativo sofrido por estas células. Entretanto, nas análises utilizando DCFH, para quantificação das EROs, verificou-se uma redução destas substâncias em folículos cultivados *in vitro* em relação aos maturados *in vivo* e imaturos, sugerindo um equilíbrio adequado entre pró e antioxidantes. Poderíamos especular que, o uso de antioxidantes (Glutamina, ácido ascórbico) no meio de cultivo *in vitro* provavelmente foi eficiente para o controle da produção das espécies reativas de oxigênio.

Como uma forma de complementar a avaliação do metabolismo oxidativo do folículo avaliado também o estado redox mitocondrial e citoplasmático; para isso optamos pela avaliação de duas espécies oxidadas no processo respiratório, são eles o FAD (de localização mitocondrial) e o NAD (P) H (de localização mitocondrial e citoplasmática), além da relação FAD: NAD (P) H. O aumento destas substâncias sinalizam a atividade oxidativa da mitocôndria, com liberação de radicais de hidrogênio que tanto podem produzir EROs quanto água, na dependência da ação dos

antioxidantes ali presentes (CHANCE et al., 1979; SUTTON-MCDOWALL et al., 2012). Neste estudo a produção de NAD e FAD apontaram para um aumento do estado redox nos oócitos, entretanto, sem o aumento da produção de EROs pode sugerir que haja um equilíbrio no metabolismo oxidativo destas células. Este efeito pode ser consequência dos antioxidantes acrescentados ao meio de cultivo, que tenham sido capazes de neutralizar as EROs produzidas ao longo do cultivo.

O método de cultivo proposto neste estudo, utilizando o sistema 3D em matriz de gel de alginato, permitiu a maturação parcial de folículos secundários isolados, mantendo a viabilidade e características do metabolismo oxidativo semelhantes a folículos maturados *in vivo* de mesmo tamanho. Entretanto, há algum grau de comprometimento na saúde global do folículo, especialmente em relação às células somáticas da parede folicular, sugerido pela menor expressão do KL nestas células.

8-CONCLUSÃO

Com base nos dados apresentados, chegamos as seguintes conclusões:

- O cultivo tridimensional em matrix de gel de alginato proposto foi eficiente e permitiu o crescimento e desenvolvimento parcial do folículo, mantendo característica do metabolismo oxidativo e a expressão de genes ligados a diferentes processos envolvidos na foliculogênese semelhante a folículos maturados *in vivo* de mesmo diâmetro

-O cultivo não promoveu aumento da expressão de genes ligados à apoptose, sugerindo uma boa viabilidade dos folículos

-Embora o desenvolvimento durante os 16 dias de cultivo tenha se mostrados promissores, o método ainda apresenta limitações para mimetizar o ambiente *in vivo*, uma vez que não permitiu maturação completa dos oócitos, os quais foram recuperados na sua totalidade imaturos.

-A quantificação dos transcritos de *KL* menor nas células da parede folicular pode representar a perda ou diminuição de comunicação entre estas células e o oócito, o que poderia levar a uma alteração no crescimento e desenvolvimento.

-O menor diâmetro e velocidade de crescimento não representa a incapacidade do folículos em se desenvolver.

Referências

- ABIR, R.; FRANKS, S.; MOBBERLEY, M. A.; MOORE, P. A.; MARGARA, R. A.; WINSTON, R. M. Mechanical isolation and in vitro growth of preantral and small antral human follicles. **Fertil Steril**, v. 68, n. 4, p. 682–8, out. 1997.
- ABIR, R.; NITKE, S.; BEN-HAROUSH, A.; FISCH, B. In vitro maturation of human primordial ovarian follicles: clinical significance, progress in mammals, and methods for growth evaluation. **Histol Histopathol**, v. 21, n. 8, p. 887–98, ago. 2006.
- ADHIKARI, D.; ZHENG, W.; SHEN, Y.; GORRE, N.; HAMALAINEN, T.; COONEY, A. J.; HUHTANIEMI, I.; LAN, Z. J.; LIU, K. Tsc/mTORC1 signaling in oocytes governs the quiescence and activation of primordial follicles. **Hum Mol Genet**, v. 19, n. 3, p. 397–410, 1 fev. 2010.
- ALBERTINI, D. F.; BARRETT, S. L. Oocyte-Somatic Cell Communication. **Reproduction (Cambridge, England) Supplement**, v. 61, p. 49–54, 2003.
- ARAUJO, V. R.; GASTAL, M. O.; WISCHRAL, A.; FIGUEIREDO, J. R.; GASTAL, E. L. In vitro development of bovine secondary follicles in two- and three-dimensional culture systems using vascular endothelial growth factor, insulin-like growth factor-1, and growth hormone. **Theriogenology**, v. 82, n. 9, p. 1246–53, dez. 2014.
- ARAUJO, V. R.; SILVA, G. M.; DUARTE, A. B.; MAGALHAES, D. M.; ALMEIDA, A. P.; GONCALVES, R. F.; BRUNO, J. B.; SILVA, T. F.; CAMPELLO, C. C.; RODRIGUES, A. P.; FIGUEIREDO, J. R. Vascular endothelial growth factor-A(165) (VEGF-A(165)) stimulates the in vitro development and oocyte competence of goat preantral follicles. **Cell Tissue Res**, v. 346, n. 2, p. 273–81, nov. 2011.
- ARUNAKUMARI, G.; SHANMUGASUNDARAM, N.; RAO, V. H. Development of Morulae from the Oocytes of Cultured Sheep Preantral Follicles. **Theriogenology**, v. 74, n. 5, p. 884–894, 15 set. 2010.
- AUBIN, J. E.; WEBER, K.; OSBORN, M. Analysis of Actin and Microfilament-Associated Proteins in the Mitotic Spindle and Cleavage Furrow of PtK2 Cells by Immunofluorescence Microscopy. A Critical Note. **Experimental Cell Research**, v. 124, n. 1, p. 93–109, nov. 1979.
- AUSTIN, S.; ST-PIERRE, J. PGC1alpha and mitochondrial metabolism--emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders. **J Cell Sci**, v. 125, n. Pt 21, p. 4963–71, 1 nov. 2012.
- BETTS, D. H.; KING, W. A. Genetic regulation of embryo death and senescence. **Theriogenology**, v. 55, n. 1, p. 171–91, 1 jan. 2001.

- BLONDIN, P.; COENEN, K.; SIRARD, M. A. The Impact of Reactive Oxygen Species on Bovine Sperm Fertilizing Ability and Oocyte Maturation. **Journal of Andrology**, v. 18, n. 4, p. 454–460, ago. 1997.
- BOATRRIGHT, K. M.; SALVESEN, G. S. Caspase activation. **Biochem Soc Symp**, n. 70, p. 233–42, 2003a.
- BOATRRIGHT, K. M.; SALVESEN, G. S. Mechanisms of caspase activation. **Curr Opin Cell Biol**, v. 15, n. 6, p. 725–31, dez. 2003b.
- BRAD, A. M.; HENDRICKS, K. E. M.; HANSEN, P. J. The Block to Apoptosis in Bovine Two-Cell Embryos Involves Inhibition of Caspase-9 Activation and Caspase-Mediated DNA Damage. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 134, n. 6, p. 789–797, dez. 2007.
- BURATINI, J., Jr.; GLAPINSKI, V. F.; GIOMETTI, I. C.; TEIXEIRA, A. B.; COSTA, I. B.; AVELLAR, M. C.; BARROS, C. M.; PRICE, C. A. Expression of fibroblast growth factor-8 and its cognate receptors, fibroblast growth factor receptor (FGFR)-3c and-4, in fetal bovine preantral follicles. **Mol Reprod Dev**, v. 70, n. 3, p. 255–61, mar. 2005.
- CAETANO, L.; MIRANDA-FURTADO, C.; BATISTA, L.; PITANGUI-MOLINA, C.; HIGA, T.; PADOVAN, C.; ROSA-E-SILVA, A. Validation of reference genes for gene expression studies in bovine oocytes and cumulus cells derived from in vitro maturation. submetido 2018.
- CARABATSOS, M. J.; ELVIN, J.; MATZUK, M. M.; ALBERTINI, D. F. Characterization of Oocyte and Follicle Development in Growth Differentiation Factor-9-Deficient Mice. **Developmental Biology**, v. 204, n. 2, p. 373–384, 15 dez. 1998.
- CHANCE, B.; COHEN, P.; JOBSIS, F.; SCHOENER, B. Intracellular Oxidation-Reduction States in Vivo. **Science (New York, N.Y.)**, v. 137, n. 3529, p. 499–508, 17 ago. 1962.
- CHANCE, B.; SCHOENER, B.; OSHINO, R.; ITSHAK, F.; NAKASE, Y. Oxidation-Reduction Ratio Studies of Mitochondria in Freeze-Trapped Samples. NADH and Flavoprotein Fluorescence Signals. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 254, n. 11, p. 4764–4771, 10 jun. 1979.
- CHAO, H.-T.; LEE, S.-Y.; LEE, H.-M.; LIAO, T.-L.; WEI, Y.-H.; KAO, S.-H. Repeated Ovarian Stimulations Induce Oxidative Damage and Mitochondrial DNA Mutations in Mouse Ovaries. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1042, p. 148–156, maio 2005.
- CHENG, Y.; MAEDA, A.; GOTO, Y.; MATSUDA, F.; MIYANO, T.; INOUE, N.; SAKAMAKI, K.; MANABE, N. Changes in Expression and Localization of X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein (XIAP) in Follicular Granulosa Cells during Atresia in Porcine Ovaries. **The Journal of Reproduction and Development**, v. 54, n. 6, p. 454–459, dez. 2008.
- COMBELLES, C. M. H.; GUPTA, S.; AGARWAL, A. Could Oxidative Stress Influence the In-Vitro Maturation of Oocytes? **Reproductive Biomedicine Online**, v. 18, n. 6, p. 864–880, jun. 2009.

CORTVRINDT, R. G.; SMITZ, J. E. Fluorescent Probes Allow Rapid and Precise Recording of Follicle Density and Staging in Human Ovarian Cortical Biopsy Samples. **Fertility and Sterility**, v. 75, n. 3, p. 588–593, mar. 2001.

CURNOW, E. C.; RYAN, J. P.; SAUNDERS, D. M.; HAYES, E. S. Developmental Potential of Bovine Oocytes Following IVM in the Presence of Glutathione Ethyl Ester. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 22, n. 4, p. 597–605, 2010.

DADARWAL, D.; ADAMS, G. P.; HYTTEL, P.; BROGLIATTI, G. M.; CALDWELL, S.; SINGH, J. Organelle reorganization in bovine oocytes during dominant follicle growth and regression. **Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E**, v. 13, 14 nov. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4650271/>>. Acesso em: 16 maio. 2018.

DE MATOS, D. G.; FURNUS, C. C.; MOSES, D. F. Glutathione Synthesis during in Vitro Maturation of Bovine Oocytes: Role of Cumulus Cells. **Biology of Reproduction**, v. 57, n. 6, p. 1420–1425, dez. 1997.

DE MATOS, D. G.; GASPARRINI, B.; PASQUALINI, S. R.; THOMPSON, J. G. Effect of Glutathione Synthesis Stimulation during in Vitro Maturation of Ovine Oocytes on Embryo Development and Intracellular Peroxide Content. **Theriogenology**, v. 57, n. 5, p. 1443–1451, 15 mar. 2002a.

DE MATOS, D. G.; HERRERA, C.; CORTVRINDT, R.; SMITZ, J.; VAN SOOM, A.; NOGUEIRA, D.; PASQUALINI, R. S. Cysteamine Supplementation during in Vitro Maturation and Embryo Culture: A Useful Tool for Increasing the Efficiency of Bovine in Vitro Embryo Production. **Molecular Reproduction and Development**, v. 62, n. 2, p. 203–209, jun. 2002b.

DEVINE, P. J.; PERREAULT, S. D.; LUDERER, U. Roles of Reactive Oxygen Species and Antioxidants in Ovarian Toxicity. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 2, p. 27, fev. 2012.

DITTRICH, R.; LOTZ, L.; KECK, G.; HOFFMANN, I.; MUELLER, A.; BECKMANN, M. W.; VAN DER VEN, H.; MONTAG, M. Live birth after ovarian tissue autotransplantation following overnight transportation before cryopreservation. **Fertil Steril**, v. 97, n. 2, p. 387–90, fev. 2012.

DOLMANS, M.-M.; MICHAUX, N.; CAMBONI, A.; MARTINEZ-MADRID, B.; VAN LANGENDONCKT, A.; NOTTOLA, S. A.; DONNEZ, J. Evaluation of Liberase, a Purified Enzyme Blend, for the Isolation of Human Primordial and Primary Ovarian Follicles. **Human Reproduction (Oxford, England)**, v. 21, n. 2, p. 413–420, fev. 2006.

DONAHUE, R. P.; STERN, S. Follicular Cell Support of Oocyte Maturation: Production of Pyruvate in Vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 17, n. 2, p. 395–398, nov. 1968.

DONG, Z.; HUANG, M.; LIU, Z.; XIE, P.; DONG, Y.; WU, X.; QU, Z.; SHEN, B.; HUANG, X.; ZHANG, T.; LI, J.; LIU, J.; YANASE, T.; ZHOU, C.; XU, Y. Focused screening of mitochondrial metabolism reveals a crucial role for a tumor suppressor Hbp1 in ovarian reserve. **Cell Death Differ**, 20 maio 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27206316>>.

- DONNEZ, J.; DOLMANS, M. M. Ovarian cortex transplantation: 60 reported live births brings the success and worldwide expansion of the technique towards routine clinical practice. **J Assist Reprod Genet**, v. 32, n. 8, p. 1167–70, ago. 2015.
- DUNNING, K. R.; CASHMAN, K.; RUSSELL, D. L.; THOMPSON, J. G.; NORMAN, R. J.; ROBKER, R. L. Beta-Oxidation Is Essential for Mouse Oocyte Developmental Competence and Early Embryo Development. **Biology of Reproduction**, v. 83, n. 6, p. 909–918, dez. 2010.
- ECKELMAN, B. P.; SALVESEN, G. S. The human anti-apoptotic proteins cIAP1 and cIAP2 bind but do not inhibit caspases. **J Biol Chem**, v. 281, n. 6, p. 3254–60, 10 fev. 2006.
- EICHENLAUB-RITTER, U.; PESCHKE, M. Expression in in-vivo and in-vitro growing and maturing oocytes: focus on regulation of expression at the translational level. **Hum Reprod Update**, v. 8, n. 1, p. 21–41, jan. 2002.
- ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol**, v. 35, n. 4, p. 495–516, jun. 2007.
- EPPIG, J. J. Analysis of Mouse Oogenesis in Vitro. Oocyte Isolation and the Utilization of Exogenous Energy Sources by Growing Oocytes. **The Journal of Experimental Zoology**, v. 198, n. 3, p. 375–382, dez. 1976.
- EPPIG, J. J.; CHESNEL, F.; HIRAO, Y.; O'BRIEN, M. J.; PENDOLA, F. L.; WATANABE, S.; WIGGLESWORTH, K. Oocyte control of granulosa cell development: how and why. **Hum Reprod**, v. 12, n. 11 Suppl, p. 127–32, nov. 1997.
- EPPIG, J. J.; O'BRIEN, M. J. Development in vitro of mouse oocytes from primordial follicles. **Biol Reprod**, v. 54, n. 1, p. 197–207, jan. 1996.
- FERREIRA, E. M.; VIREQUE, A. A.; ADONA, P. R.; MEIRELLES, F. V.; FERRIANI, R. A.; NAVARRO, P. a. a. S. Cytoplasmic Maturation of Bovine Oocytes: Structural and Biochemical Modifications and Acquisition of Developmental Competence. **Theriogenology**, v. 71, n. 5, p. 836–848, 15 mar. 2009.
- FERREIRA, R. M.; CHIARATTI, M. R.; MACABELLI, C. H.; RODRIGUES, C. A.; FERRAZ, M. L.; WATANABE, Y. F.; SMITH, L. C.; MEIRELLES, F. V.; BARUSELLI, P. S. The Infertility of Repeat-Breeder Cows During Summer Is Associated with Decreased Mitochondrial DNA and Increased Expression of Mitochondrial and Apoptotic Genes in Oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 94, n. 3, 1 mar. 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/biolreprod/article/94/3/66, 1-10/2434451>>. Acesso em: 21 maio. 2018.
- FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; SILVA, J. R. V.; SANTOS, R. R. Cryopreservation and in Vitro Culture of Caprine Preantral Follicles. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 23, n. 1, p. 40–47, 2011.
- FORTUNE, J. E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biol Reprod**, v. 50, n. 2, p. 225–32, fev. 1994.

- FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Anim Reprod Sci**, v. 78, n. 3–4, p. 135–63, 15 out. 2003.
- GHAFFARI NOVIN, M.; NORUZINIA, M.; ALLAHVEISI, A.; SAREMI, A.; FADAEI FATHABADI, F.; MASTERY FARAHANI, R.; DEGHANI FARD, A.; POOLADI, A.; MAZAHERINEZHAD FARD, R.; YOUSEFIAN, E. Comparison of mitochondrial-related transcriptional levels of TFAM, NRF1 and MT-CO1 genes in single human oocytes at various stages of the oocyte maturation. **Iran Biomed J**, v. 19, n. 1, p. 23–8, 2015.
- GINTHER, O. J.; BEG, M. A.; DONADEU, F. X.; BERGFELT, D. R. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. **Anim Reprod Sci**, v. 78, n. 3–4, p. 239–57, 15 out. 2003.
- GOOK, D. A.; EDGAR, D. H.; LEWIS, K.; SHEEDY, J. R.; GARDNER, D. K. Impact of oxygen concentration on adult murine pre-antral follicle development in vitro and the corresponding metabolic profile. **Mol Hum Reprod**, v. 20, n. 1, p. 31–41, jan. 2014.
- GUPTA, P. S. P.; RAMESH, H. S.; MANJUNATHA, B. M.; NANDI, S.; RAVINDRA, J. P. Production of Buffalo Embryos Using Oocytes from in Vitro Grown Preantral Follicles. **Zygote (Cambridge, England)**, v. 16, n. 1, p. 57–63, fev. 2008.
- GUTIERREZ, C. G.; RALPH, J. H.; TELFER, E. E.; WILMUT, I.; WEBB, R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. **Biol Reprod**, v. 62, n. 5, p. 1322–8, maio 2000.
- GUTNISKY, C.; MORADO, S.; DALVIT, G. C.; THOMPSON, J. G.; CETICA, P. D. Glycolytic Pathway Activity: Effect on IVM and Oxidative Metabolism of Bovine Oocytes. **Reproduction, Fertility, and Development**, v. 25, n. 7, p. 1026–1035, 2013.
- HAN, P.; XIN, H.; PENG, J.; HOU, J.; ZHANG, L.; SONG, Y.; LI, G.; CAO, B.; AN, X. Identification and Expression of X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein during Follicular Development in Goat Ovary. **Theriogenology**, v. 98, p. 30–35, ago. 2017.
- HOWLADER, N.; MARIOTTO, A. B.; WOLOSHIN, S.; SCHWARTZ, L. M. Providing clinicians and patients with actual prognosis: cancer in the context of competing causes of death. **J Natl Cancer Inst Monogr**, v. 2014, n. 49, p. 255–64, nov. 2014.
- HOWLADER, N.; NOONE, A. M.; YU, M.; CRONIN, K. A. Use of imputed population-based cancer registry data as a method of accounting for missing information: application to estrogen receptor status for breast cancer. **Am J Epidemiol**, v. 176, n. 4, p. 347–56, 15 ago. 2012.
- HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, Proceedings Annual Conference of the International Embryo Transfer Society. v. 47, n. 1, p. 23–32, 1 jan. 1997.
- ITO, T.; KACCHI, M.; ABE, H.; SENDAI, Y.; HOSHI, H. Growth, Antrum Formation, and Estradiol Production of Bovine Preantral Follicles Cultured in a Serum-Free Medium. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 4, p. 1099–1105, out. 2002.

JAKUS, A. E.; LARONDA, M. M.; RASHEDI, A. S.; ROBINSON, C. M.; LEE, C.; JORDAN, S. W.; ORWIG, K. E.; WOODRUFF, T. K.; SHAH, R. N. "Tissue Papers" from Organ-Specific Decellularized Extracellular Matrices. **Advanced Functional Materials**, v. 27, n. 3, 13 set. 2017.

JOYCE, I. M.; PENDOLA, F. L.; WIGGLESWORTH, K.; EPPIG, J. J. Oocyte Regulation of Kit Ligand Expression in Mouse Ovarian Follicles. **Developmental Biology**, v. 214, n. 2, p. 342–353, 15 out. 1999.

JOZA, N.; KROEMER, G.; PENNINGER, J. M. Genetic analysis of the mammalian cell death machinery. **Trends Genet**, v. 18, n. 3, p. 142–9, mar. 2002.

KATAYAMA, T.; SHIOTA, K.; TAKAHASHI, M. Activin A Increases the Number of Follicle-Stimulating Hormone Cells in Anterior Pituitary Cultures. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 69, n. 2–3, p. 179–185, 5 mar. 1990.

KLINGER, F. G.; DE FELICI, M. In vitro development of growing oocytes from fetal mouse oocytes: stage-specific regulation by stem cell factor and granulosa cells. **Dev Biol**, v. 244, n. 1, p. 85–95, 1 abr. 2002.

KNIGHT, P. G.; GLISTER, C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. **Reproduction**, v. 132, n. 2, p. 191–206, ago. 2006.

KREEGER, P. K.; FERNANDES, N. N.; WOODRUFF, T. K.; SHEA, L. D. Regulation of Mouse Follicle Development by Follicle-Stimulating Hormone in a Three-Dimensional in Vitro Culture System Is Dependent on Follicle Stage and Dose. **Biology of Reproduction**, v. 73, n. 5, p. 942–950, nov. 2005.

KRISHER, R. L. The Effect of Oocyte Quality on Development. **Journal of Animal Science**, v. 82 E-Suppl, p. E14-23, 2004.

LAI, K. W.; CHENG, L. Y. L.; CHEUNG, A. L. M.; O, W. S. Inhibitor of Apoptosis Proteins and Ovarian Dysfunction in Galactosemic Rats. **Cell and Tissue Research**, v. 311, n. 3, p. 417–425, mar. 2003.

LERER-SERFATY, G.; SAMARA, N.; FISCH, B.; SHACHAR, M.; KOSSOVER, O.; SELIKTAR, D.; BEN-HAROUSH, A.; ABIR, R. Attempted application of bioengineered/biosynthetic supporting matrices with phosphatidylinositol-trisphosphate-enhancing substances to organ culture of human primordial follicles. **J Assist Reprod Genet**, v. 30, n. 10, p. 1279–88, out. 2013.

LI, J.; KIM, J. M.; LISTON, P.; LI, M.; MIYAZAKI, T.; MACKENZIE, A. E.; KORNELUK, R. G.; TSANG, B. K. Expression of Inhibitor of Apoptosis Proteins (IAPs) in Rat Granulosa Cells during Ovarian Follicular Development and Atresia. **Endocrinology**, v. 139, n. 3, p. 1321–1328, mar. 1998.

LI, R.; PHILLIPS, D. M.; MATHER, J. P. Activin Promotes Ovarian Follicle Development in Vitro. **Endocrinology**, v. 136, n. 3, p. 849–856, mar. 1995.

- LI, X.; FANG, P.; MAI, J.; CHOI, E. T.; WANG, H.; YANG, X. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 6, p. 19, 25 fev. 2013.
- LIU, K.; RAJAREDDY, S.; LIU, L.; JAGARLAMUDI, K.; BOMAN, K.; SELSTAM, G.; REDDY, P. Control of mammalian oocyte growth and early follicular development by the oocyte PI3 kinase pathway: new roles for an old timer. **Dev Biol**, v. 299, n. 1, p. 1–11, 1 nov. 2006.
- LUSSIER, J. G.; MATTON, P.; DUFOUR, J. J. Growth Rates of Follicles in the Ovary of the Cow. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 81, n. 2, p. 301–307, nov. 1987.
- MACHACA, K. Ca²⁺ Signaling Differentiation during Oocyte Maturation. **Journal of Cellular Physiology**, v. 213, n. 2, p. 331–340, nov. 2007.
- 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. In Vitro Production of a Caprine Embryo from a Preantral Follicle Cultured in Media Supplemented with Growth Hormone. **Theriogenology**, v. 75, n. 1, p. 182–188, 1 jan. 2011.
- MAGOFFIN, D. A. Ovarian theca cell. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 37, n. 7, p. 1344–9, jul. 2005.
- MATSUDA, F.; INOUE, N.; MANABE, N.; OHKURA, S. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. **J Reprod Dev**, v. 58, n. 1, p. 44–50, 2012.
- MATZUK, M. M.; BURNS, K. H.; VIVEIROS, M. M.; EPPIG, J. J. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. **Science**, v. 296, n. 5576, p. 2178–80, 21 jun. 2002.
- MCLAUGHLIN, M.; ALBERTINI, D. F.; WALLACE, W. H. B.; ANDERSON, R. A.; TELFER, E. E. Metaphase II Oocytes from Human Unilaminar Follicles Grown in a Multi-Step Culture System. **Molecular Human Reproduction**, v. 24, n. 3, p. 135–142, 1 mar. 2018.
- MCLAUGHLIN, M.; BROMFIELD, J. J.; ALBERTINI, D. F.; TELFER, E. E. Activin Promotes Follicular Integrity and Oogenesis in Cultured Pre-Antral Bovine Follicles. **Molecular Human Reproduction**, v. 16, n. 9, p. 644–653, set. 2010.
- MCNATTY, K. P.; FIDLER, A. E.; JUENGEL, J. L.; QUIRKE, L. D.; SMITH, P. R.; HEATH, D. A.; LUNDY, T.; O'CONNELL, A.; TISDALL, D. J. Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. **Mol Cell Endocrinol**, v. 163, n. 1–2, p. 11–20, 25 maio 2000.
- MONNIAUX, D. Driving folliculogenesis by the oocyte-somatic cell dialog: Lessons from genetic models. **Theriogenology**, Proceedings of the 18th ICAR. v. 86, n. 1, p. 41–53, 1 jul. 2016.

- MONNIAUX, D.; CLEMENT, F.; DALBIES-TRAN, R.; ESTIENNE, A.; FABRE, S.; MANSANET, C.; MONGET, P. The ovarian reserve of primordial follicles and the dynamic reserve of antral growing follicles: what is the link? **Biol Reprod**, v. 90, n. 4, p. 85, abr. 2014.
- MOSS, S.; WRENN, T. R.; SYKES, J. F. Some Histological and Histochemical Observations of the Bovine Ovary during the Estrous Cycle. **The Anatomical Record**, v. 120, n. 2, p. 409–433, out. 1954.
- NAGAI, S.; MABUCHI, T.; HIRATA, S.; SHODA, T.; KASAI, T.; YOKOTA, S.; SHITARA, H.; YONEKAWA, H.; HOSHI, K. Correlation of Abnormal Mitochondrial Distribution in Mouse Oocytes with Reduced Developmental Competence. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 2, p. 137–144, out. 2006.
- OPIELA, J.; LIPÍŃSKI, D.; SŁOMSKI, R.; KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L. Transcript Expression of Mitochondria Related Genes Is Correlated with Bovine Oocyte Selection by BCB Test. **Animal Reproduction Science**, v. 118, n. 2–4, p. 188–193, abr. 2010.
- ORISAKA, M.; TAJIMA, K.; TSANG, B. K.; KOTSUJI, F. Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development. **J Ovarian Res**, v. 2, n. 1, p. 9, 2009.
- OTSUKA, F.; SHIMASAKI, S. A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: its role in regulating granulosa cell mitosis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 99, n. 12, p. 8060–5, 11 jun. 2002.
- PANGAS, S. A.; SAUDYE, H.; SHEA, L. D.; WOODRUFF, T. K. Novel Approach for the Three-Dimensional Culture of Granulosa Cell-Oocyte Complexes. **Tissue Engineering**, v. 9, n. 5, p. 1013–1021, out. 2003.
- PHILLIPPS, H. R.; HURST, P. R. XIAP: a potential determinant of ovarian follicular fate. **Reproduction**, v. 144, n. 2, p. 165–76, ago. 2012.
- PHILLIPPS, H. R.; KOKAY, I. C.; GRATTAN, D. R.; HURST, P. R. X-linked inhibitor of apoptosis protein and active caspase-3 expression patterns in antral follicles in the sheep ovary. **Reproduction**, v. 142, n. 6, p. 855–67, dez. 2011a.
- PHILLIPPS, H. R.; KOKAY, I. C.; GRATTAN, D. R.; HURST, P. R. X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein and Active Caspase-3 Expression Patterns in Antral Follicles in the Sheep Ovary. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 142, n. 6, p. 855–867, dez. 2011b.
- PICTON, H. M.; HARRIS, S. E.; MURUVI, W.; CHAMBERS, E. L. The in vitro growth and maturation of follicles. **Reproduction**, v. 136, n. 6, p. 703–15, dez. 2008.
- PITANGUI, CP, A. C. J. de S. R. e S. **Suplementação do meio de maturação in vitro e vitrificação com fosfolipídio e seu impacto na criotolerância, qualidade oocitária e expressão gênica em oócitos, usando o bovino como modelo experimental**. 2016. FMRP-USP, Ribeirão Preto, 2016.

- RACEDO, S. E.; RAWE, V. Y.; NIEMANN, H. Dynamic Changes of the Golgi Apparatus during Bovine in Vitro Oocyte Maturation. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 143, n. 4, p. 439–447, abr. 2012.
- RAMANUJAM, N.; RICHARDS-KORTUM, R.; THOMSEN, S.; MAHADEVAN-JANSEN, A.; FOLLEN, M.; CHANCE, B. Low Temperature Fluorescence Imaging of Freeze-Trapped Human Cervical Tissues. **Optics Express**, v. 8, n. 6, p. 335–343, 12 mar. 2001.
- REYNAUD, K.; CORTVRINDT, R.; SMITZ, J.; DRIANCOURT, M. A. Effects of Kit Ligand and anti-Kit antibody on growth of cultured mouse preantral follicles. **Mol Reprod Dev**, v. 56, n. 4, p. 483–94, ago. 2000.
- RIOS, P. D.; KNIAZEVA, E.; LEE, H. C.; XIAO, S.; OAKES, R. S.; SAITO, E.; JERUSS, J. S.; SHIKANOV, A.; WOODRUFF, T. K.; SHEA, L. D. Retrieval Hydrogels for Ovarian Follicle Transplantation and Oocyte Collection. **Biotechnology and Bioengineering**, 28 abr. 2018.
- ROSENKRANZ, A. R.; SCHMALDIENST, S.; STUHLMEIER, K. M.; CHEN, W.; KNAPP, W.; ZLABINGER, G. J. A microplate assay for the detection of oxidative products using 2',7'-dichlorofluorescein-diacetate. **Journal of Immunological Methods**, v. 156, n. 1, p. 39–45, 25 nov. 1992.
- SALAMA, M.; WOODRUFF, T. K. New Advances in Ovarian Autotransplantation to Restore Fertility in Cancer Patients. **Cancer Metastasis Reviews**, v. 34, n. 4, p. 807–822, dez. 2015.
- SALVESEN, G. S.; DUCKETT, C. S. IAP Proteins: Blocking the Road to Death's Door. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 6, p. 401–410, jun. 2002.
- SANDERS, E.; PARKER, E. The role of mitochondria, cytochrome c and caspase-9 in embryonic lens fibre cell denucleation. **Journal of Anatomy**, v. 201, n. 2, p. 121–135, ago. 2002.
- SARAIVA, M. V. A.; ROSSETTO, R.; BRITO, I. R.; CELESTINO, J. J. H.; SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; ALMEIDA, A. P.; BRUNO, J. B.; MAGALHÃES, D. M.; MATOS, M. H. T.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Dynamic Medium Produces Caprine Embryo from Preantral Follicles Grown in Vitro. **Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)**, v. 17, n. 12, p. 1135–1143, dez. 2010.
- SASTRE, J.; PALLARDÓ, F. V.; GARCÍA DE LA ASUNCIÓN, J.; VIÑA, J. Mitochondria, Oxidative Stress and Aging. **Free Radical Research**, v. 32, n. 3, p. 189–198, mar. 2000.
- SCHINDELIN, J.; RUEDEN, C. T.; HINER, M. C.; ELICEIRI, K. W. The ImageJ Ecosystem: An Open Platform for Biomedical Image Analysis. **Molecular Reproduction and Development**, v. 82, n. 7–8, p. 518–529, 1 jul. 2015.
- SCHMIDT, K. T.; LARSEN, E. C.; ANDERSEN, C. Y.; ANDERSEN, A. N. Risk of ovarian failure and fertility preserving methods in girls and adolescents with a malignant disease. **BJOG**, v. 117, n. 2, p. 163–74, jan. 2010.

- SIMON, A. M.; GOODENOUGH, D. A.; LI, E.; PAUL, D. L. Female Infertility in Mice Lacking Connexin 37. **Nature**, v. 385, n. 6616, p. 525–529, 6 fev. 1997.
- SIRARD, M. A. Resumption of Meiosis: Mechanism Involved in Meiotic Progression and Its Relation with Developmental Competence. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1241–1254, 1 abr. 2001.
- SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 126–36, 7 jan. 2006.
- SKALA, M.; RAMANUJAM, N. Multiphoton Redox Ratio Imaging for Metabolic Monitoring in vivo. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 594, p. 155–162, 2010.
- SMITZ, J.; DOLMANS, M. M.; DONNEZ, J.; FORTUNE, J. E.; HOVATTA, O.; JEWGENOW, K.; PICTON, H. M.; PLANCHA, C.; SHEA, L. D.; STOUFFER, R. L.; TELFER, E. E.; WOODRUFF, T. K.; ZELINSKI, M. B. Current achievements and future research directions in ovarian tissue culture, in vitro follicle development and transplantation: implications for fertility preservation. **Hum Reprod Update**, v. 16, n. 4, p. 395–414, jul. 2010.
- SUGINO, N. Reactive Oxygen Species in Ovarian Physiology. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 4, n. 1, p. 31–44, mar. 2005.
- SUN, J.; LI, X. Growth and antrum formation of bovine primary follicles in long-term culture in vitro. **Reprod Biol**, v. 13, n. 3, p. 221–8, set. 2013.
- SUTTON, M. L.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Effects of In-Vivo and in-Vitro Environments on the Metabolism of the Cumulus-Oocyte Complex and Its Influence on Oocyte Developmental Capacity. **Human Reproduction Update**, v. 9, n. 1, p. 35–48, fev. 2003.
- SUTTON-MCDOWALL, M. L.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. The Pivotal Role of Glucose Metabolism in Determining Oocyte Developmental Competence. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 139, n. 4, p. 685–695, abr. 2010.
- SUTTON-MCDOWALL, M. L.; MOTTERSHEAD, D. G.; GARDNER, D. K.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Metabolic Differences in Bovine Cumulus-Oocyte Complexes Matured in Vitro in the Presence or Absence of Follicle-Stimulating Hormone and Bone Morphogenetic Protein 15. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 4, p. 87, out. 2012.
- TORNER, H.; BRÜSSOW, K.-P.; ALM, H.; RATKY, J.; PÖHLAND, R.; TUCHSCHERER, A.; KANITZ, W. Mitochondrial Aggregation Patterns and Activity in Porcine Oocytes and Apoptosis in Surrounding Cumulus Cells Depends on the Stage of Pre-Ovulatory Maturation. **Theriogenology**, v. 61, n. 9, p. 1675–1689, jun. 2004.
- TUCK, A. R.; ROBKER, R. L.; NORMAN, R. J.; TILLEY, W. D.; HICKEY, T. E. Expression and localisation of c-kit and KITL in the adult human ovary. **Journal of Ovarian Research**, v. 8, n. 1, p. 31, 26 maio 2015.

VALLE, A.; OLIVER, J.; ROCA, P. Role of Uncoupling Proteins in Cancer. **Cancers**, v. 2, n. 2, p. 567–591, 16 abr. 2010.

VAN BLERKOM, J. Microtubule Mediation of Cytoplasmic and Nuclear Maturation during the Early Stages of Resumed Meiosis in Cultured Mouse Oocytes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 11, p. 5031–5035, 1 jun. 1991.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1717–51, 1 abr. 2005.

WIGGLESWORTH, K.; LEE, K. B.; EMORI, C.; SUGIURA, K.; EPPIG, J. J. Transcriptomic diversification of developing cumulus and mural granulosa cells in mouse ovarian follicles. **Biol Reprod**, v. 92, n. 1, p. 23, jan. 2015.

WU, J.; EMERY, B. R.; CARRELL, D. T. In vitro growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. **Biol Reprod**, v. 64, n. 1, p. 375–81, jan. 2001.

XIE, H.-L.; WANG, Y.-B.; JIAO, G.-Z.; KONG, D.-L.; LI, Q.; LI, H.; ZHENG, L.-L.; TAN, J.-H. Effects of glucose metabolism during in vitro maturation on cytoplasmic maturation of mouse oocytes. **Scientific Reports**, v. 6, 9 fev. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4746733/>>. Acesso em: 16 maio. 2018.

XU, J.; XU, M.; BERNUCI, M. P.; FISHER, T. E.; SHEA, L. D.; WOODRUFF, T. K.; ZELINSKI, M. B.; STOUFFER, R. L. Primate follicular development and oocyte maturation in vitro. **Adv Exp Med Biol**, v. 761, p. 43–67, 2013.

XU, M.; BANC, A.; WOODRUFF, T. K.; SHEA, L. D. Secondary follicle growth and oocyte maturation by culture in alginate hydrogel following cryopreservation of the ovary or individual follicles. **Biotechnol Bioeng**, v. 103, n. 2, p. 378–86, 1 jun. 2009.

XU, M.; FAZLEABAS, A. T.; SHIKANOV, A.; JACKSON, E.; BARRETT, S. L.; HIRSHFELD-CYTRON, J.; KIESEWETTER, S. E.; SHEA, L. D.; WOODRUFF, T. K. In vitro oocyte maturation and preantral follicle culture from the luteal-phase baboon ovary produce mature oocytes. **Biol Reprod**, v. 84, n. 4, p. 689–97, abr. 2011.

XU, M.; KREEGER, P. K.; SHEA, L. D.; WOODRUFF, T. K. Tissue-Engineered Follicles Produce Live, Fertile Offspring. **Tissue Engineering**, v. 12, n. 10, p. 2739–2746, out. 2006a.

XU, M.; KREEGER, P. K.; SHEA, L. D.; WOODRUFF, T. K. Tissue-engineered follicles produce live, fertile offspring. **Tissue Eng**, v. 12, n. 10, p. 2739–46, out. 2006b.

YOSHIDA, H.; TAKAKURA, N.; KATAOKA, H.; KUNISADA, T.; OKAMURA, H.; NISHIKAWA, S. I. Stepwise Requirement of C-Kit Tyrosine Kinase in Mouse Ovarian Follicle Development. **Developmental Biology**, v. 184, n. 1, p. 122–137, 1 abr. 1997.

ZHAO, J.; TAVERNE, M. A.; VAN DER WEIJDEN, G. C.; BEVERS, M. M.; VAN DEN HURK, R. Effect of Activin A on in Vitro Development of Rat Preantral Follicles and Localization of Activin A and Activin Receptor II. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 3, p. 967–977, set. 2001.