

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA**

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DOS ANTIOXIDANTES ANETOL OU
RESVERATROL NO METABOLISMO OXIDATIVO DE TECIDO OVARIANO
BOVINO CULTIVADO *IN VITRO***

**Orientadora: Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva
Aluna: Júlia Menezes Candido Silva**

**RIBEIRÃO PRETO
2023**

Júlia Menezes Candido Silva

**EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DOS ANTIOXIDANTES ANETOL OU
RESVERATROL NO METABOLISMO OXIDATIVO DE TECIDO OVARIANO
BOVINO CULTIVADO *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ginecologia e Obstetrícia da Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre em Biologia da Reprodução.

Área de Concentração: Biologia da Reprodução

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

**Ribeirão Preto
2023**

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Julia Menezes Candido

Efeitos da suplementação dos antioxidantes anetol ou resveratrol no metabolismo oxidativo de tecido ovariano bovino cultivado in vitro/ Julia Menezes Candido Silva; orientadora, Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2023

p.83: il; 30cm

Dissertação (Mestrado em Biologia da Reprodução) - Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

1. Meio de cultivo 2; Cultivo de tecido ovariano; 3. Antioxidantes; 4. Resveratrol;
5. Anetol.

AGRADECIMENTOS

Minha profunda gratidão a meus pais, Andréa e Carlos, por compartilharem e nutrirem meus sonhos, sempre me apoiando incansavelmente na busca por realizá-los. Ao meu pai, que inclusive, foi comigo muitas vezes nos abatedouros buscar os ovários para realização deste projeto. Agradecer por me darem confiança e apoio com suas palavras tranquilizadoras. Aos meus irmãos Gustavo e Heitor por me incentivarem e oferecerem seu apoio sempre que necessário.

Agradeço a toda minha família que me acompanhou e torceu o tempo todo por mim, mesmo de longe. A minha vó Madalena por ser uma das minhas inspirações, espero conseguir um dia ser só um pouquinho da pessoa que a senhora foi, e agradeço ao meu vô Joel, que em vida sempre mostrou estar torcendo por mim. Agradeço minha vó Aparecida, que consegue me renovar com seu abraço apertado. Ao meu vô Aparecido que sempre quando me vê, demonstra seu orgulho por mim.

Ao meu noivo Gabriel, minha âncora nas adversidades, agradeço por estar nesse desafio comigo, por acalmar meu coração e por fornecer apoio nos momentos em que mais precisei.

À minha orientadora, Dra. Ana Carolina Japur, minha gratidão por confiar este trabalho a mim e por sua compreensão e apoio sempre que precisei.

Agradecer ao Laboratório de Fisiopatologia da Audição, Olfato e Visão da Universidade de São Paulo, a Rede de Laboratórios Multiusuário (RELAM/PROPP) da Universidade Federal de Uberlândia e ao nosso Laboratório de Reprodução Humana no Departamento de Ginecologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP - USP) por fornecerem equipamentos e suporte técnico para a realização dos experimentos.

Quero estender meu agradecimento a todos os técnicos e professores cujas contribuições desempenharam um papel fundamental em minha jornada de aprendizado, moldando a pessoa que sou hoje.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) por meio do Programa de Excelência Acadêmica (PROEX).

Silva, J.M.C. **Efeitos da suplementação dos antioxidantes Anetol ou Resveratrol no metabolismo oxidativo de tecido ovariano bovino cultivado *in vitro***. 2023. Dissertação (Mestrado em Biologia da Reprodução - Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

RESUMO

Este estudo tem como objetivo avaliar o efeito de diferentes concentrações dos agentes antioxidantes - resveratrol e anetol - no metabolismo oxidativo de tecido ovariano bovino submetido ao cultivo *in vitro*. Os ovários bovinos foram fatiados e os fragmentos cultivados individualmente com 1000 µL de meio de cultura isolado ou suplementado. Vinte e quatro fragmentos foram removidos aleatoriamente e imediatamente fixados em paraformaldeído a 4% para o tratamento controle não cultivado (fresco). O meio básico (MB) para cultivo *in vitro* foi composto pelo meio essencial mínimo modificado (a-MEM) suplementado com BSA, ITS (insulina, transferrina, selênio), glutamina, hipoxantina, estreptomicina, penicilina e amicacina. Além disso, 336 fragmentos foram distribuídos aleatoriamente nos sete grupos de tratamento contendo MB ou MB suplementado com: resveratrol [1µM]; resveratrol [2µM]; resveratrol [5µM]; anetol [1000 µg/ml]; anetol [1500 µg/ml]; e anetol [2000µg/ml]. Todos os fragmentos foram avaliados através da histologia clássica (HE); microscopia confocal (MC) - sondas de iodeto de propídio (IP) (morte celular) e 2'7'-diclorodihidrofluoresceína (H2DCFDA) (estresse oxidativo); imuno-histoquímica (IH) - sondas FOXO3 (ativação folicular). Os dados são apresentados como média (\pm erro padrão da média) e percentagem. A probabilidade de $p < 0,05$ indica diferença significativa. O cultivo de tecido ovariano bovino leva à ativação massiva dos folículos no primeiro dia de cultivo, apesar da composição do meio. A suplementação com 2.000µg/mL de Anetol, embora boa para a ativação folicular, comprometeu a continuidade da viabilidade dos folículos. Por outro lado, o composto AN1500 não só preservou a viabilidade dos folículos, mas também promoveu a sua ativação.

Palavras chave: meio de cultivo, cultivo de tecido ovariano; antioxidantes; resveratrol; anetol.

Silva, J.M.C. **Effects of the supplementation of antioxidants Anethole and Resveratrol on the oxidative metabolism of bovine ovarian tissue cultured *in vitro***. 2023. Dissertation (Master's degree in Reproductive Biology - Postgraduate Program in Gynecology and Obstetrics). Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

ABSTRACT

This study aims to evaluate the effect of different concentrations of the antioxidant agents - resveratrol and anethole - on the oxidative metabolism of bovine ovarian tissue submitted to *in vitro* culture. Thus, bovine ovaries were sliced and the fragments were cultured individually with 1000 μ L of culture medium alone or supplemented. Twenty-four fragments were removed randomly and immediately fixed in a 4% paraformaldehyde for the non-cultivated control treatment (fresh). The basic medium (BM) for *in vitro* culture was composed of the modified minimum essential medium (α -MEM) supplemented with BSA, ITS (insulin, transferrin, selenium), glutamine, hypoxanthine, streptomycin, penicillin, and amikacin. Furthermore, 336 fragments were randomly distributed in the seven treatment groups containing BM or BM supplemented with: resveratrol [1 μ M]; resveratrol [2 μ M]; resveratrol [5 μ M]; anethole [1000 μ g/ml]; anethole [1500 μ g/ml]; and anethole [2000 μ g/ml]. All fragments were evaluated through classical histology (HE); confocal microscopy (CM) - propidium iodide (IP) (apoptosis) and 2',7'-dichlorodihydrofluoresceina (H2DCFDA) (oxidative stress) probes; immunohistochemistry (IH) - FOXO3 (follicular activation) probes. The data are presented as mean (\pm standard error of the mean) and percentage. The probability of $p < 0.05$ indicates a significant difference. The cultivation of bovine ovarian tissue leads to massive activation of follicles on the first day of culture, despite the medium composition. Supplementation with 2000 μ g/mL of Anethole, while being good for follicular activation, compromised the continued viability of the follicles. On the other hand, the AN1500 compound not only preserved the viability of the follicles, but also promoted their activation.

Keywords: Culture Media; Ovarian Tissue Culture; Antioxidants; Resveratrol; Anethole.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 3 |
| 2. OBJETIVOS | 11 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 11 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 11 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 12 |
| 3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS | 12 |
| 3.2 DESENHO EXPERIMENTAL | 12 |
| 3.3 LOCAIS DE EXECUÇÃO DO PROJETO | 13 |
| 3.4 COLETA DOS OVÁRIOS | 13 |
| 3.5 MEIO DE TRANSPORTE DOS OVÁRIOS | 13 |
| 3.6 MEIO DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> DOS FRAGMENTOS | 13 |
| 3.7 FRAGMENTAÇÃO DO CÓRTEX OVARIANO BOVINO | 14 |
| 3.8 CONDIÇÕES DO CULTIVO <i>IN VITRO</i> | 15 |
| 3.9 AVALIAÇÕES DOS FRAGMENTOS OVARIANOS | 15 |
| 3.9.1 Análise histológica | 16 |
| 3.9.2 Análise microscopia confocal | 17 |
| 3.9.3 Imunohistoquímica | 18 |
| 3.9.4 Análises estatísticas | 19 |
| 4. RESULTADOS | 20 |
| 5. DISCUSSÃO | 33 |
| 6. CONCLUSÃO | 36 |
| 7. REFERÊNCIAS | 37 |
| 9. ANEXOS | 43 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: PI3K/AKT-FOXO3 durante o desenvolvimento do folículo ovariano (Li *et al.*, 2021 adaptado);
- Figura 2: Representação do sistema de cultura em várias etapas para apoiar o desenvolvimento folicular *in vitro* (Smitz *et al.* Human Reproduction Update, 2010 adaptado);
- Figura 3 Produção de espécies reativas de oxigênio e seu controle pelo sistema antioxidante (Li *et al.*, 2013);
- Figura 4. Fluxograma do Desenho do Estudo;
- Figura 5. Análise Histológica;
- Figura 6. Análise Confocal;
- Figura 7. Avaliação da ativação folicular pela marcação imuno-histoquímica por FOXO3;
- Figura 8. Distribuição dos folículos totais por grupo em dias diferentes de cultivo.
- Figura 9. Distribuição dos folículos por grupo em dias diferentes de cultivo;
- Figura 10. Distribuição dos folículos ativos e não ativos por grupo em dias diferentes de cultivo;
- Figura 11. Intensidade de emissão de fluorescência na marcação de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) para todos os grupos;
- Figura 12. Intensidade de emissão de fluorescência na marcação de Iodeto de propídio (IP) para todos os grupos;

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Preparo concentrações dos antioxidantes nos meios de cultivo de cada grupo experimental;
- Tabela 2. Comparação Análise Morfologia Folicular AN2000 em D1;
- Tabela 3. Comparação Análise Morfologia Folicular RESV1 em D1;
- Tabela 4. Comparação Análise Morfologia Folicular RESV2 em D1;
- Tabela 5. Comparação Análise Morfologia Folicular CT em D1;
- Tabela 6. Comparação Análise Morfologia Folicular AN1500 em D7;
- Tabela 7. Comparação Ativação Folicular FOXO3 com o grupo RESV2 em D7.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Cultivo tecido ovariano

O cultivo de tecido ovariano vem sendo estudado desde os anos de 1990. Essa técnica trouxe uma alternativa de preservação de fertilidade para as mulheres pré-púberes e para aquelas que não podem postergar o tratamento do câncer para serem submetidas à estimulação ovariana e à recuperação de oócitos. Em alguns países, hoje o banco de tecido ovariano é uma técnica aceitável de preservação da fertilidade e não é mais considerado experimental (J. Hao et al, 2020; Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine, 2019).

O desenvolvimento de sistemas de cultivo que otimizem o aproveitamento de folículos em todos os estágios de desenvolvimento permite maximizar o potencial reprodutivo para futura fertilidade (Telfer *et al.*, 2013). O desenvolvimento de sistemas de cultivo tem como desafio a necessidade de um cultivo eficiente desde o estágio inicial do folículo (primordial – inativo) até a maturação completa para a fertilização *in vitro* (FIV). O crescimento oocitário depende de uma sinalização com as células foliculares, as quais medeiam a ação de sinais externos e nutrem o oócito durante sua maturação (Jeruss *et al.*, 2009; Belli *et al.*, 2012; Araújo *et al.*, 2014). O aprimoramento da técnica de cultivo de tecido ovariano pode ter um impacto duradouro na reprodução assistida, particularmente no número crescente de mulheres que sobrevivem ao câncer e enfrentam a infertilidade como resultado da gonadotoxicidade das terapias contra o câncer (Jeruss *et al.*, 2009).

1.2 Ativação folicular

O pool de reserva folicular, composto de folículos inativos, contém 90% da população total de folículos ovarianos. Este estado de inativação persiste durante toda a vida até o ciclo em que o folículo será ativado para iniciar seu processo de maturação que culminará na ovulação (Li, J. *et al.*, 2010). Embora muitas moléculas tenham sido já implicadas no processo de ativação folicular, o mecanismo exato pelo qual ele é desencadeado e desenvolvido, não está bem estabelecido (McLaughlin, M., Kinnell, H. L. Anderson, R. A., & Telfer, E. E., 2014). Durante a ativação do folículo ocorre a deleção do gene FOXO3 (Li, J. *et al.*, 2010). A FOXO3, dentro da vesícula germinativa, é um supressor reconhecido pelo crescimento do folículo primordial; quando transferido para o ooplasma, essa supressão é suspensa e ocorre a ativação do folículo

(McLaughlin, M., Kinnell, H. L. Anderson, R. A., & Telfer, E. E., 2014), portanto, o FOXO3 tem sido utilizado como um marcador precoce de ativação folicular, que indica o início deste processo antes mesmo das mudanças morfológicas sofridas pelo folículo.

Forkhead Box O3 (FOXO3) desempenha papéis importantes em diversos processos celulares, incluindo apoptose, metabolismo, proliferação celular e sobrevivência celular. O estresse oxidativo induz a ativação de FOXO (Zhang e Zhang, 2020). Durante o desenvolvimento do folículo, a via de sinalização PI3K controla a ativação do folículo primordial através do FOXO3. As fosfatidilinositol 3-quinases (PI3K) são uma família de enzimas que compartilham a função de fosforilar o grupo 3-hidroxila dos fosfoinosítídeos, os quais são ativados por diversos receptores de fator de crescimento. A serina/treonina quinase AKT/PKB é um fator de crescimento, alvo downstream chave do PI3K e um meio central para o caminho do PI3K (Li et al, 2021; Zhang e Zhang, 2020). A conversão do fosfoinosítídeo PIP3 a partir de PIP2 na membrana plasmática é catalisada por PI3K, resultando em recrutamento de membrana, fosforilação e ativação de AKT. Uma vez ativado, o AKT se move para o núcleo, onde uma série de alvos fazem o reconhecimento do AKT e são fosforilados e ativados/suprimidos, incluindo GSK3, BAD, TSC2 e FOXOs, mediando assim uma variedade de efeitos metabólicos. Uma vez ativada a via PI3K/AKT, o FOXO é fosforilado pelo AKT e excluído do núcleo, levando à supressão da ativação transcricional do gene alvo e à inibição da proliferação celular (figura 1). O FOXO3 é regulado pelo vaivém nucleocitoplasmático dentro dos oócitos. Durante o desenvolvimento do folículo primordial, o FOXO3 é não fosforilado e localizado no núcleo, onde atua para suprimir a ativação dos folículos primordiais. A ativação de PI3K/AKT resulta em fosforilação de FOXO3 e exportação nuclear, desencadeando assim a ativação do folículo primordial (Li et al, 2021).

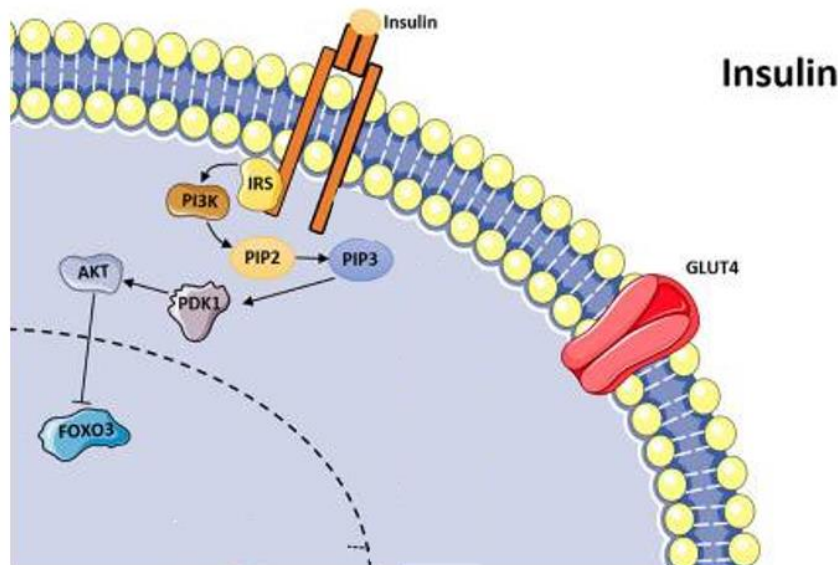


Figura 1. PI3K/AKT-FOXO3 durante o desenvolvimento do folículo ovariano. Li et al, 2021 adaptado.

Os folículos primordiais são essenciais para a manutenção da fertilidade ao longo da vida reprodutiva das fêmeas de mamíferos (Pepling, 2006). A grande maioria desta categoria é perdida devido ao processo fisiológico denominado atresia. A fim de evitar a perda maciça destes folículos, em situações de criopreservação de tecido ovariano para preservação de fertilidade, e otimizar o aproveitamento dos folículos armazenados, a cultura do folículo pré-antral tem sido empregada, não só como forma de obtenção de oócitos maduros, mas também como ferramenta importante para estudar a foliculogênese e aprimorar os sistemas de cultivo, através da inclusão de diferentes substâncias adicionadas ao cultivo (Figueiredo *et al.*, 2008). Os sistemas contemporâneos de cultivo ainda não mimetizam perfeitamente o ambiente intra ovariano (Choi *et al.*, 2014) e por isso ainda são necessários testes com novos protocolos e substâncias estimulatórias do desenvolvimento, com potencial de manter a integridade do tecido. É necessário um sistema dinâmico de cultura em várias etapas para apoiar cada um dos estágios de transição, conhecido como cultivo *multistep*, como pode-se observar na figura 1 (Telfer et al, 2011, Smits *et al.*, 2010). O primeiro passo é apoiar a ativação e o início do desenvolvimento folicular primordial através do cultivo do folículo *in situ*, ou seja, ainda incluso no tecido ovariano; na segunda etapa, a partir desta ativação, são isolados os folículos em estágios pré-antrais para serem cultivados, otimizando o número de folículos em crescimento dos estágios ativos mais iniciais até a formação do antro, em estágios pré-ovulatório; e, por fim, a terceira etapa envolve a extrusão do *complexo cumulus oócito* (COC)

da unidade folicular antral para o cultivo em sistemas de maturação *in vitro* convencional de oócitos (Telfer, *et al.*, 2013). Este estudo tem como foco a primeira etapa do cultivo *multistep*, o cultivo *in situ* de folículos (Figura 2(i)).

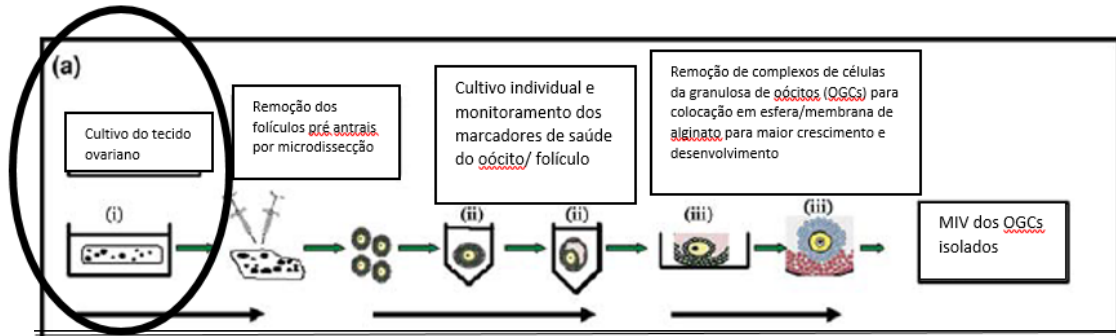


Figura 2. Representação do sistema de cultura em várias etapas para apoiar o desenvolvimento folicular *in vitro*. (a) Diagrama mostrando as etapas envolvidas na cultura de folículos primordiais humanos até os estágios antrais (i-ii) e remoção de complexos de células da granulosa de oócitos (OGCs) para colocação em esfera/membrana de alginato (iii) para maior crescimento e desenvolvimento e maturação *in vitro* (MIV) subsequente. Smitz *et al.* Human Reproduction Update, 2010 adaptado.

A literatura sugere que os folículos maturados *in vitro* apresentam menor capacidade de desenvolvimento do que os maturados *in vivo* (Magalhaes *et al.*, 2009). Em condições *in vitro*, os folículos podem estar expostos a concentrações de oxigênio supra fisiológicas (20%) (Fischer *et al.*, 1993), o que pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) promovendo o estresse oxidativo (Silva *et al.*, 2011).

1.3 Viabilidade celular

Uma das formas de se verificar a eficiência dos sistemas de cultivo na preservação do tecido é a avaliação de processos de proliferação e morte celular. Existem dois tipos de morte celular: apoptose (morte celular programada) e necrose (morte devido a lesões causadas por fontes externas), ambos os tipos podem ser identificados com o uso de sondas fluorescentes. A sonda de iodeto de propídio (IP) pode atravessar apenas as membranas de células necróticas e não das apoptóticas, corando DNA e RNA presentes no citoplasma, e emitindo uma fluorescência vermelha, já as células íntegras não fluorescem (Silva, 2007).

O IP é considerado impermeável à membrana plasmática e, portanto, comumente utilizado para detectar células com integridade de membrana plasmática comprometida (em processo de morte celular). Após a entrada na célula, o IP cora o DNA em virtude da ligação a ácidos nucleicos de fita dupla por intercalação, o que leva a um aumento de mais de 30 vezes de sua fluorescência. As propriedades de excitação e emissão do IP, o tornaram como corante de

escolha para avaliação de morte celular por equipamentos equipados por fonte de excitação a laser (Zhao H., 2010).

1.4 Estresse oxidativo

As EROs são moléculas reativas radicais não-livres e radicais livres derivadas do oxigênio (Agarwal *et al.*, 2014). Nos organismos aeróbicos a produção destas moléculas acontece de forma natural, sendo geradas tanto no citoplasma (mitocôndrias, lisossomos e peroxissomos), quanto na membrana plasmática (Idelchik *et al.*, 2017). A maior produção de EROs acontece, principalmente, nas mitocôndrias durante o processo de fosforilação oxidativa, reação responsável pela produção de ATP (Davies *et al.*, 1995). De acordo com Ray and Shah, (2005), os tipos mais comuns de EROs pertencem a uma família de moléculas que incluem os radicais: ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila (OH^{\bullet}) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

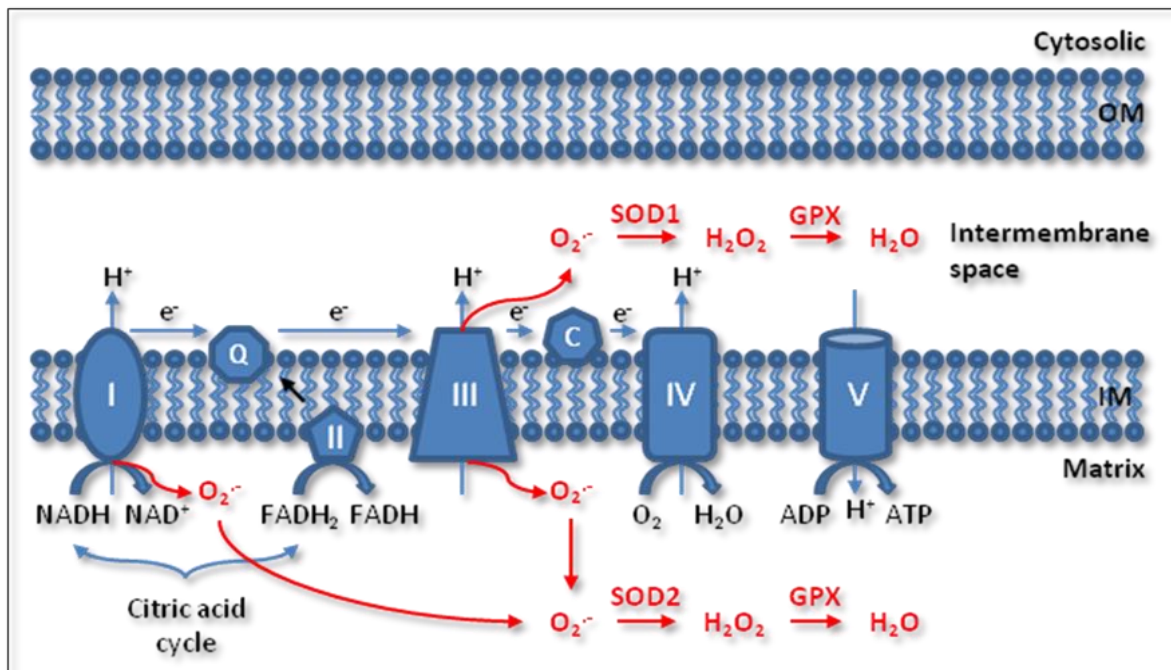


Figura 3. Produção de espécies reativas de oxigênio e seu controle pelo sistema antioxidante. Legenda: Os elétrons (e^-) doados de NADH e FADH 2 passam pela cadeia de transporte de elétrons e finalmente reduzem O_2 para formar H_2O no complexo IV. MtROS são produzidos a partir do vazamento de e^- para formar superóxido (O_2^-) no complexo I e complexo III. O_2^- é produzido dentro da matriz no complexo I, enquanto no complexo III O_2^- é liberado tanto para a matriz quanto para o espaço intermembrana. Uma vez gerado, O_2^- é dismutado em H_2O_2 pela superóxido dismutase 1 (SOD1) no espaço intermembrana e pela SOD2 na matriz. Em seguida, o H_2O_2 é totalmente reduzido à água pela glutatona peroxidase (GPX). Ambos O_2^- e H_2O_2 produzidos neste processo são considerados como mtROS. OM: membrana externa; IM: membrana interna. Li et al., 2013.

Existem diversos métodos para avaliar o efeito do cultivo *in vitro* associado a antioxidantes na preservação de folículos pré-antrais, no entanto, os testes rápidos podem poupar tempo e melhorar o aproveitamento posterior da amostra de tecido ovariano. A identificação de EROs em análise em microscopia confocal por meio de sonda fluorescente tem sido utilizada com o objetivo de quantificar o estresse oxidativo de tecidos e folículos ovarianos após criopreservação. As sondas fluorescentes são excelentes sensores de espécies reativas de oxigênio, devido à alta sensibilidade, aplicabilidade, simplicidade na coleta e análise de dados, além de apresentar alta resolução espacial em técnicas de imagem microscópica (Rocha, C.D.,2017). A avaliação da oxidação intracelular, pode ser medida utilizando a sonda de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), a qual mede a produção de peróxido de hidrogênio por meio de detecção intracelular de oxidação gerando coloração verde que varia de alta a baixa intensidade de acordo com o grau de oxidação (FABRI *et al.*, 2014; Rocha, C.D.,2017).

Em excesso as EROs oferecem risco de dano à célula, porém em quantidades adequadas, essas moléculas são importantes na manutenção de várias funções fisiológicas e exercem um papel crítico na regulação de processos celulares como, resposta imunológica, crescimento, proliferação e sinalização celular. Além disso, atuam de forma indireta na regulação de morte celular e em processos bioquímicos como a transferência de elétrons, fertilização de oócitos, ativação de genes e defesa contra infecções (Shami *et al.*, 2004). Apesar de promoverem o processo celular normal sob condições fisiológicas, quando ocorre o desequilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade dos sistemas de defesa antioxidante, o excesso de EROs pode gerar estresse oxidativo (Sahebkar *et al.*, 2015; Schafer *et al.*, 2001; Qingming *et al.*, 2010). O estresse oxidativo é responsável por alterar diversas moléculas intracelulares e causar prejuízos entre os quais podemos citar, danos no DNA, nas proteínas e nos lipídios (Vaanholt *et al.*, 2016).

1.5 Antioxidantes

Vários estudos demonstraram que altos níveis de EROs produzidos durante o cultivo *in vitro* prejudicam o desenvolvimento folicular ao danificar suas estruturas celulares e moleculares. Nesse sentido, uma grande variedade de antioxidantes (AO) como o selênio, α -tocoferol, ácido ascórbico e, mais recentemente o resveratrol e o anetol foram adicionados ao meio de cultivo a fim de criar um ambiente antioxidante, numa tentativa de proteção das células e tecidos em cultivo (Sa *et al.*, 2018).

O resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) é um polifenol natural sintetizado por várias plantas como uma fitoalexina em resposta a patógenos, como bactérias ou fungos. Este bioflavonoide, encontrado naturalmente em uvas, vinho tinto, amendoim e várias plantas medicinais, tem sido postulado como sendo o principal agente responsável por inúmeros benefícios para a saúde associados ao consumo desses alimentos dietéticos. (Vastano *et al.*, 2000). Na última década, o interesse nas propriedades terapêuticas do resveratrol aumentou consideravelmente, uma vez que esse agente pode ter efeitos benéficos, incluindo propriedades quimiopreventivas, ações antioxidantes e anti-inflamatórias e ações protetoras contra a isquemia-reperfusão, processos neurodegenerativos, doenças metabólicas e patologias cardiovasculares, tanto *in vitro* como *in vivo* (em estudos com modelos animais) (Ortega and Duleba, 2015). O resveratrol pode limpar efetivamente o acúmulo de EROs, além de conseguir manter o nível de enzimas antioxidantes, aliviando os danos causados pelo estresse oxidativo. Este bioflavonoide protege o oócito contra o envelhecimento pós-ovulatório, impedindo a produção de EROs, e também melhora a qualidade da maturação *in vitro* de oócitos em camundongos e humanos (Jiang *et al.*, 2019; Han *et al.*, 2020).

O anetol, principal constituinte do óleo essencial extraído de *Croton zehntneri*, encontrado também no óleo essencial de anis estrelado (*Illicium verum*), anis (*Pimpinella anisum*) e anis doce (*Foeniculum vulgare*), tem sido utilizado na medicina popular e nas indústrias alimentícia e cosmética. (Yea *et al.*, 2006; Ritter, A.M.; Ames, F.Q.; Otani, F.; de Oliveira, R.M.; Cuman, R.K.; Bersani-Amado, C.A., 2014). Assim, este composto pode atuar como um antiinflamatório, anestésico, anticarcinogênico e antioxidante. Alguns estudos demonstraram que o efeito antioxidante do anetol é devido à sua capacidade de seqüestrar radicais livres, aumentar os níveis intracelulares de glutatona e glutatona-S-transferase e inibir a peroxidação lipídica (Ritter, A.M.; Ames, F.Q.; Otani, F.; de Oliveira, R.M.; Cuman, R.K.; Bersani-Amado, C.A., 2014). Recentes estudos, demonstraram que o anetol presente no meio de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais (folículos secundários isolados) caprinos, além de reduzir os níveis de EROs foi também capaz de estimular o desenvolvimento folicular e aumentar as taxas de retomada da meiose de oócitos oriundos desses folículos (Sá *et al.*, 2017; Sá *et al.*, 2018).

Até o momento são escassos os estudos que demonstram a ação destes antioxidantes no cultivo *in vitro* de tecido ovariano.

1.5 Modelos animais

Devido à disponibilidade limitada de tecido ovariano humano e de primata para pesquisa, a tecnologia de cultura de folículos progrediu mais rapidamente em alguns animais domésticos, tais como vaca, ovelha, cabra e porco, do que em primatas e humanos. Os dados gerados a partir desses modelos animais são valiosos para pesquisas translacionais e clínicas, já que o tecido humano é menos acessível (Telfer *et al.*, 2013).

A espécie bovina é apontada como modelo experimental comparativo destes estudos com dupla aptidão, por favorecer o avanço genético e conservação desta espécie e fornecer informações importantes a serem aplicadas na clínica reprodutiva humana. Além do mais, estes ovários têm razoável disponibilidade em frigoríficos e são bons modelos de estudos para compreensão do desenvolvimento folicular (Araújo *et al.*, 2014; Baerwald, 2009). Pela facilidade de acesso às amostras de ovários bovinos e pela semelhança descrita com o ciclo reprodutivo humano, neste estudo optamos pela utilização do modelo bovino.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da suplementação dos antioxidantes Anetol e Resveratrol, em diferentes concentrações, no metabolismo oxidativo de fragmentos de tecido ovariano bovino fresco cultivado.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito da suplementação dos antioxidantes Anetol e Resveratrol, em diferentes concentrações (resveratrol [1 μ M]; resveratrol [2 μ M]; resveratrol [5 μ M]; anetol [1000 μ g/mL]; anetol [1500 μ g/mL] e anetol [2000 μ g/mL]), no meio de cultivo convencional de tecido ovariano *in situ*, sobre a saúde do tecido cultivado e o metabolismo oxidativo, verificados através da mensuração da produção de EROs, identificação de morte celular e avaliação da morfologia dos folículos pelas técnicas microscopia confocal, imunohistoquímica e análise histológica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Pesquisa do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP) sob o protocolo número 648 e pela Comissão de Ética no Uso de Animais da FMRP, sob o número 216/2018 (anexos).

3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

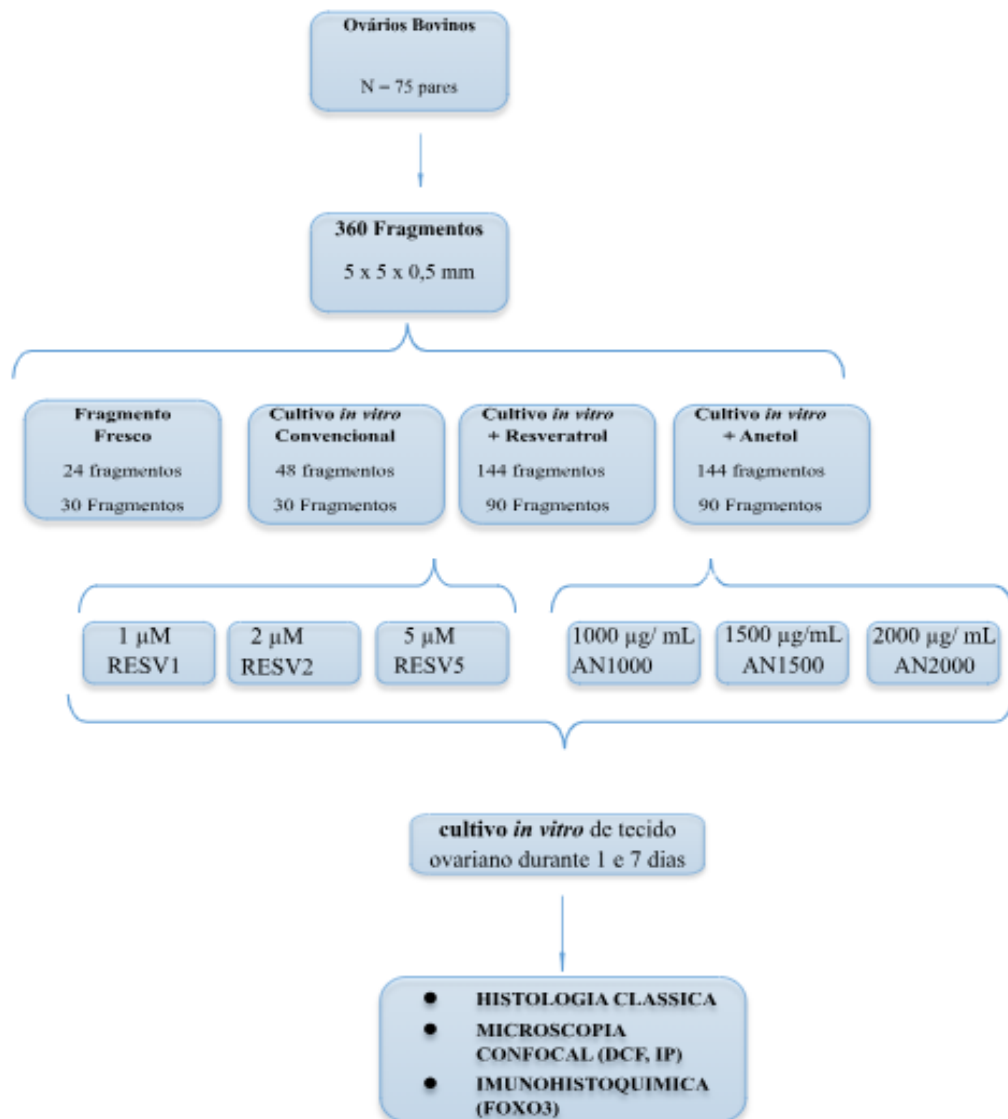


Figura 4. Fluxograma do Desenho do Estudo

3.2 LOCAIS DE EXECUÇÃO DO PROJETO

Os procedimentos (preparo de meios de cultivo, preparo dos fragmentos de tecido e os cultivos) foram realizados no Laboratório de Reprodução Humana no Departamento de Ginecologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP - USP). As imagens captadas por microscopia confocal foram feitas em parceria com o Laboratório de Citometria de fluxo e microscopia avançada (Universidade Federal de Uberlândia). As lamínas de histologia clássica e imunohistoquímica foram realizadas em parceria com o Laboratório de Fisiopatologia da Audição, Olfato e Visão (casa 19).

3.3 COLETA E TRANSPORTE DOS OVÁRIOS

Ovários bovinos (n = 25 pares) foram coletados em abatedouros de animais sem raça definida. Os ovários foram transportados do frigorífico para o laboratório em garrafa térmica com solução fisiológica 0,9% (4°C) suplementada com 100 µg/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, no período máximo de 4 horas do abate.

3.4 MEIO DE LAVAGEM DOS OVÁRIOS

Os ovários, fragmentos, folículos e oócitos foram lavados com meio de lavagem composto de α -MEM HEPES, suplementado com 100 µg/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 100 µg/mL de amicacina.

3.5 MEIO DE CULTIVO *IN VITRO* DOS FRAGMENTOS

O meio de cultivo *in vitro* dos fragmentos foi composto de α -MEM suplementado com 0,00125 g/mL de BSA, 10µL/mL de ITS (insulina, transferrina, selênio), 10µL/mL de glutamina, 10µL/mL de hipoxantina, 10µL/mL de estreptomicina, 10µL/mL de penicilina e 10µL/mL de amicacina. No grupo controle o cultivo foi feito de forma convencional (α -MEM + suplementado), sem adição dos antioxidantes. Nos grupos RESV1, RESV2 e RESV5 foram adicionadas ao α -MEM + suplementado concentrações de 1µM, 2µM e 5µM de resveratrol, respectivamente. Nos grupos AN1000, AN1500 e AN2000 foram adicionadas ao α -MEM + suplementado, concentrações de 1000 µg/mL, 1500 µg/mL e 2000 µg/mL de anetol, respectivamente. As concentrações de resveratrol e anetol foram definidas com base em estudos anteriores encontrados na literatura sobre o tema (Dos Santos Morais *et al.*, 2019; Sa *et al.*, 2018; Hao *et al.*, 2018; Bezerra *et al.*, 2018).

A tabela 1 demonstra como foi feito o preparo dos meios de cultivo suplementados com as concentrações dos antioxidantes nos diferentes grupos experimentais. O preparo das soluções estoques foram realizados visando otimizar o aproveitamento desses.

Tabela 1. Preparo concentrações dos antioxidantes nos meios de cultivo de cada grupo experimental

| | |
|---|---|
| 1 μM Resveratrol | Solução estoque: 0,00912mg de Resveratrol em 40μL de DMSO = 1mM Solução estoque intermediária: 40μL da solução estoque e 360μL de meio de cultivo = 0,1mM Solução Final: 0,4mL de solução estoque intermediária e 39,6 mL de meio de cultivo = 1μM de Resveratrol |
| 2 μM Resveratrol | Solução estoque: 0,01824 mg de Resveratrol em 40μL de DMSO = 2mM Solução estoque intermediária: 40μL da solução estoque e 360μL de meio de cultivo = 0,1mM Solução Final: 0,4mL de solução estoque intermediária e 39,6 mL de meio de cultivo = 2μM de Resveratrol |
| 5 μM Resveratrol | Solução estoque: 0,0456mg de Resveratrol em 40μL de DMSO = 5mM Solução estoque intermediária: 40μL da solução estoque e 360μL de meio de cultivo = 0,1mM Solução Final: 0,4mL de solução estoque intermediária e 39,6 mL de meio de cultivo = 5μM |
| 2000μg/ mL Anetol | Solução estoque: 0,081789mL de Anetol em 4,918211 mL de Água Milli-Q. Solução Final: adicionar 5 mL da solução estoque e completar com 35mL de meio de cultivo. |
| 1500μg/ mL Anetol | Solução estoque: 0,06134mL de Anetol em 4,93866mL de Água Milli-Q Solução Final: adicionar 5 mL da solução estoque e completar com 35mL de meio de cultivo. |
| 1000μg/ mL Anetol | Solução estoque: 0,04089mL de Anetol em 4,95911 mL de Água Milli-Q. Solução Final: adicionar 5 mL da solução estoque e completar com 35mL de meio de cultivo. |

3.6 FRAGMENTAÇÃO DO CÓRTEX OVARIANO BOVINO

No laboratório, os ovários foram lavados com solução fisiológica 0,9% (4°C) suplementada com 100 μ g/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina. Em seguida, o tecido conjuntivo e a gordura foram removidos e os ovários transferidos para o mesmo meio permanecendo até o momento da fragmentação.

Antes da manipulação, os ovários foram lavados uma vez com álcool 70% e duas vezes com solução fisiológica 0,9% (4°C) suplementada com 100 μ g/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina. A fragmentação dos ovários foi realizada utilizando-se o Thomas Stadie-Riggs Tissue Slicer (Thomas Scientific®, NJ, USA), para a obtenção de fatias do córtex ovariano com espessura de 5 x 5 x 0,5 mm, retiradas das porções mais externas dos ovários. Esses cortes foram analisados na lupa, para seleção de fragmentos com presença de folículos pré-antrais.

Esta última etapa foi feita dentro de um fluxo laminar, em placa aquecida a temperatura 37°C. Os fragmentos de córtex ovariano permaneceram no meio α -MEM HEPES, suplementado com 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de amicacina até a seleção para inclusão nos grupos de cultivo.

3.7 CONDIÇÕES DO CULTIVO *IN VITRO*

Os cultivos dos fragmentos de todos os tratamentos ocorreram de forma individual em placas com 24 poços (Corning) com 1000 μL de meio de cultivo em cada poço. Vinte e quatro fragmentos foram retirados aleatoriamente e imediatamente fixados para o tratamento controle não cultivado. Os fragmentos restantes (336 fragmentos) foram distribuídos aleatoriamente nos sete tratamentos (CT, RESV1, RESV2, RESV5, AN1000, AN1500 e AN2000). Os fragmentos permaneceram em estufa com 5% de CO_2 no ar, a 38,5°C e umidade saturada durante o tempo de cultivo (1 ou 7 dias). Trocas parciais do meio de cultivo ocorreram a cada 2 dias. Nesse processo, 500 μL de meio foram retirados de cada poço de cultivo e substituídos por 500 μL de meio novo nos mesmos poços correspondentes.

3.8 AVALIAÇÕES DOS FRAGMENTOS OVARIANOS

3.8.1 Análise histológica

Os fragmentos destinados a histologia foram fixados em paraformaldeído a 4%, armazenados em álcool 70% e encaminhados para histologia clássica. Após a inclusão em parafina os fragmentos foram seccionados serialmente na espessura de 5 μm . Os fragmentos foram corados com hematoxilina e eosina (HE) conforme técnica padrão. As lâminas foram analisadas utilizando o microscópio óptico (Nikon, Tokio, Japão) em aumento de 400x.

As variáveis analisadas foram: número de folículos por fragmento; classificação morfológica (folículos normais ou anormais); classificação quanto ao estágio de desenvolvimento. Os folículos foram classificados como normais quando o oócito se encontrava preservado, circundado por uma ou mais camadas de células da granulosa organizadas. Já os folículos foram classificados como anormais quando apresentavam o citoplasma retraído ou desorganizado com células da granulosa separada da membrana basal, ruptura ou perda de células da granulosa, oócito com núcleo picnótico. Os estágios de desenvolvimento dos folículos pré-antrais quantificados e avaliados foram:

- Primordial: oócito imaturo localizado no centro do folículo e rodeado por uma camada de células da pré-granulosa de formato pavimentoso (Figura 5 (a));
- Transição: oócito em crescimento e multiplicação das células da granulosa com mudança morfológica de pavimentoso para cuboide (Figura 5 (t));
- Primário: oócito imaturo e central rodeado por uma camada de células da granulosa de formato cuboide (Figura 5 (p));
- Secundário: oócito imaturo rodeado por duas ou mais camadas de células da granulosa de formato cuboide (Figura 5 (s)).

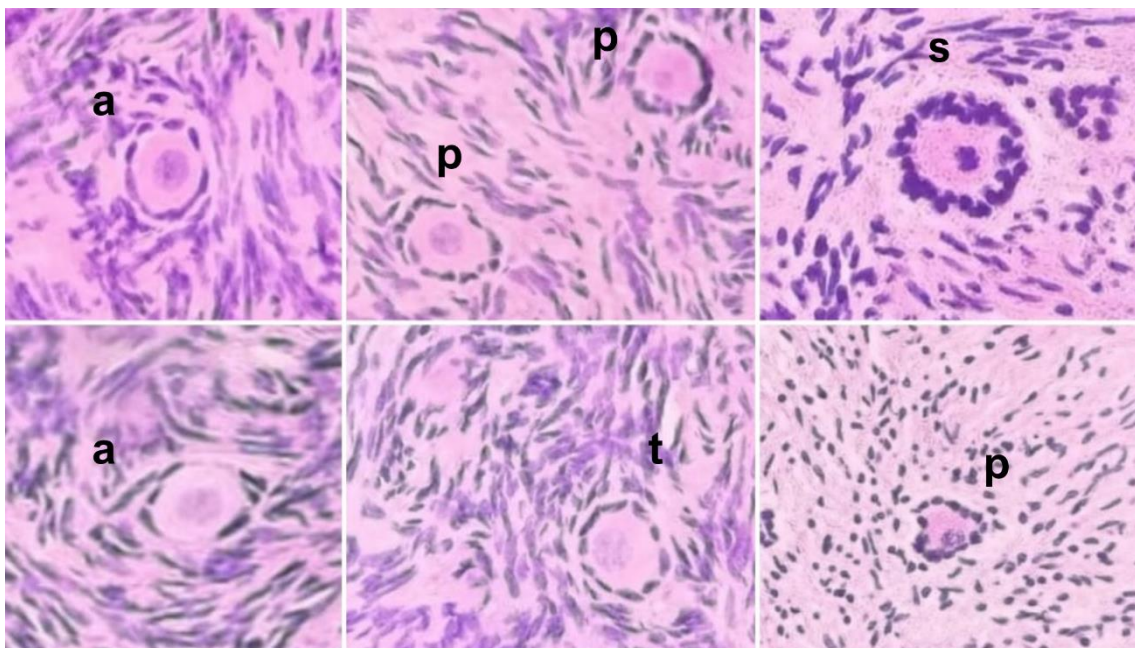


Figura 5. Análise Histológica. Fonte: Da autora, 2022. Legenda: a: Primordial T: Transição P: Primário S: Secundário

3.8.2 Análise microscopia confocal

A microscopia Confocal se destaca por ser capaz de produzir imagens tridimensionais a partir de amostras espessas, ainda nesta mesma amostra espessa é possível obter imagens de seus planos específicos sem a necessidade de fatiar ainda mais o tecido. A imagem é adquirida pelo microscópio Confocal através de feixe de laser, e o comprimento desse é definido de acordo com o comprimento de onda luminosa de excitação que se deseja, de acordo com a sonda que está sendo utilizada. Seguente a isto, a luz emitida pelo agente fluorescente formará a imagem que se encontra em plano focal conjugado (confocal) ao do ponto iluminado (Corrêa et al., 2012).

Os fragmentos destinados para análise de intensidade de fluorescência por microscopia confocal foram lavados em solução PBS com 5% soro fetal bovino e corados em solução com 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) (Product: 35848 Sigma Aldrich 76-54-0) por 30 minutos. Em seguida, foram corados em solução com 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de iodeto de propídeo (Sigma Aldrich) por 15 minutos (Vallorani *et al*, 2012). Após este período, foram fixados em paraformaldeído 4% durante 15 minutos e armazenados em PBS, a 4°C. A intensidade de fluorescência (pixels) em diferentes profundidades teciduais com a utilização de microscópio LSM 710 ZEISS® (Oberkochen, Alemanha) foram analisadas.

Através da análise confocal, foi possível avaliar as condições de viabilidade (morte celular) e oxidação do tecido ovariano após o tratamento. Para isso, utilizamos os corantes DCF ($\lambda = 485\text{-}530\text{ nm}$) e iodeto de propídeo ($\lambda = 536\text{-}620\text{ nm}$). O corante DCF, é oxidado por ERO's, emitindo assim alta fluorescência e indicando a intensidade de emissão de espécies reativas de oxigênio produzida, enquanto o iodeto de propídeo emite fluorescência adquirida por células degeneradas, sendo que este só consegue atravessar a membrana de células necróticas, sendo impermeável a células viáveis com membranas íntegras (Silva, 2007).

Nossa análise foi realizada com 6 fragmentos de cada grupo, sendo selecionados 5 campos do tecido para a obtenção das medidas de emissão de fluorescência tanto para o DCF quanto para o iodeto de propídeo. O comprimento de onda apropriado para cada probe foi programado previamente, e as seções foram realizadas em intervalos de 8 micrômetros, com uma média de 10 seções em Z-stack (Martino *et al.*, 2013).

Utilizando o software ImageJ, as imagens obtidas foram analisadas e os pixels de intensidade de fluorescência foram convertidos em dados numéricos, para análises estatísticas posteriores. O corante DCF emite fluorescência na cor verde (Figura 6(A,B,C)), enquanto o iodeto de propídeo emite fluorescência na cor vermelha (Figura 6(D,E,F)). Foi utilizada a mesma área para analisar os cinco campos de cada fragmento, garantindo que o mesmo campo utilizado para a medição da fluorescência do DCF fosse também utilizado para a medição da fluorescência do iodeto de propídeo.

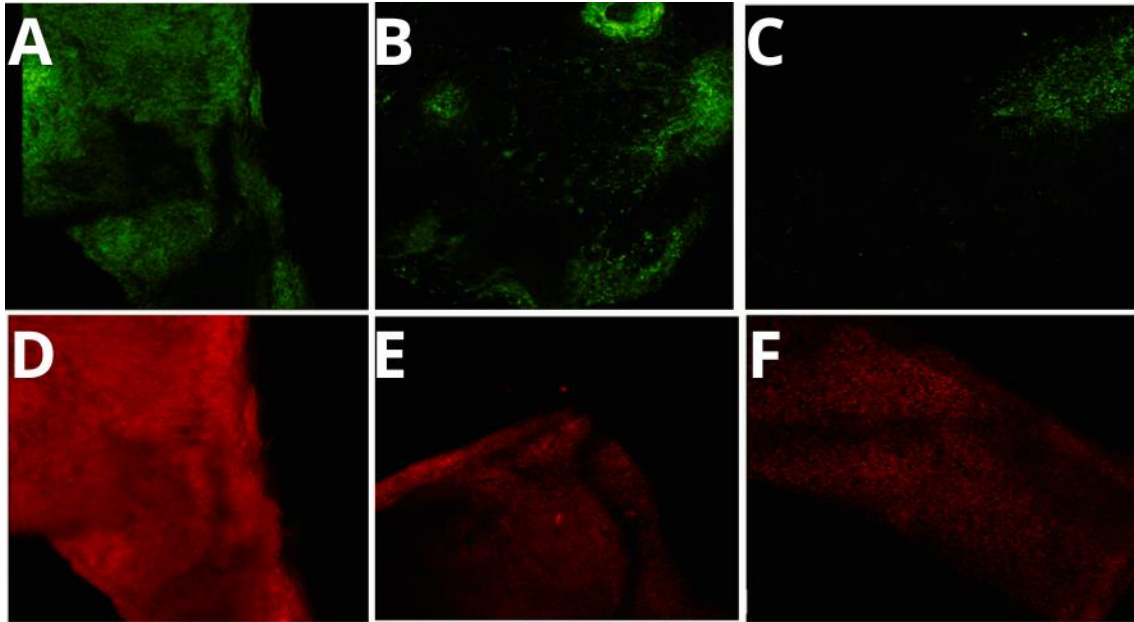


Figura 6. Análise Confocal. Fonte: Da autora, 2022. Legenda: A, B, C- Diferentes intensidades emitida pela sonda 2',7'-diclorofluoresceína (DCF); D,E,F- Diferentes intensidades emitida pela sonda Iodeto de Propídio (IP).

3.8.3 Imunohistoquímica

Os fragmentos de todos os grupos foram fixados em paraformaldeído 4%, desidratados em bateria de álcool crescente 70%, clarificada em xilol, embebidos em parafina e cortados em secções de 6 μ m. A recuperação do antígeno foi realizada usando citrato de sódio 0,01 M por 20 min e a atividade da peroxidase endógena extinta usando 3% de peróxido de hidrogênio em metanol. As secções de tecido foram incubadas em anticorpo primário FOXO3A Polyclonal Antibody (Product #PA5-27145) diluído em 1:500, durante a noite a 4°C. Os controles negativos foram estabelecidos suprimindo o anticorpo primário por soro de cabra. No dia seguinte as lâminas foram lavadas em solução PBS 0.1 M e incubadas com anticorpo secundário Abcam Goat Anti-Rabbit IgG (HRP) 500ug. Supplier: Abcam AB205718) diluído em 1:2000, marcado com peroxidase de rábano por 30 minutos (McLaughlin, M., Kinnell, H. L. Anderson, R. A., & Telfer, E. E., 2014). Novamente foram lavados com solução de PBS 0.1M. A hematoxilina de Mayer foi usada para contracorar as lâminas. Através de um Scanscope CS System, com uma objetiva 20x Olympus foram capturadas imagens das lâminas imunocoradas. As imagens digitalizadas foram analisadas posteriormente utilizando o programa de visualização OlyVIA. Os folículos foram classificados como positivos (ativados) quando a coloração marrom foi observada somente no ooplasma (Figura 7 (A,C,E,,G,H)) e negativos (não ativados) quando a coloração marrom foi observada na também na vesícula germinativa (Figura 7 (B,D,F)).

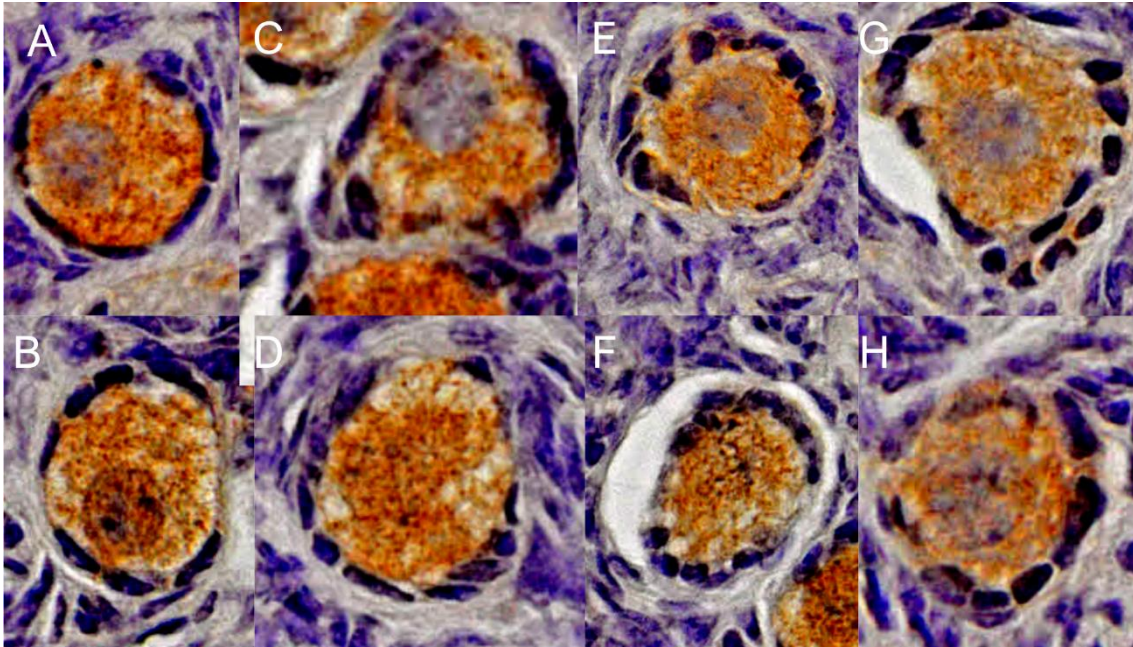


Figura 7. Avaliação da ativação folicular pela marcação imuno-histoquímica por FOXO3. Fonte: Da autora, 2023. Legenda: (A) Folículo primordial tardio ativado (B) Folículo primordial não ativado (C) Folículo em transição ativado (D) Folículo em transição não ativado (E) Folículo primário ativado (F) Folículo primário não ativado (G) Folículo secundário ativado (H) Folículo primário ativado.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada uma análise exploratória de dados através de medidas de posição central e de dispersão. Os gráficos de box plot e histograma foram construídos para verificar a distribuição das amostras.

A comparação entre os tempos dentro de cada grupo e entre os grupos dentro de cada tempo foi realizada considerando os contrastes ortogonais no modelo linear generalizado. Os pressupostos do modelo de normalidade dos resíduos e homocedasticidade da variância foram checados considerando os gráficos QQ-Plot e histograma dos resíduos, e gráficos do resíduo versus o predito. As análises foram implementadas no programa SAS versão 9.4. Foi considerado como significância estatística um $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

O presente estudo avaliou os efeitos dos antioxidantes Anetol e Resveratrol em diferentes concentrações sob o cultivo de tecido ovariano. Nas três replicatas foram incluídos 360 fragmentos. Estes foram distribuídos entre os 7 grupos de cultivo analisados em D1 e em D7 e o grupo fresco (D0), sendo que 6 fragmentos de cada grupo foram destinados para Histologia Clássica, 6 fragmentos de cada grupo foram destinados para Microscopia Confocal, 6 fragmentos de cada grupo foram destinados para Imunohistoquímica.

4.1 Avaliação Histológica

Na avaliação histológica foi verificado o desenvolvimento folicular, bem como as características estruturais indicativas de sobrevivência ou degeneração dos folículos. Na figura 9 são apresentadas as comparações do desenvolvimento folicular entre os grupos.

Antes do cultivo *in vitro*, a proporção de folículos primordiais era maior do que de folículos em outros estádios; entretanto, após 1 dia de cultivo, os folículos estavam crescidos; assim, a proporção de folículos primordiais diminuiu, enquanto a proporção de folículos primários aumentou (Figura 8).

Podemos observar que houve diminuição significativa dos folículos primordiais após sete dias de cultivo em todos os grupos. De forma coerente, ocorreu aumento significativo no número de folículos primários em D7 em todos os grupos, com exceção somente dos grupos AN2000 e CT.

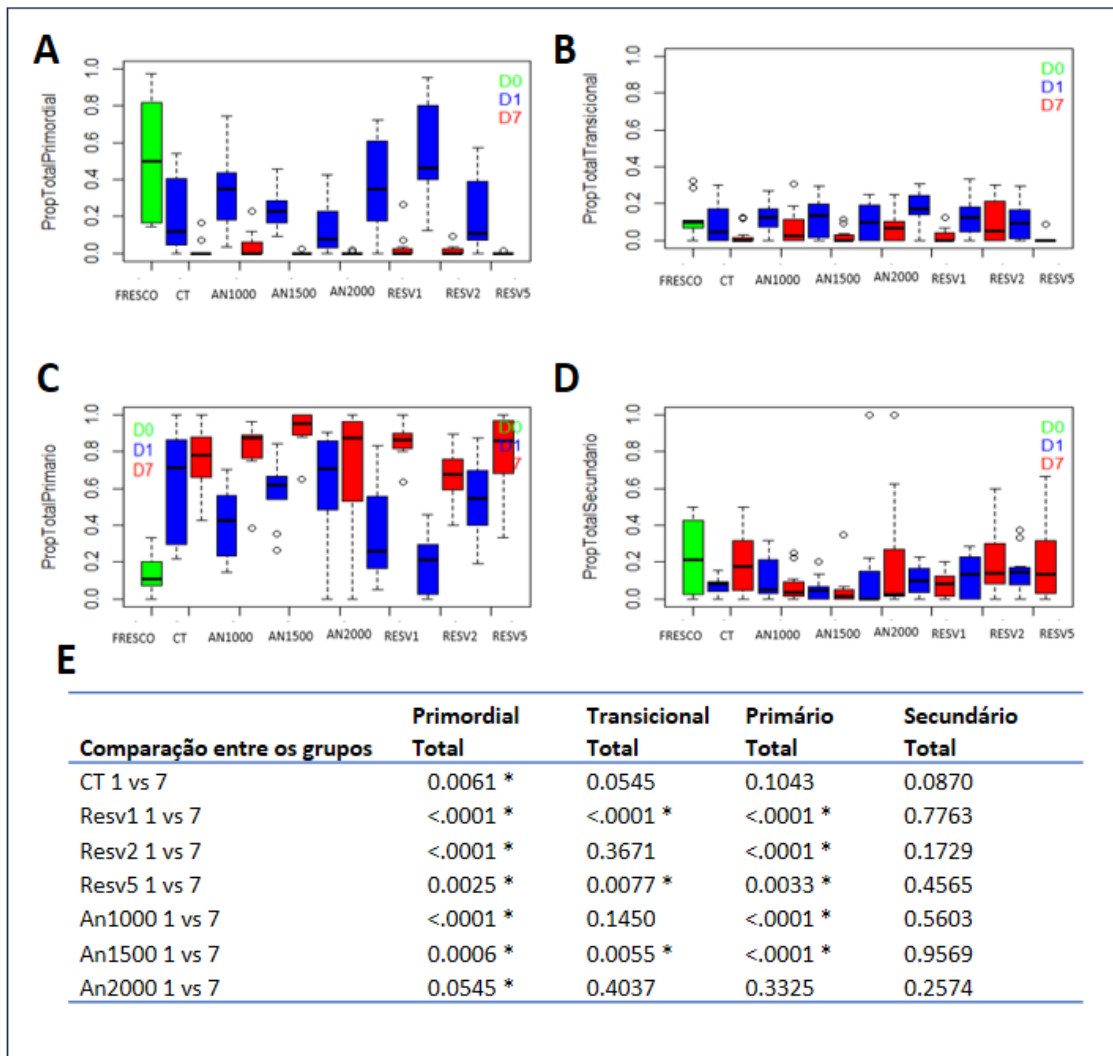


Figura 8. Distribuição dos folículos totais por grupo em dias diferentes de cultivo. (A) Proporção Total de Folículos Primordiais; (B) Proporção Total de Folículos Transicionais; (C) Proporção Total de Folículos Primários; (D) Proporção Total de Folículos Secundários; (E) Tabela apresentando os ps das comparações entre os Dias 1 e 7 da proporção de folículos nos diferentes estádios.

Legenda: D0, D1 e D7. CT=controle; Resv=resveratrol; An=anetol; D0=Dia zero (pré-cultivo); D1=dia 1; D7=dia 7. A = $p < 0,05$ em D1 quando comparado ao controle; B = $p < 0,05$ em D7 quando comparado ao controle; (*) $p < 0,05$.

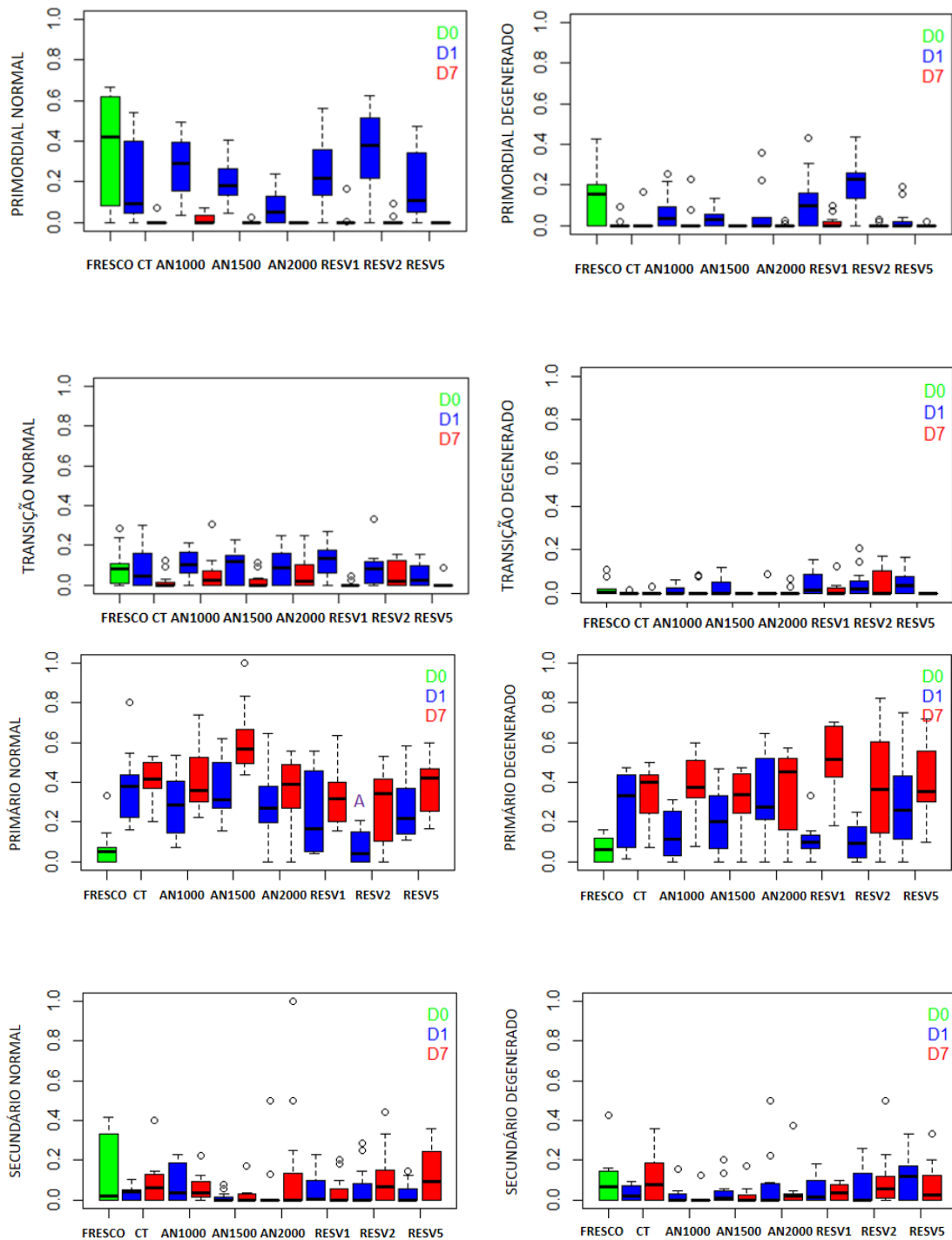


Figura 9. Distribuição dos folículos por grupo em dias diferentes de cultivo.

Legenda: CT=controle; Resv=resveratrol; An=anetol; D0=Dia zero (pré-cultivo); D1=dia 1; D7=dia 7.

No entanto, o grupo AN2000 apresentou uma menor porcentagem de folículos primordiais em comparação aos outros grupos, além de uma maior porcentagem de folículos primários degenerados. Embora tenha ocorrido ativação satisfatória dos folículos nesse grupo, houve uma menor proteção desses folículos (Tabela 2; Figura 9).

Tabela 2. Comparação Análise Morfologia Folicular AN2000 em D1. (*) p<0,05

| D1 | | | | | | | | |
|-----------------------------|------------|-----------------------|--------------|-------------------------|----------|---------------------|------------|-----------------------|
| Comparações entre os grupos | Primordial | Primordial Degenerado | Transicional | Transicional Degenerado | Primario | Primario Degenerado | Secundário | Secundário Degenerado |
| AN2000 vs AN1000 | 0.0002* | 0.8172 | 0.5806 | 0.7287 | 0.9317 | 0.0038* | 0.4845 | 0.1810 |
| AN2000 vs AN1500 | 0.0237 * | 0.5687 | 0.9314 | 0.2741 | 0.1770 | 0.0664 | 0.4596 | 0.3382 |
| AN2000 vs CT | 0.0240* | 0.1422 | 0.9210 | 0.7255 | 0.2166 | 0.2271 | 0.7835 | 0.2896 |
| AN2000 vs RESV1 | 0.0013* | 0.0371* | 0.2621 | 0.0235* | 0.4500 | 0.0012* | 0.9842 | 0.4822 |
| AN2000 vs RESV2 | <.0001* | <.0001* | 0.8051 | 0.0235* | 0.0007* | 0.0011* | 0.9098 | 0.7362 |
| AN2000 vs RESV5 | 0.0662 | 0.4203 | 0.1501 | 0.0054* | 0.6459 | 0.3820 | 0.6914 | 0.3041 |
| AN2000 vs FRESCO | <.0001* | 0.0058* | 0.9983 | 0.3311 | 0.0013* | 0.0003* | 0.1507 | 0.5875 |

Tabela 3. Comparação Análise Morfologia Folicular RESV1 em D1. (*) p<0,05

| D1 | | | | | | | | |
|-----------------------------|------------|-----------------------|--------------|-------------------------|----------|---------------------|------------|-----------------------|
| Comparações entre os grupos | Primordial | Primordial Degenerado | Transicional | Transicional Degenerado | Primario | Primario Degenerado | Secundário | Secundário Degenerado |
| RESV1 vs AN1000 | 0.5855 | 0.0632 | 0.5684 | 0.0541 | 0.5029 | 0.7135 | 0.4970 | 0.5236 |
| RESV1 vs AN1500 | 0.3270 | 0.0083* | 0.3003 | 0.2357 | 0.0361* | 0.1480 | 0.4477 | 0.7982 |
| RESV1 vs AN2000 | 0.0013* | 0.0371* | 0.2621 | 0.0235* | 0.4500 | 0.0012* | 0.9842 | 0.4822 |
| RESV1 vs CT | 0.3615 | 0.0005 (>)* | 0.2319 | 0.0105* | 0.0493* | 0.0454* | 0.7686 | 0.7092 |
| RESV1 vs RESV2 | 0.0363* | 0.0096* | 0.1718 | 10.000 | 0.0081* | 0.9803 | 0.9256 | 0.7141 |
| RESV1 vs RESV5 | 0.1586 | 0.0041* | 0.0110* | 0.5962 | 0.7669 | 0.0164* | 0.6769 | 0.0846 |
| RESV1 vs FRESCO | 0.0462* | 0.4287 | 0.2858 | 0.2294 | 0.0120* | 0.5799 | 0.1561 | 0.2261 |

Tabela 4. Comparação Análise Morfologia Folicular RESV2 em D1. (*) p<0,05

| D1 | | | | | | | | |
|-----------------------------|------------|-----------------------|--------------|-------------------------|----------|---------------------|------------|-----------------------|
| Comparações entre os grupos | Primordial | Primordial Degenerado | Transicional | Transicional Degenerado | Primário | Primário Degenerado | Secundário | Secundário Degenerado |
| RESV2 vs AN1000 | 0.1196 | <.0001* | 0.4244 | 0.0541 | 0.0010* | 0.6952 | 0.5579 | 0.3159 |
| RESV2 vs AN1500 | 0.0023* | <.0001* | 0.7393 | 0.2357 | <.0001* | 0.1413 | 0.3940 | 0.5341 |
| RESV2 vs AN2000 | <.0001* | <.0001* | 0.8051 | 0.0235* | 0.000* | 0.0011* | 0.9098 | 0.7362 |
| RESV2 vs CT | 0.0033* | <.0001* | 0.8869 | 0.0105* | <.0001* | 0.0429* | 0.6999 | 0.4650 |
| RESV2 vs RESV1 | 0.0363* | 0.0096* | 0.1718 | 0.2294 | 0.0081* | 0.9803 | 0.9256 | 0.7141 |
| RESV2 vs RESV5 | 0.0005* | <.0001* | 0.2323 | 10.000 | 0.0034* | 0.0154* | 0.6100 | 0.1730 |
| RESV2 vs FRESCO | 0.9973 | 0.0900 | 0.8124 | 0.5962 | 0.9885 | 0.5961 | 0.1835 | 0.3881 |

Tabela 5. Comparação Análise Morfologia Folicular CT em D1. (*) p<0,05

| D1 | | | | | | | | |
|-----------------------------|------------|-----------------------|--------------|-------------------------|----------|---------------------|------------|-----------------------|
| Comparações entre os grupos | Primordial | Primordial Degenerado | Transicional | Transicional Degenerado | Primário | Primário Degenerado | Secundário | Secundário Degenerado |
| CT vs AN1000 | 0.1491 | 0.0908 | 0.5226 | 0.4902 | 0.1872 | 0.0994 | 0.3382 | 0.8017 |
| CT vs AN1500 | 0.9631 | 0.3608 | 0.8546 | 0.1561 | 0.9318 | 0.5525 | 0.6535 | 0.9022 |
| CT vs AN2000 | 0.0240* | 0.1422 | 0.9210 | 0.7255 | 0.2166 | 0.2271 | 0.7835 | 0.2896 |
| CT vs RESV1 | 0.3615 | 0.0005* | 0.2319 | 0.0105* | 0.0493* | 0.0454* | 0.7686 | 0.7092 |
| CT vs RESV2 | 0.0033* | <.0001* | 0.8869 | 0.0105* | <.0001* | 0.0429* | 0.6999 | 0.4650 |
| CT vs RESV5 | 0.6389 | 0.4944 | 0.1903 | 0.0022* | 0.0928 | 0.7230 | 0.9096 | 0.0400* |
| CT vs FRESCO | 0.0050* | <.0001* | 0.9229 | 0.1985 | <.0001* | 0.0145* | 0.0953 | 0.1237 |

O grupo AN1000 mostrou-se menos eficiente na ativação dos folículos, porém apresentou um menor número de folículos degenerados em comparação aos outros grupos. Isso sugere que o grupo AN1000 preservou melhor os folículos inativos, revelando um efeito protetor.

Por outro lado, os grupos RESV1 e RESV2 apresentam baixa taxa de ativação dos folículos presentes no tecido. Além disso, muitos desses folículos não ativados já apresentavam sinais de degeneração no primeiro dia de cultivo (D1). Notavelmente, o grupo RESV2 demonstrou ser mais tóxico do que o grupo RESV1, conforme indicado pelo aumento de folículos primordiais degenerados no D1 (Tabela 3 e 5).

No grupo RESV5, foi observada boa ativação dos folículos. No entanto, esses folículos ativados logo entraram em processo de morte celular, evidenciado pelo aumento de folículos em transição degenerados, folículos primários degenerados e folículos secundários degenerados (Figura 9).

No grupo Controle, que consistiu no cultivo convencional sem adição de antioxidantes, a ativação dos folículos ocorreu normalmente. Foi possível observar uma maior taxa de ativação em comparação aos grupos RESV1 e RESV2. Além disso, não houve diferença relevante quando comparado aos demais grupos suplementados com antioxidantes (Tabela 5; Figura 9).

Em relação aos resultados em D7, o grupo AN1500 demonstrou a maior quantidade de folículos primários quando comparado a todos os outros grupos. Além disso, esse mesmo grupo apresentou uma menor quantidade de folículos degenerados em comparação aos grupos RESV1, RESV2 e CONTROLE (Tabela 6; Figura 9).

No grupo RESV1, os folículos que foram ativados já estavam com aspecto de degeneração. Houve aumento significativo desses folículos primários degenerados em comparação aos grupos AN1500, AN2000, CONTROLE, RESV2 e FRESCO (Figura 9).

No grupo RESV2, foi observado um maior número de folículos em transição degenerados em comparação aos grupos AN1500, AN2000, CONTROLE e RESV5. Além disso, notou-se que no grupo controle houve uma quantidade maior de folículos primários em comparação ao grupo RESV2 (Figura 9).

Tabela 6. Comparação Análise Morfologia Folicular AN1500 em D7. (*) p<0,05

| D7 | | | | | | | | |
|-----------------------------|------------|------------|--------------|------------|----------|------------|------------|------------|
| Comparações entre os grupos | Primordial | | Transicional | | Primário | | Secundário | |
| | Primordial | Degenerado | Transicional | Degenerado | Primário | Degenerado | Secundário | Degenerado |
| AN1500 vs AN1000 | 0.7780 | 0.3838 | 0.2692 | 0.3839 | 0.0035* | 0.3017 | 0.4912 | 0.7368 |
| AN1500 vs AN2000 | 0.9690 | 0.9218 | 0.1997 | 0.5851 | 0.0004* | 0.7209 | 0.0120* | 0.5605 |
| AN1500 vs CT | 0.9417 | 0.6609 | 0.9459 | 0.8755 | 0.0033* | 0.6970 | 0.2350 | 0.0402* |
| AN1500 vs RESV1 | 0.8151 | 0.0001* | 0.5845 | 0.2289 | <.0001* | 0.0036* | 0.7412 | 0.6673 |
| AN1500 vs RESV2 | 0.8711 | <.0001* | 0.3106 | 0.0051* | <.0001* | 0.4140 | 0.0958 | 0.0458* |
| AN1500 vs RESV5 | 0.9683 | 0.3125 | 0.6202 | 10.000 | 0.0006* | 0.2143 | 0.0562 | 0.2051 |
| AN1500 vs FRESCO | <.0001* | <.0001* | 0.0252* | 0.1621 | <.0001* | 0.0009* | 0.0534 | 0.0699 |

4.2 Imunohistoquímica (Ativação Folicular)

Para a realização da imunohistoquímica, o tecido foi marcado com o anticorpo FOXO3. Possibilitando não apenas a avaliação do desenvolvimento folicular, mas também a determinação da ativação ou não ativação dos folículos através da marcação do anticorpo. Foi observada ativação em massa dos folículos a partir do primeiro dia de cultivo.

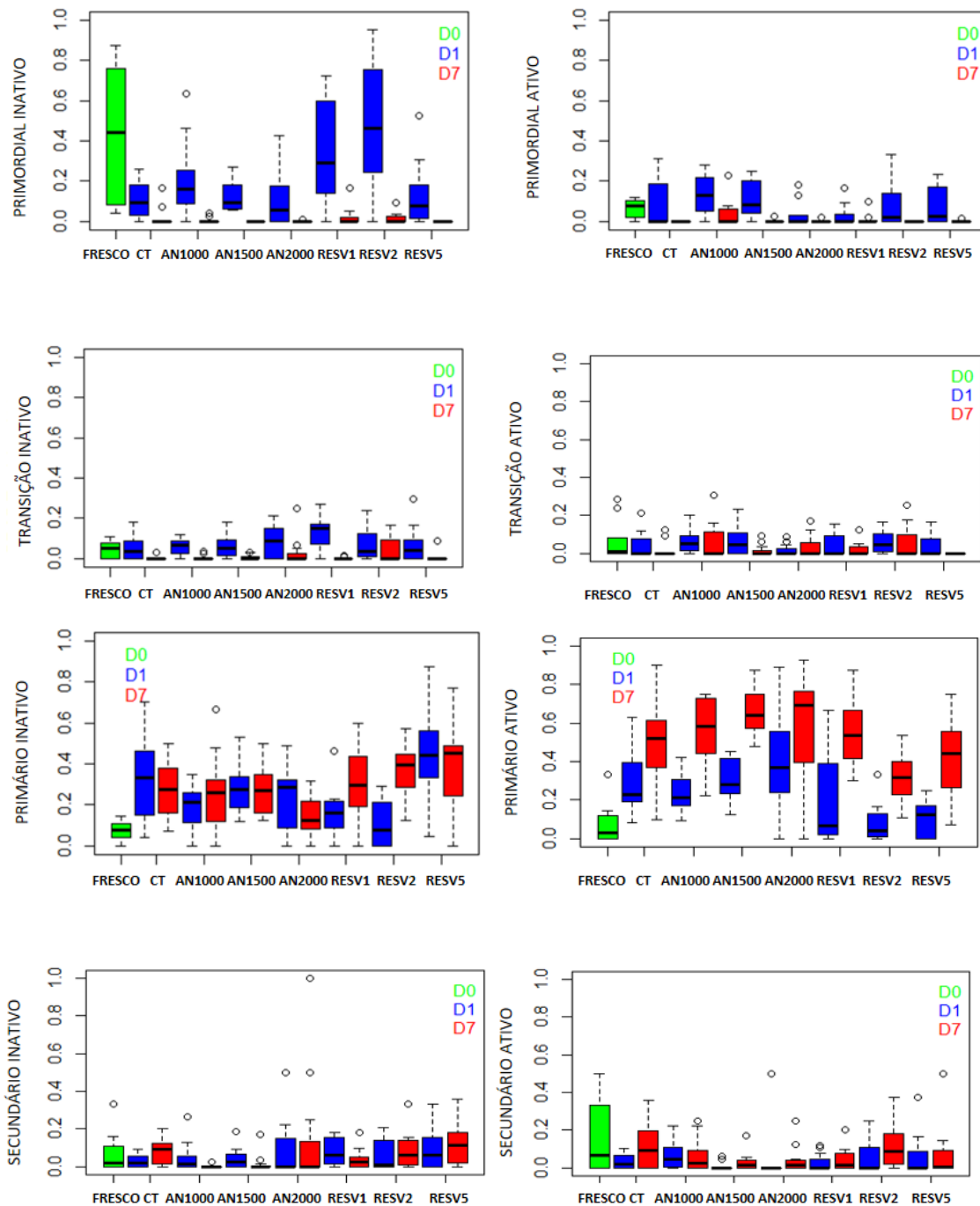


Figura 10. Distribuição dos folículos ativos e não ativos por grupo em dias diferentes de cultivo. Legenda: A distribuição dos folículos nos diferentes grupos analisada em D0, D1 e D7. CT=controle; Resv=resveratrol; An=anetol; D0=Dia zero (pré-cultivo); D1=dia 1; D7=dia 7.

Após 24 horas de cultivo, verificou-se ativação de folículos em todos os grupos estudados (Figura 10).

Foi observado que os grupos de cultivo suplementados com RESV1 e RESV2 conseguiram manter uma maior porcentagem de folículos em seus estágios iniciais ainda no primeiro dia (D1) de cultivo. Além disso, esses grupos apresentaram uma maior quantidade de folículos em transição inativos em D1 (Figura 10).

No grupo AN1000, foi observada uma maior porcentagem de folículos primordiais. No entanto, esses folículos já apresentavam marcação de ativação em D1, indicando o início do processo de ativação, chamamos esses de folículos primordiais tardios (Figura 7; Figura 10).

No grupo AN1500 em D1, foi observado maior quantidade de folículos primordiais em comparação ao grupo RESV1. Além disso, houve maior quantidade de folículos primordiais inativos em comparação aos grupos RESV2 e FRESCO. No entanto, em comparação aos demais grupos, não foram observadas diferenças significativas (Figura 10).

O grupo AN2000 mostrou-se mais eficiente na ativação dos folículos. Apresentou uma menor quantidade de folículos primordiais e demonstrou aumento nos folículos primários ativados (Figura 10).

No grupo RESV1, foi observada maior quantidade de folículos primordiais inativos em comparação a todos os grupos, com exceção do grupo RESV2 e FRESCO. Além disso, esse grupo também apresentou uma maior porcentagem de folículos em transição inativos quando comparado a todos os grupos (Figura 10).

No grupo RESV2, também foi observada maior quantidade de folículos primordiais inativos em comparação a todos os outros grupos cultivados. Além disso, foi observada menor porcentagem de folículos primários, indicando que essa suplementação não ativou adequadamente os folículos.

No grupo RESV5, foi observada maior quantidade de folículos primários inativados em comparação aos demais grupos, com exceção do grupo CT (Cultivo convencional), no qual não houve diferença significativa no aumento desses folículos. O grupo RESV5 apresentou uma diferença significativa na redução dos folículos primordiais inativos em comparação ao RESV1, RESV2 e FRESCO (Figura 10).

No grupo CT, foi observado aumento nos folículos primários ativos já no primeiro dia (D1) de cultivo, em comparação aos grupos RESV2, RESV5 e FRESCO. Além disso, foi observada

uma maior quantidade de folículos primários inativos em comparação aos grupos AN1000, RESV1, RESV2 e FRESCO (Figura 10).

Em D7, foi observado que os folículos já estavam ativos, resultando em uma quantidade muito baixa de folículos primordiais neste dia. Em comparação ao grupo fresco, todos os grupos apresentaram uma redução significativa de folículos primordiais inativos. Além disso, houve aumento significativo de folículos primários ativos em D7 em todos os grupos cultivados (Figura 10).

No grupo RESV2 em D7, foi observado menor número de folículos primários ativos em comparação a todos os grupos de cultivo, exceto pelo RESV5 (Tabela 7).

Da mesma forma, o grupo RESV5 apresentou menor número de folículos primários ativos em comparação ao grupo AN1500 e AN2000 (D7).

Por outro lado, o grupo AN1500 demonstrou maior quantidade de folículos primários ativos em comparação ao grupo CT (Figura 10).

No grupo AN1000, foi observada maior ativação em comparação aos grupos RESV2 e RESV5, demonstrado pelo aumento de folículos primários e folículos em transição ativos, respectivamente (D7).

Já no grupo AN1500, foi observada melhor ativação em comparação aos grupos CONTROLE, RESV2 e RESV5 (D7).

No grupo AN2000, houve uma maior ativação em comparação aos grupos RESV2 e RESV5 (D7)

Tabela 7. Comparação Ativação Folicular FOXO3 com o grupo RESV2 em D7. (*) p<0,05

| D7 | | | | | | | | |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|----------------------|----------------------|------------------|------------------|--------------------|--------------------|
| Comparações entre os grupos | Prop. Primordial + | Prop. Primordial - | Prop. Transicional + | Prop. Transicional - | Prop. Primario + | Prop. Primario - | Prop. Secundário + | Prop. Secundário - |
| RESV2 vs AN1000 | 0.1582 | 0.8999 | 0.7097 | 0.1112 | 0.0009* | 0.0712 | 0.2529 | 0.0912 |
| RESV2 vs AN1500 | 0.9390 | 0.8272 | 0.1453 | 0.1141 | <.0001* | 0.1189 | 0.0466* | 0.1495 |
| RESV2 vs AN2000 | 0.9408 | 0.8435 | 0.5404 | 0.6621 | 0.0004* | 0.0005* | 0.1001 | 0.1128 |
| RESV2 vs CT | 1000 | 0.9411 | 0.1700 | 0.0971 | 0.0155* | 0.1585 | 0.8205 | 0.9222 |
| RESV2 vs RESV1 | 0.7042 | 0.9136 | 0.2271 | 0.0747 | 0.0008* | 0.3142 | 0.0908 | 0.3149 |
| RESV2 vs RESV5 | 0.9572 | 0.8272 | 0.0430* | 0.1187 | 0.1416 | 0.9026 | 0.2723 | 0.3779 |
| RESV2 vs FRESCO | 0.0198* | <.0001* | 0.5986 | 0.8571 | 0.0016* | <.0001* | 0.4354* | 0.7929 |

4.3 Estresse Oxidativo e Viabilidade

Para análise em microscopia confocal, 90 fragmentos foram marcados com as probes diclorodihidrofluoresceína e iodeto de propídeo, sendo que 6 destes foram fixados em paraformaldeído 4% no mesmo dia da coleta (D0). De cada fragmento foram selecionados 5 campos do tecido para as medidas de emissão de fluorescência para o DCF e o IP. Sendo assim, foram analisados 30 campos por grupo por microscopia confocal. As intensidades de fluorescência (pixels) foram medidas pelo programa Image J.

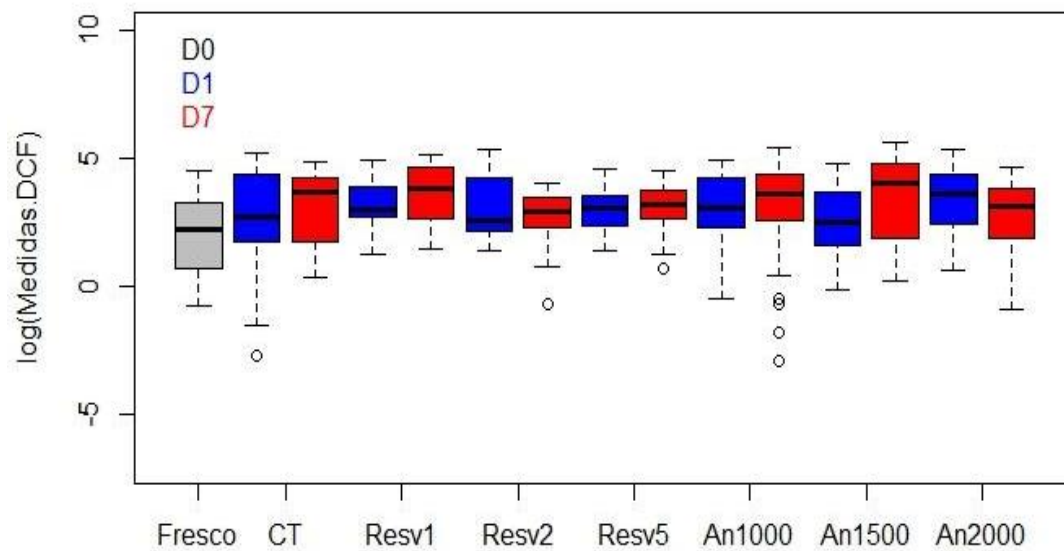


Figura 11. Intensidade de emissão de fluorescência na marcação de 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) para todos os grupos. Legenda: CT=controle; Resv=resveratrol; An=anetol; D0=Dia zero (pré-cultivo); D1=dia 1; D7=dia 7.

Através da análise Confocal com uso do marcador DCF (Figura 6) obtivemos aumento significativo na produção de EROs no grupo AN2000 D1 quando comparado aos grupos AN1500 D1 ($p=0.0325$) e CT D1 ($p=0.0343$). No entanto, após sete dias de cultivo, o grupo AN2000 demonstrou menor produção de EROs quando comparado ao grupo RESV1 ($p=0.0122$). E o grupo RESV1 D7 demonstrou aumento significativo na produção de EROs quando comparado com o grupo RESV2 D7 ($p=0.0038$). Foi possível observar diferença significativa entre o grupo FRESCO e os demais grupos (figura 11). O grupo FRESCO foi fixado em paraformaldeído 4% em D0, passando por menos manipulação, assim apresentando menor estresse oxidativo. Não foram observadas mais diferenças inter e nem intragrupo com relação à produção de espécies reativas de oxigênio entre os demais grupos.

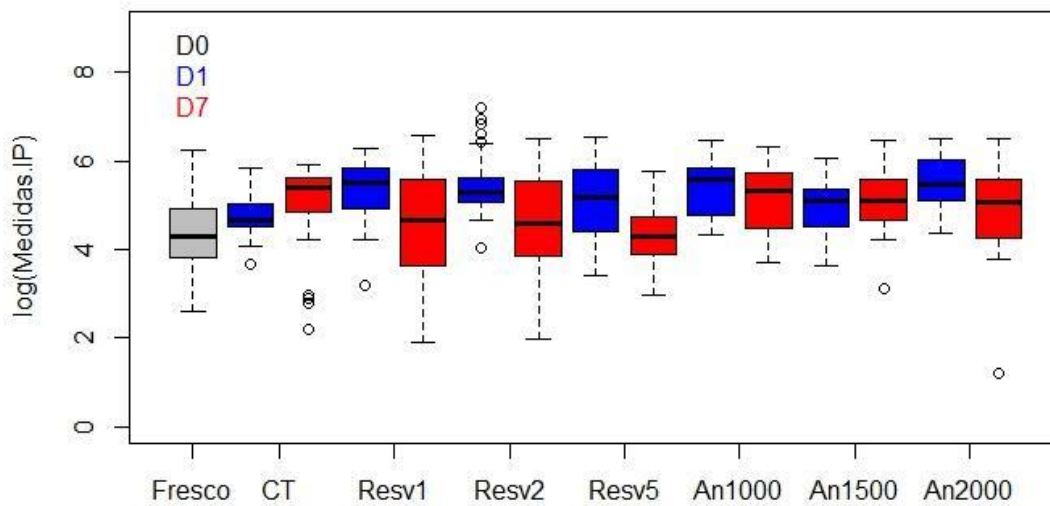


Figura 12. Intensidade de emissão de fluorescência na marcação de Iodeto de propídio (IP) para todos os grupos. Legenda: CT=controle; Resv=resveratrol; An=anetol; D0=Dia zero (pré-cultivo); D1=dia 1; D7=dia 7.

Já com relação à morte celular (IP) foi observado aumento significativo na marcação por IP nos grupos AN2000 D1 quando comparado ao AN2000 D7 ($p=0.0042$) e quando comparado ao grupo FRESCO ($p=0.0495$), indicando aumento de morte celular do tecido cultivado neste grupo em D1 (Figura 12). Não houve diferença na comparação entre os demais grupos entre si e nem intragrupo entre o D0, D1 e D7.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo analisou três diferentes concentrações de dois antioxidantes em dois períodos distintos. Os dados compilados nesta pesquisa fornecem uma base sólida para discutirmos o uso destes antioxidantes no cultivo de tecido ovariano.

O estresse oxidativo gerado durante o cultivo *in vitro* representa um dos principais desafios no desenvolvimento de sistemas de cultivo. Esse estresse ocorre devido ao desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e os mecanismos antioxidantes. As EROs podem causar danos às macromoléculas celulares durante o crescimento folicular (Dumesic *et al.*, 2015). Neste estudo, um dos desafios foi reduzir a quantidade de EROs durante o cultivo, utilizando dois diferentes antioxidantes, anetol e resveratrol.

Alguns estudos recentes comprovam os benefícios da suplementação de antioxidantes em meios de cultivo de tecido ovariano. Por exemplo, Silva *et al.* (2022) demonstrou que o uso de eugenol resultou em melhorias significativas na sobrevivência dos folículos, ativação e crescimento folicular e oocitário, além de reduzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) no tecido ovariano após 7 dias de cultivo.

Outro estudo conduzido por Abedpour *et al.* (2022) revelou que o ácido clorogênico pode otimizar o sistema de cultura, melhorando a sobrevivência, o desenvolvimento e o potencial funcional dos folículos em tecidos ovarianos inteiros de camundongos após 7 dias de cultivo.

Além disso, Cerezetti *et al.* (2021) observaram que a suplementação com o antioxidante quercetina foi eficaz na preservação da integridade e no desenvolvimento dos folículos ovarianos em cultivo *in vitro* por 5 e 10 dias.

Por fim, o estudo realizado por Kim *et al.* (2015) constatou que o uso de polietilenoglicol-superóxido dismutase apresentou um efeito protetor, principalmente em relação aos folículos primordiais, embora por um curto período de tempo em cultivo *in vitro*.

Foram encontrados resultados promissores com a suplementação de anetol e resveratrol no cultivo de folículos, oócitos e embriões. No entanto, há uma escassez de dados sobre o uso desses antioxidantes no cultivo de tecido ovariano. Diante disso, decidimos conduzir esta pesquisa com o objetivo de investigar os efeitos do anetol e do resveratrol em meios de cultivo de tecido ovariano.

Estudos anteriores evidenciaram a ação antioxidante do anetol quando adicionado ao meio de cultivo de folículos isolados e embriões (Sá *et al.*, 2017; Sá *et al.*, 2018; Anjos *et al.*, 2019). As

pesquisas analisadas revelaram que o anetol proporciona benefícios no cultivo de embriões, reduzindo o estresse oxidativo quando adicionado ao meio e melhorando a qualidade dos blastocistos (Dos Santos Morais *et al.*, 2019). O estudo de Anjos *et al.* (2019), que utilizou a sonda DCF para detecção do estresse oxidativo em microscopia confocal, observou uma diminuição do estresse oxidativo em meios suplementados com anetol. Já o estudo de Sá *et al.* (2018), que empregou diferentes concentrações de anetol, obteve melhores resultados, incluindo melhora na morfologia dos folículos ovarianos e redução do estresse oxidativo com concentrações de 2000µg/ml de anetol.

Dessa forma, em nosso estudo, foram determinadas as concentrações de 1000 µg/ml, 1500 µg/ml e 2000 µg/ml de anetol, com base nas pesquisas anteriores mencionadas. Essas concentrações foram escolhidas visando obter resultados consistentes e avaliar os efeitos do anetol no tecido ovariano em nosso contexto específico.

De acordo com o estudo de Bezerra *et al.* (2018), o resveratrol apresentou melhores resultados no cultivo de folículos isolados quando utilizado na concentração de 2µM, em comparação com as concentrações de 10µM e 30µM. Essa concentração mostrou-se mais eficaz na proteção do DNA contra danos.

Além disso, o estudo realizado por Hao *et al.* (2018) evidenciou resultados promissores no cultivo de tecidos ovarianos com a adição de resveratrol. A concentração de 0,1µM de resveratrol foi capaz de melhorar o suporte ao desenvolvimento dos folículos presentes nos tecidos ovarianos cultivados.

Com base nessas descobertas, em nosso estudo foram determinadas as concentrações de 1µM, 2µM e 5µM de resveratrol. Essas concentrações foram selecionadas com o objetivo de avaliar os efeitos do resveratrol no tecido ovariano, levando em consideração os resultados positivos observados em estudos anteriores.

Neste estudo, ao utilizar a sonda fluorescente DCF em microscopia confocal, foi observada maior produção de EROs em todos os grupos cultivados *in situ*. Sendo que, ao adicionar os diferentes antioxidantes ao meio de cultivo, não foi observado melhora na redução de ERO's. Na verdade, o grupo AN2000 demonstrou aumento de EROs quando comparado aos demais grupos no D1 de cultivo.

Por outro lado, quando utilizada a sonda fluorescente IP em microscopia confocal, foi observada uma marcação mais intensa no D1 do grupo AN2000, indicando uma certa toxicidade associada ao uso de anetol nessa concentração.

Os achados de Li et al (2009) indicam que oócitos com sinais precoces de atresia apresentam bom potencial de desenvolvimento. A apoptose precoce pode estar positivamente correlacionada com a competência *in vitro* dos oócitos, o que pode estar relacionado com a maturação citoplasmática. A trajetória de maturação dos oócitos é acompanhada por transformações na ultraestrutura citoplasmática, abrangendo alterações na localização dos complexos de Golgi, retículo endoplasmático e grânulos corticais (Li et al, 2009). Sabe-se que o oócito é o último compartimento a ser afetado pela apoptose durante a atresia dos folículos antrais. É importante ressaltar que esses folículos se encontram em um compartimento externo em relação ao oócito, indicando que os sinais de apoptose nesses, podem ainda estar em estágios iniciais, antes de provocarem qualquer impacto sobre o oócito ou, ainda mais crucial, sem promover danos ao seu DNA (Li et al, 2009).

O AN2000 no dia 1 de cultivo apresentou efeito positivo para ativação dos folículos, tendo maior quantidade de folículos primários ativos em D1 quando comparados aos demais grupos, no entanto este mesmo grupo não conseguiu preservar os folículos, fato demonstrado pelo aumento de folículos primários degenerados na histologia, maior estresse oxidativo e conseqüentemente maior marcação para morte celular na análise por microscopia confocal. Tendo este comportamento em vista, sugerimos que a concentração 2000µg/ml de Anetol é tóxica para os folículos cultivados *in situ*. Já a concentração 1500µg/ml de Anetol demonstrou-se efetivo na preservação dos folículos, apresentou maior ativação dos folículos em D7, e menor quantidade de folículos degenerados. O AN1500 não tem efeito imediato na ativação desses, no entanto consegue manter o melhor funcionamento para que em D7 ative esses folículos ao mesmo tempo que os mantém viáveis.

Neste estudo podemos observar a ativação em massa dos folículos já em D1. A ativação espontânea dos folículos primordiais ocorre quando utilizamos o sistema de cultura *in situ* em várias espécies, incluindo a espécie bovina. Portanto essa ativação dos folículos em massa já pode ser explicada pela literatura. A maioria dos folículos primordiais bovinos podem ativar em menos de 2 dias de cultivo *in situ*. Esses folículos podem atingir o estágio de folículo secundário entre 6 e 22 dias de cultivo (Araújo *et al*, 2014).

O FOXO3 revelou-se crucial para o desenvolvimento folicular, como evidenciado por um estudo em que ocorreu a supressão desse gene em camundongos, resultando na falência ovariana dos mesmos (Castrillon, 2003). Empregamos o anticorpo FOXO3 devido à sua capacidade de marcar a ativação folicular e com isso analisar o desenvolvimento folicular dentro de cada grupo de cultivo. Contudo, é importante destacar que também existem estudos que associam essa marcação a atresia folicular e apoptose de células da granulosa (Matsuda *et al.*, 2011).

No presente estudo, observa-se marcação nuclear com a foxo3 em folículos morfológicamente ativos (transição, primário, secundário). A presença de marcação nuclear nesses folículos pode estar correlacionada a um processo de apoptose que está sendo desencadeado nesses. No entanto, são necessários estudos mais detalhados para se fazer esta correlação.

O cultivo de tecido ovariano leva à ativação massiva dos folículos no primeiro dia de cultivo. O próprio cultivo promove maior geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), porém, essas ERO não necessariamente exercem efeitos nocivos ao tecido, muitas vezes. O resveratrol não parece proteger o tecido ovariano do estresse oxidativo nas concentrações testadas. Por outro lado, o anetol na concentração de 1500µg/mL não tem efeito imediato na ativação folicular, porém consegue manter a melhor viabilidade e após sete dias de cultivo apresenta boa taxa de ativação mantendo os folículos viáveis. O Anetol na concentração de 2000µg/mL causou danos ao tecido, demonstrando-se tóxico ao mesmo.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitem tirar as seguintes conclusões:

- A suplementação com 2000 μ g/mL de Anetol é um bom ativador para os folículos cultivados *in situ*. No entanto, essa concentração se revelou tóxica para o tecido, comprometendo a viabilidade contínua dos folículos.
- O AN1500 não tem efeito imediato na ativação desses, no entanto consegue manter o melhor funcionamento para que em D7 ative esses folículos ao mesmo tempo que os mantem viáveis.
- As concentrações 1 μ M e 2 μ M de Resveratrol não apresentou efeito positivo para ativação dos folículos. Sendo que os mesmos, quando ativados apresentavam maior índice de degeneração.
- O cultivo *in situ* leva a ativação em massa dos folículos no primeiro dia de cultivo.
- O cultivo *in situ* potencializa a geração de espécies reativas de oxigênio. No entanto, essas EROs não necessariamente exercem efeitos prejudiciais ao tecido, muitas vezes, elas representam simplesmente um comportamento fisiológico do tecido.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agarwal A., Durairajanayagam D., DU Plessis S. S. Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*, v. 12, n. 1, p. 112, 2014.

Araújo V. R., Gastal M.O., Figueiredo J.R., Gastal E.L. *In vitro* culture of bovine preantral follicles: a review. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*, v. 12, p. 78, 2014.

Asadi M., Taghizadeh S., Kaviani E., Vakili O., Taheri-Anganeh M., Tahamtan M., Savardashtaki A. Caspase-3: Structure, function, and biotechnological aspects. *Biotechnol Appl Biochem*. Aug;69(4):1633-1645, 2022.

Baerwald, A. R. Human antral folliculogenesis: what we have learned from the bovine and equine models. *Animal Reproduction*, v. 6, n. 1, p. 20–29, 2009.

Belli M., Vigone G., Merico V., Redi C. A., Zuccotti M. and Garagna S. Towards a 3D culture of mouse ovarian follicles. *Int. J. Dev. Biol.* 56: 931-937, 2012.

Bezerra MÉS, Gouveia BB, Barberino RS, Menezes VG, Macedo TJS, Cavalcante AYP, Monte APO, Santos JMS, Matos MHT. Resveratrol promotes *in vitro* activation of ovine primordial follicles by reducing DNA damage and enhancing granulosa cell proliferation via phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Reprod Domest Anim*; 53(6):1298-1305, 2018.

Castrillon D.H., Miao L., Kollipara R., Horner J.W., DePinho RA. Suppression of ovarian follicle activation in mice by the transcription factor Foxo3a. *Science* 301:215–218, 2003.

Choi J.K, Agarwal P., Huang H., Zhao S., He X. The crucial role of mechanical heterogeneity in regulating follicle development and ovulation with engineered ovarian microtissue. *Biomaterials*. Jun;35(19):5122-8. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.03.028. Epub 2014 Apr 2. PMID: 24702961; PMCID: PMC4016819.

Davies, K. J. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochemical Society symposium*, v. 61, p. 1–31, 1995.

Dumesic, D. A., Meldrum, D.R., Katz-Jaffe, M.G., Krisher, R.L., Schoolcraft, W.B. Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health, *Fertility and Sterility*, Volume 103, Issue 2, 303-316, 2015.

Dos Santos Morais M.L.G., de Brito D.C.C., Pinto Y., Mascena Silva L., Montano Vizcarra D., Silva RF, Weber Santos Cibin F., Cabral Campello C., Alves B.G., Rocha Araújo V., da Chagas Pinto F., Pessoa O.D.L., Figueiredo J.R., Ribeiro Rodrigues A.P. Natural antioxidants in the vitrification solution improve the ovine ovarian tissue preservation. *Reprod Biol*. 2019 Sep;19(3):270-278. doi: 10.1016/j.repbio.2019.07.008. Epub Aug 26. PMID: 31466906.

Figueiredo J.R., Freitas V.J.F. (Editors). *Biotécnicas aplicadas a reprodução animal*. São Paulo: Roca; p 261–291, 2008.

Fischer, B.; Bayister, B.D. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. *J Reprod Fertil*, v.99, n.2, p.673–679, 1993.

Hao J., Tuck A.R., Sjödin M.O.D., Lindberg J., Sand A., Niklasson B., Argyraki M., Hovatta O., Damdimopoulou P. Resveratrol supports and alpha-naphthoflavone disrupts growth of human ovarian follicles in an *in vitro* tissue culture model. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1; 338:73-82, 2018.

Han, J.; Wang, H.; Zhang, T.; Chen, Z.; Zhao, T.; Lin, L.; Xia, G.; Wang, C.

Resveratrol attenuates doxorubicin-induced meiotic failure through inhibiting oxidative stress and apoptosis in mouse oocytes. *AGING*, vol. 12, p. 1-12, 30 apr, 2020.

H.J. Li, D.J. Liu, M. Cang, L.M. Wang, M.Z. Jin, Y.Z. Ma, B. Shorgan. Early apoptosis is associated with improved developmental potential in bovine oocytes. *Animal Reproduction Science*, Volume 114, Issues 1–3, 2009, Pages 89-98, ISSN 0378-4320, <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2008.09.018>.

Idelchik, M. del P. S.; Begley, U.; Begley, T. J.; Melendez, J. A. Mitochondrial ROS control of cancer. *Seminars in Cancer Biology*, v.47, p. 57-66, 2017.

Jeruss, J. S; Woodruff, T.K. Preservation of fertility in patients with cancer. *N Engl J Med*, 360, 2009.

J. Hao, A. R. Tuck, C. R. Prakash, A. Damdimopoulos, M. O. D. Sjödin, J. Lindberg, B. Niklasson, K. Pettersson, O. Hovatta, P. Damdimopoulou. Culture of human ovarian tissue in xeno-free conditions using laminin components of the human ovarian extracellular matrix. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 37:2137–2150, 2020.

Jiang Y, Zhang Z, Cha L, Li L, Zhu D, Fang Z, He Z, Huang J, Pan Z. Resveratrol Plays a Protective Role against Premature Ovarian Failure and Prompts Female Germline Stem Cell

Survival. *Int J Mol Sci.* 2019 Jul 23;20(14):3605, p.1-16. doi: 10.3390/ijms20143605. PMID: 31340581; PMCID: PMC6678805.

Li L, Shi X, Shi Y, Wang Z. The Signaling Pathways Involved in Ovarian Follicle Development. *Front Physiol.* 2021 Sep 20;12:730196. doi: 10.3389/fphys.2021.730196. PMID: 34646156; PMCID: PMC8504451.

Li J, Kawamura K, Cheng Y, Liu S, Klein C, Liu S, Duan EK, Hsueh AJ. Activation of dormant ovarian follicles to generate mature eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Jun 1;107(22):10280-4. doi: 10.1073/pnas.1001198107. Epub 2010 May 17. PMID: 20479243; PMCID: PMC2890455.

Li X, Fang P, Mai J, Choi ET, Wang H, Yang XF. Targeting mitochondrial reactive oxygen species as novel therapy for inflammatory diseases and cancers. *J Hematol Oncol.* 2013 Feb 25;6:19. doi: 10.1186/1756-8722-6-19. PMID: 23442817; PMCID: PMC3599349.

Magalhães, D. de M., Araujo, V. R., Verde, I. B. L., Matos, M. H. T. de, Silva, R. C., Lucci, C. M., Bão, S. N., Campello, C. C., & Figueiredo, J. R. de. Different Follicle-Stimulating Hormone (FSH) sources influence caprine preantral follicle viability and development *in vitro*. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 46(5), 378-386, 2009. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2009.26787>

Martino, N.A.; Dell'Aquila, M.E.; Cardone, R.A.; Somoskoi, B.; Lacalandra, G.M.; Cseh, S. Vitrification preserves chromatin integrity, bioenergy potential and oxidative parameters in mouse embryos. *Reproductive Biology and Endocrinology.* v.11, n.27, 2013.

Matsuda F, Inoue N, Maeda A, Cheng YA, Sai T, Gonda H, Goto Y, Sakamaki K, Manabe N. Expression and function of apoptosis initiator FOXO3 in granulosa cells during follicular atresia in pig ovaries. *J Reprod Dev* 2011; 57: 151-158, 2011.

McLaughlin, M., Kinnell, H. L., Anderson, R. A., & Telfer, E. E. Inhibition of phosphatase and tensin homologue (PTEN) in human ovary *in vitro* results in increased activation of primordial follicles but compromises development of growing follicles. *Molecular human reproduction*, 20(8), 736–744, 2014. <https://doi.org/10.1093/molehr/gau037>.

Mikaeili S, Rashidi BH, Safa M, Najafi A, Sobhani A, Asadi E, Abbasi M. Altered FoxO3 expression and apoptosis in granulosa cells of women with polycystic ovary syndrome. *Arch Gynecol Obstet.* 2016 Jul;294(1):185-92, 2016. doi: 10.1007/s00404-016-4068-z. Epub Mar 18. PMID: 26993517.

Ortega, I; Duleba, A.J. Ovarian actions of resveratrol. *Ann. NY Acad. Sci.*, v.1348, n.1, p.86-96, 2015.

Pais A.S., Reis S., Laranjo M., Caramelo F., Silva F., Botelho M.F., Almeida-Santos T. The challenge of ovarian tissue culture: 2D versus 3D culture. *J Ovarian Res.* 1;14(1):147, 2021. doi: 10.1186/s13048-021-00892-z. PMID: 34724957; PMCID: PMC8561954.

Pepling, M.E. From primordial germ cell to primordial follicle: mammalian female germ cell development. *Genesis*, v.44, p.622–632, 2006.

Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Fertility preservation in patients undergoing gonadotoxic therapy or gonadectomy: a committee opinion. *American Society for Reproductive Medicine, Birmingham, Alabama.* VOL. 112 NO. 6, DECEMBER 2019.

Qingming, Y.; Xianhui, P.; Weibao, K.; Hong, Y.; Yidan, S.; Li, Z.; Yanan, Z.; Yuling, Y.; Lan, D.; Guoan, L. Antioxidant activities of malt extract from barley (*Hordeum vulgare* L.) toward various oxidative stress *in vitro* and *in vivo*. *Food Chemistry*, v. 118, n. 1, p. 84–89, 2010.

Ray, R.; Shah, A. M. NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clinical Science*, v. 109, p. 217-226, 2005.

Ritter, A.M.; Ames, F.Q.; Otani, F.; de Oliveira, R.M.; Cuman, R.K.; Bersani-Amado, C.A. Effects of anethole in nociception experimental models. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014; p. 1-7, 25 nov, 2014.

Rocha, C. D. Vitriificação de tecido ovariano de fetos bovinos associada ao resveratrol. 2017. 92 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Uberlândia. DOI <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2017.53>

Sá NAR, Araújo VR, Correia HHV, Ferreira ACA, Guerreiro DD, Sampaio AM, Escobar E, Santos FW, Moura AA, Lôbo CH, Ceccatto VM, Campello CC, Rodrigues APR, Leal-Cardoso JH, Figueiredo JR. Anethole improves the *in vitro* development of isolated caprine secondary follicles. *Theriogenology*. Feb;89:226-234, 2017. doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.12.014. Epub 2015 Dec 28. PMID: 28043356.

Sá NAR, Bruno JB, Guerreiro DD, Cadenas J, Alves BG, Cibin FWS, Leal-Cardoso JH, Gastal EL, Figueiredo JR. Anethole reduces oxidative stress and improves *in vitro* survival and

activation of primordial follicles. *Braz J Med Biol Res.* 2018;51(8):e7129. doi: 10.1590/1414-431x20187129. Epub 2018 May 28. PMID: 29846431; PMCID: PMC5999067.

Sahebkar, A.; Serban, M. C.; Ursoniu, S.; Banach, M. Effect of curcuminoids on oxidative stress: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Functional Foods*, v. 18, p. 898–909, 2015.

Smitz J, Dolmans MM, Donnez J, Fortune JE, Hovatta O, Jewgenow K, Picton HM, Plancha C, Shea LD, Stouffer RL, Telfer EE, Woodruff TK, Zelinski MB. Current achievements and future research directions in ovarian tissue culture, *in vitro* follicle development and transplantation: implications for fertility preservation. *Hum Reprod Update.* 2010 Jul-Aug;16(4):395-414. doi: 10.1093/humupd/dmp056. Epub 2010 Feb 1. PMID: 20124287; PMCID: PMC2880913

Schafer, F.; Buettner, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple, *Free Radical Biology and Medicine*, v. 11, p. 1191-1212, 2001.

Shami, N. J. I. E.; Moreira, E. A. M. Lycopene as an antioxidant agent. *Revista de nutrição*, v.17, p.227-236, 2004.

Silva G.M, Araujo V.R., Duarte A.B.G., Chaves R.N., Silva C.M.G., Lobo C.H., Almeida A.P., Matos M.H.T., Tavares L.M.T., Campelo C.C., Figueiredo J.R. Ascorbic acid improves the survival and *in vitro* growth of isolated caprine preantral follicles. *Anim Reprod*, 8: 14–24, 2011.

Silva, B. G. Quantificação de apoptose e necrose mediante corantes fluorescentes e análise de imagens, no cultivo de células de inseto: o caso da *Drosophila melanogaster* S2. 2007. 116 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Exatas e da Terra) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.

Smitz J, Dolmans MM, Donnez J, Fortune JE, Hovatta O, Jewgenow K, Picton HM, Plancha C, Shea LD, Stouffer RL, Telfer EE, Woodruff TK, Zelinski MB. Current achievements and future research directions in ovarian tissue culture, *in vitro* follicle development and transplantation: implications for fertility preservation. *Hum Reprod Update.* 2010 Jul-Aug;16(4):395-414, 2010. doi: 10.1093/humupd/dmp056. Epub 2010 Feb 1. PMID: 20124287; PMCID: PMC2880913

Telfer, E.E.; Mclaughlin, M. *In vitro* growth (IVG) systems for human oocytes: from primordial to maturation. In: Kim SS, Donnez J, editors. Principles and practice in fertility preservation. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 397–408, 2011.

Telfer, E.E.; Zelinski, M.B. Ovarian follicle culture advances and challenges for human and nonhuman primates. *Fertil Steril*, v.99, n.6, p.0015-0282, 2013.

Vaanholt, L. M.; Milne, A.; Zheng, Y.; Hambly, C.; Mitchell, S. E.; Valencak, T. G.; Allison, D. B.; Speakman, J. R. Oxidative costs of reproduction: Oxidative stress in mice fed standard and low antioxidant diets. *Physiology and Behavior*, v. 154, p. 1–7, 2016.

Vallorani, C.; Spinaci, M.; Bucci, D.; Porcub, E.; Tamanini, C.; Galeati, G. Pig oocyte vitrification by Cryotop method and the activation of the apoptotic cascade. *Animal Reproduction Science*. v.135 p.68-74, 2012.

Vastano BC, Chen Y, Zhu N, Ho CT, Zhou Z, Rosen RT. Isolation and identification of stilbenes in two varieties of *Polygonum cuspidatum*. *J Agric Food Chem*. 2000 Feb;48(2):253-6, 2000. doi: 10.1021/jf9909196. PMID: 10691624.

Yea SS, Jeong HS, Choi CY, Park KR, Oh S, Shin JG, Yun CH. Inhibitory effect of anethole on T-lymphocyte proliferation and interleukin-2 production through down-regulation of the NF-AT and AP-1. *Toxicol In Vitro*. 2006 Oct;20(7):1098-105, 2006. doi: 10.1016/j.tiv.2006.01.020. Epub 2006 Mar 13. PMID: 16531003.

Zhao H, Oczos J, Janowski P, Trembecka D, Dobrucki J, Darzynkiewicz Z, Wlodkowic D. Rationale for the real-time and dynamic cell death assays using propidium iodide. *Cytometry A*. 2010 Apr;77(4):399-405, 2010. doi: 10.1002/cyto.a.20867. PMID: 20131407; PMCID: PMC3646415.

Zhang S, Deng W, Liu Q, Wang P, Yang W, Ni W. Altered m6 A modification is involved in up-regulated expression of FOXO3 in luteinized granulosa cells of non-obese polycystic ovary syndrome patients. *J Cell Mol Med*. 2020 Oct;24(20):11874-11882, 2020. doi: 10.1111/jcmm.15807. Epub 2020 Sep 1. PMID: 32869942; PMCID: PMC7578862.

8. Anexos

Tabela 9. Medidas de posição central e de dispersão para os dados de Morfologia

| Grupo | Dia | Variável | N | Média | Desv. Pad. | Mediana | Q1 | Q3 | Min | Max |
|--------|-----|---------------------------|----|--------|------------|---------|--------|--------|--------|--------|
| AN1000 | D1 | PROP_Primordial | 12 | 0.2763 | 0.1538 | 0.2935 | 0.1570 | 0.3970 | 0.0380 | 0.4920 |
| | | PROP_Primordial_Anormal | 12 | 0.0650 | 0.0875 | 0.0375 | 0.0000 | 0.0925 | 0.0000 | 0.2540 |
| | | PROP_Transicional | 12 | 0.1121 | 0.0688 | 0.1040 | 0.0640 | 0.1652 | 0.0000 | 0.2121 |
| | | PROP_Transicional_Anormal | 12 | 0.0128 | 0.0211 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0250 | 0.0000 | 0.0606 |
| | | PROP_Primario | 12 | 0.2861 | 0.1601 | 0.2853 | 0.1465 | 0.4048 | 0.0725 | 0.5385 |
| | | PROP_Primario_Anormal | 12 | 0.1338 | 0.1175 | 0.1130 | 0.0305 | 0.2525 | 0.0000 | 0.3120 |
| | | PROP_Secundario | 12 | 0.0890 | 0.0985 | 0.0367 | 0.0000 | 0.1870 | 0.0000 | 0.2308 |
| | | PROP_Secundario_Anormal | 12 | 0.0247 | 0.0454 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0314 | 0.0000 | 0.1579 |
| | D7 | PROP_Primordial | 11 | 0.0172 | 0.0259 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0400 | 0.0000 | 0.0710 |
| | | PROP_Primordial_Anormal | 11 | 0.0283 | 0.0714 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.2310 |
| | | PROP_Transicional | 11 | 0.0573 | 0.0941 | 0.0256 | 0.0000 | 0.1081 | 0.0000 | 0.3077 |
| | | PROP_Transicional_Anormal | 11 | 0.0144 | 0.0320 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0811 |
| | | PROP_Primario | 11 | 0.4162 | 0.1619 | 0.3590 | 0.2973 | 0.5556 | 0.2222 | 0.7407 |
| | | PROP_Primario_Anormal | 11 | 0.3935 | 0.1573 | 0.3750 | 0.2860 | 0.5560 | 0.0770 | 0.6000 |
| | | PROP_Secundario | 11 | 0.0619 | 0.0686 | 0.0370 | 0.0000 | 0.1111 | 0.0000 | 0.2222 |
| | | PROP_Secundario_Anormal | 11 | 0.0114 | 0.0377 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1250 |
| AN1500 | D1 | PROP_Primordial | 12 | 0.1963 | 0.1077 | 0.1805 | 0.1365 | 0.2625 | 0.0450 | 0.4050 |
| | | PROP_Primordial_Anormal | 12 | 0.0396 | 0.0458 | 0.0330 | 0.0000 | 0.0585 | 0.0000 | 0.1360 |
| | | PROP_Transicional | 12 | 0.0977 | 0.0798 | 0.1201 | 0.0000 | 0.1523 | 0.0000 | 0.2273 |
| | | PROP_Transicional_Anormal | 12 | 0.0249 | 0.0413 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0490 | 0.0000 | 0.1176 |
| | | PROP_Primario | 12 | 0.3771 | 0.1564 | 0.3119 | 0.2723 | 0.5015 | 0.1563 | 0.6207 |
| | | PROP_Primario_Anormal | 12 | 0.2108 | 0.1637 | 0.2045 | 0.0670 | 0.3330 | 0.0000 | 0.4690 |
| | | PROP_Secundario | 12 | 0.0139 | 0.0270 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0157 | 0.0000 | 0.0769 |
| | | PROP_Secundario_Anormal | 12 | 0.0396 | 0.0642 | 0.0098 | 0.0000 | 0.0440 | 0.0000 | 0.2000 |
| | D7 | PROP_Primordial | 12 | 0.0021 | 0.0072 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0250 |
| | | PROP_Primordial_Anormal | 12 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| | | PROP_Transicional | 12 | 0.0225 | 0.0401 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0316 | 0.0000 | 0.1163 |
| | | PROP_Transicional_Anormal | 12 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| | | PROP_Primario | 12 | 0.6072 | 0.1692 | 0.5670 | 0.4958 | 0.6667 | 0.4348 | 1.0000 |
| | | PROP_Primario_Anormal | 12 | 0.3184 | 0.1405 | 0.3355 | 0.2420 | 0.4420 | 0.0000 | 0.4750 |
| | | PROP_Secundario | 12 | 0.0251 | 0.0493 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0321 | 0.0000 | 0.1739 |
| | | PROP_Secundario_Anormal | 12 | 0.0247 | 0.0503 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0257 | 0.0000 | 0.1739 |
| AN2000 | D1 | PROP_Primordial | 12 | 0.0768 | 0.0874 | 0.0505 | 0.0000 | 0.1315 | 0.0000 | 0.2380 |
| | | PROP_Primordial_Anormal | 12 | 0.0577 | 0.1133 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0405 | 0.0000 | 0.3570 |
| | | PROP_Transicional | 12 | 0.0951 | 0.0947 | 0.0890 | 0.0000 | 0.1627 | 0.0000 | 0.2500 |
| | | PROP_Transicional_Anormal | 12 | 0.0073 | 0.0251 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0870 |
| | | PROP_Primario | 12 | 0.2915 | 0.1655 | 0.2719 | 0.1990 | 0.3798 | 0.0000 | 0.6429 |
| | | PROP_Primario_Anormal | 12 | 0.3419 | 0.2048 | 0.2755 | 0.2155 | 0.5225 | 0.0000 | 0.6450 |
| | | PROP_Secundario | 12 | 0.0525 | 0.1458 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.5000 |
| | | PROP_Secundario_Anormal | 12 | 0.0769 | 0.1488 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0841 | 0.0000 | 0.5000 |
| | D7 | PROP_Primordial | 11 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| | | PROP_Primordial_Anormal | 11 | 0.0032 | 0.0075 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0230 |
| | | PROP_Transicional | 11 | 0.0629 | 0.0818 | 0.0185 | 0.0000 | 0.1250 | 0.0000 | 0.2500 |
| | | PROP_Transicional_Anormal | 11 | 0.0090 | 0.0217 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0682 |
| | | PROP_Primario | 11 | 0.3722 | 0.1659 | 0.3889 | 0.2500 | 0.5000 | 0.0000 | 0.5556 |
| | | PROP_Primario_Anormal | 11 | 0.3444 | 0.2358 | 0.4500 | 0.0000 | 0.5370 | 0.0000 | 0.5740 |
| | | PROP_Secundario | 11 | 0.1605 | 0.3208 | 0.0000 | 0.0000 | 0.2500 | 0.0000 | 1.0000 |
| | | PROP_Secundario_Anormal | 11 | 0.0479 | 0.1098 | 0.0185 | 0.0000 | 0.0385 | 0.0000 | 0.3750 |

| | | | | | | | | | | |
|-------------------------|----|--------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| CT | D1 | PROP_Primordial | 11 | 0.1987 | 0.2060 | 0.0950 | 0.0000 | 0.4400 | 0.0000 | 0.5420 |
| | | PROP_Primordial_Anormal | 11 | 0.0099 | 0.0274 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0910 |
| | | PROP_Transicional | 11 | 0.0920 | 0.1108 | 0.0476 | 0.0000 | 0.1774 | 0.0000 | 0.3000 |
| | | PROP_Trasicional_Anormal | 11 | 0.0015 | 0.0049 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0161 |
| | | PROP_Primary | 11 | 0.3715 | 0.1897 | 0.3810 | 0.1875 | 0.4545 | 0.1600 | 0.8000 |
| | | PROP_Primary_Anormal | 11 | 0.2540 | 0.1921 | 0.3330 | 0.0600 | 0.4550 | 0.0160 | 0.4710 |
| | | PROP_Secundario | 11 | 0.0379 | 0.0386 | 0.0417 | 0.0000 | 0.0536 | 0.0000 | 0.1053 |
| | | PROP_Secundario_Anormal | 11 | 0.0347 | 0.0407 | 0.0200 | 0.0000 | 0.0909 | 0.0000 | 0.0952 |
| | D7 | PROP_Primordial | 12 | 0.0059 | 0.0205 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0710 |
| | | PROP_Primordial_Anormal | 12 | 0.0139 | 0.0482 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1670 |
| | | PROP_Transicional | 12 | 0.0204 | 0.0424 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0147 | 0.0000 | 0.1250 |
| | | PROP_Trasicional_Anormal | 12 | 0.0025 | 0.0087 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0303 |
| | | PROP_Primary | 12 | 0.4189 | 0.0930 | 0.4175 | 0.3693 | 0.5000 | 0.2000 | 0.5294 |
| | | PROP_Primary_Anormal | 12 | 0.3461 | 0.1331 | 0.4030 | 0.2465 | 0.4370 | 0.0710 | 0.5000 |
| PROP_Secundario | | 12 | 0.0872 | 0.1139 | 0.0602 | 0.0000 | 0.1315 | 0.0000 | 0.4000 | |
| PROP_Secundario_Anormal | | 12 | 0.1050 | 0.1164 | 0.0758 | 0.0000 | 0.1890 | 0.0000 | 0.3571 | |
| FRESCO | D0 | PROP_Primordial | 10 | 0.3579 | 0.2758 | 0.4210 | 0.0830 | 0.6210 | 0.0000 | 0.6670 |
| | | PROP_Primordial_Anormal | 10 | 0.1506 | 0.1379 | 0.1550 | 0.0000 | 0.2050 | 0.0000 | 0.4240 |
| | | PROP_Transicional | 10 | 0.0952 | 0.0974 | 0.0805 | 0.0080 | 0.1111 | 0.0000 | 0.2857 |
| | | PROP_Trasicional_Anormal | 10 | 0.0237 | 0.0392 | 0.0057 | 0.0000 | 0.0185 | 0.0000 | 0.1111 |
| | | PROP_Primary | 10 | 0.0756 | 0.1004 | 0.0498 | 0.0000 | 0.0714 | 0.0000 | 0.3333 |
| | | PROP_Primary_Anormal | 10 | 0.0665 | 0.0676 | 0.0610 | 0.0000 | 0.1200 | 0.0000 | 0.1600 |
| | | PROP_Secundario | 10 | 0.1314 | 0.1719 | 0.0179 | 0.0000 | 0.3333 | 0.0000 | 0.4167 |
| | | PROP_Secundario_Anormal | 10 | 0.0990 | 0.1322 | 0.0695 | 0.0000 | 0.1429 | 0.0000 | 0.4286 |
| RESV1 | D1 | PROP_Primordial | 12 | 0.2477 | 0.1612 | 0.2175 | 0.1360 | 0.3595 | 0.0000 | 0.5640 |
| | | PROP_Primordial_Anormal | 12 | 0.1243 | 0.1336 | 0.0980 | 0.0000 | 0.1635 | 0.0000 | 0.4300 |
| | | PROP_Transicional | 12 | 0.1296 | 0.0900 | 0.1325 | 0.0630 | 0.1791 | 0.0000 | 0.2727 |
| | | PROP_Trasicional_Anormal | 12 | 0.0441 | 0.0544 | 0.0160 | 0.0000 | 0.0884 | 0.0000 | 0.1538 |
| | | PROP_Primary | 12 | 0.2438 | 0.2079 | 0.1670 | 0.0526 | 0.4584 | 0.0426 | 0.5556 |
| | | PROP_Primary_Anormal | 12 | 0.1078 | 0.0861 | 0.0995 | 0.0650 | 0.1360 | 0.0000 | 0.3330 |
| | | PROP_Secundario | 12 | 0.0536 | 0.0800 | 0.0044 | 0.0000 | 0.0972 | 0.0000 | 0.2308 |
| | | PROP_Secundario_Anormal | 12 | 0.0495 | 0.0712 | 0.0132 | 0.0000 | 0.0984 | 0.0000 | 0.1818 |
| | D7 | PROP_Primordial | 12 | 0.0143 | 0.0481 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1670 |
| | | PROP_Primordial_Anormal | 12 | 0.0180 | 0.0336 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0220 | 0.0000 | 0.0980 |
| | | PROP_Transicional | 12 | 0.0057 | 0.0142 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0455 |
| | | PROP_Trasicional_Anormal | 12 | 0.0194 | 0.0358 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0260 | 0.0000 | 0.1250 |
| | | PROP_Primary | 12 | 0.3309 | 0.1434 | 0.3182 | 0.2000 | 0.4000 | 0.1544 | 0.6364 |
| | | PROP_Primary_Anormal | 12 | 0.5278 | 0.1677 | 0.5175 | 0.4250 | 0.6835 | 0.1820 | 0.7030 |
| PROP_Secundario | | 12 | 0.0423 | 0.0750 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0593 | 0.0000 | 0.2000 | |
| PROP_Secundario_Anormal | | 12 | 0.0414 | 0.0420 | 0.0364 | 0.0000 | 0.0798 | 0.0000 | 0.1000 | |
| RESV2 | D1 | PROP_Primordial | 12 | 0.3581 | 0.1930 | 0.3810 | 0.2200 | 0.5135 | 0.0000 | 0.6270 |
| | | PROP_Primordial_Anormal | 12 | 0.2073 | 0.1345 | 0.2310 | 0.1340 | 0.2615 | 0.0000 | 0.4390 |
| | | PROP_Transicional | 12 | 0.0875 | 0.0924 | 0.0814 | 0.0119 | 0.1202 | 0.0000 | 0.3333 |
| | | PROP_Trasicional_Anormal | 12 | 0.0441 | 0.0669 | 0.0210 | 0.0000 | 0.0566 | 0.0000 | 0.2069 |
| | | PROP_Primary | 12 | 0.0747 | 0.0813 | 0.0432 | 0.0000 | 0.1484 | 0.0000 | 0.2083 |
| | | PROP_Primary_Anormal | 12 | 0.1060 | 0.0964 | 0.0940 | 0.0195 | 0.1785 | 0.0000 | 0.2500 |
| | | PROP_Secundario | 12 | 0.0584 | 0.1062 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0828 | 0.0000 | 0.2857 |
| | | PROP_Secundario_Anormal | 12 | 0.0638 | 0.0957 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1363 | 0.0000 | 0.2619 |
| | D7 | PROP_Primordial | 12 | 0.0106 | 0.0279 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0940 |
| | | PROP_Primordial_Anormal | 12 | 0.0043 | 0.0100 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0290 |
| | | PROP_Transicional | 12 | 0.0537 | 0.0647 | 0.0179 | 0.0000 | 0.1238 | 0.0000 | 0.1556 |
| | | PROP_Trasicional_Anormal | 12 | 0.0457 | 0.0712 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1051 | 0.0000 | 0.1714 |
| | | PROP_Primary | 12 | 0.2941 | 0.1784 | 0.3434 | 0.1012 | 0.4143 | 0.0000 | 0.5333 |
| | | PROP_Primary_Anormal | 12 | 0.3765 | 0.2824 | 0.3640 | 0.1445 | 0.6025 | 0.0000 | 0.8210 |
| PROP_Secundario | | 12 | 0.1124 | 0.1427 | 0.0693 | 0.0000 | 0.1484 | 0.0000 | 0.4444 | |
| PROP_Secundario_Anormal | | 12 | 0.1029 | 0.1425 | 0.0563 | 0.0111 | 0.1208 | 0.0000 | 0.5000 | |

| | | | | | | | | | | |
|-------|----|---------------------------|----|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| RESV5 | D1 | PROP_Primordial | 12 | 0.1736 | 0.1662 | 0.1110 | 0.0515 | 0.3445 | 0.0000 | 0.4710 |
| | | PROP_Primordial_Anormal | 12 | 0.0321 | 0.0668 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0205 | 0.0000 | 0.1900 |
| | | PROP_Transicional | 12 | 0.0508 | 0.0612 | 0.0238 | 0.0000 | 0.1005 | 0.0000 | 0.1538 |
| | | PROP_Transicional_Anormal | 12 | 0.0526 | 0.0575 | 0.0385 | 0.0000 | 0.0801 | 0.0000 | 0.1667 |
| | | PROP_Primario | 12 | 0.2625 | 0.1434 | 0.2203 | 0.1394 | 0.3677 | 0.1111 | 0.5833 |
| | | PROP_Primario_Anormal | 12 | 0.2798 | 0.2198 | 0.2620 | 0.1155 | 0.4305 | 0.0000 | 0.7500 |
| | | PROP_Secundario | 12 | 0.0318 | 0.0532 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0570 | 0.0000 | 0.1429 |
| | | PROP_Secundario_Anormal | 12 | 0.1169 | 0.1083 | 0.1181 | 0.0000 | 0.1716 | 0.0000 | 0.3333 |
| | D7 | PROP_Primordial | 12 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| | | PROP_Primordial_Anormal | 12 | 0.0015 | 0.0052 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0180 |
| | | PROP_Transicional | 12 | 0.0073 | 0.0253 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0877 |
| | | PROP_Transicional_Anormal | 12 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| | | PROP_Primario | 12 | 0.3850 | 0.1413 | 0.4189 | 0.2561 | 0.4693 | 0.1667 | 0.6000 |
| | | PROP_Primario_Anormal | 12 | 0.4068 | 0.1891 | 0.3540 | 0.3010 | 0.5575 | 0.1000 | 0.7190 |
| | | PROP_Secundario | 12 | 0.1253 | 0.1409 | 0.0939 | 0.0000 | 0.2436 | 0.0000 | 0.3571 |
| | | PROP_Secundario_Anormal | 12 | 0.0741 | 0.1048 | 0.0244 | 0.0000 | 0.1241 | 0.0000 | 0.3333 |

Legenda: a média e a mediana estão apresentados na forma de proporção de folículos por estágio, sendo estas calculadas pelo N de folículo em determinado estágio dividido pelo N total de folículos no grupo.
 $p < 0,05$

Tabela 10. Medidas de posição central e de dispersão para os dados de Imunohistoquímica – FOXO3

| Grupo | Dia | Variável | N | Média | Desv. Pad | Mediana | Q1 | Q3 | Min | Max | |
|--------|-----|------------------------|----|--------|-----------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|
| AN1000 | D1 | PROP_Primordial_Menos | 12 | 0.2027 | 0.1872 | 0.1627 | 0.0868 | 0.2557 | 0.0000 | 0.6349 | |
| | | PROP_Primordial_Mais | 12 | 0.1386 | 0.0999 | 0.1294 | 0.0511 | 0.2198 | 0.0000 | 0.2784 | |
| | | PROP_Trasicional_Menos | 12 | 0.0593 | 0.0397 | 0.0649 | 0.0268 | 0.0870 | 0.0000 | 0.1212 | |
| | | PROP_Trasicional_Mais | 12 | 0.0656 | 0.0618 | 0.0507 | 0.0175 | 0.0951 | 0.0000 | 0.2000 | |
| | | PROP_Primario_Menos | 12 | 0.1867 | 0.1102 | 0.2135 | 0.1154 | 0.2604 | 0.0000 | 0.3503 | |
| | | PROP_Primario_Mais | 12 | 0.2334 | 0.0970 | 0.2135 | 0.1714 | 0.3056 | 0.0909 | 0.4231 | |
| | | PROP_SecundarioMenos | 12 | 0.0467 | 0.0788 | 0.0144 | 0.0000 | 0.0544 | 0.0000 | 0.2632 | |
| | | PROP_SecundarioMais | 12 | 0.0671 | 0.0797 | 0.0453 | 0.0062 | 0.1072 | 0.0000 | 0.2222 | |
| | D7 | PROP_Primordial_Menos | 11 | 0.0061 | 0.0139 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0400 |
| | | PROP_Primordial_Mais | 11 | 0.0394 | 0.0709 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0714 | 0.0000 | 0.2308 | |
| | | PROP_Trasicional_Menos | 11 | 0.0057 | 0.0128 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0357 | |
| | | PROP_Trasicional_Mais | 11 | 0.0659 | 0.1000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1250 | 0.0000 | 0.3077 | |
| | | PROP_Primario_Menos | 11 | 0.2521 | 0.1939 | 0.2593 | 0.1111 | 0.3333 | 0.0000 | 0.6667 | |
| | | PROP_Primario_Mais | 11 | 0.5575 | 0.1876 | 0.5833 | 0.4000 | 0.7500 | 0.2222 | 0.7500 | |
| | | PROP_SecundarioMenos | 11 | 0.0050 | 0.0111 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0278 | |
| | | PROP_SecundarioMais | 11 | 0.0682 | 0.0904 | 0.0278 | 0.0000 | 0.1111 | 0.0000 | 0.2500 | |
| AN1500 | D1 | PROP_Primordial_Menos | 12 | 0.1236 | 0.0764 | 0.0938 | 0.0625 | 0.1826 | 0.0556 | 0.2703 | |
| | | PROP_Primordial_Mais | 12 | 0.1106 | 0.0921 | 0.0850 | 0.0400 | 0.2040 | 0.0000 | 0.2500 | |
| | | PROP_Trasicional_Menos | 12 | 0.0615 | 0.0590 | 0.0505 | 0.0156 | 0.0958 | 0.0000 | 0.1818 | |
| | | PROP_Trasicional_Mais | 12 | 0.0653 | 0.0795 | 0.0455 | 0.0000 | 0.1073 | 0.0000 | 0.2353 | |
| | | PROP_Primario_Menos | 12 | 0.2818 | 0.1261 | 0.2743 | 0.1877 | 0.3385 | 0.1176 | 0.5294 | |
| | | PROP_Primario_Mais | 12 | 0.3048 | 0.1013 | 0.2795 | 0.2330 | 0.4152 | 0.1250 | 0.4545 | |
| | | PROP_SecundarioMenos | 12 | 0.0435 | 0.0561 | 0.0259 | 0.0000 | 0.0679 | 0.0000 | 0.1875 | |
| | | PROP_SecundarioMais | 12 | 0.0090 | 0.0213 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0625 | |
| | D7 | PROP_Primordial_Menos | 12 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| | | PROP_Primordial_Mais | 12 | 0.0021 | 0.0072 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0250 |
| | | PROP_Trasicional_Menos | 12 | 0.0068 | 0.0125 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0116 | 0.0000 | 0.0303 | |
| | | PROP_Trasicional_Mais | 12 | 0.0157 | 0.0310 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0172 | 0.0000 | 0.0930 | |
| | | PROP_Primario_Menos | 12 | 0.2701 | 0.1142 | 0.2708 | 0.1632 | 0.3494 | 0.1250 | 0.5000 | |
| | | PROP_Primario_Mais | 12 | 0.6555 | 0.1222 | 0.6399 | 0.5701 | 0.7507 | 0.4783 | 0.8750 | |
| | | PROP_SecundarioMenos | 12 | 0.0186 | 0.0500 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0071 | 0.0000 | 0.1739 | |
| | | PROP_SecundarioMais | 12 | 0.0313 | 0.0498 | 0.0143 | 0.0000 | 0.0427 | 0.0000 | 0.1739 | |
| AN2000 | D1 | PROP_Primordial_Menos | 12 | 0.1038 | 0.1319 | 0.0583 | 0.0000 | 0.1763 | 0.0000 | 0.4286 | |
| | | PROP_Primordial_Mais | 12 | 0.0310 | 0.0606 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0296 | 0.0000 | 0.1818 | |
| | | PROP_Trasicional_Menos | 12 | 0.0859 | 0.0802 | 0.0889 | 0.0000 | 0.1493 | 0.0000 | 0.2143 | |
| | | PROP_Trasicional_Mais | 12 | 0.0164 | 0.0309 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0238 | 0.0000 | 0.0870 | |
| | | PROP_Primario_Menos | 12 | 0.2302 | 0.1575 | 0.2857 | 0.0870 | 0.3229 | 0.0000 | 0.4865 | |
| | | PROP_Primario_Mais | 12 | 0.4033 | 0.2399 | 0.3693 | 0.2381 | 0.5565 | 0.0000 | 0.8889 | |
| | | PROP_SecundarioMenos | 12 | 0.0877 | 0.1543 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1492 | 0.0000 | 0.5000 | |
| | | PROP_SecundarioMais | 12 | 0.0417 | 0.1443 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.5000 | |
| | D7 | PROP_Primordial_Menos | 11 | 0.0011 | 0.0037 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0123 |
| | | PROP_Primordial_Mais | 11 | 0.0021 | 0.0069 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0227 |
| | | PROP_Trasicional_Menos | 11 | 0.0334 | 0.0757 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0494 | 0.0000 | 0.2500 | |
| | | PROP_Trasicional_Mais | 11 | 0.0385 | 0.0592 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0732 | 0.0000 | 0.1692 | |
| | | PROP_Primario_Menos | 11 | 0.1421 | 0.0989 | 0.1250 | 0.0750 | 0.2222 | 0.0000 | 0.3182 | |
| | | PROP_Primario_Mais | 11 | 0.5746 | 0.3108 | 0.6923 | 0.2500 | 0.7857 | 0.0000 | 0.9250 | |
| | | PROP_SecundarioMenos | 11 | 0.1630 | 0.3196 | 0.0000 | 0.0000 | 0.2500 | 0.0000 | 1.0000 | |
| | | PROP_SecundarioMais | 11 | 0.0452 | 0.0774 | 0.0154 | 0.0000 | 0.0455 | 0.0000 | 0.2500 | |
| CT | D1 | PROP_Primordial_Menos | 11 | 0.1156 | 0.0950 | 0.0952 | 0.0000 | 0.1818 | 0.0000 | 0.2600 | |
| | | PROP_Primordial_Mais | 11 | 0.0929 | 0.1234 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1964 | 0.0000 | 0.3125 | |
| | | PROP_Trasicional_Menos | 11 | 0.0490 | 0.0593 | 0.0357 | 0.0000 | 0.0909 | 0.0000 | 0.1800 | |
| | | PROP_Trasicional_Mais | 11 | 0.0444 | 0.0729 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1129 | 0.0000 | 0.2143 | |
| | | PROP_Primario_Menos | 11 | 0.3283 | 0.2128 | 0.3333 | 0.1071 | 0.4706 | 0.0417 | 0.7000 | |
| | | PROP_Primario_Mais | 11 | 0.2971 | 0.1751 | 0.2292 | 0.1818 | 0.4118 | 0.0806 | 0.6316 | |
| | | PROP_SecundarioMenos | 11 | 0.0349 | 0.0361 | 0.0200 | 0.0000 | 0.0645 | 0.0000 | 0.0909 | |
| | | PROP_SecundarioMais | 11 | 0.0376 | 0.0427 | 0.0200 | 0.0000 | 0.0952 | 0.0000 | 0.1053 | |

| Grupo | Dia | Variável | N | Média | Desv. Pad | Mediana | Q1 | Q3 | Min | Max | |
|----------------------|-----|------------------------|---------------------|--------|-----------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | D7 | PROP_Primordial_Menos | 12 | 0.0198 | 0.0506 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1667 | |
| | | PROP_Primordial_Mais | 12 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | |
| | | PROP_Trasicional_Menos | 12 | 0.0050 | 0.0116 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0303 |
| | | PROP_Trasicional_Mais | 12 | 0.0180 | 0.0426 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1250 |
| | | PROP_Primario_Menos | 12 | 0.2795 | 0.1426 | 0.2743 | 0.1623 | 0.3796 | 0.0714 | 0.5000 | |
| | | PROP_Primario_Mais | 12 | 0.4855 | 0.2208 | 0.5227 | 0.3682 | 0.6123 | 0.1000 | 0.9000 | |
| | | PROP_SecundarioMenos | 12 | 0.0819 | 0.0668 | 0.0923 | 0.0147 | 0.1232 | 0.0000 | 0.2000 | |
| | | PROP_SecundarioMais | 12 | 0.1103 | 0.1165 | 0.0923 | 0.0000 | 0.1952 | 0.0000 | 0.3571 | |
| FRESCO | D0 | PROP_Primordial_Menos | 10 | 0.4414 | 0.3228 | 0.4444 | 0.0833 | 0.7586 | 0.0400 | 0.8720 | |
| | | PROP_Primordial_Mais | 10 | 0.0671 | 0.0459 | 0.0774 | 0.0190 | 0.1040 | 0.0000 | 0.1200 | |
| | | PROP_Trasicional_Menos | 10 | 0.0483 | 0.0448 | 0.0517 | 0.0000 | 0.0800 | 0.0000 | 0.1111 | |
| | | PROP_Trasicional_Mais | 10 | 0.0706 | 0.1059 | 0.0123 | 0.0000 | 0.0833 | 0.0000 | 0.2857 | |
| | | PROP_Primario_Menos | 10 | 0.0713 | 0.0492 | 0.0757 | 0.0418 | 0.1111 | 0.0000 | 0.1429 | |
| | | PROP_Primario_Mais | 10 | 0.0709 | 0.1056 | 0.0286 | 0.0000 | 0.1200 | 0.0000 | 0.3333 | |
| | | PROP_SecundarioMenos | 10 | 0.0736 | 0.1069 | 0.0196 | 0.0000 | 0.1111 | 0.0000 | 0.3333 | |
| | | | PROP_SecundarioMais | 10 | 0.1569 | 0.1936 | 0.0648 | 0.0000 | 0.3333 | 0.0000 | 0.5000 |
| | D0 | PROP_Primordial_Menos | 10 | 0.4414 | 0.3228 | 0.4444 | 0.0833 | 0.7586 | 0.0400 | 0.8720 | |
| | | PROP_Primordial_Mais | 10 | 0.0671 | 0.0459 | 0.0774 | 0.0190 | 0.1040 | 0.0000 | 0.1200 | |
| | | PROP_Trasicional_Menos | 10 | 0.0483 | 0.0448 | 0.0517 | 0.0000 | 0.0800 | 0.0000 | 0.1111 | |
| | | PROP_Trasicional_Mais | 10 | 0.0706 | 0.1059 | 0.0123 | 0.0000 | 0.0833 | 0.0000 | 0.2857 | |
| | | PROP_Primario_Menos | 10 | 0.0713 | 0.0492 | 0.0757 | 0.0418 | 0.1111 | 0.0000 | 0.1429 | |
| | | PROP_Primario_Mais | 10 | 0.0709 | 0.1056 | 0.0286 | 0.0000 | 0.1200 | 0.0000 | 0.3333 | |
| PROP_SecundarioMenos | | 10 | 0.0736 | 0.1069 | 0.0196 | 0.0000 | 0.1111 | 0.0000 | 0.3333 | | |
| | | PROP_SecundarioMais | 10 | 0.1569 | 0.1936 | 0.0648 | 0.0000 | 0.3333 | 0.0000 | 0.5000 | |
| RESV1 | D1 | PROP_Primordial_Menos | 12 | 0.3446 | 0.2405 | 0.2902 | 0.1422 | 0.5980 | 0.0000 | 0.7234 | |
| | | PROP_Primordial_Mais | 12 | 0.0278 | 0.0523 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0382 | 0.0000 | 0.1667 | |
| | | PROP_Trasicional_Menos | 12 | 0.1335 | 0.0877 | 0.1515 | 0.0711 | 0.1706 | 0.0000 | 0.2727 | |
| | | PROP_Trasicional_Mais | 12 | 0.0394 | 0.0572 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0949 | 0.0000 | 0.1538 | |
| | | PROP_Primario_Menos | 12 | 0.1589 | 0.1234 | 0.1627 | 0.0855 | 0.2164 | 0.0000 | 0.4615 | |
| | | PROP_Primario_Mais | 12 | 0.1926 | 0.2284 | 0.0651 | 0.0207 | 0.3889 | 0.0000 | 0.6667 | |
| | | PROP_SecundarioMenos | 12 | 0.0761 | 0.0689 | 0.0620 | 0.0132 | 0.1538 | 0.0000 | 0.1818 | |
| | | | PROP_SecundarioMais | 12 | 0.0271 | 0.0462 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0439 | 0.0000 | 0.1176 |
| | D7 | PROP_Primordial_Menos | 12 | 0.0222 | 0.0490 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0223 | 0.0000 | 0.1679 |
| | | PROP_Primordial_Mais | 12 | 0.0103 | 0.0286 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0024 | 0.0000 | 0.0992 | |
| | | PROP_Trasicional_Menos | 12 | 0.0021 | 0.0050 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0153 | |
| | | PROP_Trasicional_Mais | 12 | 0.0225 | 0.0373 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0340 | 0.0000 | 0.1250 | |
| | | PROP_Primario_Menos | 12 | 0.3048 | 0.1797 | 0.2956 | 0.1909 | 0.4370 | 0.0000 | 0.6000 | |
| | | PROP_Primario_Mais | 12 | 0.5541 | 0.1682 | 0.5374 | 0.4184 | 0.6682 | 0.3000 | 0.8750 | |
| PROP_SecundarioMenos | | 12 | 0.0392 | 0.0543 | 0.0258 | 0.0000 | 0.0518 | 0.0000 | 0.1818 | | |
| | | PROP_SecundarioMais | 12 | 0.0448 | 0.0621 | 0.0139 | 0.0000 | 0.0787 | 0.0000 | 0.2000 | |
| RESV2 | D1 | PROP_Primordial_Menos | 12 | 0.4884 | 0.3137 | 0.4643 | 0.2463 | 0.7549 | 0.0000 | 0.9500 | |
| | | PROP_Primordial_Mais | 12 | 0.0741 | 0.1023 | 0.0208 | 0.0000 | 0.1404 | 0.0000 | 0.3333 | |
| | | PROP_Trasicional_Menos | 12 | 0.0698 | 0.0775 | 0.0369 | 0.0096 | 0.1222 | 0.0000 | 0.2414 | |
| | | PROP_Trasicional_Mais | 12 | 0.0618 | 0.0584 | 0.0470 | 0.0119 | 0.1031 | 0.0000 | 0.1667 | |
| | | PROP_Primario_Menos | 12 | 0.1054 | 0.1158 | 0.0789 | 0.0000 | 0.2112 | 0.0000 | 0.2917 | |
| | | PROP_Primario_Mais | 12 | 0.0782 | 0.0988 | 0.0400 | 0.0075 | 0.1310 | 0.0000 | 0.3333 | |
| | | PROP_SecundarioMenos | 12 | 0.0697 | 0.0850 | 0.0114 | 0.0000 | 0.1404 | 0.0000 | 0.2083 | |
| | | | PROP_SecundarioMais | 12 | 0.0525 | 0.0831 | 0.0000 | 0.0000 | 0.1071 | 0.0000 | 0.2500 |
| | D7 | PROP_Primordial_Menos | 12 | 0.0148 | 0.0279 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0254 | 0.0000 | 0.0938 |
| | | PROP_Primordial_Mais | 12 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | |
| | | PROP_Trasicional_Menos | 12 | 0.0438 | 0.0634 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0940 | 0.0000 | 0.1667 | |
| | | PROP_Trasicional_Mais | 12 | 0.0555 | 0.0872 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0979 | 0.0000 | 0.2571 | |
| | | PROP_Primario_Menos | 12 | 0.3677 | 0.1238 | 0.3954 | 0.2833 | 0.4495 | 0.1250 | 0.5714 | |
| | | PROP_Primario_Mais | 12 | 0.3112 | 0.1250 | 0.3167 | 0.2286 | 0.4018 | 0.1111 | 0.5385 | |
| PROP_SecundarioMenos | | 12 | 0.0865 | 0.0970 | 0.0613 | 0.0111 | 0.1394 | 0.0000 | 0.3333 | | |
| | | PROP_SecundarioMais | 12 | 0.1204 | 0.1279 | 0.0885 | 0.0179 | 0.1825 | 0.0000 | 0.3750 | |

| Grupo | Dia | Variável | N | Média | Desv. Pad | Mediana | Q1 | Q3 | Min | Max | |
|-------|-----|------------------------|----|--------|-----------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|
| RESV5 | D1 | PROP_Primordial_Menos | 12 | 0.1295 | 0.1563 | 0.0801 | 0.0147 | 0.1801 | 0.0000 | 0.5238 | |
| | | PROP_Primordial_Mais | 12 | 0.0762 | 0.1001 | 0.0238 | 0.0000 | 0.1709 | 0.0000 | 0.2353 | |
| | | PROP_Trasicional_Menos | 12 | 0.0669 | 0.0897 | 0.0396 | 0.0000 | 0.0917 | 0.0000 | 0.2963 | |
| | | PROP_Trasicional_Mais | 12 | 0.0365 | 0.0584 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0769 | 0.0000 | 0.1667 | |
| | | PROP_Primario_Menos | 12 | 0.4362 | 0.2357 | 0.4444 | 0.3303 | 0.5625 | 0.0476 | 0.8750 | |
| | | PROP_Primario_Mais | 12 | 0.1060 | 0.0943 | 0.1270 | 0.0000 | 0.1716 | 0.0000 | 0.2500 | |
| | | PROP_SecundarioMenos | 12 | 0.0892 | 0.1041 | 0.0623 | 0.0000 | 0.1557 | 0.0000 | 0.3333 | |
| | | PROP_SecundarioMais | 12 | 0.0595 | 0.1132 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0861 | 0.0000 | 0.3750 | |
| | D7 | PROP_Primordial_Menos | 12 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| | | PROP_Primordial_Mais | 12 | 0.0015 | 0.0051 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0175 |
| | | PROP_Trasicional_Menos | 12 | 0.0073 | 0.0253 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0877 |
| | | PROP_Trasicional_Mais | 12 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 |
| | | PROP_Primario_Menos | 12 | 0.3753 | 0.2263 | 0.4511 | 0.2467 | 0.4886 | 0.0000 | 0.7692 | |
| | | PROP_Primario_Mais | 12 | 0.4165 | 0.2167 | 0.4421 | 0.2667 | 0.5581 | 0.0714 | 0.7500 | |
| | | PROP_SecundarioMenos | 12 | 0.1280 | 0.1221 | 0.1151 | 0.0210 | 0.1833 | 0.0000 | 0.3571 | |
| | | PROP_SecundarioMais | 12 | 0.0714 | 0.1438 | 0.0032 | 0.0000 | 0.0939 | 0.0000 | 0.5000 | |

Legenda: a média e a mediana estão apresentados na forma de proporção de folículos por estágio, sendo estas calculadas pelo N de folículo em determinado estágio dividido pelo N total de folículos no grupo.

Tabela 11. Análise da produção de espécies reativas de oxigênio (DCF) e apoptose (IP)

| Grupo | Dia | N | Variável | Média | Desv. Pad. | Mediana | Q1 | Q3 | Min | Max |
|--------|-----|----|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|---------------|-------------------|
| AN1000 | D1 | 30 | Medidas_DCF Medidas_IP | 36.69 262.70 | 36.99 146.21 | 21.43 268.11 | 9.69 119.17 | 68.20 349.43 | 0.59 75.56 | 137.61 629.83 |
| | D7 | 30 | Medidas_DCF Medidas_IP | 58.79 216.19 | 64.23 123.06 | 37.80 204.45 | 12.73 88.91 | 79.49 305.58 | 0.06 41.15 | 219.23 544.26 |
| AN1500 | D1 | 30 | Medidas_DCF Medidas_IP | 30.35 176.67 | 36.28 106.09 | 11.99 163.78 | 4.91 92.55 | 40.50 215.56 | 0.89 37.94 | 116.73 422.80 |
| | D7 | 30 | Medidas_DCF Medidas_IP | 62.59 202.63 | 61.60 130.85 | 56.96 165.27 | 6.39 106.09 | 118.45 260.92 | 1.23 22.76 | 268.39 634.71 |
| AN2000 | D1 | 30 | Medidas_DCF Medidas_IP | 52.90 290.28 | 52.24 163.91 | 38.45 238.79 | 11.09 165.30 | 77.01 405.05 | 1.93 77.77 | 216.10 677.58 |
| | D7 | 30 | Medidas_DCF Medidas_IP | 30.44 196.00 | 28.80 161.21 | 23.57 156.20 | 6.70 70.29 | 46.83 269.58 | 0.42 3.37 | 104.97 662.78 |
| CT | D1 | 30 | Medidas_DCF Medidas_IP | 46.81 130.80 | 55.82 71.09 | 14.80 105.20 | 5.75 91.02 | 78.23 154.71 | 0.07 39.82 | 185.13 339.28 |
| | D7 | 30 | Medidas_DCF Medidas_IP | 45.16 197.25 | 40.32 106.38 | 41.08 222.14 | 5.69 127.22 | 71.44 272.31 | 1.37 8.91 | 132.18 364.88 |
| FRESCO | D0 | 30 | Medidas_DCF Medidas_IP | 20.43 117.91 | 25.73 115.18 | 8.93 74.11 | 1.94 44.61 | 26.82 138.11 | 0.48 13.60 | 90.65 512.62 |
| RESV1 | D1 | 30 | Medidas_DCF Medidas_IP | 36.61 249.09 | 35.21 119.68 | 19.74 245.89 | 14.87 138.83 | 48.84 341.27 | 3.50 24.65 | 136.68 539.84 |
| | D7 | 30 | Medidas_DCF Medidas_IP | 63.62 180.66 | 54.26 189.21 | 44.57 104.07 | 14.18 37.45 | 107.13 267.36 | 4.16 6.76 | 170.23 716.93 |
| RESV2 | D1 | 30 | Medidas_DCF Medidas_IP | 41.98 334.46 | 52.82 312.74 | 13.30 197.61 | 8.43 160.97 | 68.36 274.77 | 3.97 57.31 | 213.93 1351.80 |
| | D7 | 30 | Medidas_DCF Medidas_IP | 21.60 176.40 | 15.75 176.01 | 17.99 98.61 | 10.16 47.99 | 33.27 252.18 | 0.49 7.33 | 56.78 663.08 |
| RESV5 | D1 | 30 | Medidas_DCF Medidas_IP | 27.62 227.34 | 23.21 171.18 | 21.65 176.01 | 10.71 83.01 | 35.13 329.16 | 3.90 29.78 | 100.42 695.36 |
| | D7 | 30 | Medidas_DCF Medidas_IP | 33.62 97.60 | 26.35 69.97 | 28.08 80.00 | 13.84 48.74 | 42.25 152.58 | 2.02 19.69 | 90.07 323.84 |

Legenda: Análise da produção de espécies reativas de oxigênio (DCF) e apoptose (IP) entre os grupos e intra-grupos ao longo do cultivo: medidas de posição central e dispersão.

Tabela 13. Análise Morfológica. Comparação entre D1 e D7 de cada grupo. (*) p<0,05

| Comparações entre os dias | Primordial | | Transicional | | Primario | | Secundário | |
|---------------------------|------------|----------|--------------|---------|----------|----------|------------|---------|
| | Primordial | Anormal | Transicional | Anormal | Primario | Anormal | Secundário | Anormal |
| CT 1 vs 7 | 0.0004 * | 0.9016 | 0.0237 * | 0.9486 | 0.4636 | 0.2059 | 0.3559 | 0.0784 |
| Resv1 1 vs 7 | <.0001 * | 0.0010 * | <.0001 * | 0.1279 | 0.1689 | <.0001 * | 0.8295 | 0.8349 |
| Resv2 1 vs 7 | <.0001 * | <.0001 * | 0.2714 | 0.9193 | 0.0006 * | 0.0002 * | 0.3020 | 0.3157 |
| Resv5 1 vs 7 | 0.0011 * | 0.3356 | 0.1581 | 0.0013 | 0.0539 | 0.0750 | 0.0746 | 0.2719 |
| An1000 1 vs 7 | <.0001 * | 0.2583 | 0.0823 | 0.9264 | 0.0454 | 0.0005 * | 0.6106 | 0.7366 |
| An1500 1 vs 7 | 0.0003 * | 0.2131 | 0.0152 * | 0.1236 | 0.0004 * | 0.1312 | 0.8303 | 0.7020 |
| An2000 1 vs 7 | 0.1527 | 0.0944 | 0.3055 | 0.9154 | 0.2128 | 0.9731 | 0.0443* | 0.4658 |
| FRESCO 0 vs 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Tabela 14. Análise Morfológica. Comparação entre os grupos em D1. (*) p<0,05

D1

| Comparações entre os grupos | Primordial | | Transicional | | Primario | | Secundário | |
|-----------------------------|------------|------------|--------------|------------|----------|------------|------------|------------|
| | Primordial | Degenerado | Transicional | Degenerado | Primario | Degenerado | Secundário | Degenerado |
| AN1000 vs AN1500 | 0.1281 | 0.4234 | 0.6408 | 0.4544 | 0.1513 | 0.2792 | 0.1513 | 0.7022 |
| AN1000 vs AN2000 | 0.0002* | 0.8172 | 0.5806 | 0.7287 | 0.9317 | 0.0038* | 0.4845 | 0.1810 |
| AN1000 vs CT | 0.1491 | 0.0908 | 0.5226 | 0.4902 | 0.1872 | 0.0994 | 0.3382 | 0.8017 |
| AN1000 vs RESV1 | 0.5855 | 0.0632 | 0.5684 | 0.0541 | 0.5029 | 0.7135 | 0.4970 | 0.5236 |
| AN1000 vs RESV2 | 0.1196 | <.0001* | 0.4244 | 0.0541 | 0.0010* | 0.6952 | 0.5579 | 0.3159 |
| AN1000 vs RESV5 | 0.0514 | 0.3001 | 0.0472* | 0.0145* | 0.7085 | 0.0413* | 0.2737 | 0.0187* |
| AN1000 vs FRESCO | 0.1386 | 0.0109* | 0.5997 | 0.5209 | 0.0018 | 0.3667 | 0.4390 | 0.0699 |

D1

| Comparações entre os grupos | Primordial | | Transicional | | Primario | | Secundário | |
|-----------------------------|------------|------------|--------------|------------|----------|------------|------------|------------|
| | Primordial | Degenerado | Transicional | Degenerado | Primario | Degenerado | Secundário | Degenerado |
| AN1500 vs AN1000 | 0.1281 | 0.4234 | 0.6408 | 0.4544 | 0.1513 | 0.2792 | 0.1513 | 0.7022 |
| AN1500 vs AN2000 | 0.0237* | 0.5687 | 0.9314 | 0.2741 | 0.1770 | 0.0664 | 0.4596 | 0.3382 |
| AN1500 vs CT | 0.9631 | 0.3608 | 0.8546 | 0.1561 | 0.9318 | 0.5525 | 0.6535 | 0.9022 |
| AN1500 vs RESV1 | 0.3270 | 0.0083* | 0.3003 | 0.2357 | 0.0361* | 0.1480 | 0.4477 | 0.7982 |
| AN1500 vs RESV2 | 0.0023 | <.0001* | 0.7393 | 0.2357 | <.0001* | 0.1413 | 0.3940 | 0.5341 |
| AN1500 vs RESV5 | 0.6653 | 0.8131 | 0.1274 | 0.0872 | 0.0712 | 0.3326 | 0.7316 | 0.0481* |
| AN1500 vs FRESCO | 0.0037* | 0.0010* | 0.9362 | 0.9430 | <.0001* | 0.0541 | 0.0330* | 0.1464 |

D1

| Comparações entre os grupos | Primordial | | Transicional | | Primario | | Secundário | |
|-----------------------------|------------|------------|--------------|------------|----------|------------|------------|------------|
| | Primordial | Degenerado | Transicional | Degenerado | Primario | Degenerado | Secundário | Degenerado |
| AN2000 vs AN1000 | 0.0002* | 0.8172 | 0.5806 | 0.7287 | 0.9317 | 0.0038* | 0.4845 | 0.1810 |
| AN2000 vs AN1500 | 0.0237 * | 0.5687 | 0.9314 | 0.2741 | 0.1770 | 0.0664 | 0.4596 | 0.3382 |
| AN2000 vs CT | 0.0240* | 0.1422 | 0.9210 | 0.7255 | 0.2166 | 0.2271 | 0.7835 | 0.2896 |
| AN2000 vs RESV1 | 0.0013* | 0.0371* | 0.2621 | 0.0235* | 0.4500 | 0.0012* | 0.9842 | 0.4822 |
| AN2000 vs RESV2 | <.0001* | <.0001* | 0.8051 | 0.0235* | 0.0007* | 0.0011* | 0.9098 | 0.7362 |
| AN2000 vs RESV5 | 0.0662 | 0.4203 | 0.1501 | 0.0054* | 0.6459 | 0.3820 | 0.6914 | 0.3041 |
| AN2000 vs FRESCO | <.0001* | 0.0058* | 0.9983 | 0.3311 | 0.0013* | 0.0003* | 0.1507 | 0.5875 |

D1

| Comparações entre os grupos | Primordial | | Transicional | | Primario | | Secundário | |
|-----------------------------|------------|-------------|--------------|------------|----------|------------|------------|------------|
| | Primordial | Degenerado | Transicional | Degenerado | Primario | Degenerado | Secundário | Degenerado |
| RESV1 vs AN1000 | 0.5855 | 0.0632 | 0.5684 | 0.0541 | 0.5029 | 0.7135 | 0.4970 | 0.5236 |
| RESV1 vs AN1500 | 0.3270 | 0.0083* | 0.3003 | 0.2357 | 0.0361* | 0.1480 | 0.4477 | 0.7982 |
| RESV1 vs AN2000 | 0.0013* | 0.0371* | 0.2621 | 0.0235* | 0.4500 | 0.0012* | 0.9842 | 0.4822 |
| RESV1 vs CT | 0.3615 | 0.0005 (>)* | 0.2319 | 0.0105* | 0.0493* | 0.0454* | 0.7686 | 0.7092 |
| RESV1 vs RESV2 | 0.0363* | 0.0096* | 0.1718 | 10.000 | 0.0081* | 0.9803 | 0.9256 | 0.7141 |
| RESV1 vs RESV5 | 0.1586 | 0.0041* | 0.0110* | 0.5962 | 0.7669 | 0.0164* | 0.6769 | 0.0846 |
| RESV1 vs FRESCO | 0.0462* | 0.4287 | 0.2858 | 0.2294 | 0.0120* | 0.5799 | 0.1561 | 0.2261 |

D1

| Comparações entre os grupos | Primordial | | Transicional | | Primario | | Secundário | |
|-----------------------------|------------|------------|--------------|------------|----------|------------|------------|------------|
| | Primordial | Degenerado | Transicional | Degenerado | Primario | Degenerado | Secundário | Degenerado |
| RESV2 vs AN1000 | 0.1196 | <.0001* | 0.4244 | 0.0541 | 0.0010* | 0.6952 | 0.5579 | 0.3159 |
| RESV2 vs AN1500 | 0.0023* | <.0001* | 0.7393 | 0.2357 | <.0001* | 0.1413 | 0.3940 | 0.5341 |
| RESV2 vs AN2000 | <.0001* | <.0001* | 0.8051 | 0.0235* | 0.000* | 0.0011* | 0.9098 | 0.7362 |
| RESV2 vs CT | 0.0033* | <.0001* | 0.8869 | 0.0105* | <.0001* | 0.0429* | 0.6999 | 0.4650 |
| RESV2 vs RESV1 | 0.0363* | 0.0096* | 0.1718 | 0.2294 | 0.0081* | 0.9803 | 0.9256 | 0.7141 |
| RESV2 vs RESV5 | 0.0005* | <.0001* | 0.2323 | 10.000 | 0.0034* | 0.0154* | 0.6100 | 0.1730 |
| RESV2 vs FRESCO | 0.9973 | 0.0900 | 0.8124 | 0.5962 | 0.9885 | 0.5961 | 0.1835 | 0.3881 |

D1

| Comparações entre os grupos | Primordial | | Transicional | | Primario | | Secundário | |
|-----------------------------|------------|------------|--------------|------------|----------|------------|------------|------------|
| | Primordial | Degenerado | Transicional | Degenerado | Primario | Degenerado | Secundário | Degenerado |
| RESV5 vs AN1000 | 0.0514 | 0.3001 | 0.0472* | 0.0145* | 0.7085 | 0.0413* | 0.2737 | 0.0187* |
| RESV5 vs AN1500 | 0.6653 | 0.8131 | 0.1274 | 0.0872 | 0.0712 | 0.3326 | 0.7316 | 0.0481* |
| RESV5 vs AN2000 | 0.0662 | 0.4203 | 0.1501 | 0.0054* | 0.6459 | 0.3820 | 0.6914 | 0.3041 |
| RESV5 vs CT | 0.6389 | 0.4944 | 0.1903 | 0.0022* | 0.0928 | 0.7230 | 0.9096 | 0.0400* |
| RESV5 vs RESV1 | 0.1586 | 0.0041* | 0.0110* | 0.5962 | 0.7669 | 0.0164* | 0.6769 | 0.0846 |
| RESV5 vs RESV2 | 0.0005* | <.0001* | 0.2323 | 0.5962 | 0.0034* | 0.0154* | 0.6100 | 0.1730 |
| RESV5 vs FRESCO | 0.0010* | 0.0005* | 0.1692 | 0.0887 | 0.0053* | 0.0047* | 0.0702 | 0.6609 |

D1

| Comparações entre os grupos | Primordial | | Transicional | | Primario | | Secundário | |
|-----------------------------|------------|------------|--------------|------------|----------|------------|------------|------------|
| | Primordial | Degenerado | Transicional | Degenerado | Primario | Degenerado | Secundário | Degenerado |
| CT vs AN1000 | 0.1491 | 0.0908 | 0.5226 | 0.4902 | 0.1872 | 0.0994 | 0.3382 | 0.8017 |
| CT vs AN1500 | 0.9631 | 0.3608 | 0.8546 | 0.1561 | 0.9318 | 0.5525 | 0.6535 | 0.9022 |
| CT vs AN2000 | 0.0240* | 0.1422 | 0.9210 | 0.7255 | 0.2166 | 0.2271 | 0.7835 | 0.2896 |
| CT vs RESV1 | 0.3615 | 0.0005* | 0.2319 | 0.0105* | 0.0493* | 0.0454* | 0.7686 | 0.7092 |
| CT vs RESV2 | 0.0033* | <.0001* | 0.8869 | 0.0105* | <.0001* | 0.0429* | 0.6999 | 0.4650 |
| CT vs RESV5 | 0.6389 | 0.4944 | 0.1903 | 0.0022* | 0.0928 | 0.7230 | 0.9096 | 0.0400* |
| CT vs FRESCO | 0.0050* | <.0001* | 0.9229 | 0.1985 | <.0001* | 0.0145* | 0.0953 | 0.1237 |

D7

| Comparações entre os grupos | Primordial | | Transicional | | Primario | | Secundário | |
|-----------------------------|------------|------------|--------------|------------|----------|------------|------------|------------|
| | Primordial | Degenerado | Transicional | Degenerado | Primario | Degenerado | Secundário | Degenerado |
| AN1000 vs AN1500 | 0.7780 | 0.3838 | 0.2692 | 0.3839 | 0.0035* | 0.3017 | 0.4912 | 0.7368 |
| AN1000 vs AN2000 | 0.7535 | 0.4492 | 0.8611 | 0.7500 | 0.5056 | 0.5076 | 0.0717 | 0.3691 |
| AN1000 vs CT | 0.8334 | 0.6581 | 0.2416 | 0.4728 | 0.9659 | 0.5137 | 0.6349 | 0.0195* |
| AN1000 vs RESV1 | 0.9576 | 0.0035 * | 0.1020 | 0.7584 | 0.1882 | 0.0659 | 0.7145 | 0.4496 |
| AN1000 vs RESV2 | 0.9020 | <.0001* | 0.9094 | 0.0587 | 0.0602 | 0.8144 | 0.3442 | 0.0224* |
| AN1000 vs RESV5 | 0.7484 | 0.9065 | 0.1128 | 0.3839 | 0.6293 | 0.8548 | 0.2354 | 0.1158 |
| AN1000 vs FRESCO | <.0001* | 0.0004* | 0.2497 | 0.5885 | <.0001* | <.0001* | 0.2139 | 0.0364* |

54

D7

| Comparações entre os grupos | Primordial | | Transicional | | Primario | | Secundário | |
|-----------------------------|------------|------------|--------------|------------|----------|------------|------------|------------|
| | Primordial | Degenerado | Transicional | Degenerado | Primario | Degenerado | Secundário | Degenerado |
| AN1500 vs AN1000 | 0.7780 | 0.3838 | 0.2692 | 0.3839 | 0.0035* | 0.3017 | 0.4912 | 0.7368 |
| AN1500 vs AN2000 | 0.9690 | 0.9218 | 0.1997 | 0.5851 | 0.0004* | 0.7209 | 0.0120* | 0.5605 |
| AN1500 vs CT | 0.9417 | 0.6609 | 0.9459 | 0.8755 | 0.0033* | 0.6970 | 0.2350 | 0.0402* |
| AN1500 vs RESV1 | 0.8151 | 0.0001* | 0.5845 | 0.2289 | <.0001* | 0.0036* | 0.7412 | 0.6673 |
| AN1500 vs RESV2 | 0.8711 | <.0001* | 0.3106 | 0.0051* | <.0001* | 0.4140 | 0.0958 | 0.0458* |
| AN1500 vs RESV5 | 0.9683 | 0.3125 | 0.6202 | 10.000 | 0.0006* | 0.2143 | 0.0562 | 0.2051 |
| AN1500 vs FRESCO | <.0001* | <.0001* | 0.0252* | 0.1621 | <.0001* | 0.0009* | 0.0534 | 0.0699 |

D7

| Comparações entre os grupos | Primordial | | Transicional | | Primario | | Secundário | |
|-----------------------------|------------|------------|--------------|------------|----------|------------|------------|------------|
| | Primordial | Degenerado | Transicional | Degenerado | Primario | Degenerado | Secundário | Degenerado |
| AN2000 vs AN1000 | 0.7535 | 0.4492 | 0.8611 | 0.7500 | 0.5056 | 0.5076 | 0.0717 | 0.3691 |
| AN2000 vs AN1500 | 0.9690 | 0.9218 | 0.1997 | 0.5851 | 0.0004* | 0.7209 | 0.0120* | 0.5605 |
| AN2000 vs CT | 0.9120 | 0.7407 | 0.1776 | 0.6944 | 0.4699 | 0.9811 | 0.1707 | 0.1518 |
| AN2000 vs RESV1 | 0.7890 | 0.0003* | 0.0701 | 0.5269 | 0.5231 | 0.0124* | 0.0279* | 0.8715 |
| AN2000 vs RESV2 | 0.8434 | <.0001* | 0.7699 | 0.0271* | 0.2277 | 0.6582 | 0.3678 | 0.1679 |
| AN2000 vs RESV5 | 10.000 | 0.3734 | 0.0781 | 0.5851 | 0.8434 | 0.3902 | 0.5098 | 0.5095 |
| AN2000 vs FRESCO | <.0001* | <.0001* | 0.3265 | 0.3946 | <.0001* | 0.0003* | 0.6028 | 0.2201 |

55

D7

| Comparações entre os grupos | Primordial | | Transicional | | Primario | | Secundário | |
|-----------------------------|------------|------------|--------------|------------|----------|------------|------------|------------|
| | Primordial | Degenerado | Transicional | Degenerado | Primario | Degenerado | Secundário | Degenerado |
| RESV1 vs AN1000 | 0.9576 | 0.7514 | 0.1020 | 0.7584 | 0.1882 | 0.0659 | 0.7145 | 0.4496 |
| RESV1 vs AN1500 | 0.8151 | 0.5705 | 0.5845 | 0.2289 | <.0001* | 0.0036* | 0.7412 | 0.6673 |
| RESV1 vs AN2000 | 0.7890 | 0.6478 | 0.0701 | 0.5269 | 0.5231 | 0.0124* | 0.0279* | 0.8715 |
| RESV1 vs CT | 0.8724 | 0.8976 | 0.6319 | 0.2949 | 0.1649 | 0.0113* | 0.3905 | 0.1034 |
| RESV1 vs RESV2 | 0.9429 | 0.6647 | 0.1195 | 0.1046 | 0.5601 | 0.0344* | 0.1806 | 0.1156 |
| RESV1 vs RESV5 | 0.7844 | 0.6030 | 0.9591 | 0.2289 | 0.3929 | 0.0899 | 0.1132 | 0.4012 |
| RESV1 vs FRESCO | <.0001* | <.0001* | 0.0060* | 0.8007 | 0.0002* | <.0001* | 0.1049 | 0.1592 |

D7

| Comparações entre os grupos | Primordial | | Transicional | | Primario | | Secundário | |
|-----------------------------|------------|------------|--------------|------------|----------|------------|------------|------------|
| | Primordial | Degenerado | Transicional | Degenerado | Primario | Degenerado | Secundário | Degenerado |
| RESV2 vs AN1000 | 0.9020 | 0.4592 | 0.9094 | 0.0587 | 0.0602 | 0.8144 | 0.3442 | 0.0224* |
| RESV2 vs AN1500 | 0.8711 | 0.8934 | 0.3106 | 0.0051* | <.0001* | 0.4140 | 0.0958 | 0.0458* |
| RESV2 vs AN2000 | 0.8434 | 0.9737 | 0.7699 | 0.0271* | 0.2277 | 0.6582 | 0.3678 | 0.1679 |
| RESV2 vs CT | 0.9290 | 0.7606 | 0.2795 | 0.0081* | 0.0495* | 0.6686 | 0.6293 | 0.9556 |
| RESV2 vs RESV1 | 0.9429 | 0.6647 | 0.1195 | 0.1046 | 0.5601 | 0.0344* | 0.1806 | 0.1156 |
| RESV2 vs RESV5 | 0.8399 | 0.9309 | 0.1321 | 0.0051* | 0.1517 | 0.6694 | 0.8045 | 0.4601 |
| RESV2 vs FRESCO | <.0001* | <.0001* | 0.1989 | 0.1944 | 0.0012* | <.0001* | 0.7280 | 0.9250 |

56

D7

| Comparações entre os grupos | Primordial | | Transicional | | Primario | | Secundário | |
|-----------------------------|------------|------------|--------------|------------|----------|------------|------------|------------|
| | Primordial | Degenerado | Transicional | Degenerado | Primario | Degenerado | Secundário | Degenerado |
| RESV5 vs AN1000 | 0.7484 | 0.4095 | 0.1128 | 0.3839 | 0.6293 | 0.8548 | 0.2354 | 0.1158 |
| RESV5 vs AN1500 | 0.9683 | 0.9623 | 0.6202 | 10.000 | 0.0006* | 0.2143 | 0.0562 | 0.2051 |
| RESV5 vs AN2000 | 10.000 | 0.9586 | 0.0781 | 0.5851 | 0.8434 | 0.3902 | 0.5098 | 0.5095 |
| RESV5 vs CT | 0.9101 | 0.6955 | 0.6688 | 0.8755 | 0.5911 | 0.3929 | 0.4655 | 0.4270 |
| RESV5 vs RESV1 | 0.7844 | 0.6030 | 0.9591 | 0.2289 | 0.3929 | 0.0899 | 0.1132 | 0.4012 |
| RESV5 vs RESV2 | 0.8399 | 0.9309 | 0.1321 | 0.0051* | 0.1517 | 0.6694 | 0.8045 | 0.4601 |
| RESV5 vs FRESCO | <.0001* | <.0001* | 0.0070* | 0.1621 | <.0001* | <.0001* | 0.9110 | 0.5416 |

| Comparações entre os grupos | Primordial | | Transicional | | Primário | | Secundário | |
|-----------------------------|------------|------------|--------------|------------|----------|------------|------------|------------|
| | Primordial | Degenerado | Transicional | Degenerado | Primário | Degenerado | Secundário | Degenerado |
| CT vs AN1000 | 0.8334 | 0.6581 | 0.2416 | 0.4728 | 0.9659 | 0.5137 | 0.6349 | 0.0195* |
| CT vs AN1500 | 0.9417 | 0.6609 | 0.9459 | 0.8755 | 0.0033* | 0.6970 | 0.2350 | 0.0402* |
| CT vs AN2000 | 0.9120 | 0.7407 | 0.1776 | 0.6944 | 0.4699 | 0.9811 | 0.1707 | 0.1518 |
| CT vs RESV1 | 0.8724 | 0.8976 | 0.6319 | 0.2949 | 0.1649 | 0.0113* | 0.3905 | 0.1034 |
| CT vs RESV2 | 0.9290 | 0.7606 | 0.2795 | 0.0081* | 0.0495* | 0.6686 | 0.6293 | 0.9556 |
| CT vs RESV5 | 0.9101 | 0.6955 | 0.6688 | 0.8755 | 0.5911 | 0.3929 | 0.4655 | 0.4270 |
| CT vs FRESCO | <.0001* | <.0001* | 0.0213* | 0.2114 | <.0001* | 0.0002* | 0.4194 | 0.8829 |

Tabela 16. Análise Morfológica Folículos Total. Comparação entre D1 e D7 de cada grupo. (*) p<0,05

| Comparações entre os dias | Primordial Total | Transicional Total | Primário Total | Secundário Total |
|---------------------------|------------------|--------------------|----------------|------------------|
| CT 1 vs 7 | 0.0061 * | 0.0545 | 0.1043 | 0.0870 |
| Resv1 1 vs 7 | <.0001 * | <.0001 * | <.0001 * | 0.7763 |
| Resv2 1 vs 7 | <.0001 * | 0.3671 | <.0001 * | 0.1729 |
| Resv5 1 vs 7 | 0.0025 * | 0.0077 * | 0.0033 * | 0.4565 |
| An1000 1 vs 7 | <.0001 * | 0.1450 | <.0001 * | 0.5603 |
| An1500 1 vs 7 | 0.0006 * | 0.0055 * | <.0001 * | 0.9569 |
| An2000 1 vs 7 | 0.0545 * | 0.4037 | 0.3325 | 0.2574 |
| FRESCO 0 vs 0 | | | | |

D1

| Comparações entre os grupos | Primordial Total | Transicional Total | Primário Total | Secundário Total |
|-----------------------------|------------------|--------------------|----------------|------------------|
| AN1000 vs AN1500 | 0.1148 | 0.9491 | 0.0462* | 0.3763 |
| AN1000 vs AN2000 | 0.0022* | 0.5264 | 0.0115* | 0.8181 |
| AN1000 vs CT | 0.0524 | 0.3884 | 0.0174* | 0.5541 |
| AN1000 vs RESV1 | 0.6457 | 0.1729 | 0.4125 | 0.8756 |
| AN1000 vs RESV2 | 0.0009* | 0.8519 | 0.0047* | 0.9010 |
| AN1000 vs RESV5 | 0.0429* | 0.5462 | 0.1457 | 0.6076 |
| AN1000 vs FRESCO | 0.0175* | 0.8714 | 0.0018* | 0.1035 |

D1

| Comparações entre os grupos | Primordial Total | Transicional Total | Primário Total | Secundário Total |
|-----------------------------|------------------|--------------------|----------------|------------------|
| AN1500 vs AN1000 | 0.1148 | 0.9491 | 0.0462* | 0.3763 |
| AN1500 vs AN2000 | 0.1294 | 0.5689 | 0.5857 | 0.2655 |
| AN1500 vs CT | 0.6870 | 0.4236 | 0.6611 | 0.7839 |
| AN1500 vs RESV1 | 0.0424* | 0.1538 | 0.0052* | 0.4663 |
| AN1500 vs RESV2 | <.0001* | 0.8022 | <.0001* | 0.3132 |
| AN1500 vs RESV5 | 0.6492 | 0.5895 | 0.5851 | 0.1630 |
| AN1500 vs FRESCO | 0.0001* | 0.9196 | <.0001* | 0.0140* |

D1

| Comparações entre os grupos | Primordial Total | Transicional Total | Primário Total | Secundário Total |
|-----------------------------|------------------|--------------------|----------------|------------------|
| AN2000 vs AN1000 | 0.0022* | 0.5264 | 0.0115* | 0.8181 |
| AN2000 vs AN1500 | 0.1294 | 0.5689 | 0.5857 | 0.2655 |
| AN2000 vs CT | 0.2787 | 0.8075 | 0.9244 | 0.4145 |
| AN2000 vs RESV1 | 0.0005* | 0.0468* | 0.0009* | 0.6991 |
| AN2000 vs RESV2 | <.0001* | 0.4124 | <.0001* | 0.9160 |
| AN2000 vs RESV5 | 0.2869 | 0.9760 | 0.2759 | 0.7767 |
| AN2000 vs FRESCO | <.0001* | 0.6583 | <.0001* | 0.1582 |

D1

| Comparações entre os grupos | Primordial Total | Transicional Total | Primário Total | Secundário Total |
|-----------------------------|------------------|--------------------|----------------|------------------|
| RESV1 vs AN1000 | 0.6457 | 0.1729 | 0.4125 | 0.8756 |
| RESV1 vs AN1500 | 0.0424* | 0.1538 | 0.0052* | 0.4663 |
| RESV1 vs AN2000 | 0.0005* | 0.0468* | 0.0009* | 0.6991 |
| RESV1 vs CT | 0.0173* | 0.0290* | 0.0016* | 0.6609 |
| RESV1 vs RESV2 | 0.0041* | 0.2389 | 0.0427* | 0.7787 |
| RESV1 vs RESV5 | 0.0134* | 0.0501 | 0.0237* | 0.5030 |
| RESV1 vs FRESCO | 0.0515 | 0.1442 | 0.0181* | 0.0758 |

D1

| Comparações entre os grupos | Primordial Total | Transicional Total | Primário Total | Secundário Total |
|-----------------------------|------------------|--------------------|----------------|------------------|
| RESV2 vs AN1000 | 0.0009* | 0.8519 | 0.0047* | 0.9010 |
| RESV2 vs AN1500 | <.0001* | 0.8022 | <.0001* | 0.3132 |
| RESV2 vs AN2000 | <.0001* | 0.4124 | <.0001* | 0.9160 |
| RESV2 vs CT | <.0001* | 0.2963 | <.0001* | 0.4758 |
| RESV2 vs RESV1 | 0.0041* | 0.2389 | 0.0427* | 0.7787 |
| RESV2 vs RESV5 | <.0001* | 0.4297 | <.0001* | 0.6972 |
| RESV2 vs FRESCO | 0.4152 | 0.7340 | 0.6602 | 0.1308 |

D1

| Comparações entre os grupos | Primordial Total | Transicional Total | Primário Total | Secundário Total |
|-----------------------------|------------------|--------------------|----------------|------------------|
| RESV5 vs AN1000 | 0.0429* | 0.5462 | 0.1457 | 0.6076 |
| RESV5 vs AN1500 | 0.6492 | 0.5895 | 0.5851 | 0.1630 |
| RESV5 vs AN2000 | 0.2869 | 0.9760 | 0.2759 | 0.7767 |
| RESV5 vs CT | 0.9665 | 0.7848 | 0.3314 | 0.2747 |
| RESV5 vs RESV1 | 0.0134* | 0.0501 | 0.0237* | 0.5030 |
| RESV5 vs RESV2 | <.0001* | 0.4297 | <.0001* | 0.6972 |
| RESV5 vs FRESCO | <.0001* | 0.6791 | <.0001* | 0.2531 |

D1

| Comparações entre os grupos | Primordial Total | Transicional Total | Primário Total | Secundário Total |
|-----------------------------|------------------|--------------------|----------------|------------------|
| CT vs AN1000 | 0.0524 | 0.3884 | 0.0174 | 0.5541 |
| CT vs AN1500 | 0.6870 | 0.4236 | 0.6611 | 0.7839 |
| CT vs AN2000 | 0.2787 | 0.8075 | 0.9244 | 0.4145 |
| CT vs RESV1 | 0.0173* | 0.0290 | 0.0016 | 0.6609 |
| CT vs RESV2 | <.0001* | 0.2963 | <.0001* | 0.4758 |
| CT vs RESV5 | 0.9665 | 0.7848 | 0.3314 | 0.2747 |
| CT vs FRESCO | <.0001* | 0.5055 | <.0001* | 0.0314 |

Tabela 17. Análise Morfológica Folículos Total. Comparação entre os grupos em D7. (*) p<0,05

d7

| Comparações entre os grupos | Primordial Total | Transicional Total | Primário Total | Secundário Total |
|-----------------------------|------------------|--------------------|----------------|------------------|
| AN1000 vs AN1500 | 0.5235 | 0.1790 | 0.1767 | 0.7366 |
| AN1000 vs AN2000 | 0.5428 | 0.9950 | 0.2879 | 0.0586 |
| AN1000 vs CT | 0.7060 | 0.1829 | 0.6018 | 0.0886 |
| AN1000 vs RESV1 | 0.8461 | 0.2033 | 0.5661 | 0.8794 |
| AN1000 vs RESV2 | 0.6521 | 0.4467 | 0.1054 | 0.0425 |
| AN1000 vs RESV5 | 0.5176 | 0.0790 | 0.8349 | 0.0711 |
| AN1000 vs FRESCO | <.0001* | 0.2167 | <.0001* | 0.0321* |

d7

| Comparações entre os grupos | Primordial Total | Transicional Total | Primário Total | Secundário Total |
|-----------------------------|------------------|--------------------|----------------|------------------|
| AN1500 vs AN1000 | 0.5235 | 0.1790 | 0.1767 | 0.7366 |
| AN1500 vs AN2000 | 0.9870 | 0.1769 | 0.0155* | 0.0238* |
| AN1500 vs CT | 0.7895 | 0.9900 | 0.0564 | 0.0377* |
| AN1500 vs RESV1 | 0.6497 | 0.9411 | 0.4251 | 0.6179 |
| AN1500 vs RESV2 | 0.8481 | 0.0322 | 0.0027* | 0.0160* |
| AN1500 vs RESV5 | 0.9925 | 0.6696 | 0.1113 | 0.0291 |
| AN1500 vs FRESCO | <.0001* | 0.0107* | <.0001* | 0.0122* |

d7

| Comparações entre os grupos | Primordial Total | Transicional Total | Primário Total | Secundário Total |
|-----------------------------|------------------|--------------------|----------------|------------------|
| AN2000 vs AN1000 | 0.5428 | 0.9950 | 0.2879 | 0.0586 |
| AN2000 vs AN1500 | 0.9870 | 0.1769 | 0.0155* | 0.0238* |
| AN2000 vs CT | 0.8066 | 0.1808 | 0.5719 | 0.8165 |
| AN2000 vs RESV1 | 0.6687 | 0.2010 | 0.0980 | 0.0748 |
| AN2000 vs RESV2 | 0.8642 | 0.4505 | 0.5907 | 0.9211 |
| AN2000 vs RESV5 | 0.9797 | 0.0779 | 0.3799 | 0.8979 |
| AN2000 vs FRESCO | <.0001* | 0.2190 | <.0001* | 0.7617 |

d7

| Comparações entre os grupos | Primordial Total | Transicional Total | Primário Total | Secundário Total |
|-----------------------------|------------------|--------------------|----------------|------------------|
| RESV1 vs AN1000 | 0.8461 | 0.2033 | 0.5661 | 0.8794 |
| RESV1 vs AN1500 | 0.6497 | 0.9411 | 0.4251 | 0.6179 |
| RESV1 vs AN2000 | 0.6687 | 0.2010 | 0.0980 | 0.0748 |
| RESV1 vs CT | 0.8514 | 0.9512 | 0.2633 | 0.1124 |
| RESV1 vs RESV2 | 0.7928 | 0.0385 | 0.0256 | 0.0547 |
| RESV1 vs RESV5 | 0.6430 | 0.6168 | 0.4240 | 0.0906 |
| RESV1 vs FRESCO | <.0001* | 0.0130* | <.0001* | 0.0412* |

d7

| Comparações entre os grupos | Primordial Total | Transicional Total | Primário Total | Secundário Total |
|-----------------------------|------------------|--------------------|----------------|------------------|
| RESV2 vs AN1000 | 0.6521 | 0.4467 | 0.1054 | 0.0425* |
| RESV2 vs AN1500 | 0.8481 | 0.0322* | 0.0027* | 0.0160* |
| RESV2 vs AN2000 | 0.8642 | 0.4505 | 0.5907 | 0.9211 |
| RESV2 vs CT | 0.9399 | 0.0333* | 0.2601 | 0.7350 |
| RESV2 vs RESV1 | 0.7928 | 0.0385* | 0.0256* | 0.0547 |
| RESV2 vs RESV5 | 0.8408 | 0.0106* | 0.1487 | 0.8162 |
| RESV2 vs FRESCO | <.0001* | 0.6024 | <.0001* | 0.8314 |

d7

| Comparações entre os grupos | Primordial Total | Transicional Total | Primário Total | Secundário Total |
|-----------------------------|------------------|--------------------|----------------|------------------|
| RESV5 vs AN1000 | 0.5176 | 0.0790 | 0.8349 | 0.0711 |
| RESV5 vs AN1500 | 0.9925 | 0.6696 | 0.1113 | 0.0291 |
| RESV5 vs AN2000 | 0.9797 | 0.0779 | 0.3799 | 0.8979 |
| RESV5 vs CT | 0.7823 | 0.6605 | 0.7486 | 0.9156 |
| RESV5 vs RESV1 | 0.6430 | 0.6168 | 0.4240 | 0.0906 |
| RESV5 vs RESV2 | 0.8408 | 0.0106* | 0.1487 | 0.8162 |
| RESV5 vs FRESCO | <.0001* | 0.0032* | <.0001* | 0.6640 |

d7

| Comparações entre os grupos | Primordial Total | Transicional Total | Primário Total | Secundário Total |
|-----------------------------|------------------|--------------------|----------------|------------------|
| CT vs AN1000 | 0.7060 | 0.1829 | 0.6018 | 0.0886 |
| CT vs AN1500 | 0.7895 | 0.9900 | 0.0564 | 0.0377* |
| CT vs AN2000 | 0.8066 | 0.1808 | 0.5719 | 0.8165 |
| CT vs RESV1 | 0.8514 | 0.9512 | 0.2633 | 0.1124 |
| CT vs RESV2 | 0.9399 | 0.0333* | 0.2601 | 0.7350 |
| CT vs RESV5 | 0.7823 | 0.6605 | 0.7486 | 0.9156 |
| CT vs FRESCO | <.0001* | 0.0111* | <.0001* | 0.5924 |

Tabela 18. Imunohistoquímica FOXO3. Comparação entre D1 e D7 de cada grupo. (*) p<0,05

| Comparações entre os dias | Prop. Primordial + | Prop. Primordial - | Prop. Transicional + | Prop. Transicional - | Prop. Primario + | Prop. Primario - | Prop. Secundário + | Prop. Secundário - |
|---------------------------|--------------------|--------------------|----------------------|----------------------|------------------|------------------|--------------------|--------------------|
| CT 1 vs 7 | 0.0010 * | 0.1688 | 0.3437 | 0.0663 | 0.0106 * | 0.4444 | 0.1119 | 0.3292 |
| Resv1 1 vs 7 | 0.5209 | <.0001 * | 0.5374 | <.0001 * | <.0001 * | 0.0203 * | 0.6916 | 0.4331 |
| Resv2 1 vs 7 | 0.0071 * | <.0001 * | 0.8192 | 0.2671 | 0.0013 * | <.0001 * | 0.1285 | 0.7215 |
| Resv5 1 vs 7 | 0.0066 * | 0.0578 | 0.1820 | 0.0114 * | <.0001 * | 0.3300 | 0.7885 | 0.4100 |
| An1000 1 vs 7 | 0.0005 * | 0.0051 * | 0.9909 | 0.0257 * | <.0001 * | 0.3056 | 0.9797 | 0.3861 |
| An1500 1 vs 7 | <.0001 * | 0.0701 | 0.0702 | 0.0202 * | <.0001 * | 0.8514 | 0.6171 | 0.5963 |
| An2000 1 vs 7 | 0.3002 | 0.1406 | 0.4302 | 0.0289 * | 0.0200 * | 0.1684 | 0.9376 | 0.1187 |
| FRESCO 0 vs 0 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

Tabela 19. Imunohistoquímica FOXO3. Comparação entre os grupos em D1. (*) p<0,05

D1

| Comparações entre os grupos | Prop. Primordial + | Prop. Primordial - | Prop. Transicional + | Prop. Transicional - | Prop. Primario + | Prop. Primario - | Prop. Secundário + | Prop. Secundário - |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|----------------------|----------------------|------------------|------------------|--------------------|--------------------|
| AN1000 vs AN1500 | 0.3060 | 0.2447 | 0.9915 | 0.9255 | 0.3182 | 0.1286 | 0.1932 | 0.9454 |
| AN1000 vs AN2000 | 0.0001* | 0.1463 | 0.0728 | 0.2552 | 0.0182* | 0.4855 | 0.5683 | 0.3828 |
| AN1000 vs CT | 0.1024 | 0.2108 | 0.4484 | 0.6661 | 0.3832 | 0.0274* | 0.5181 | 0.8071 |
| AN1000 vs RESV1 | <.0001* | 0.0379* | 0.3365 | 0.0017* | 0.5685 | 0.6561 | 0.3699 | 0.5320 |
| AN1000 vs RESV2 | 0.0189* | <.0001* | 0.8883 | 0.6533 | 0.0309* | 0.1936 | 0.7431 | 0.6237 |
| AN1000 vs RESV5 | 0.0231* | 0.2817 | 0.2870 | 0.7453 | 0.0759 | <.0001* | 0.8645 | 0.3659 |
| AN1000 vs FRESCO | 0.0132* | 0.0010* | 0.8613 | 0.6517 | 0.0312 | 0.0790 | 0.0559 | 0.5857 |

| Comparações entre os grupos | Prop. Primordial + | Prop. Primordial - | Prop. Transicional + | Prop. Transicional - | Prop. Primario + | Prop. Primario - | Prop. Secundário + | Prop. Secundário - |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|----------------------|----------------------|------------------|------------------|--------------------|--------------------|
| AN1500 vs AN1000 | 0.3060 | 0.2447 | 0.9915 | 0.9255 | 0.3182 | 0.1286 | 0.1932 | 0.9454 |
| AN1500 vs AN2000 | 0.0039* | 0.7704 | 0.0745 | 0.2961 | 0.1686 | 0.4088 | 0.4635 | 0.3467 |
| AN1500 vs CT | 0.5244 | 0.9089 | 0.4546 | 0.6011 | 0.9167 | 0.4658 | 0.5296 | 0.8594 |
| AN1500 vs RESV1 | 0.0027* | 0.0013* | 0.3419 | 0.0023* | 0.1177 | 0.0501 | 0.6843 | 0.4881 |
| AN1500 vs RESV2 | 0.1812 | <.0001* | 0.8967 | 0.7220 | 0.0018 | 0.0052* | 0.3294 | 0.5762 |
| AN1500 vs RESV5 | 0.2070 | 0.9306 | 0.2919 | 0.8170 | 0.0059 | 0.0141* | 0.2578 | 0.3309 |
| AN1500 vs FRESCO | 0.1288 | <.0001* | 0.8533 | 0.5889 | 0.0021 | 0.0015* | 0.0018* | 0.5417 |

D1

| Comparações entre os grupos | Prop. Primordial + | Prop. Primordial - | Prop. Transicional + | Prop. Transicional - | Prop. Primario + | Prop. Primario - | Prop. Secundário + | Prop. Secundário - |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|----------------------|----------------------|------------------|------------------|--------------------|--------------------|
| AN2000 vs AN1000 | 0.0001* | 0.1463 | 0.0728 | 0.2552 | 0.0182* | 0.4855 | 0.5683 | 0.3828 |
| AN2000 vs AN1500 | 0.0039* | 0.7704 | 0.0745 | 0.2961 | 0.1686 | 0.4088 | 0.4635 | 0.3467 |
| AN2000 vs CT | 0.0272* | 0.8642 | 0.3159 | 0.1233 | 0.1469 | 0.1252 | 0.9295 | 0.2728 |
| AN2000 vs RESV1 | 0.9086 | 0.0005* | 0.4012 | 0.0425* | 0.0036* | 0.2538 | 0.7438 | 0.8038 |
| AN2000 vs RESV2 | 0.1143 | <.0001* | 0.0978 | 0.4901 | <.0001* | 0.0466* | 0.8080 | 0.7018 |
| AN2000 vs RESV5 | 0.0980 | 0.7048 | 0.4619 | 0.4155 | <.0001* | 0.0012* | 0.6891 | 0.9748 |
| AN2000 vs FRESCO | 0.2067 | <.0001* | 0.0596 | 0.1253 | <.0001* | 0.0160* | 0.0145* | 0.7735 |

68

D1

| Comparações entre os grupos | Prop. Primordial + | Prop. Primordial - | Prop. Transicional + | Prop. Transicional - | Prop. Primario + | Prop. Primario - | Prop. Secundário + | Prop. Secundário - |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|----------------------|----------------------|------------------|------------------|--------------------|--------------------|
| RESV1 vs AN1000 | <.0001* | 0.0379* | 0.3365 | 0.0017* | 0.5685 | 0.6561 | 0.3699 | 0.5320 |
| RESV1 vs AN1500 | 0.0027* | 0.0013* | 0.3419 | 0.0023* | 0.1177 | 0.0501 | 0.6843 | 0.4881 |
| RESV1 vs AN2000 | 0.9086 | 0.0005* | 0.4012 | 0.0425* | 0.0036* | 0.2538 | 0.7438 | 0.8038 |
| RESV1 vs CT | 0.0204* | 0.0012* | 0.8552 | 0.0005* | 0.1537 | 0.0085* | 0.8172 | 0.3927 |
| RESV1 vs RESV2 | 0.0905 | 0.0353* | 0.4116 | 0.0069* | 0.1104 | 0.3915 | 0.5689 | 0.8929 |
| RESV1 vs RESV5 | 0.0771 | 0.0018* | 0.9172 | 0.0048* | 0.2262 | <.0001* | 0.4676 | 0.7795 |
| RESV1 vs FRESCO | 0.1703 | 0.1749 | 0.2755 | 0.0006* | 0.1054 | 0.1815 | 0.0060* | 0.9594 |

D1

| Comparações entre os grupos | Prop. Primordial + | Prop. Primordial - | Prop. Transicional + | Prop. Transicional - | Prop. Primario + | Prop. Primario - | Prop. Secundário + | Prop. Secundário - |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|----------------------|----------------------|------------------|------------------|--------------------|--------------------|
| RESV2 vs AN1000 | 0.0189* | <.0001* | 0.8883 | 0.6533 | 0.0309* | 0.1936 | 0.7431 | 0.6237 |
| RESV2 vs AN1500 | 0.1812 | <.0001* | 0.8967 | 0.7220 | 0.0018* | 0.0052* | 0.3294 | 0.5762 |
| RESV2 vs AN2000 | 0.1143 | <.0001* | 0.0978 | 0.4901 | <.0001* | 0.0466* | 0.8080 | 0.7018 |
| RESV2 vs CT | 0.5004 | <.0001* | 0.5346 | 0.3842 | 0.0031* | 0.0006* | 0.7443 | 0.4694 |
| RESV2 vs RESV1 | 0.0905 | 0.0353* | 0.4116 | 0.0069* | 0.1104 | 0.3915 | 0.5689 | 0.8929 |
| RESV2 vs RESV5 | 0.9394 | <.0001* | 0.3551 | 0.9009 | 0.6970 | <.0001* | 0.8752 | 0.6785 |
| RESV2 vs FRESCO | 0.8058 | 0.5094 | 0.7576 | 0.3794 | 0.9220 | 0.6019 | 0.0265* | 0.9383 |

69

D1

| Comparações entre os grupos | Prop. Primordial + | Prop. Primordial - | Prop. Transicional + | Prop. Transicional - | Prop. Primario + | Prop. Primario - | Prop. Secundário + | Prop. Secundário - |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|----------------------|----------------------|------------------|------------------|--------------------|--------------------|
| RESV5 vs AN1000 | 0.0231* | 0.2817 | 0.2870 | 0.7453 | 0.0759 | <.0001* | 0.8645 | 0.3659 |
| RESV5 vs AN1500 | 0.2070 | 0.9306 | 0.2919 | 0.8170 | 0.0059* | 0.0141* | 0.257 | 0.3309 |
| RESV5 vs AN2000 | 0.0980 | 0.7048 | 0.4619 | 0.4155 | <.0001* | 0.0012* | 0.6891 | 0.9748 |
| RESV5 vs CT | 0.5487 | 0.8418 | 0.7763 | 0.4540 | 0.0096* | 0.0921 | 0.6315 | 0.2596 |
| RESV5 vs RESV1 | 0.0771 | 0.0018* | 0.9172 | 0.0048* | 0.2262 | <.0001* | 0.4676 | 0.7795 |
| RESV5 vs RESV2 | 0.9394 | <.0001* | 0.3551 | 0.9009 | 0.6970 | <.0001* | 0.8752 | 0.6785 |
| RESV5 vs FRESCO | 0.7503 | <.0001* | 0.2344 | 0.4469 | 0.6390 | <.0001* | 0.0383* | 0.7506 |

| Comparações entre os grupos | Prop. Primordial + | Prop. Primordial - | Prop. Transicional + | Prop. Transicional - | Prop. Primario + | Prop. Primario - | Prop. Secundário + | Prop. Secundário - |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|----------------------|----------------------|------------------|------------------|--------------------|--------------------|
| CT vs AN1000 | 0.1024 | 0.2108 | 0.4484 | 0.6661 | 0.3832 | 0.0274* | 0.5181 | 0.8071 |
| CT vs AN1500 | 0.5244 | 0.9089 | 0.4546 | 0.6011 | 0.9167 | 0.4658 | 0.5296 | 0.8594 |
| CT vs AN2000 | 0.0272* | 0.8642 | 0.3159 | 0.1233 | 0.1469 | 0.1252 | 0.9295 | 0.2728 |
| CT vs RESV1 | 0.0204* | 0.0012* | 0.8552 | 0.0005* | 0.1537 | 0.0085* | 0.8172 | 0.3927 |
| CT vs RESV2 | 0.5004 | <.0001* | 0.5346 | 0.3842 | 0.0031* | 0.0006* | 0.7443 | 0.4694 |
| CT vs RESV5 | 0.5487 | 0.8418 | 0.7763 | 0.4540 | 0.0096* | 0.0921 | 0.6315 | 0.2596 |
| CT vs FRESCO | 0.3767 | <.0001* | 0.3708 | 0.9759 | 0.0035* | 0.0002* | 0.0132* | 0.4431 |

Tabela 20. Imunohistoquímica FOXO3. Comparação entre os grupos em D7. (*) p<0,05

D7

| Comparações entre os grupos | Prop. Primordial + | Prop. Primordial - | Prop. Transicional + | Prop. Transicional - | Prop. Primario + | Prop. Primario - | Prop. Secundário + | Prop. Secundário - |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|----------------------|----------------------|------------------|------------------|--------------------|--------------------|
| AN1000 vs AN1500 | 0.1812 | 0.9301 | 0.0730 | 0.9619 | 0.1809 | 0.7780 | 0.4172 | 0.7776 |
| AN1000 vs AN2000 | 0.1904 | 0.9441 | 0.3356 | 0.2564 | 0.8190 | 0.0927 | 0.6209 | 0.0015* |
| AN1000 vs CT | 0.1582 | 0.8430 | 0.0871 | 0.9757 | 0.3244 | 0.6676 | 0.3563 | 0.1108 |
| AN1000 vs RESV1 | 0.2973 | 0.8166 | 0.1210 | 0.8787 | 0.9621 | 0.4087 | 0.6065 | 0.4768 |
| AN1000 vs RESV2 | 0.1582 | 0.8999 | 0.7097 | 0.1112 | 0.0009* | 0.0712 | 0.2529 | 0.0912 |
| AN1000 vs RESV5 | 0.1741 | 0.9301 | 0.0191* | 0.9463 | 0.0546 | 0.0546 | 0.9442 | 0.0112* |
| AN1000 vs FRESCO | 0.3425 | <.0001* | 0.8726 | 0.0898 | <.0001* | 0.0073* | 0.0643 | 0.1740 |

D7

| Comparações entre os grupos | Prop. Primordial + | Prop. Primordial - | Prop. Transicional + | Prop. Transicional - | Prop. Primario + | Prop. Primario - | Prop. Secundário + | Prop. Secundário - |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|----------------------|----------------------|------------------|------------------|--------------------|--------------------|
| AN1500 vs AN1000 | 0.1812 | 0.9301 | 0.0730 | 0.9619 | 0.1809 | 0.7780 | 0.4172 | 0.7776 |
| AN1500 vs AN2000 | 0.9995 | 0.9871 | 0.4147 | 0.2663 | 0.2688 | 0.0461* | 0.7592 | 0.0030* |
| AN1500 vs CT | 0.9390 | 0.7701 | 0.9323 | 0.9362 | 0.0182* | 0.8801 | 0.0773 | 0.1788 |
| AN1500 vs RESV1 | 0.7617 | 0.7438 | 0.8021 | 0.8376 | 0.1568 | 0.5775 | 0.7617 | 0.6607 |
| AN1500 vs RESV2 | 0.9390 | 0.8272 | 0.1453 | 0.1141 | <.0001* | 0.1189 | 0.0466* | 0.1495 |
| AN1500 vs RESV5 | 0.9818 | 1000 | 0.5658 | 0.9841 | 0.0010* | 0.0929 | 0.3677 | 0.0209* |
| AN1500 vs FRESCO | 0.0239* | <.0001* | 0.0562 | 0.0920 | <.0001* | 0.0027* | 0.0078* | 0.2654 |

D7

| Comparações entre os grupos | Prop. Primordial + | Prop. Primordial - | Prop. Transicional + | Prop. Transicional - | Prop. Primario + | Prop. Primario - | Prop. Secundário + | Prop. Secundário - |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|----------------------|----------------------|------------------|------------------|--------------------|--------------------|
| AN2000 vs AN1000 | 0.1904 | 0.9441 | 0.3356 | 0.2564 | 0.8190 | 0.0927 | 0.6209 | 0.0015* |
| AN2000 vs AN1500 | 0.9995 | 0.9871 | 0.4147 | 0.2663 | 0.2688 | 0.0461* | 0.7592 | 0.0030* |
| AN2000 vs CT | 0.9408 | 0.7874 | 0.4637 | 0.2342 | 0.2232 | 0.0324* | 0.1542 | 0.0929 |
| AN2000 vs RESV1 | 0.7663 | 0.7615 | 0.5680 | 0.1899 | 0.7786 | 0.0115* | 0.9921 | 0.0107* |
| AN2000 vs RESV2 | 0.9408 | 0.8435 | 0.5404 | 0.6621 | 0.0004* | 0.0005* | 0.1001 | 0.1128 |
| AN2000 vs RESV5 | 0.9827 | 0.9871 | 0.1693 | 0.2747 | 0.0315* | 0.0003* | 0.5652 | 0.4668 |
| AN2000 vs FRESCO | 0.0267* | <.0001* | 0.2716 | 0.5526 | <.0001* | 0.2892 | 0.0201* | 0.0768 |

D7

| Comparações entre os grupos | Prop. Primordial + | Prop. Primordial - | Prop. Transicional + | Prop. Transicional - | Prop. Primario + | Prop. Primario - | Prop. Secundário + | Prop. Secundário - |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|----------------------|----------------------|------------------|------------------|--------------------|--------------------|
| RESV1 vs AN1000 | 0.2973 | 0.8166 | 0.1210 | 0.8787 | 0.9621 | 0.4087 | 0.6065 | 0.4768 |
| RESV1 vs AN1500 | 0.7617 | 0.7438 | 0.8021 | 0.8376 | 0.1568 | 0.5775 | 0.7617 | 0.6607 |
| RESV1 vs AN2000 | 0.7663 | 0.7615 | 0.5680 | 0.1899 | 0.7786 | 0.0115* | 0.9921 | 0.0107* |
| RESV1 vs CT | 0.7042 | 0.9724 | 0.8684 | 0.9006 | 0.3374 | 0.6844 | 0.1425 | 0.3640 |
| RESV1 vs RESV2 | 0.7042 | 0.9136 | 0.2271 | 0.0747 | 0.0008* | 0.3142 | 0.0908 | 0.3149 |
| RESV1 vs RESV5 | 0.7444 | 0.7438 | 0.4097 | 0.8221 | 0.0553 | 0.2593 | 0.5497 | 0.0602 |
| RESV1 vs FRESCO | 0.0482* | <.0001* | 0.0942 | 0.0604 | <.0001* | 0.0005* | 0.0173* | 0.4860 |

D7

| Comparações entre os grupos | Prop. Primordial + | Prop. Primordial - | Prop. Transicional + | Prop. Transicional - | Prop. Primario + | Prop. Primario - | Prop. Secundário + | Prop. Secundário - |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|----------------------|----------------------|------------------|------------------|--------------------|--------------------|
| RESV2 vs AN1000 | 0.1582 | 0.8999 | 0.7097 | 0.1112 | 0.0009* | 0.0712 | 0.2529 | 0.0912 |
| RESV2 vs AN1500 | 0.9390 | 0.8272 | 0.1453 | 0.1141 | <.0001* | 0.1189 | 0.0466* | 0.1495 |
| RESV2 vs AN2000 | 0.9408 | 0.8435 | 0.5404 | 0.6621 | 0.0004* | 0.0005* | 0.1001 | 0.1128 |
| RESV2 vs CT | 1000 | 0.9411 | 0.1700 | 0.0971 | 0.0155* | 0.1585 | 0.8205 | 0.9222 |
| RESV2 vs RESV1 | 0.7042 | 0.9136 | 0.2271 | 0.0747 | 0.0008* | 0.3142 | 0.0908 | 0.3149 |
| RESV2 vs RESV5 | 0.9572 | 0.8272 | 0.0430* | 0.1187 | 0.1416 | 0.9026 | 0.2723 | 0.3779 |
| RESV2 vs FRESCO | 0.0198* | <.0001* | 0.5986 | 0.8571 | 0.0016* | <.0001* | 0.4354* | 0.7929 |

D7

| Comparações entre os grupos | Prop. Primordial + | Prop. Primordial - | Prop. Transicional + | Prop. Transicional - | Prop. Primario + | Prop. Primario - | Prop. Secundário + | Prop. Secundário - |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|----------------------|----------------------|------------------|------------------|--------------------|--------------------|
| RESV5 vs AN1000 | 0.1741 | 0.9301 | 0.0191* | 0.9463 | 0.0546 | 0.0546 | 0.9442 | 0.0112* |
| RESV5 vs AN1500 | 0.9818 | 1000 | 0.5658 | 0.9841 | 0.0010* | 0.0929 | 0.3677 | 0.0209* |
| RESV5 vs AN2000 | 0.9827 | 0.9871 | 0.1693 | 0.2747 | 0.0315* | 0.0003* | 0.5652 | 0.4668 |
| RESV5 vs CT | 0.9572 | 0.7701 | 0.5099 | 0.9203 | 0.3344 | 0.1257 | 0.3833 | 0.3275 |
| RESV5 vs RESV1 | 0.7444 | 0.7438 | 0.4097 | 0.8221 | 0.0553 | 0.2593 | 0.5497 | 0.0602 |
| RESV5 vs RESV2 | 0.9572 | 0.8272 | 0.0430* | 0.1187 | 0.1416 | 0.9026 | 0.2723 | 0.3779 |
| RESV5 vs FRESCO | 0.0226* | <.0001* | 0.0145* | 0.0957 | <.0001* | <.0001* | 0.0687 | 0.2703 |

D7

| Comparações entre os grupos | Prop. Primordial + | Prop. Primordial - | Prop. Transicional + | Prop. Transicional - | Prop. Primario + | Prop. Primario - | Prop. Secundário + | Prop. Secundário - |
|-----------------------------|--------------------|--------------------|----------------------|----------------------|------------------|------------------|--------------------|--------------------|
| CT vs AN1000 | 0.1582 | 0.8430 | 0.0871 | 0.9757 | 0.3244 | 0.6676 | 0.3563 | 0.1108 |
| CT vs AN1500 | 0.9390 | 0.7701 | 0.9323 | 0.9362 | 0.0182* | 0.8801 | 0.0773 | 0.1788 |
| CT vs AN2000 | 0.9408 | 0.7874 | 0.4637 | 0.2342 | 0.2232 | 0.0324* | 0.1542 | 0.0929 |
| CT vs RESV1 | 0.7042 | 0.9724 | 0.8684 | 0.9006 | 0.3374 | 0.6844 | 0.1425 | 0.3640 |
| CT vs RESV2 | 10000 | 0.9411 | 0.1700 | 0.0971 | 0.0155* | 0.1585 | 0.8205 | 0.9222 |
| CT vs RESV5 | 0.9572 | 0.7701 | 0.5099 | 0.9203 | 0.3344 | 0.1257 | 0.3833 | 0.3275 |
| CT vs FRESCO | 0.0198* | <.0001* | 0.0673 | 0.0784 | <.0001* | 0.0017* | 0.3194 | 0.8655 |



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CEUA
FMRP-USP
Comissão de Ética no Uso de Animais
Replacement | Reduction | Refinement

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo intitulado “*Efeitos da suplementação dos antioxidantes anetol e resveratrol no metabolismo oxidativo de tecido ovariano bovino cultivado in vitro*”, registrado com o número **216/2018**, sob a responsabilidade da **Profa. Dra. Ana Carolina Japur de Sá Rosa e Silva**, envolvendo a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos) para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo em reunião de 26 de novembro de 2018.

Este Protocolo prevê a utilização de 20 *Bos taurus* fêmeas pesando 300000g oriundos da Barra Mansa comércio de carnes e derivados limitada. Vigência da autorização: 26/11/2018 a 08/12/2020.

We certify that the Protocol *n° 216/2018*, entitled “*Effects of antioxidants anetol and resveratrol supplementation in the oxidative metabolism of ovarian bovine tissue cultivated in vitro*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in *11/26/2018*. This protocol involves the production, maintenance or use of animals from *phylum Chordata, subphylum Vertebrata* (except humans) for research purposes, and includes the use of 20 male *Bos taurus* females weighing 300000g from the Barra Mansa trade in meat and by-products limited. This certificate is valid until 12/08/2020.

Ribeirão Preto, 26 de novembro de 2018


Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Coordenador da CEUA-FMRP – USP