

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS
BOVINOS ASSOCIADO À NANOPARTÍCULAS E
LEVITAÇÃO MAGNÉTICA**

Deize de Cássia Antonino

Bióloga

UBERLÂNDIA

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS
BOVINOS ASSOCIADO À NANOPARTÍCULAS E
LEVITAÇÃO MAGNÉTICA**

Deize de Cássia Antonino

Orientador: Prof. Dr. José Octávio Jacomini

Coorientadores: Dra. Kele Amaral Alves

Dr. Luis Alberto Vieira

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – UFU, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias (Biotécnicas e Eficiência Reprodutiva).

UBERLÂNDIA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

A635c Antonino, Deize de Cássia, 1991
2017 Cultivo in vitro de folículos pré-antrais bovinos associado à
nanopartículas e levitação magnética / Deize de Cássia Antonino. - 2017.
71 f. : il.

Orientador: José Octávio Jacomini.

Coorientadora: Kele Amaral Alves.

Coorientador: Luis Alberto Vieira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Inclui bibliografia.

1. Veterinária - Teses. 2. Bovino - Reprodução - Teses. 3.
Fertilização in vitro - Teses. 4. Nanopartículas - Teses. I. Jacomini, José
Octávio. II. Alves, Kele Amaral, 1975-. III. Vieira, Luis Alberto. IV.
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias. V. Título.

CDU: 619

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Deize de Cássia Antonino – nascida na cidade de Guariba, Estado de São Paulo aos vinte e nove dias do mês de março de um mil novecentos e noventa e um. Ingressou no curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) no segundo semestre de 2009, tendo concluído o curso em janeiro de 2013. Foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) na modalidade DTI-C – Desenvolvimento Tecnológico Industrial na empresa Geneal em Uberaba-MG, no período de dezembro de 2013 a janeiro de 2015. Em dezembro de 2014 foi aprovada no processo seletivo de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (Mestrado) da UFU, na área de Produção Animal com linha de pesquisa em Biotécnicas e Eficiência Reprodutiva. Ingressou no Mestrado em março de 2015, onde foi bolsista pela Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) no período de março de 2015 a fevereiro de 2016. Em sistema de dedicação exclusiva à Pós-Graduação durante todo o período, trabalhou com produção *in vitro* de embriões bovinos e cultivo de folículos pré-antrais isolados ou *in situ* de animais adultos e fetos bovinos.

“Toda decisão acertada é proveniente de experiência. E toda experiência é proveniente de uma decisão não acertada.”
(Albert Einstein)

Dedico esta dissertação aos meus pais Augusto e Antonia, as minhas irmãs Mislaine e Marcela e ao meu sobrinho Luan por todo o apoio, amor, orações, companheirismo e paciência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, a Nossa Senhora e a Santa Rita de Cássia por terem me guiado pelos caminhos que percorri e me acalmarem nos momentos difíceis nos quais pensei em desistir de todos os meus sonhos.

Aos meus pais, Augusto Antonino e Antonia Antonino, às minhas irmãs, Mislaine Firmino e Marcela Antonino, ao meu sobrinho Luan Antonino Firmino e ao meu cunhado Edilson Firmino pelo amor, carinho, exemplos e força que sempre me deram. Se hoje estou conquistando mais um sonho, saibam que vocês foram a principal motivação para superar os obstáculos. Essa vitória é de todos. Amo muito vocês.

Às famílias Carvalho e Mazeti, por me apoiarem e incentivarem a não desistir de lutar.

Aos meus amigos Eliziane Veríssimo, Evelyn Benati, Henrique Magalhães, Kamila Mariconi, Priscilla Flávia, Tamara Finarde e Wêrana Silva, pelo amparo e amizade mesmo a distância.

Às novas amizades que o mestrado me permitiu construir: Amanda Lima, Eriky Tongu, Erisson Moura, Eros Mendonça, Jairo de Melo Junior, Luiz Borges, Paula Batista, Mayara Mafra, Mayara Oliveira, Sara Hiraiwa, Renata Mohallem e Virgínia Rodrigues. Vocês foram e são muito importantes.

Aos professores da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, em especial a Dra. Mariângela Cintra, Dr. Afonso Pelli, Dra. Patrícia Buranello, Dra. Ana Daniela Lopes, Dra. Mariângela Tambellini pelos ensinamentos acadêmicos e pessoais que me tornaram mais persistente e decidida.

Aos colegas que conheci na empresa Geneal, em especial a Regina Almeida, Carla Alves, Paulo Lemos, Tiago Diesel, Emivaldo Siqueira Filho, Sílvia Dias, Júlio Silva, Vanessa Silva, Luísa Marinelli, Warlei Carneiro, Álvaro Leme e Dr. Rodolfo Rumpf que mesmo indiretamente ajudaram no desenvolvimento da minha vida acadêmica e profissional.

Aos professores e colegas da Universidade Federal de Uberlândia e do Instituto Federal do Triângulo Mineiro, Universidade Estadual do Ceará pelo apoio no desenvolvimento desse trabalho e pelas experiências compartilhadas, em especial ao Dr. Marcelo Beletti, Dr. José Ricardo Figueiredo, Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, Dr. Benner Alves, Dr. Rodrigo Rossi, Dra. Renata Zanon, Dr. Emílio Pereira, Aline Borges e Pedro Nogueira.

Aos professores do Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal de Uberlândia, Dr. Gustavo Macedo e Dra. Teresinha Assumpção pelos conhecimentos, e em especial a Dra. Ricarda Maria dos Santos pelo carinho e atenção nos momentos que mais precisava de apoio. Agradeço também às técnicas Maria Silva e Graciele Cardoso pela colaboração.

Agradeço em especial ao meu orientador Dr. José Jacomini e aos meus coorientadores Dra. Kele Alves e Dr. Luis Vieira pela oportunidade, orientação, paciência, conselhos, amizade, compreensão e confiança em mim depositada.

Aos alunos de iniciação científica pelo apoio e amizade: Aparecida Castro, Bárbara Rizoto, Igor Carrijo, Luciana Ribeiro, Rodolfo Fernandes, Susi Kloster e Tatiane Maia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro concedido para custear a execução do projeto.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação esquemática dos sistemas de cultivo bidimensional e tridimensional para folículos pré-antrais bovinos.....26
- Figura 2.** Imagem ilustrativa da mensuração do diâmetro folicular realizada no programa HLImage ++.....39
- Figura 3.** Porcentagem de folículos normais bovinos submetidos ao cultivo *in vitro* nos sistemas 2D (controle) e 3D por levitação com diferentes concentrações (50, 100 e 200 $\mu\text{L/mL}$) de nanopartículas compostas de ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina.....43
- Figura 4.** Porcentagem de folículos extrusos bovinos durante o cultivo *in vitro* nos sistemas 2D (controle) e 3D por levitação com diferentes concentrações (50, 100 e 200 $\mu\text{L/mL}$) de nanopartículas compostas de ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina.....44
- Figura 5.** Porcentagem de folículos degenerados bovinos durante o cultivo *in vitro* nos sistemas 2D (controle) e 3D por levitação com diferentes concentrações (50, 100 e 200 $\mu\text{L/mL}$) de nanopartículas compostas de ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina.....45
- Figura 6.** Diâmetro médio (\pm epm) de folículos normais bovinos durante o cultivo *in vitro* nos sistemas 2D (controle) e 3D por levitação com diferentes concentrações (50, 100 e 200 $\mu\text{L/mL}$) de nanopartículas compostas de ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina. Comparação entre os tratamentos: (A) controle vs. 50 $\mu\text{L/mL}$; (B) controle vs. 100 $\mu\text{L/mL}$; (C) controle vs. 200 $\mu\text{L/mL}$; (D) 50 vs. 100 $\mu\text{L/mL}$; (E) 50 vs. 200 $\mu\text{L/mL}$; (D) 100 vs. 200 $\mu\text{L/mL}$42

Figura 7. Representação da taxa de crescimento ($\mu\text{m}/\text{dia}$) de folículos normais bovinos e valores de variância e desvio padrão determinados após o cultivo *in vitro* nos sistemas 2D (controle) e 3D por levitação com diferentes concentrações (50, 100 e 200 $\mu\text{L}/\text{mL}$) de nanopartículas compostas de ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina.....48

Figura 8. (A) Representação de folículos classificados de acordo com a categoria de crescimento (ausente: -37,1 a 0,0 $\mu\text{m}/\text{dia}$; lento: 0,1 a 7,0 $\mu\text{m}/\text{dia}$; rápido: 7,1 a 29,8 $\mu\text{m}/\text{dia}$). (B) Distribuição da categoria de crescimento folicular após o cultivo *in vitro* nos sistemas 2D (controle) e 3D por levitação com diferentes concentrações (50, 100 e 200 $\mu\text{L}/\text{mL}$) de nanopartículas compostas de ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina.....49

Figura 9. Porcentagem de formação de antro durante o cultivo *in vitro* nos sistemas 2D (controle) e 3D por levitação com diferentes concentrações (50, 100 e 200 $\mu\text{L}/\text{mL}$) de nanopartículas compostas de ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina.....53

Figura 10. (A) Análise de regressão linear entre a condição folicular e a taxa de crescimento ($\mu\text{m}/\text{dia}$) após o cultivo *in vitro*. Cada círculo no gráfico representa um folículo avaliado ($n = 208$). A análise de regressão está representada pela reta (linha preta) e fórmula [condição folicular = $1,623 + (0,0215 \times \text{taxa de crescimento folicular})$]; $r = 0,25$; $R^2 = 0,06$; $P < 0,001$. (B) Frequência de distribuição da condição folicular após o cultivo *in vitro* nos sistemas 2D (controle) e 3D por levitação com diferentes concentrações (50, 100 e 200 $\mu\text{L}/\text{mL}$) de nanopartículas compostas de ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina.....54

Figura 11. Variáveis (média \pm epm) determinadas em folículos pré-antrais bovinos [(A) período de dias; (B) diâmetro folicular; e (C) diâmetro folicular relativo] no momento da

formação do antro durante o cultivo *in vitro* nos sistemas 2D (controle) e 3D por levitação com diferentes concentrações (50, 100 e 200 $\mu\text{L/mL}$) de nanopartículas compostas de ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina. (D) Efeito do tratamento e do período da formação do antro sobre a porcentagem de folículos normais ao final do cultivo *in vitro* (Dia 16).....56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Taxa de crescimento diário (média \pm epm) de folículos pré-antrais normais bovinos durante o cultivo <i>in vitro</i> nos sistemas 2D (controle) e 3D por levitação magnética com diferentes concentrações (50, 100 e 200 μ L/mL) de nanopartículas.....	47
Tabela 2. Razão de possibilidades (<i>Odds ratio</i>) para formação de antro durante o cultivo folicular <i>in vitro</i> de acordo com a categoria de crescimento folicular (ausente, lento e rápido).....	50
Tabela 3. Razão de possibilidades (<i>Odds ratio</i>) para formação e manutenção do antro de acordo com o cultivo folicular <i>in vitro</i> nos sistemas 2D (controle) e 3D por levitação magnética com diferentes concentrações (50, 100 e 200 μ L/mL) de nanopartículas.....	51
Tabela 4. Razão de possibilidades (<i>Odds ratio</i>) para extrusão e/ou degeneração folicular de acordo com o cultivo <i>in vitro</i> nos sistemas 2D (controle) e 3D por levitação magnética com diferentes concentrações (50, 100 e 200 μ L/mL) de nanopartículas.....	52
Tabela 5. Percentual de recuperação ovocitária, viabilidade ovocitária, retomada meiótica, vesícula germinativa (VG), quebra da vesícula germinativa (VGBD), metáfase I (MI) e metáfase II (MII) de ovócitos de folículos pré-antrais cultivados <i>in vitro</i> nos sistemas 2D (controle) e 3D por levitação com diferentes concentrações (50, 100 e 200 μ L/mL) de nanopartículas.....	57

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 OVOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE	17
2.2 MOIFOPA	20
2.3 SISTEMAS DE CULTIVO IN VITRO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS	20
2.4 SISTEMA DE CULTIVO 2D	21
2.5 SISTEMA DE CULTIVO 3D	22
2.5.1 <i>Hidrogéis de alginato</i>	23
2.5.2 <i>Matrigel</i>	24
2.5.3 <i>PEG</i>	24
2.5.4 <i>Nanopartículas</i>	25
2.6 CULTIVO EM 3D POR LEVITAÇÃO MAGNÉTICA	25
2.7 TÉCNICAS PARA AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO CULTIVO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS IN VITRO	27
3 JUSTIFICATIVA	29
4 HIPÓTESES CIENTÍFICAS	30
5 OBJETIVO GERAL	31
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
6 MATERIAIS E MÉTODOS	32
6.1 REAGENTES QUÍMICOS E MEIOS	32
6.2 COLETA E TRANSPORTE DOS OVÁRIOS BOVINOS	32
6.3 DESENHO EXPERIMENTAL	33
6.4 ISOLAMENTO DOS FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS SECUNDÁRIOS	33

6.5 CULTIVO IN VITRO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS SECUNDÁRIOS: MÉTODO CONVENCIONAL (2D) E TRIDIMENSIONAL (3D, NANOPARTÍCULAS + LEVITAÇÃO MAGNÉTICA)	34
6.6 A AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E DO DESENVOLVIMENTO FOLICULAR IN VITRO.....	35
6.7 MATURAÇÃO IN VITRO DOS COMPLEXOS-CUMULUS-OVÓCITOS (COCs)	36
6.8 AVALIAÇÕES DA MATURAÇÃO IN VITRO DOS COCS	37
6.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
7. RESULTADOS	39
7.1 MORFOLOGIA FOLICULAR	39
7.2 <i>DIÂMETRO, TAXA DE CRESCIMENTO DIÁRIA E CATEGORIAS DE CRESCIMENTO FOLICULAR</i>	42
7.3 FORMAÇÃO DO ANTRO, EXTRUSÃO E DEGENERAÇÃO FOLICULAR.....	46
7.4 MATURAÇÃO IN VITRO	53
8 DISCUSSÃO	55
REFERÊNCIAS	59

CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS BOVINOS ASSOCIADO À NANOPARTÍCULAS E LEVITAÇÃO MAGNÉTICA

RESUMO – Objetivou-se avaliar o desenvolvimento dos folículos secundários de bovinos no cultivo *in vitro* em sistema 3D de nanopartículas (ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina) associadas a levitação magnética com três concentrações (50, 100 e 200 $\mu\text{L/mL}$) comparado ao cultivo *in vitro* 2D (controle, cultivo tradicional em placa) durante 16 dias. Foram coletados 60 ovários bovinos e a microdissecção dos folículos pré-antrais secundários 200 μm a 400 μm de diâmetro foi feita a partir dos fragmentos do córtex ovariano de forma manual. Em seguida, os folículos isolados foram transferidos de forma individual para microtubos que continham meio de cultivo. Para os tratamentos de cultura em 3D, foram adicionadas as nanopartículas de acordo com as concentrações propostas. Após 12 horas de incubação, os folículos foram transferidos para placas de 24 poços com meio de cultivo e permaneceram novamente na estufa por 16 dias. Ao final do cultivo, os ovócitos foram maturados *in vitro* por 22-24 horas. Um total de 213 folículos pré-antrais foram selecionados para o cultivo *in vitro* e distribuídos aleatoriamente nos tratamentos. O tratamento 200 $\mu\text{L/mL}$ apresentou redução ($P < 0,05$) na viabilidade folicular apenas a partir do D12 e ao final do cultivo (D16), a maior proporção de folículos viáveis ($P < 0,05$) foi observada neste grupo. Os tratamentos com as maiores concentrações de nanopartículas apresentaram as menores taxas de extrusão ovocitária e maior proporção de formação de antro. Além disso, dentro da categoria de crescimento lento, uma porcentagem de superior folículos ($P < 0,05$) foi observada no grupo 200 $\mu\text{L/mL}$. Os folículos do grupo controle apresentaram 6 vezes mais chances ($P < 0,05$) de degeneração e/ou extrusão folicular quando comparado ao 200 $\mu\text{L/mL}$. Adicionalmente, a taxa de viabilidade ovocitária na maturação *in vitro* foi superior ($P < 0,05$) no tratamento de 200 $\mu\text{L/mL}$ apenas os ovócitos desenvolvidos no cultivo 3D alcançaram a fase de MI após a retomada da meiose. Finalmente, concluiu-se que o sistema de cultivo tridimensional com nanopartículas associadas a levitação magnética propiciou o

desenvolvimento *in vitro* dos folículos secundários bovinos e a concentração de 200 $\mu\text{L/mL}$ obteve a maior proporção de folículos viáveis com a melhores taxas de formação e manutenção do antro.

Palavras-Chave: Folículos pré-antrais. Cultivo tridimensional. Nanopartículas. Levitação magnética.

IN VITRO CULTURE OF BOVINE PREANTRAL FOLLICLES ASSOCIATED WITH NANOPARTICLES AND MAGNETIC LEVITATION

ABSTRACT - The aim of this study was to evaluate the development of secondary follicles in the in vitro culture on a three-dimensional system of nanoparticles (gold, iron oxide and poly-L-lysine) associated with magnetic levitation at three concentrations (50, 100 and 200 $\mu\text{L/mL}$) compared to 2D in vitro culture (control, traditional) for 16 days. Sixty bovine ovaries were collected and the micro dissection of the secondary preantral follicles (200 μm to 400 μm in diameter) was done manually from the fragments of the ovarian cortex. Thereafter, the isolated follicles were individually transferred to micro tubes containing culture medium. For 3D treatments, the nanoparticles were added according to the proposed concentrations. After 12 hours of incubation, the follicles were transferred to 24-well plates with culture medium and cultured for 16 days. At the end of the culture, the oocytes were in vitro matured for 22-24 hours. A total of 213 preantral follicles were selected for in vitro culture and randomly assigned to the treatments. The 200 $\mu\text{L/mL}$ treatment showed a reduction ($P < 0.05$) in follicular viability only from D12 and at the end of the culture (D16), the highest proportion of viable follicles ($P < 0.05$) was observed in this group. The treatments with the highest concentrations of nanoparticles had the lowest rates of oocyte extrusion and higher proportion of antrum formation. In addition, within the slow-growing category, a superior percentage of follicles ($P < 0.05$) was observed in the 200 $\mu\text{L/mL}$ group. The follicles of the control group were 6 times more likely ($P < 0.05$) of follicular degeneration and/or extrusion when compared to 200 $\mu\text{L/mL}$ group. Additionally, the oocyte viability rate in in vitro maturation was higher ($P < 0.05$) in the treatment of 200 $\mu\text{L/mL}$. Furthermore, only the oocytes developed in the 3D culture reached the MI phase after the resumption of meiosis. Finally, it was concluded that the three-dimensional culture system with nanoparticles associated with magnetic levitation promoted the in vitro development of

bovine secondary follicles and the concentration of 200 $\mu\text{L/mL}$ obtained the highest proportion of viable follicles with the best rates of antrum formation and maintenance.

Keywords: Nanoparticles. Magnetic levitation. Preantral follicles. Three-dimensional culture.

1 INTRODUÇÃO

O cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais possibilita realizar estudos fundamentados na foliculogênese inicial e nos fatores que influenciam o desenvolvimento folicular. Além disso, esta técnica tem sido proposta como uma estratégia para restaurar ou preservar a função reprodutiva de mulheres que enfrentam a infertilidade proveniente de diversas causas entre as quais, se destaca os tratamentos quimioterápicos (CONCEPTS; JERUSS; WOODRUFF, 2009). Porém, os sistemas contemporâneos de cultivo folicular ainda não mimetizam perfeitamente o ambiente intra ovariano (CHOI et al., 2014) e por isso ainda são necessários testes com novos procedimentos e substâncias estimulatórias ao desenvolvimento e integridade dos folículos pré-antrais.

A pesquisa e o aprimoramento do cultivo folicular *in vitro* apresentam barreiras éticas e disponibilidade limitada que dificultam o uso do tecido ovariano humano (FRANSOLET et al., 2014). Assim, estudos translacionais com modelos animais têm sido realizados em diversas espécies (ALVES et al., 2016; FRANSOLET et al., 2014; TELFER; ZELINSKI, 2013). A espécie bovina é apontada (ARAÚJO et al., 2014a; BAERWALD, 2009) 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.

Folículos pré-antrais bovinos já foram cultivados em sistema convencional (2D, ARAÚJO et al., 2014a) ou encapsulados em matrizes (3D, ARAÚJO et al., 2014b). No cultivo convencional desenvolvido em placas, as células foliculares aderem à superfície da placa causando uma difusão da morfologia folicular que não corresponde à fisiológica (CHOI et al., 2013). Por outro lado, o cultivo no sistema tridimensional pode preservar a arquitetura

original do folículo recriando um ambiente similar à matriz extracelular do ovário durante o cultivo *in vitro* (TELFER; MCLAUGHLIN, 2012).

Desta forma, novas técnicas têm sido desenvolvidas a fim de aprimorar os resultados do cultivo folicular no sistema 3D utilizando sistema de gotas suspensas (ROWGHANI et al., 2004) ou matrizes de hidrogel (SILVA et al., 2015b). Um novo sistema de cultivo tridimensional que utiliza levitação magnética com o auxílio de nanopartículas formadas de ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina vem sendo utilizado com diferentes tipos celulares (HAISLER et al., 2013). Os resultados mostraram que o sistema possibilitou a interação célula-célula, a síntese da matriz extracelular e a manutenção da viabilidade celular (DAQUINAG; SOUZA; KOLONIN, 2013; HOGAN; SOUZA; BIRLA, 2016; LIN et al., 2016; SOUZA et al., 2010). Diante do exposto acredita-se que o uso do sistema 3D por levitação magnética com nanopartículas influenciaria positivamente no desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais secundários com a preservação da estrutura folicular original e crescimento controlado da mesma.

Portanto, objetivou-se avaliar o desenvolvimento dos folículos pré-antrais secundários isolados de ovários bovinos no cultivo *in vitro* em sistema 3D de nanopartículas associadas a levitação magnética comparando ao cultivo *in vitro* em 2D durante 16 dias.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 OVOGÊNESE E FOLICULOGÊNESE

A ovogênese é o processo de formação e desenvolvimento dos ovócitos nos animais a partir das células germinativas primordiais (CGP) até a formação do ovócito haplóide fecundado (RÜSSE, 1983). Inicia-se durante o desenvolvimento embrionário com a migração das células germinativas primordiais (CGP) do saco vitelínico para a crista gonadal e após sucessivas mitoses, dão origem às ovogônias. Em seguida, as ovogônias realizam a primeira divisão meiótica e originam os ovócitos primários. Este processo é interrompido no estágio de diplóteno na prófase I, permanecendo nesta etapa até a puberdade do animal (FIGUEIREDO et al., 1998; HAFEZ; HAFEZ; BARNABE, 2004). Concomitante a este processo, ocorre o início da foliculogênese que compreende a diferenciação e migração das células da granulosa para o contorno do ovócito, formando o pool de folículos primordiais. Nos bovinos este processo ocorre por volta dos 130 dias de gestação (FIGUEIREDO et al., 2007).

O folículo é a unidade morfofuncional do ovário, sendo constituído do ovócito circundado pelas células da teca e da granulosa (GONSALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2002). Possui duas funções: a esteroidogênese (produção e liberação de esteroides e alguns peptídeos) e a gametogênese (promove um ambiente que mantém a viabilidade, crescimento e liberação de um ovócito maturo no processo de ovulação) (FIGUEIREDO et al., 2007). Durante a foliculogênese, os folículos formados ainda na vida fetal, podem se desenvolver de pré-antrais (primordial, transição, primário e secundário) para antrais (terciário e pré-ovulatório). Em geral, eles se diferenciam entre si pelo número de camadas de células da granulosa (FIGUEIREDO et al., 2007). Hennet e Combelles (2012) afirmam que o folículo é um microambiente para o ovócito, resultando em uma co-dependência, mas pouco se sabe sobre as influências dos seus componentes na ovogênese. Sabe-se que a foliculogênese é um

processo altamente regulado pelas sinalizações autócrina, parácrina e endócrina (GREEN; SHIKANOV, 2016). Entretanto, ainda não estão esclarecidos os fatores e mecanismos que participam da escolha dos folículos ativados, bem como o que influencia os processos de crescimento, desenvolvimento e diferenciação (ARAÚJO et al., 2014b; FIGUEIREDO et al., 2007). Ao atingir a puberdade, o processo fisiológico de formação, crescimento e maturação folicular é retomado.

A grande maioria (95%) dos folículos presentes nos ovários se encontra no estágio de primordiais, pois as células da pré-granulosa param de se multiplicar e permanecem em repouso até que haja um estímulo para que voltem a crescer (FIGUEIREDO et al., 2007). Com o mecanismo irreversível da ativação folicular, as células da granulosa se tornam cubóides e a proliferação celular é retomada, evoluindo para folículos de transição (uma camada de células da granulosa pavimentosas e cubóides) e primários (uma camada de 11-40 células da granulosa cubóides ao redor do ovócito primário). Portanto, alguns folículos primordiais deixam o *pool* quiescente e continuam o seu desenvolvimento (ARAÚJO et al., 2014b; FIGUEIREDO; SILVA; RODRIGUES, 1999). Aos 210 dias de gestação, encontram-se os folículos secundários com duas ou mais camadas de células da granulosa (FIGUEIREDO et al., 2007). Além disso, há a formação da zona pelúcida (ZP), grânulos corticais dentro do citoplasma do ovócito, início da formação das células da teca e síntese de mRNA no ovócito (ARAÚJO et al., 2014b).

Por volta dos 230-250 dias de gestação, alguns folículos passam a ser chamados de terciários devido a presença de várias camadas de células da granulosa e da teca e por possuir uma cavidade antral com fluido folicular. Entretanto, os ovócitos presentes nesses folículos ainda se encontram com o núcleo na prófase I (FIGUEIREDO et al., 2007). Em bovinos, o desenvolvimento de folículos antrais ocorre em 2 fases. Na primeira, há a formação do antro com diâmetro médio de 300 μm . Na segunda fase, acontece o recrutamento de folículos com

diâmetro entre 2 a 3 mm, o crescimento, a seleção, a dominância de apenas um folículo (pré-ovulatório) e então a ovulação. Os folículos restantes (99,9%) sofrem atresia ou entram em apoptose (HENNET; COMBELLES, 2012). O folículo antral, possui em seu antro o fluido folicular que é derivado tanto da corrente sanguínea como também dos componentes secretados pelas células da granulosa, sendo seus constituintes os esteróides e as glicoproteínas (GREEN; SHIKANOV, 2016). O folículo também é formado pelo ovócito circundado pelas células do *cumulus* (células da granulosa especializada), formando o complexo-*cumulus*-ovócito (COC), pelas células da granulosa murais que circundam a parte interior do folículo e pela lâmina basal que separa as células da granulosa das células da teca (HENNET; COMBELLES, 2012).

As células da teca são divididas em externa e interna. A externa é fibrosa, enquanto a interna é mais vascularizada. A interna constitui-se de 3 a 5 camadas de células endócrinas alongadas e secretoras de esteróides. Portanto, a principal função das células da teca é a secreção de esteróides, porém, elas não conseguem sintetizar estrogênios a partir dos seus andrógenos (MAGOFFIN, 2005). Assim, antes da ovulação as células da granulosa desenvolvem a capacidade de converter os derivados dos andrógenos da teca em estrogênios. Essa relação entre as células da teca e da granulosa tem como resultado a produção de estradiol (HATZIRODOS et al., 2015). As células da teca expressam receptores para LH (hormônio luteinizante) e a ligação hormônio/receptor estimula a síntese de substratos androgênicos. Já as células da granulosa expressam receptores de FSH (hormônio folículo estimulante) que desempenha um papel importante no desenvolvimento folicular e na regulação da esteroidogênese no ovário. Os hormônios FSH e LH são produzidos na hipófise e chegam aos folículos por meio dos vasos sanguíneos (YOUNG; MCNEILLY, 2010).

A partir do momento em que o folículo se torna responsivo ao LH e FSH e, juntamente com o pico pré-ovulatório de LH durante a puberdade, o ovócito retoma a meiose

rompendo a vesícula germinativa e liberando o primeiro corpúsculo polar. Assim, o ovócito secundário é formado, porém, o núcleo para na segunda divisão meiótica (metáfase II) até que ocorra a fecundação. Após a fecundação pelo espermatozoide, o ovócito retoma a meiose e libera o segundo corpúsculo polar, finalizando a ovogênese com o desenvolvimento do zigoto (MARTINS et al., 2008).

2.2 MOIFOPA

A manipulação de ovócitos inclusos em folículos pré-antrais (MOIFOPA) é uma biotécnica da reprodução também conhecida como “ovário artificial”. Tem intuito de evitar a perda dos folículos que ocorre naturalmente *in vivo*, sendo possível resgatar os folículos pré-antrais dos ovários antes da atresia e os conservar de forma isolada ou inclusos em tecido ovariano por curto (resfriamento) ou longo período (criopreservação) e, posteriormente, cultivá-los *in vitro* para se obter a maturação dos ovócitos (ARAÚJO et al., 2014b). Há a possibilidade também de fazer o transplante do tecido ovariano criopreservado visando a preservação da fertilidade de mulheres que são submetidas a tratamentos com quimio/radioterápicos (ARAÚJO et al., 2014b). Além disso, é uma das principais biotécnicas que permitem compreender a foliculogênese inicial, pelo fato de permitir acompanhar o desenvolvimento folicular desde a fase de pré-antral (APOLLONI et al., 2016).

2.3 SISTEMAS DE CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS

Existem duas formas de cultivar os folículos pré-antrais: o cultivo *in situ* e o folículo isolado. No cultivo *in situ* os folículos se encontram nos fragmentos do córtex ovariano ou até mesmo no ovário inteiro. Esta é a forma mais utilizada quando os objetivos são a criopreservação e/ou manter a integridade tridimensional dos folículos mais próxima do *in vivo*, permitindo assim a interação deles com as células do estroma (FIGUEIREDO et al.,

2008). Já no cultivo de folículos na forma isolada, os folículos pré-antrais passam pelo processo de microdissecção do tecido ovariano e podem ser cultivados no sistema bidimensional (2D) ou tridimensional (3D) (FIGUEIREDO et al., 2008). Os meios bases de cultura mais utilizados para bovino são o α -MEM, TCM-199, e McCoy (ARAÚJO et al., 2014b). Entretanto, ao comparar os três meios, verificou-se que o TCM-199 foi o que manteve uma taxa maior de folículos viáveis ao final do cultivo (ROSSETTO et al., 2013a). Os meios bases são suplementado com piruvato, glutamina, hipoxantina e ácido ascórbico. Adicionalmente há adição de hormônios (ativina, hormônio folículo-estimulante (FSH), hormônio do crescimento (GH) e insulina) e fatores de crescimento (fatores de crescimento semelhantes aos de insulina (IGFs), fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs), fatores de crescimento endotelial vascular (VEGFs), proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e fatores de crescimento e diferenciação (GDFs). O ambiente de cultura mais utilizado apresenta 5% de CO₂ ou 20% de O₂ (FAUSTINO; ROSSETTO; FIGUEIREDO, 2010), umidade saturada e temperatura em 38°C (CUNHA et al., 2010). Existem diversos protocolos e os resultados são divergentes com relação ao cultivo *in vitro* ideal para folículos pré-antrais bovinos (ARAÚJO et al., 2014b). Portanto, há a necessidade de mais estudos para estabelecer as melhores condições para o cultivo.

2.4 SISTEMA DE CULTIVO 2D

Quando o folículo isolado é cultivado diretamente sobre a superfície plástica da placa de cultura, sobre uma matriz extracelular plana ou ainda sobre células somáticas, o sistema é chamado de 2D (ARAÚJO et al., 2014a; FIGUEIREDO et al., 2008). Esse tipo de sistema de cultivo pode ser realizado em placas de micro-poços com meio de cultivo com ou sem óleo mineral e microgotas de meio de cultivo sob óleo mineral (ARAÚJO et al., 2014b).

Como nesse tipo de sistema uma parte do folículo tem contato com a superfície plana, ele também pode adquirir o formato plano devido às ligações estabelecidas entre as células da

granulosa (SILVA et al., 2015b). Isso ocorre, pois as células da granulosa se proliferam e se espalham pela superfície, levando a uma disfunção das junções *gap*. As junções *gap* desempenham um papel importante na comunicação entre o ovócito e as células do *cumulus* e podem causar danos que comprometem a ovulação, o crescimento ovocitário e a competência meiótica (GREEN; SHIKANOV, 2016).

Os primeiros cultivos de folículos pré-antrais ocorreram em sistema de cultivo convencional 2D (FIGUEIREDO et al., 2007). Embora os resultados de modelos experimentais em roedores sejam promissores, o mesmo não ocorre para mamíferos maiores como bovinos, ovinos e humanos. Acredita-se que o sistema 2D não suporte de forma adequada o tamanho maior do ovócito e, consequentemente, do folículo, assim como os cultivos prolongados (GREEN; SHIKANOV, 2016). Entretanto, este sistema permitiu o desenvolvimento de folículos pré-antrais caprinos, levando a retomada da meiose e a fecundação *in vitro* do ovócito, tendo como resultado o primeiro embrião produzido em caprinos a partir de folículos pré-antrais (SARAIVA et al., 2010).

Em bovinos, o cultivo 2D foi realizado em substrato plástico, apresentando ao final de 5 dias aumento do diâmetro folicular e manutenção da viabilidade folicular (FIGUEIREDO et al., 1994). O cultivo de folículos individuais no sistema 2D no substrato também apresentou aumento das taxas de viabilidade, diâmetro folicular e a formação do antro (ROSSETTO et al., 2016).

2.5 SISTEMA DE CULTIVO 3D

O sistema de cultivo 3D foi desenvolvido para manter a morfologia do folículo, tentando recriar um ambiente similar à matriz extracelular do ovário *in vitro*. O objetivo é reduzir a tensão que o complexo granulosa-ovócito sofre quando cultivado em sistema convencional 2D com contato direto na placa (TELFER; MCLAUGHLIN, 2012) (Figura 1).

Por se tratar de uma biotécnica relativamente nova, há grande variação nas formas de cultivar os folículos, seja apenas um ou vários folículos encapsulados em matrizes (PANGAS et al., 2003), co-cultivados com outros tipos celulares (TINGEN et al., 2011) ou folículos em suspensão por agitação contínua (ROWGHANI et al., 2004). Além disso, diferentes tipos de matrizes têm sido testadas a fim de se estabelecer a melhor condição para o desenvolvimento folicular. As matrizes são divididas conforme sua origem em: matrizes com componentes naturais (alginato, misturas de alginato e fibrina e matrigel) ou sintéticos (hidrogel de polietileno glicol – PEG e nanopartículas) (GREEN; SHIKANOV, 2016).

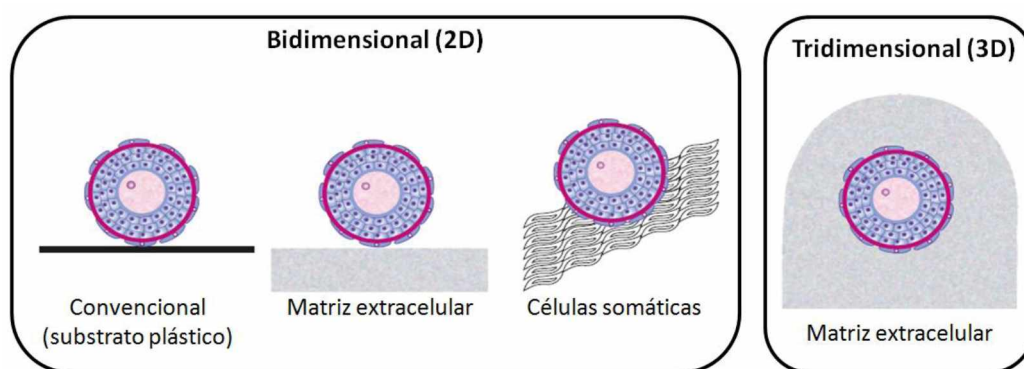


Figura 1. Representação esquemática dos sistemas de cultura bidimensional e tridimensional para folículos pré-antrais bovinos (Adaptado de ARAÚJO et al., 2014a).

2.5.1 Hidrogeis de alginato

Os sais de ácido algínico (alginatos) derivam das algas marrons e a dissociação dos sais resulta nos hidrogéis de alginato (GREEN; SHIKANOV, 2016; SHEA; WOODRUFF; SHIKANOV, 2014). Para que ocorra a polimerização é fundamental a adição de uma solução composta de íons de Ca^{2+} ou Mg^{2+} . Não há necessidade de ocorrer à exposição a altas temperaturas e a radiação UV (FILATOV; KHRAMOVA; SEMENOVA, 2014). Mesmo preservando a morfologia folicular e sua eficácia ter sido determinada na foliculogênese de roedores, primatas e humana (GREEN; SHIKANOV, 2016), o alginato parece atuar como barreira ao crescimento folicular, assim como, à formação de antro (SILVA et al., 2015; XU

et al., 2006). Xu et al. (2013), constataram que alginato com fibrina melhora o desenvolvimento de folículos primários de macacas quando comparado ao alginato sozinho. Isso se deve pelo fato da fibrina ser degradada por proteases foliculares durante o cultivo e o alginato manter a morfologia do folículo sozinho em concentrações menores.

2.5.2 Matrigel

Matrigel é um extrato do sarcoma de rato Engelbreth-Holm-Swarm disponível comercialmente, rico em proteínas da matriz extracelular (ECM). Assim, este ambiente suporta o desenvolvimento folicular, enquanto a estrutura em gel fornece uma matriz 3D aos folículos (GREEN; SHIKANOV, 2016). Entretanto, o ponto negativo do Matrigel é que sua composição química é fixa, ou seja, não permite fazer modificações para buscar melhorias de acordo com os diferentes cultivos (SOUZA et al., 2010).

2.5.3 PEG

O hidrogel de polietileno glicol (PEG) é sintético e possui a vantagem que após a encapsulação as proteases do folículo degradam lentamente as moléculas durante o desenvolvimento do folículo, gerando espaço necessário para a expansão volumétrica do folículo (até 17 vezes) (BELLI et al., 2012). Shikanov et al. (2011) observaram que folículos secundários de ratos encapsulados com PEG por 10 dias de cultura, tiveram boas taxas de sobrevivência e de crescimento folicular, chegando até ao estágio antral. Os ovócitos foram maturados e foi possível visualizar a metáfase II. Entretanto, a preparação do hidrogel é complexa e envolve várias etapas (BELLI et al., 2012).

2.5.4 Nanopartículas

O interesse pelas nanopartículas aumentou a partir da necessidade de manipular e controlar remotamente componentes celulares específicos tanto *in vitro* como em *in vivo*, permitindo também investigar a função celular e as vias de sinalização molecular (DOBSON, 2008). As nanopartículas magnéticas são compostas de ouro, óxido de ferro (Fe_3O_2 , magnetita) e sequências peptídicas de células-adesivas (poli-L-Lisina) que se aderem as células de estudo e com o auxílio de uma placa magnética é possível desenvolver um cultivo em 3D por levitação (SOUZA et al., 2010). As nanopartículas de ouro são potencialmente biocompatíveis e sua utilização já foi aprovada em várias aplicações pela *Food and Drug Administration* dos Estados Unidos (LANGER; TIRRELL, 2004). Os óxidos de ferro são endógenos no corpo humano e semelhantes aos materiais na ressonância magnética. Desta forma, geralmente as nanopartículas são bem toleradas pelas células (NEUBERGER et al., 2005).

Há vários trabalhos que comprovam os benefícios das nanopartículas no cultivo 3D em diversas áreas como nos estudos *in vitro* de fármacos e citotoxicidade (TSENG et al., 2015), vasoatividade de células musculares (TSENG et al., 2016), modelos de estudos de tumores (BECKER; SOUZA, 2013; JAGANATHAN et al., 2014), modelos de culturas celulares (TSENG et al., 2013, 2014). Um estudo *in vivo* com células-tronco derivadas de tecido adiposo com nanopartículas magnéticas no tratamento da disfunção erétil de ratos, mostrou que foi possível manter as células-tronco no corpo cavernoso utilizando um ímã e obteve-se bons resultados na terapia (LIN et al., 2016).

2.6 CULTIVO EM 3D POR LEVITAÇÃO MAGNÉTICA

O cultivo em 3D baseado na levitação magnética foi descrito pela primeira vez em 2010 por Souza et al. em um estudo com células de glioblastoma humano. Ao levitarem as células no hidrogel composto de nanopartículas de ouro, óxido de ferro e bacteriófagos

filamentosos, os autores verificaram perfis de expressão de proteínas semelhantes aos observados em xenoenxertos de tumor humano. A levitação magnética ocorre por meio do controle espacial do campo magnético por uma placa com ímãs que é colocada sobre a placa de cultivo após as nanopartículas estarem aderidas às células de estudo (SOUZA et al., 2010).

No trabalho de Daquinag, Souza, Kolonin (2013), foram comparados o sistema de cultivo 2D e o 3D com nanopartículas por levitação magnética do tecido adiposo branco. Constataram que o cultivo 3D permitiu a retenção da complexidade multicelular do tecido adiposo branco e da parcial vascularização. Além disso, observaram que a proliferação celular e a diferenciação de pré-adipócitos foram eficientes. Portanto, os resultados indicam que a levitação magnética permite simular simultaneamente a vascularização e a lipogênese em tecido cultivado composto por células endoteliais e progenitores mesenquimais, restabelecendo interações *in vivo* entre esses diferentes tipos celulares (DAQUINAG; SOUZA; KOLONIN, 2013).

No estudo de Tseng et al. (2013) buscou-se criar um bronquíolo no sistema 3D semelhante ao tecido *in vivo* por meio da levitação magnética em conjunto com nanopartículas magnéticas. Para isso, utilizou-se co-cultivo de quatro tipos de células humanas do bronquíolo: células endoteliais, células musculares lisas, fibroblastos e células epiteliais. Os resultados mostraram que a levitação magnética é um método válido para criar de forma rápida co-culturas organizadas em 3D mantendo o fenótipo e induzindo a formação de matriz extracelular.

Jaganathan et al. (2014) desenvolveram um modelo de co-cultura *in vitro* 3D de tumor de mama utilizando a levitação magnética. Os dados sugerem que este tipo de sistema de cultivo é vantajoso porque teve a capacidade de formar modelos de tumor de mama de grande porte em 24 horas e de controlar a composição e a densidade das células tumorais. Além

disso, também imita com precisão o microambiente tumoral *in vivo* tornando possível testar a eficácia do fármaco em modelo *in vitro*.

Hogan, Souza e Birla (2016), elaboraram co-culturas das células da válvula aórtica (valvares intersticiais e endoteliais) usando a levitação magnética e cultivadas durante 3 dias. Os autores concluíram que o sistema de cultivo pode servir como base para futuras experiências para entender a biologia valvar cardíaca, pois o modelo mostrou ser similar ao músculo cardíaco *in vivo*.

2.7 TÉCNICAS PARA AVALIAÇÃO DA EFICIÊNCIA DO CULTIVO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS *IN VITRO*

Depois de cultivar os folículos pré-antrais é necessário avaliar a eficiência pós cultivo, pois podem ocorrer alterações que causam efeitos positivos e/ou negativos na qualidade do folículo. Para isso existem várias técnicas que podem ser utilizadas como a avaliação morfológica (FIGUEIREDO et al., 1994), a histologia clássica (ARAÚJO et al., 2010), expressão gênica (CELESTINO et al., 2011), dosagem hormonal (SILVA et al., 2013) e a microscopia de fluorescência (ROSSETTO et al., 2013). A histologia clássica é uma técnica importante para análise da morfologia de folículos pré-antrais frescos, criopreservados e cultivados *in vitro* na avaliação de folículos pré-antrais (MATOS et al., 2007). Já a expressão gênica permite compreender melhor os mecanismos envolvidos no desenvolvimento e degeneração folicular por meio de produtos de alguns genes específicos como IGFs, EGF, β -Ativina entre outros (CELESTINO et al., 2011). A dosagem de hormônios esteroides é importante para analisar as alterações nos níveis de esteroides intrafoliculares que podem determinar o destino folicular. Os níveis elevados de progesterona e baixos de estradiol no fluido folicular bovino, evidencia a atresia (PRIZANT; GLEICHER; SEN, 2014). Por meio da microscopia de fluorescência é possível avaliar a viabilidade celular empregando marcadores específicos (LOPES et al., 2009). Para o estudo tanto de folículos pré-antrais como também de ovócitos é comum utilizar dois marcadores fluorescentes simultaneamente:

a calceína AM (excita a 494 nm e emite a 517 nm) e o etídio homodímero-1 (excita a 528 nm e emite a 617 nm). A calceína confere a marcação verde após ser clivada por enzimas esterases em células vivas. Já o etídio homodímero-1 marca de vermelho as células que possuem a integridade de membrana plasmática (HAUGLAND; MACCOUBREY; MOORE, 1994; LOPES et al., 2009). Além da viabilidade celular, é possível avaliar a configuração da cromatina de ovócitos por meio do marcador Hoechst 33342 ou o DAPI (4',6-Diamidina-2'-fenilindol di-hidroclorato, excita a 360 nm e emite a 460 nm) que se intercalam entre as bases nitrogenadas do DNA produzindo uma fluorescência azul (NUTTINCK et al., 1993; SILVA et al., 2015b).

3 JUSTIFICATIVA

A espécie bovina também é apontada por diversos autores (ARAÚJO et al., 2014a; BAERWALD, 2009) como modelo experimental comparativo de estudos sobre a foliculogênese inicial e reserva de gametas inclusos em folículos pré-antrais, visto a semelhanças entre a foliculogênese pré-antral da cava com outras espécies, entre elas a mulher. Deste modo, a biotécnica da MOIFOPA (manipulação de ovócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais) possibilita realizar pesquisas fundamentadas na reserva folicular pré-antral bovina com dupla aptidão, por favorecer o avanço genético e conservação desta espécie e fornecer informações importantes a serem aplicadas na clínica reprodutiva humana. Além disso, estes ovários têm razoável disponibilidade em frigoríficos locais e são bons modelos de estudos para compreensão dos estágios de crescimento dos folículos e dos eventos envolvidos na atresia e, apoptose folicular, que podem influenciar nas atividades reprodutivas do animal adulto.

Há uma crescente demanda por ensaios do cultivo de folículos pré-antrais *in vitro*. Pelo fato do sistema 2D causar danos na morfologia e consequentemente no desenvolvimento do folículo, o sistema 3D está ganhando atenção por proporcionar um ambiente de cultivo semelhante a matriz tecidual. Desta forma, pesquisadores tem desenvolvido novas técnicas a fim de aprimorar os resultados e desenvolveram cultivos utilizando diversos tipos de matrizes. Estudos com diferentes tipos celulares vêm usando um sistema que utiliza levitação magnética com o auxílio de nanopartículas formadas de ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina. Os resultados mostraram que o sistema possibilitou a interação célula-célula, a síntese da matriz extracelular e a manutenção da viabilidade celular (DAQUINAG; SOUZA; KOLONIN, 2013; HOGAN; SOUZA; BIRLA, 2016; LIN et al., 2016; SOUZA et al., 2010). Estes resultados foram o suporte para a idéia de cultivar folículos pré-antrais neste sistema e desenvolver uma nova proposta de cultivo tridimensional de folículos pré-antrais isolados.

4 HIPÓTESES CIENTÍFICAS

a) Os folículos secundários avançados de bovinos no sistema de cultivo *in vitro* em 3D por levitação magnética se desenvolvem de forma contínua e a maior concentração das nanopartículas favorece a viabilidade e o crescimento folicular.

b) As taxas de crescimentos diárias e de formação de antro no cultivo 3D são superiores as taxas observadas nos folículos cultivados no sistema tradicional (2D).

c) Os ovócitos oriundos de folículos secundários cultivados em sistema 3D apresentam o diâmetro médio maior comparado aos ovócitos cultivados no sistema convencional.

d) O tratamento com 200 $\mu\text{L/mL}$ de nanopartículas apresenta maior proporção de folículos viáveis ao final do cultivo e maior proporção de ovócitos com retomada da meiose após 24 horas de maturação *in vitro*.

5 OBJETIVO GERAL

Avaliar o desenvolvimento dos folículos secundários de ovários bovinos no cultivo *in vitro* em sistema 3D de nanopartículas (ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina) associadas a levitação magnética com três concentrações (50, 100 e 200 $\mu\text{L/mL}$) comparando ao cultivo *in vitro* em 2D (cultivo tradicional em placa) durante 16 dias.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar as taxas de formação de antro, viabilidade, degeneração e extrusão dos folículos secundários cultivados *in vitro* nos diferentes tratamentos;
- b) Determinar a taxa de crescimento diário e o diâmetro folicular de cada tratamento em diferentes intervalos dentro do período de cultivo;
- c) Determinar o diâmetro ovocitário e as taxas de maturação nuclear após 22-24 horas de maturação *in vitro* nos diferentes tratamentos.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

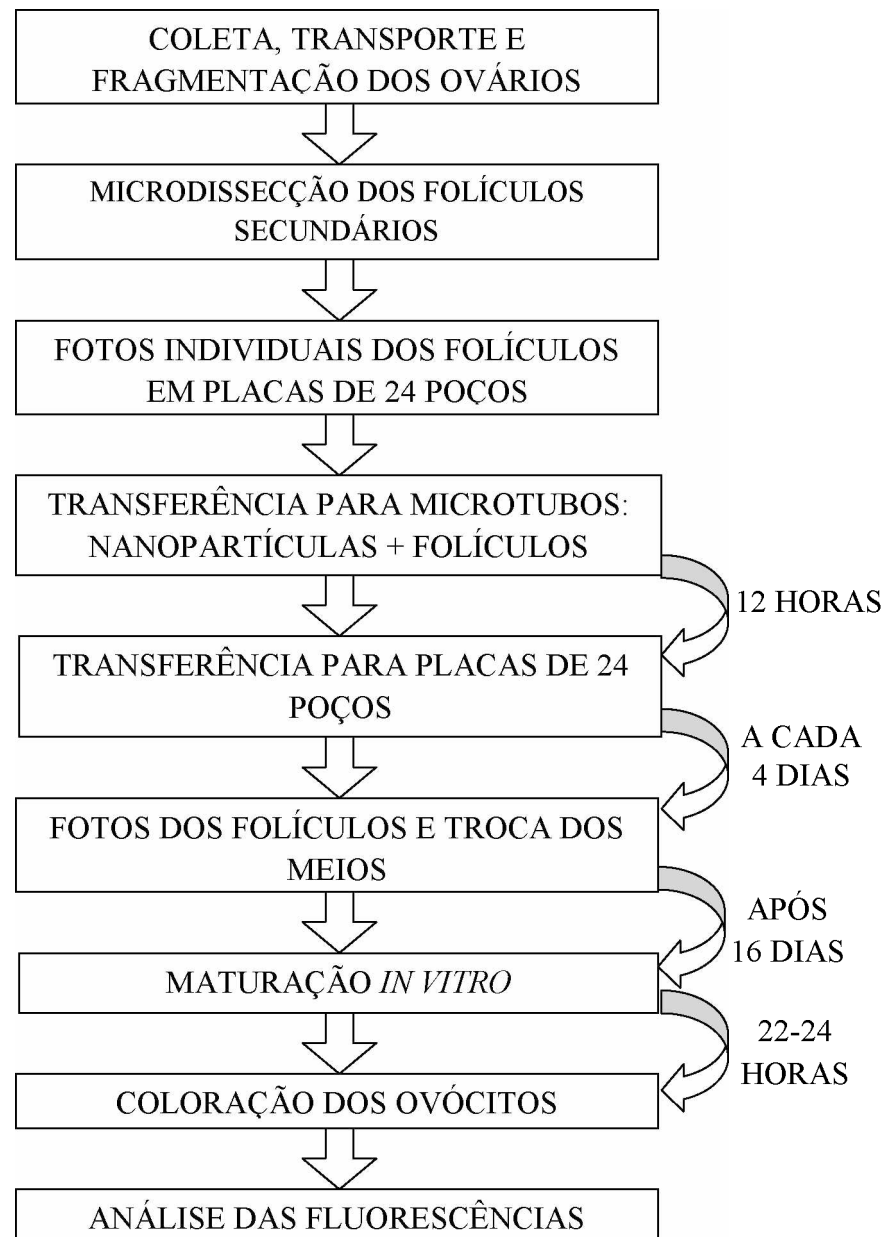
6.1 REAGENTES QUÍMICOS E MEIOS

Os reagentes químicos e os meios utilizados na execução deste trabalho foram obtidos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, EUA), a menos que indicado de outra forma.

6.2 COLETA E TRANSPORTE DOS OVÁRIOS BOVINOS

Foram coletados ovários bovinos ($n = 60$) em abatedouros locais de animais sem raça definida. Os ovários foram transportados em temperatura ambiente em garrafa térmica e no período máximo em 4 horas.

6.3 DESENHO EXPERIMENTAL



6.4 ISOLAMENTO DOS FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS SECUNDÁRIOS

No laboratório, os ovários foram lavados com soro fisiológico 0,9% previamente aquecido (37°C), suplementado com 100 µg/mL de gentamicina e 100 µg/mL de estreptomicina. Em seguida, o tecido conjuntivo e a gordura foram removidos e os ovários

foram transferidos para o mesmo meio permanecendo no banho maria à 37°C até o momento do isolamento.

Antes da manipulação, os ovários foram lavados uma vez com álcool 70% e duas vezes com tissue medium culture 199 com 25 mM de HEPES (TCM-199 HEPES), suplementado com 100 µg/mL de gentamicina e 100 µg/mL de estreptomicina. A fragmentação, o isolamento e o cultivo dos folículos foram realizados de acordo com Silva et al. (2015a) com algumas modificações. Resumindo, fatias do córtex ovariano com espessura de 1 a 2 mm foram retidas a partir da superfície do ovário utilizando uma lâmina de bisturi. Logo depois, os fragmentos do córtex ovariano foram transferidos para o meio TCM-199 HEPES. Os folículos foram visualizados com o auxílio de um estereomicroscópio (40x) (Olympus, Tóquio, Japão). A microdissecção dos folículos pré-antrais secundários 200 µm a 400 µm de diâmetro foi feita a partir dos fragmentos de forma manual, com auxílio de agulhas de calibre 26 G.

Foram selecionados 238 folículos pré-antrais secundários com ovócito circundado com células da granulosa e membrana basal intacta e distribuídos aleatoriamente entre os tratamentos. Seis réplicas foram realizadas.

6.5 CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS SECUNDÁRIOS: MÉTODO CONVENCIONAL (2D) E TRIDIMENSIONAL (3D, NANOPARTÍCULAS + LEVITAÇÃO MAGNÉTICA)

Com o intuito de propiciar a aderência entre o folículo e as nanopartículas, os folículos isolados foram primeiramente transferidos de forma individual para microtubos de 200 µL que continham 100 µL meio de cultivo composto de TCM-199 suplementado com 3 mg/mL de BSA, ITS (10 µg/mL insulina, 5,5 µg/mL transferrina, 5,0 ng/mL selênio, LifeTechnologies Inc., Grand Island, NY, USA), 2 mM de glutamina, 2 mM de hipoxantina, 50 µg/mL de ácido ascórbico, 100 µg/mL de gentamicina e 100 µg/mL de estreptomicina.

Nestes microtubos, para os tratamentos de cultivo 3D por levitação magnética foram acrescentado ao meio de cultivo nanopartículas compostas por ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina (NanoShuttle™-PL, n3D, Bioscience, Inc., Houston, TX, USA) nas concentrações de 50 µL/mL (n = 46 folículos), 100 µL/mL (n = 46 folículos) e 200 µL/mL (n = 40 folículos).

Os folículos permaneceram 12 horas incubados em estufa com 5% de CO₂, em uma temperatura de 38,5°C. Ao término desse período, os folículos foram transferidos individualmente para cada poço da placa de 24 poços com 500 µL de meio de cultivo (Corning, NY, USA) e um *drive* magnético foi adicionado substituindo a tampa da placa nos tratamentos de cultivo 3D. Após 1 hora foi possível visualizar os folículos em levitação. Os folículos do controle (n = 81) foram transferidos para uma placa de 24 poços, porém sem o *drive* magnético. Os folículos foram cultivados em estufa com 5% de CO₂ no ar, à 38,5°C por 16 dias, com troca parcial do meio a cada 4 dias.

6.6 A AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E DO DESENVOLVIMENTO FOLICULAR *IN VITRO*

A morfologia folicular foi considerada pelos critérios de viabilidade, degeneração e extrusão. Já o desenvolvimento dos folículos foi avaliado pelo diâmetro médio, presença ou ausência de antro, manutenção de antro e taxas de crescimento. Os folículos foram classificados degenerados quando possuíam ovócitos escuros, sem a presença das células da granulosa ou quando estas estavam escuras e fragmentadas. A extrusão foi considerada quando a membrana basal estava rompida (APOLLONI et al., 2016). Em sequência, os folículos foram fotografados antes de serem transferidos para os microtubos e a cada 4 dias (dia da troca dos meios de cultivo) por meio da câmera digital modelo DS-Fi2 (Nikon, Tóquio, Japão) acoplada a um estereomicroscópio AZ100 (Nikon). Utilizou-se o programa HLIImage ++ (1997, Machine Vision Tools, Midvale, Utah) para mensuração das duas medidas perpendiculares de cada folículo como é mostrado na Figura 2 e assim foi possível

gerar o diâmetro médio. Baseado nestes diâmetros, as taxas de crescimento foram calculadas e classificadas em crescimento ausente ($-37,1$ a $0,0$ $\mu\text{m}/\text{dia}$), lento ($0,1$ a $7,0$ $\mu\text{m}/\text{dia}$) e rápido ($7,1$ a $29,8$ $\mu\text{m}/\text{dia}$). Além disso, foram observadas as taxas de formação e manutenção do antro nos diferentes tratamentos. As avaliações foram realizadas pelo mesmo operador.

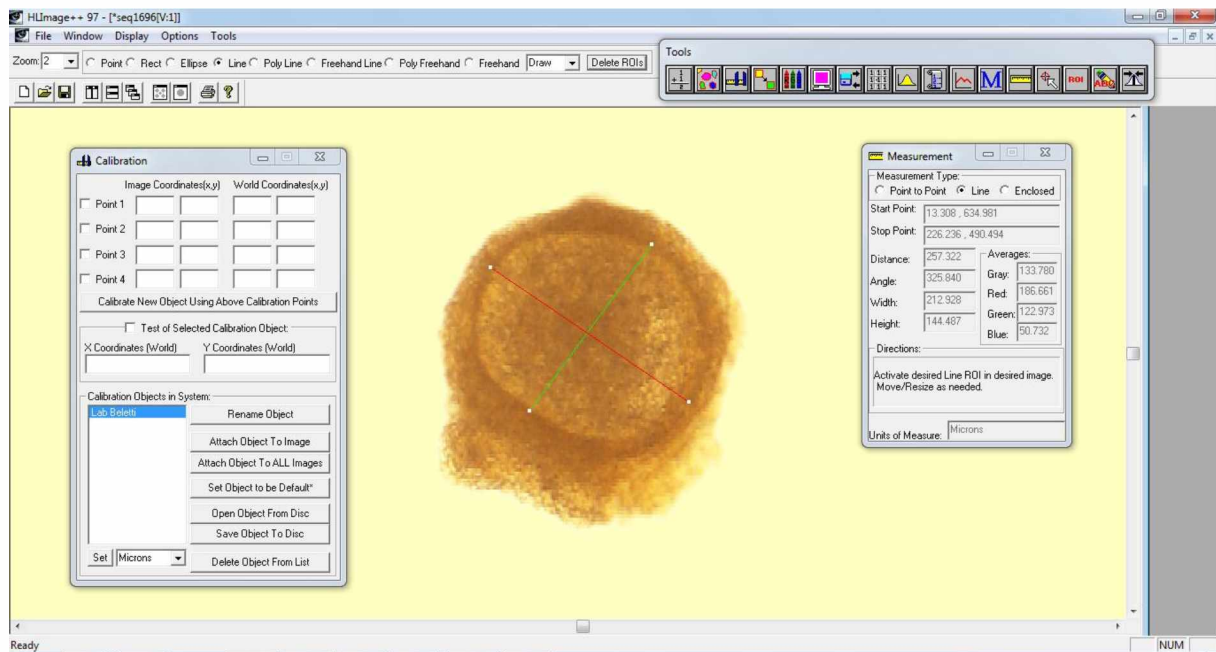


Figura 2. Imagem ilustrativa da mensuração do diâmetro folicular realizada no programa HImage ++ (1997, Machine Vision Tools, Midvale, Utah).

6.7 MATURAÇÃO *IN VITRO* DOS COMPLEXOS-CUMULUS-OVÓCITOS (COCs)

No final do período de 16 dias, os folículos foram abertos mecanicamente com agulhas de calibre de 26 G sob um esteriomicroscópio para recuperar os ovócitos. Os COCs foram lavados duas vezes em TCM-199 HEPES e uma vez em meio de maturação. Depois da lavagem, os ovócitos foram transferidos para gotas de 150 μL de meio de maturação sob óleo mineral e foram incubados por 24 horas à $38,5^{\circ}\text{C}$ em uma atmosfera de 5% de CO_2 no ar. O meio de maturação foi de acordo com Appoloni et al. (2016) com adaptações. Era composto de TCM-199 suplementado com 1 mg/mL de BSA, 1 mM de piruvato, 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de hormônio foliculo estimulante (FSH, Folltropin-V, Bioniche, Ontario, Canadá), 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de hormônio luteinizante (LH), 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 17 β -estradiol e 100 μM de cisteamina.

6.8 AVALIAÇÕES DA MATURAÇÃO *IN VITRO* DOS COCS

Ao final das 24 horas de maturação os ovócitos foram mecanicamente desnudados e incubados por 30 minutos com 4 mM calceína AM (excita a 494 nm e emite a 517 nm) e o 2 mM etídio homodímero-1 (excita a 528 nm e emite a 617 nm) (Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe, Alemanha). Ao término, os ovócitos foram lavados em DPBS, fixados em paraformaldeído por 30 minutos e transferidos para lâminas com 15 µL de Fluroshield™ com DAPI (excita a 360 nm e emite a 460 nm). As análises foram feitas em um microscópio de fluorescência (EVOS_{fl} *Imaging System*, AMG, WA, USA) em um aumento de 200x.

Os ovócitos foram considerados como viáveis quando o citoplasma foi marcado positivamente pela *calcein-AM* (verde) e não viável se o núcleo estivesse marcado pelo *ethidium homodimer-1* (vermelho). O Fluroshield™ com DAPI foi usado para avaliar a configuração da cromatina nas fases de vesícula germinativa (GV), de quebra da vesícula germinativa (GVBD), metáfase I (MI) e metáfase II (MII).

6.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas por meio do software Sigma Plot 11.0 (Systat Software Inc, San Jose, California, EUA). Os dados que não apresentaram distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) foram submetidos a transformação logarítmica. As variáveis apresentadas na forma de porcentagem (foliculos normais, degenerados e extrusos; formação de antro; categorias de crescimento folicular e condição folicular; e status meiótico após a maturação *in vitro*) foram comparadas entre os tratamentos pelos testes do qui-quadrado ou exato de Fisher. A comparação de médias entre os tratamentos foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, enquanto o diâmetro e a taxa de crescimento folicular entre os dias de cultivo foram analisados pelo teste pareado de Wilcoxon. Em adição, a análise de regressão linear

avaliou a associação da condição folicular com a taxa de crescimento folicular e a razão de possibilidades (*Odds ratio*) avaliou os efeitos do tratamento e da categoria de crescimento folicular sobre as taxas de extrusão, degeneração e formação e manutenção do antro. Os dados foram apresentados na forma de média (\pm erro padrão da média) e porcentagem. A probabilidade de $P < 0,05$ indica diferença significativa e valores entre $P > 0,05$ e $P < 0,1$ indicam tendência a significância.

7. RESULTADOS

7.1 MORFOLOGIA FOLICULAR

Um total de 213 folículos pré-antrais foram cultivados *in vitro* e distribuídos aleatoriamente nos tratamentos controle (n = 81), 50 µL/mL (n = 46), 100 µL/mL (n = 46) e 200 µL/mL (n = 40). No geral, observou-se uma redução ($P < 0,05$) na porcentagem de folículos viáveis após 16 dias de cultivo *in vitro* em todos os tratamentos (Figura 3). Em relação ao D0 do cultivo, o grupo controle apresentou um decréscimo ($P < 0,05$) na proporção de folículos normais a partir do D4, enquanto que os tratamentos 50 µL/mL e 100 µL/mL reduziram ($P < 0,05$) a proporção de folículos viáveis somente a partir do D8 do cultivo *in vitro*. Entretanto, o tratamento 200 µL/mL apresentou redução ($P < 0,05$) na viabilidade folicular apenas a partir do D12. Ao comparar a proporção de folículos viáveis entre os tratamentos, o grupo 200 µL/mL apresentou maior ($P < 0,05$) proporção de folículos viáveis no D8 e D12 em relação aos grupos controle e 100 µL/mL, respectivamente. Ao final do cultivo (D16), a maior proporção de folículos viáveis ($P < 0,05$) foi observada no grupo 200 µL/mL.

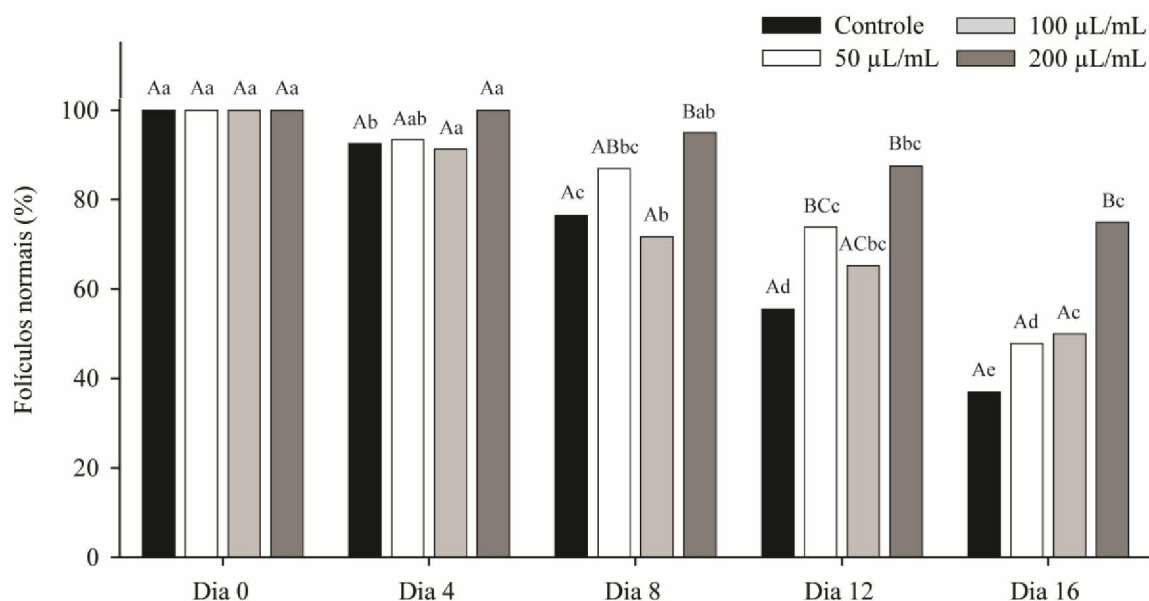


Figura 3. Porcentagem de folículos pré-antrais normais bovinos submetidos ao cultivo *in vitro* nos sistemas 2D (controle) e 3D por levitação com diferentes concentrações (50, 100 e 200 µL/mL) de nanopartículas compostas de ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina.

^{A,B,C} Entre os tratamentos e dentro do mesmo dia de cultivo *in vitro* ($P < 0,05$).

^{a,b,c,d,e} Dentro do tratamento e entre dias de cultivo *in vitro* ($P < 0,05$).

Ao longo do cultivo *in vitro* observou-se o aumento ($P < 0,05$) na proporção de folículos extrusos, com exceção para o tratamento 100 µL/mL (Figura 4). Até 12 dias de cultivo *in vitro* as taxas de extrusão ovocitária permaneceram constantes para os tratamentos do sistema 3D. Por outro lado, o controle apresentou aumento na extrusão a partir de 8 dias. Quando os tratamentos foram comparados entre si, a porcentagem de folículos extrusos foi semelhante ($P > 0,05$) até o D8 do cultivo *in vitro*. No entanto, no último dia de cultivo (D16), os tratamentos controle e 50 µL/mL apresentaram maior ($P < 0,05$) proporção de folículos extrusos em relação ao tratamento 100 µL/mL.

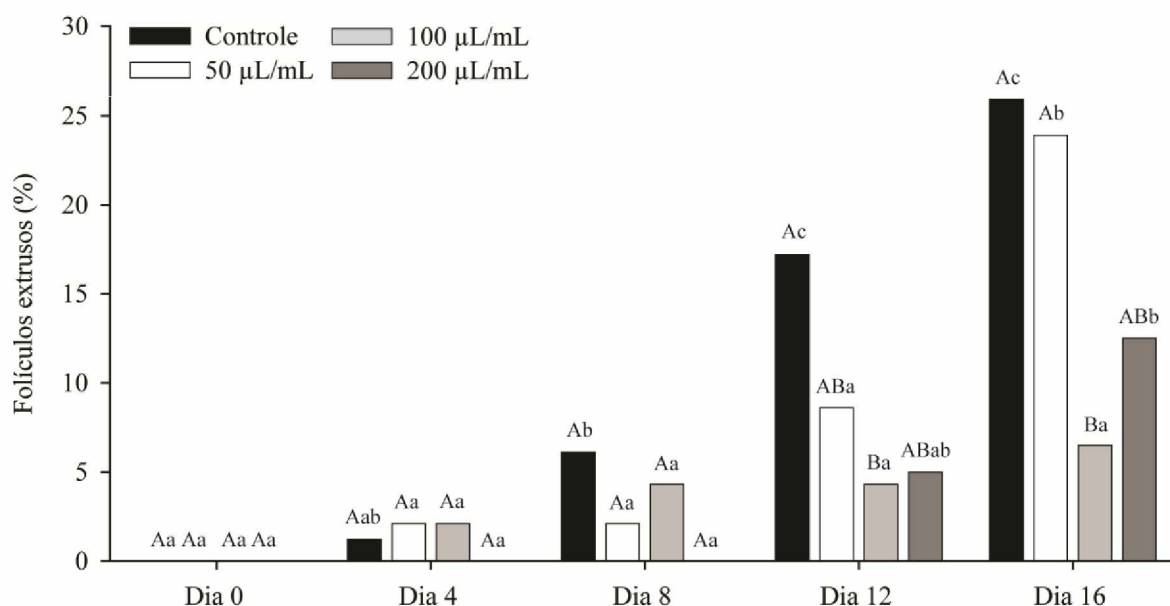


Figura 4. Porcentagem de foliculos extrusos bovinos durante o cultivo *in vitro* nos sistemas 2D (controle) e 3D por levitação com diferentes concentrações (50, 100 e 200 µL/mL) de nanopartículas compostas de ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina.

^{A,B} Entre tratamentos e dentro do mesmo dia de cultivo *in vitro* ($P < 0,05$).

^{a,b,c} Dentro do tratamento e entre dias de cultivo *in vitro* ($P < 0,05$).

Adicionalmente, houve um aumento ($P < 0,05$) na taxa de degeneração folicular durante o cultivo *in vitro* (Figura 5). Nos dias 12 e 16 do cultivo, a proporção de foliculos degenerados foi inferior ($P < 0,05$) no grupo 200 µL/mL comparado aos tratamentos controle e 100 µL/mL. Dentro do mesmo tratamento e em relação ao D0 do cultivo, a taxa de foliculos degenerados aumentou ($P < 0,05$) a partir do D4 para o grupo controle, a partir do D8 para os grupos 50 e 100 µL/mL e somente no D16 para o grupo 200 µL/mL.

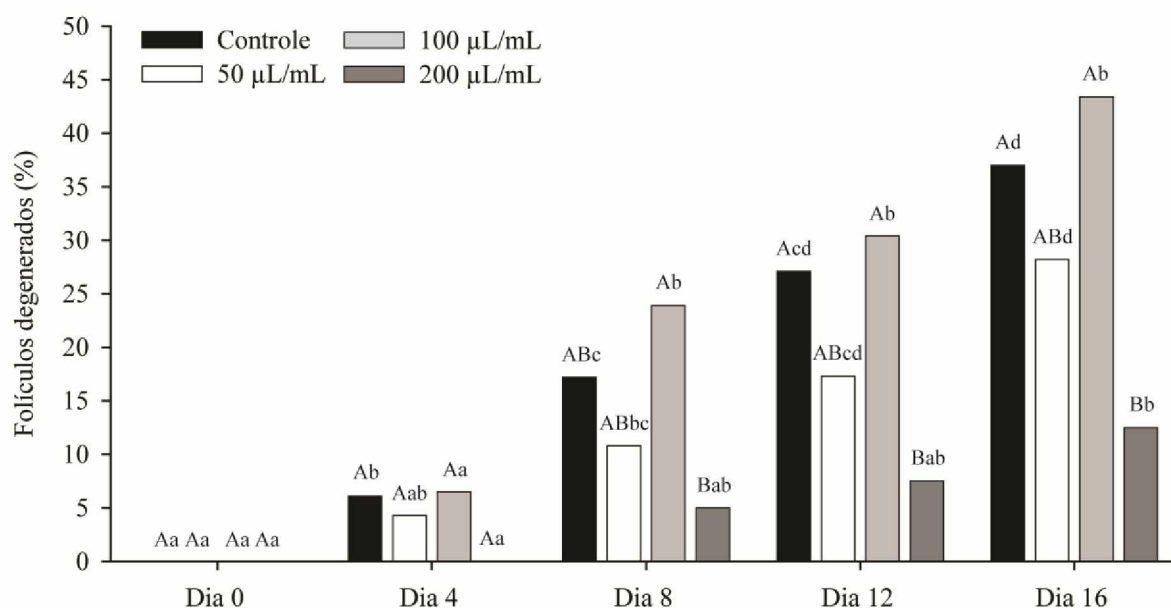


Figura 5. Porcentagem de folículos degenerados bovinos durante o cultivo *in vitro* nos sistemas 2D (controle) e 3D por levitação com diferentes concentrações (50, 100 e 200 µL/mL) de nanopartículas compostas de ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina.

^{A,B} Entre tratamentos e dentro do mesmo dia de cultivo *in vitro* ($P < 0,05$).

^{a,b,c,d} Dentro do tratamento e entre dias de cultivo *in vitro* ($P < 0,05$).

7.2 DIÂMETRO, TAXA DE CRESCIMENTO DIÁRIA E CATEGORIAS DE CRESCIMENTO FOLICULAR

Independente do tratamento foi observado um aumento ($P < 0,05$) progressivo do diâmetro folicular ao longo do cultivo (Figuras 6A,B,C,D,E,F). Porém, quando os tratamentos foram comparados entre si, observou-se que o tratamento controle apresentou maior ($P < 0,05$) diâmetro folicular no D16 em relação ao grupo 200 µL/mL (Figura 6C).

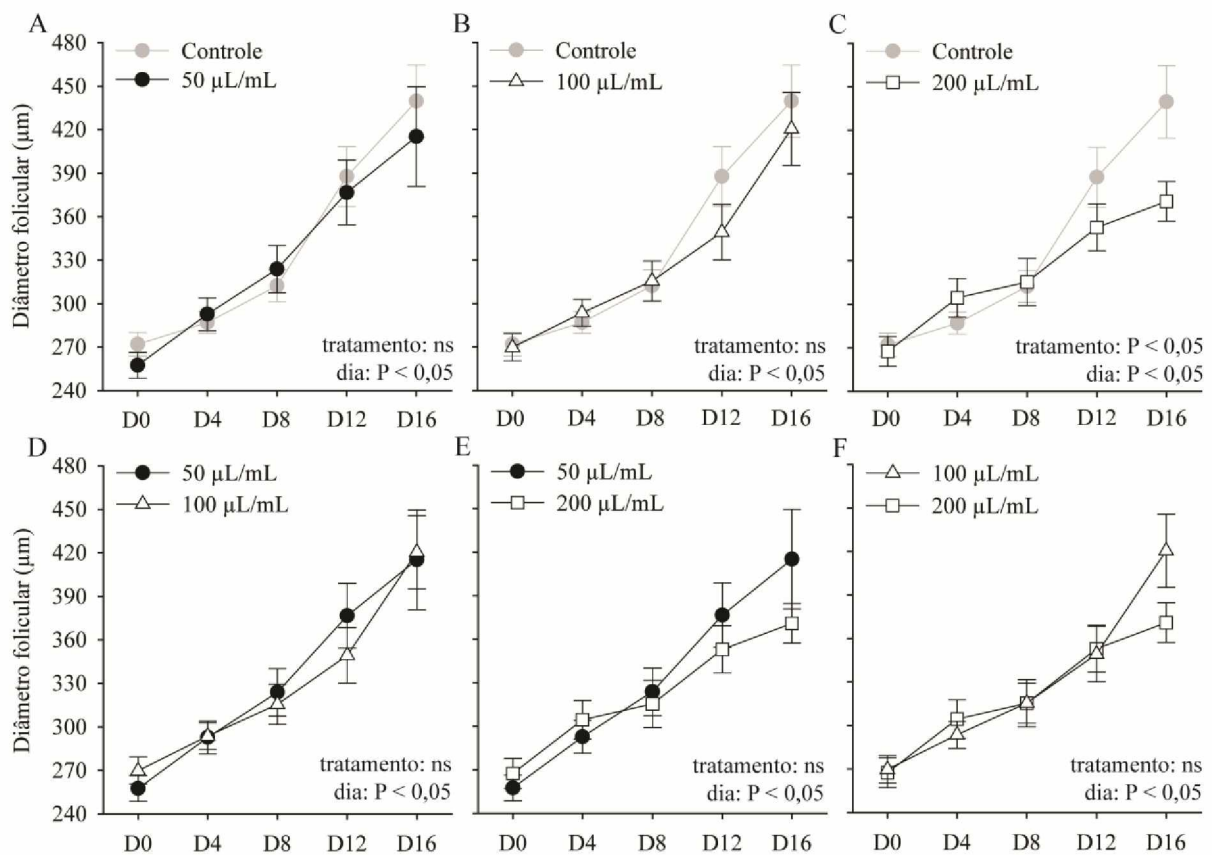


Figura 6. Diâmetro médio (\pm epm) de foliculos normais bovinos durante o cultivo *in vitro* nos sistemas 2D (controle) e 3D por levitação com diferentes concentrações (50, 100 e 200 µL/mL) de nanopartículas compostas de ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina. Comparação entre os tratamentos: (A) controle vs. 50 µL/mL; (B) controle vs. 100 µL/mL; (C) controle vs. 200 µL/mL; (D) 50 vs. 100 µL/mL; (E) 50 vs. 200 µL/mL; (F) 100 vs. 200 µL/mL. ns: não significativo ($P > 0,05$).

As taxas de crescimento folicular (µm/dia) em diferentes períodos do cultivo *in vitro* estão apresentadas (Tabela 1). No geral, após 16 dias de cultivo *in vitro*, o grupo controle apresentou taxa de crescimento folicular superior ($P < 0,05$) quando comparado ao grupo 200 µL/mL. Adicionalmente, o grupo de 200 µL/mL apresentou uma taxa de crescimento inferior no período D4-D8 comparado aos outros períodos. Dentro dos grupos controle e 100 µL/mL a taxa de crescimento folicular foi superior ($P < 0,05$) nos intervalos D8-D12 e D12-D16, respectivamente, comparado ao intervalo D0-D4.

Tabela 1. Taxa de crescimento diário (média \pm epm) de folículos normais bovinos durante o cultivo *in vitro* nos sistemas 2D (controle) e 3D por levitação com diferentes concentrações (50, 100 e 200 $\mu\text{L/mL}$) de nanopartículas.

Tratamentos	Crescimento folicular ($\mu\text{m}/\text{dia}$) em diferentes períodos do cultivo <i>in vitro</i>				
	D0 – D4	D4 – D8	D8 – D12	D12 – D16	Média geral
Controle	3,4 \pm 1,8 ^{aA}	8,3 \pm 2,5 ^{aA}	17,7 \pm 3,0 ^{bA}	11,4 \pm 3,5 ^{abAB}	10,2 \pm 3,5 ^A
50 $\mu\text{L/mL}$	6,6 \pm 2,1 ^{aA}	7,5 \pm 3,0 ^{aA}	13,3 \pm 3,8 ^{aAB}	10,3 \pm 5,4 ^{aAB}	9,4 \pm 1,9 ^{AB}
100 $\mu\text{L/mL}$	8,1 \pm 2,5 ^{aA}	4,8 \pm 2,2 ^{aAB}	9,2 \pm 2,7 ^{aB}	16,9 \pm 3,36 ^{bA}	9,8 \pm 1,5 ^{AB}
200 $\mu\text{L/mL}$	8,8 \pm 2,1 ^{aA}	0,2 \pm 2,1 ^{bB}	8,4 \pm 2,3 ^{aB}	7,7 \pm 2,6 ^{aB}	6,3 \pm ,08 ^B

^{a, b} Letras diferentes na mesma linha ($P < 0,05$).

^{A, B} Letras diferentes na mesma coluna ($P < 0,05$).

Em adição, medidas de dispersão foram calculadas para cada tratamento em função da taxa de crescimento folicular (Figura 7). Valores de variância e desvio padrão em ordem decrescente foram observados para os tratamentos 50 $\mu\text{L/mL}$, controle, 100 $\mu\text{L/mL}$ e 200 $\mu\text{L/mL}$.

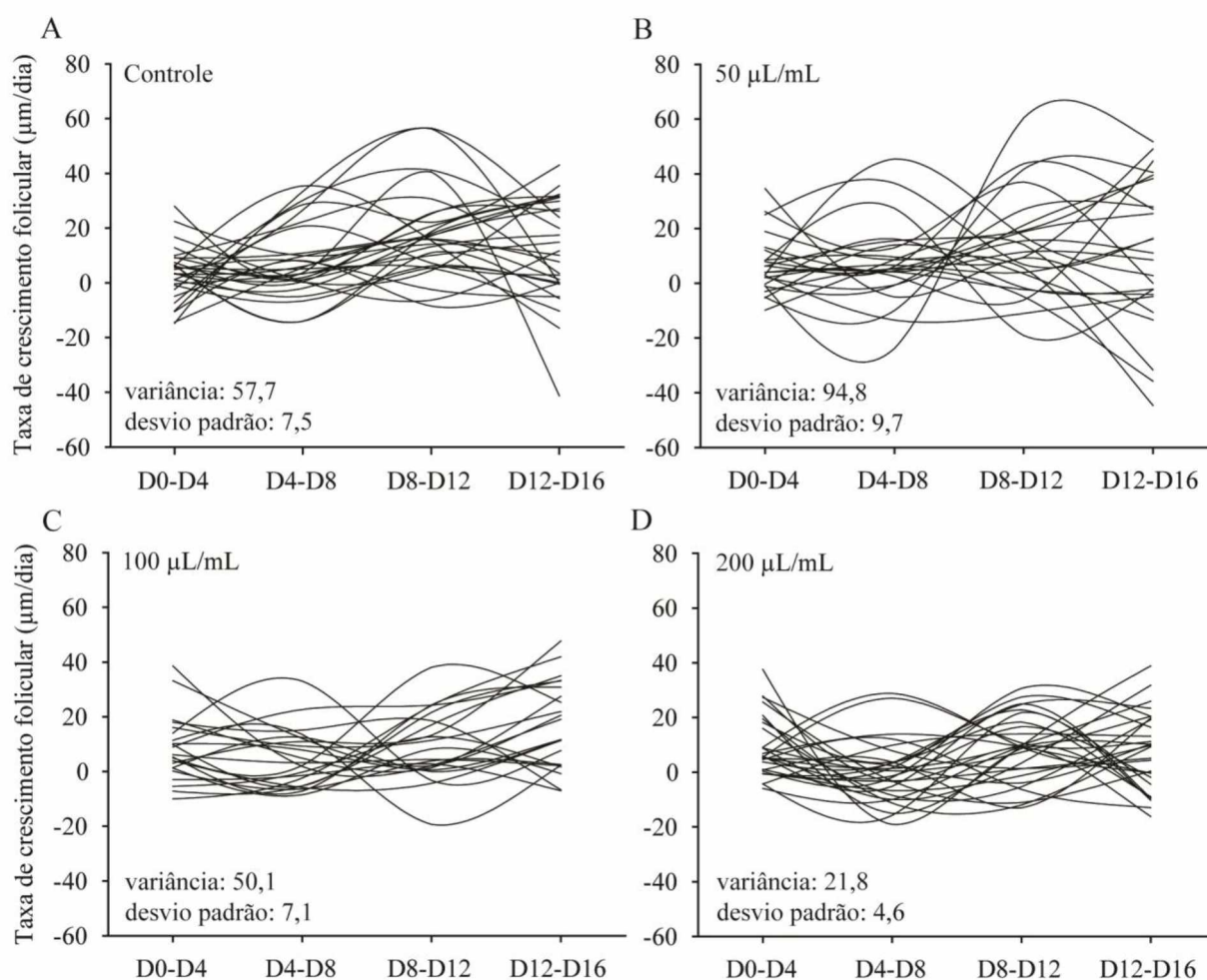


Figura 7. Representação da taxa de crescimento ($\mu\text{m}/\text{dia}$) de folículos normais bovinos e valores de variância e desvio padrão determinados após o cultivo *in vitro* nos sistemas 2D (controle) e 3D por levitação com diferentes concentrações (50, 100 e 200 $\mu\text{L}/\text{mL}$) de nanopartículas compostas de ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina. A variância e desvio padrão foram calculados sobre a taxa de crescimento geral (D16 - D4) dentro de cada tratamento [(A) controle; (B) 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$; (C) 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$; (D) 200 $\mu\text{L}/\text{mL}$].

A frequência e distribuição dos folículos classificados de acordo com a categoria de crescimento estão demonstradas na Figura 8A,B. Os tratamentos controle e 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ apresentaram maior ($P < 0.05$) proporção de folículos com ausência de crescimento em relação ao grupo 200 $\mu\text{L}/\text{mL}$ (Figura 8B). Dentro da categoria de crescimento lento, uma porcentagem superior de folículos ($P < 0,05$) foi observada no grupo 200 $\mu\text{L}/\text{mL}$ quando comparado aos grupos controle e 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$. A proporção de folículos com crescimento rápido não diferiu ($P > 0,05$) entre os tratamentos.

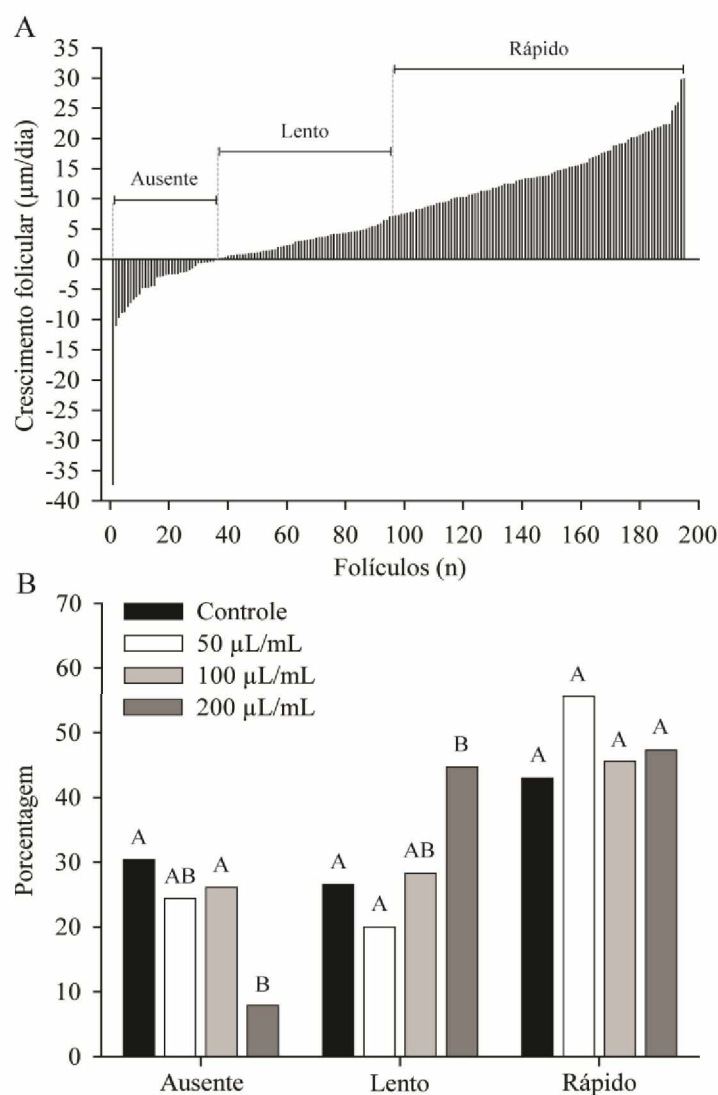


Figura 8. (A) Representação de folículos classificados de acordo com a categoria de crescimento (ausente: -37,1 a 0,0 µm/dia; lento: 0,1 a 7,0 µm/dia; rápido: 7,1 a 29,8 µm/dia). (B) Distribuição da categoria de crescimento folicular após o cultivo *in vitro* nos sistemas 2D (controle) e 3D por levitação com diferentes concentrações (50, 100 e 200 µL/mL) de nanopartículas compostas de ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina.

^{A,B} Entre tratamentos e dentro da mesma categoria de crescimento folicular ($P < 0,05$).

7.3 FORMAÇÃO DO ANTRO, EXTRUSÃO E DEGENERAÇÃO FOLICULAR

As análises de razão de possibilidades (*Odds ratio*) avaliaram a influência da categoria de crescimento folicular sobre a formação do antro (Tabela 2), a formação e manutenção do antro (Tabela 3) e a extrusão e/ou degeneração folicular (Tabela 4). Independente do tratamento, folículos com crescimento lento e rápido possuem 4 e 7 vezes mais chances ($P <$

0,05), respectivamente, de formação do antro do que aqueles com ausência de crescimento (Tabela 2). Entretanto, quando comparado os tratamentos dentro do padrão de crescimento lento (Tabela 3), observamos que os folículos cultivados no grupo 200 $\mu\text{L/mL}$ apresentaram maior probabilidade ($P < 0,05$) de formação e manutenção do antro em relação ao controle. Em adição, a razão de possibilidades foi determinada dentro da categoria de crescimento lento para extrusão e/ou degeneração folicular (Tabela 4). Os folículos do grupo controle apresentaram 6 vezes mais chances ($P < 0,05$) de degeneração e/ou extrusão folicular quando comparado ao 200 $\mu\text{L/mL}$.

Tabela 2. Razão de possibilidades (*Odds ratio*) para formação de antro durante o cultivo *in vitro* de acordo com a categoria de crescimento folicular (ausente, lento e rápido).

[†] Categorias de crescimento	Formação de antro (%)	<i>Odds ratio</i>	I.C. (95%)	P-valor
Ausente	12,0 (6/50)	4,5	1,6 – 12,3	0,0037
Lento	38,3 (23/60)			
Ausente	12,0 (6/50)	7,3	2,8 – 18,7	0,0001
Rápido	50,0 (49/98)			
Lento	38,3 (23/60)	1,6	0,8 – 3,0	0,2061
Rápido	50 (49/98)			

[†] Dados combinados independente do tratamento. Categorias de crescimento: ausente, $-37,1$ a $0,0 \mu\text{m/dia}$; lento, $0,1$ a $7,0 \mu\text{m/dia}$; rápido, $7,1$ a $29,8 \mu\text{m/dia}$.

I.C.: intervalo de confiança.

Tabela 3. Razão de possibilidades (*Odds ratio*) para formação e manutenção do antro de acordo com o cultivo *in vitro* nos sistemas 2D (controle) e 3D por levitação com diferentes concentrações (50, 100 e 200 µL/mL) de nanopartículas.

† Categoria de crescimento lento	Formação e manutenção do antro (%)	<i>Odds ratio</i>	I.C. (95%)	P-valor
Controle	19,0 (4/21)	2,1	0,3 – 12,3	0,7063
50 µL/mL	33,3 (3/9)			
Controle	19,0 (4/21)	3,6	0,7 – 17,0	0,1941
100 µL/mL	46,1 (6/13)			
Controle	19,0 (4/21)	6,1	1,4 – 26,0	0,0286
200 µL/mL	58,8 (10/17)			
50 µL/mL	33,3 (3/9)	1,7	0,2 – 9,9	0,8726
100 µL/mL	46,1 (6/13)			
50 µL/mL	33,3 (3/9)	2,8	0,5 – 15,4	0,4097
200 µL/mL	58,8 (10/17)			
100 µL/mL	46,1 (6/13)	1,6	0,3 – 7,1	0,7489
200 µL/mL	58,8 (10/17)			

† Foram considerados somente os folículos com crescimento folicular lento dentro de cada tratamento.

I.C.: intervalo de confiança.

Tabela 4. Razão de possibilidades (*Odds ratio*) para extrusão e/ou degeneração folicular de acordo com o cultivo *in vitro* nos sistemas 2D (controle) e 3D por levitação com diferentes concentrações (50, 100 e 200 $\mu\text{L/mL}$) de nanopartículas.

†Categoria de crescimento lento	Extrusão e/ou degeneração folicular (%)	<i>Odds ratio</i>	I.C. (95%)	P-valor
Controle	66,6 (14/21)	1,6	0,3 – 7,9	0,8687
50 $\mu\text{L/mL}$	55,5 (5/9)			
Controle	66,6 (14/21)	2,3	0,5 – 9,6	0,4108
100 $\mu\text{L/mL}$	46,1 (6/13)			
Controle	66,6 (14/21)	6,5	1,5 – 27,4	0,0203
200 $\mu\text{L/mL}$	23,5 (4/17)			
50 $\mu\text{L/mL}$	55,5 (5/9)	1,0	0,2 – 8,0	1,0000
100 $\mu\text{L/mL}$	46,1 (6/13)			
50 $\mu\text{L/mL}$	55,5 (5/9)	4,1	0,7 – 22,8	0,2302
200 $\mu\text{L/mL}$	23,5 (4/17)			
100 $\mu\text{L/mL}$	46,1 (6/13)	2,7	0,5 – 13,3	0,3619
200 $\mu\text{L/mL}$	23,5 (4/17)			

† Foram considerados somente os folículos com crescimento folicular lento dentro de cada tratamento.

I.C.: intervalo de confiança.

Independente do tratamento observou-se o aumento progressivo ($P < 0,05$) na taxa de formação de antro durante o cultivo *in vitro* (Figure 9). Ao comparar os tratamentos dentro do mesmo dia de cultivo, o grupo controle apresentou maior ($P < 0,05$) porcentagem de formação de antro no D4 em relação aos demais tratamentos. No entanto, ao final do cultivo, a maior ($P < 0,05$) proporção de folículos com antro foi observada no tratamento 200 $\mu\text{L/mL}$ em relação aos grupos controle e 50 $\mu\text{L/mL}$.

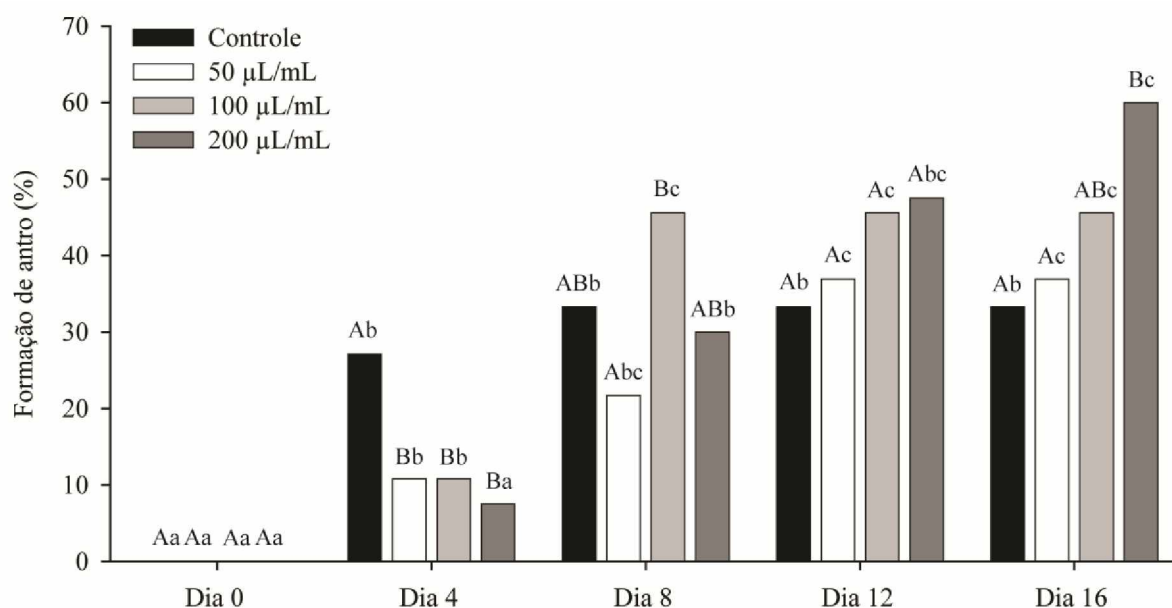


Figura 9. Porcentagem de formação de antro durante o cultivo *in vitro* nos sistemas 2D (controle) e 3D por levitação com diferentes concentrações (50, 100 e 200 µL/mL) de nanopartículas compostas de ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina.

^{A,B} Entre tratamentos e dentro do mesmo dia de cultivo *in vitro* ($P < 0,05$).

^{a,b,c} Dentro do tratamento e entre dias de cultivo *in vitro* ($P < 0,05$).

A taxa de crescimento folicular diária e a condição folicular (formação de antro, formação e manutenção do antro e degeneração e/ou extrusão folicular) apresentaram correlação positiva ($P < 0,05$) durante o cultivo *in vitro* (Figura 10A). Dentro da condição folicular, a proporção de folículos sem formação de antro foi superior ($P < 0,05$) nos tratamentos controle e 50 µL/mL em relação ao 200 µL/mL (Figura 10B). O tratamento 200 µL/mL apresentou maior ($P < 0,05$) taxa de formação e manutenção do antro quando comparado aos demais grupos. Além disso, a degeneração e/ou extrusão folicular após a formação do antro foi superior (tendência significativa; $P = 0,07$) no grupo controle em relação ao 200 µL/mL.

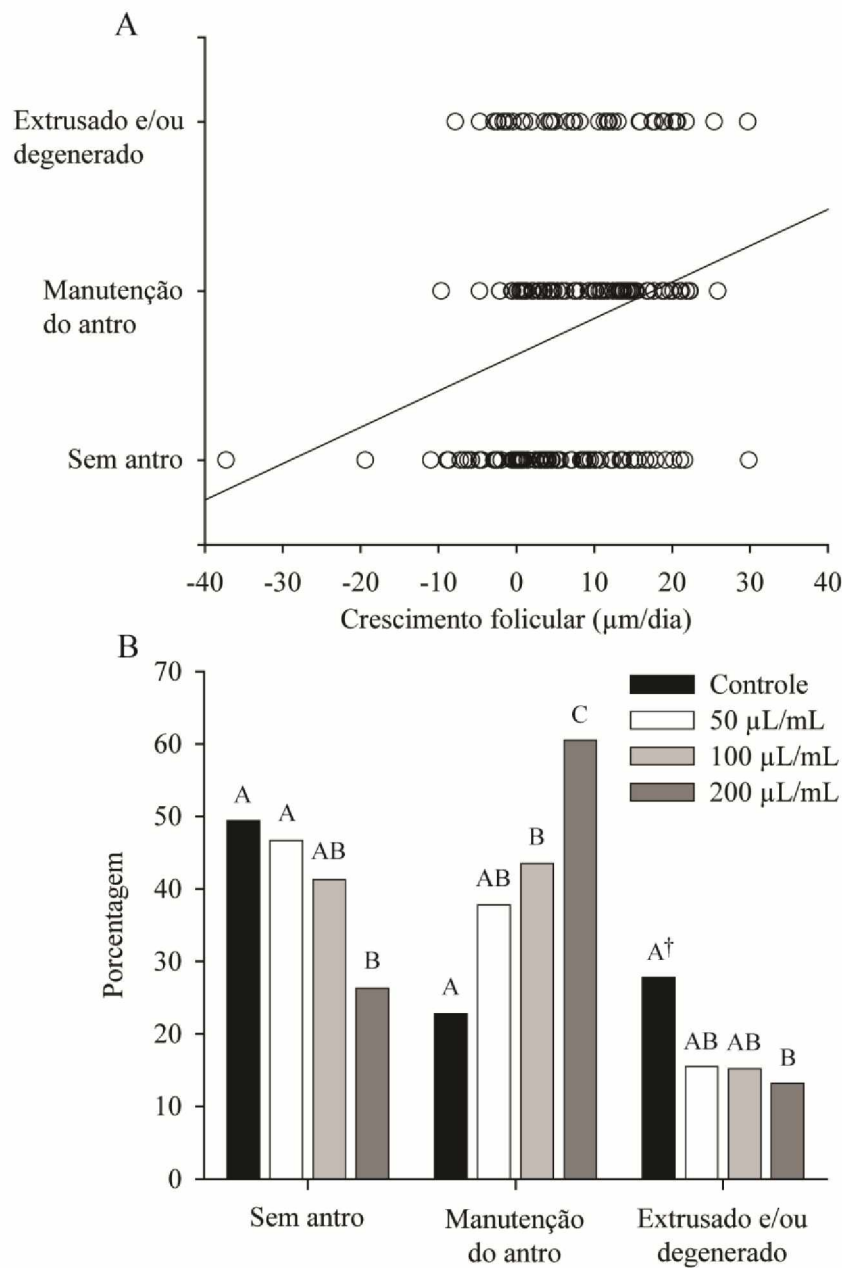


Figura 10. (A) Análise de regressão linear entre a condição folicular e a taxa de crescimento ($\mu\text{m}/\text{dia}$) após o cultivo *in vitro*. Cada círculo no gráfico representa um folículo avaliado ($n = 208$). Para análise de regressão, os folículos foram classificados quanto a condição folicular (variável dependente) em: 1 = sem antro; 2 = manutenção do antro; 3 = extrusado e/ou degenerado. A análise de regressão está representada pela reta (linha preta) e fórmula [condição folicular = $1,623 + (0,0215 \times \text{taxa de crescimento folicular})$]; $r = 0,25$; $R^2 = 0,06$; $P < 0,001$. (B) Frequência de distribuição da condição folicular após o cultivo *in vitro* nos sistemas 2D (controle) e 3D por levitação com diferentes concentrações (50, 100 e 200 $\mu\text{L}/\text{mL}$) de nanopartículas compostas de ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina.

^{A,B,C} Entre tratamentos e dentro da mesma condição folicular ($P < 0,05$).

[†] Tende a diferir do tratamento 200 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ($P = 0,07$).

As variáveis período médio em dias, diâmetro folicular e diâmetro folicular relativo foram analisadas no momento da formação do antro (Figuras 11A,B,C). A formação do antro ocorreu no grupo controle em média 3,3 dias, 1,2 dias e 3,9 dias antes ($P < 0,05$) em relação aos grupos 50, 100 e 200 $\mu\text{L/mL}$ (Figura 11A), respectivamente. O diâmetro folicular não diferiu ($P > 0,05$) entre os tratamentos (Figura 11B), entretanto, o diâmetro folicular relativo foi superior ($P < 0,05$) nos tratamentos 50 e 200 $\mu\text{L/mL}$ quando comparado ao controle e 100 $\mu\text{L/mL}$ (Figura 11C). O efeito do tratamento e do período da formação do antro sobre a porcentagem de folículos morfologicamente normais ao final do cultivo (D16) foram avaliados (Figura 11D). A proporção de folículos que sobreviveram até o D16, após a formação de antro no D4, foi superior ($P < 0,05$) nos tratamentos 100 e 200 $\mu\text{L/mL}$ em comparação ao controle.

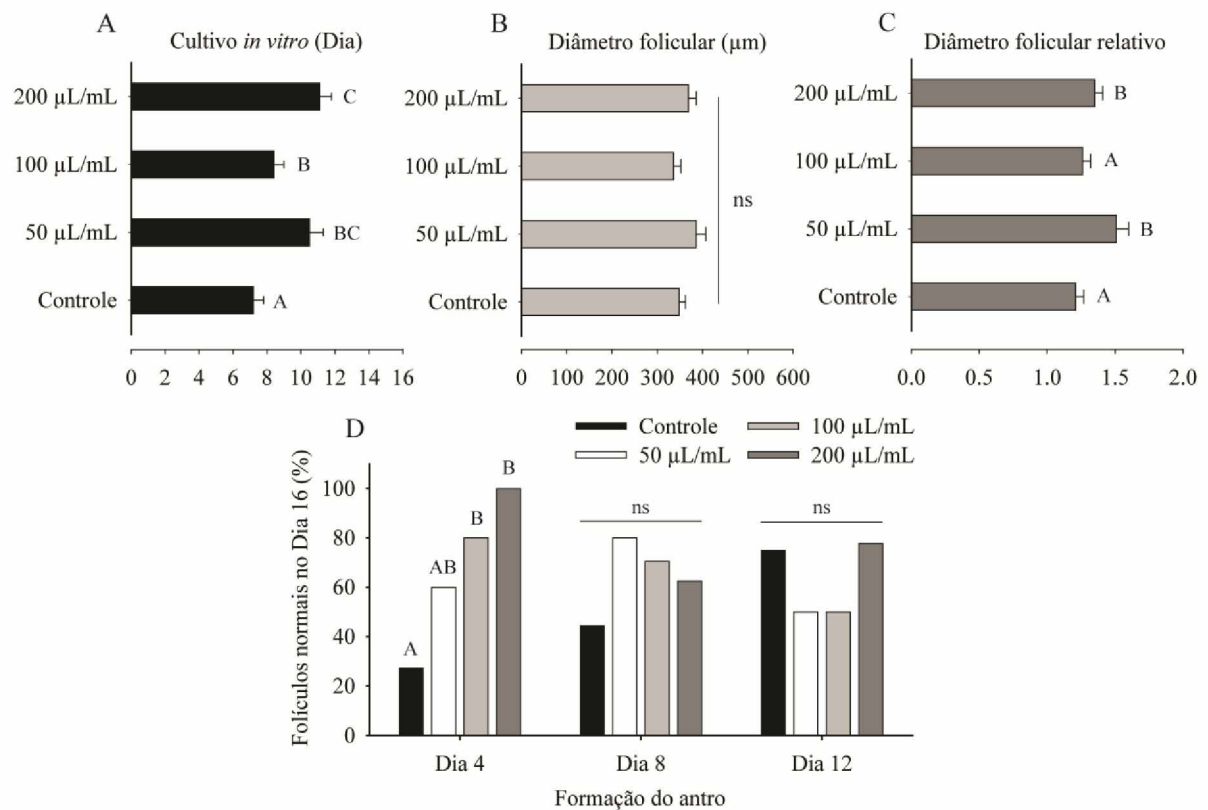


Figura 11. Variáveis (média \pm epm) determinadas em folículos pré-antrais bovinos [(A) período de dias; (B) diâmetro folicular; e (C) diâmetro folicular relativo] no momento da formação do antro durante o cultivo *in vitro* nos sistemas 2D (controle) e 3D por levitação com diferentes concentrações (50, 100 e 200 $\mu\text{L/mL}$) de nanopartículas compostas de ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina. (D) Efeito do tratamento e do período da formação do antro sobre a porcentagem de folículos normais ao final do cultivo *in vitro* (Dia 16).

^{A,B} Entre tratamentos e dentro do mesmo período de cultivo folicular ($P < 0,05$).

ns: não significativa ($P > 0,05$).

7.4 MATURAÇÃO *IN VITRO*

As taxas de recuperação ovocitária ao final do cultivo, de viabilidade e de retomada da meiose após a maturação *in vitro* estão demonstradas (Tabela 5). O tratamento de 200 $\mu\text{L/mL}$ apresentou a proporção superior ($P > 0,05$) de ovócitos recuperados ao final do período de cultivo em relação ao tratamento de 100 $\mu\text{L/mL}$. Entre os tratamentos do 3D a maior taxa de viabilidade ovocitária foi observada no grupo de 200 $\mu\text{L/mL}$. Por outro lado, este tratamento apresentou proporção de retomada da meiose semelhante ($P > 0,05$) aos demais tratamentos. Apenas os ovócitos desenvolvidos no cultivo 3D alcançaram a fase de MI após a retomada da

meiose. O diâmetro ovocitário do controle foi maior ($P > 0,05$) comparado ao de 200 $\mu\text{L/mL}$ e a espessura da zona pelúcida foi semelhante ($P > 0,05$) entre os tratamentos.

Tabela 5. Percentual de recuperação ovocitária, viabilidade ovocitária, retomada meiótica, vesícula germinativa (VG), quebra da vesícula germinativa (VGBD), metáfase I (MI) e metáfase II (MII) de ovócitos de folículos pré-antrais cultivados *in vitro* nos sistemas 2D (controle) e 3D por levitação com diferentes concentrações (50, 100 e 200 $\mu\text{L/mL}$) de nanopartículas.

Tratamentos	Recuperação Ovocitária	Viabilidade Ovocitária	Retomada Meiótica	VGBD	MI	MII
Controle	39,5 (32/81) ^{AB}	62,5 (20/32) ^{AB}	45,0 (9/20) ^A	100,0 (9/9) ^A	-	-
50 $\mu\text{L/mL}$	43,4 (20/46) ^{AB}	45,0 (9/20) ^A	88,8 (8/9) ^B	75,0 (6/8) ^A	25,0 (2/8) ^A	-
100 $\mu\text{L/mL}$	32,6 (15/46) ^A	33,3 (5/15) ^A	20,0 (1/5) ^A	-	100,0 (1/1) ^A	-
200 $\mu\text{L/mL}$	55,0 (22/40) ^B	77,2 (17/22) ^B	64,7 (11/17) ^{AB}	81,8 (9/11) ^A	18,2 (2/11) ^A	-

^{A, B} Letras diferentes na mesma coluna ($P < 0,05$).

8 DISCUSSÃO

Este estudo foi o primeiro a testar o sistema de cultivo tridimensional por levitação magnética com nanopartículas formadas de ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais independente da espécie.

Os grupos do sistema em 3D mantiveram a viabilidade folicular por mais tempo comparado ao controle. Adicionalmente, dentro do tratamento cultivado com a maior concentração de nanopartículas a taxa de degeneração folicular se manteve constante até o D12 do cultivo *in vitro*. Taxas superiores de viabilidade folicular também foram reportadas no cultivo tridimensional de folículos pré-antrais caprinos e de murinos associada a maior concentração da matriz (SILVA et al., 2015b). O sistema de cultivo em 3D favorece a sobrevivência folicular por mimetizar as condições ambientais da matriz ovariana. A vantagem desta mimetização é a manutenção da estrutura geral do folículo o que mantém as vias de comunicação entre células da granulosa e o ovócito permitindo a maturação normal do mesmo (JOO et al., 2016). Além disso, os sistemas 3D podem controlar a maturação do folículo de forma similar ao córtex ovariano que desempenha pressão física e rigidez regulando o desenvolvimento dos folículos (WEST et al., 2007; XU et al., 2009).

A proporção de folículos extrusos aumentou ao longo do período de cultivo com exceção do grupo 100 $\mu\text{L/mL}$. O processo de extrusão ocorre devido a ruptura da membrana basal e neste estudo a associação das nanopartículas com a levitação magnética garantiu a proteção da estrutura folicular e da membrana basal durante o desenvolvimento *in vitro*. Os sistemas de cultivo em 3D permitem que o folículo mantenha seu desenvolvimento, assim como a sua morfologia reduzindo a tensão colocada no complexo granulosa-ovócito como acontece quando cultivado em sistema 2D (GREEN; SHIKANOV, 2016). Além disso, taxas mais elevadas de extrusão nos folículos cultivados no sistema 2D são explicadas pela manutenção inadequada da arquitetura tridimensional e a outros fatores como o

remodelamento inadequado da membrana basal folicular. Estudos anteriores sugerem que o controle da maturação do folículo no córtex ovariano pode estar associado à pressão física e rigidez do tecido [20, 21]. Portanto, espera-se que as características biomecânicas do microambiente 3D desempenhem um papel na regulação dos fenótipos e da função das células ovarianas.

Os diâmetros foliculares e as taxas de crescimento foram semelhantes entre os tratamentos com exceção do grupo de 200 $\mu\text{L/mL}$ que apresentou o diâmetro e a taxa de crescimento inferiores ao controle no final do período de cultivo. A matriz de nanopartículas pode ter exercido resistência ao crescimento folicular. Esse resultado sugere que um ambiente mais rígido se assemelha ao estroma ovariano favorecendo o desenvolvimento controlado dos folículos pré-antrais. Resultados semelhantes foram observados no cultivo 3D de folículos pré-antrais de primatas para a maior concentração da matriz alginato (XU et al., 2009). Este fato reforça a hipótese de que o córtex ovariano é mais rígido e por isso é relativamente não-permissivo para o crescimento do folículo ao contrário da zona perimedular que é menos rígida e conseqüentemente mais permissiva. Portanto, a migração dos folículos pelo estroma ovariano estaria relacionada a regulação da diferenciação celular no ovário devido a influência mecânica de cada zona (WOODRUFF; SHEA, 2011).

O tratamento de 200 $\mu\text{L/mL}$ apresentou taxas diárias de crescimento mais homogêneas observado pelo menor desvio padrão e variância. Em adição, este grupo também apresentou maior proporção de folículos com crescimento lento em relação ao controle e ao de 50 $\mu\text{L/mL}$. A superfície folicular aumenta cerca de 500 vezes do estágio primordial até o pré-ovulatório nos bovinos. O crescimento regular favorece o desenvolvimento ovocitário sincronizado com a proliferação das células da granulosa e reorganização do citoesqueleto da membrana basal (RODGERS; IRVING RODGERS, 2003). Desta forma, o processo de desenvolvimento folicular requer o remodelamento tecidual extensivo o qual envolve a

degradação organizada e a reconstrução da membrana basal (BROWN et al., 2006). Além disso, a correlação positiva entre o crescimento rápido e a degeneração e/ou extrusão dos folículos após a formação do antro observado neste estudo também foi observada no cultivo de folículos pré-antrais caprinos submetidos a altas concentrações de FSH (APOLLONI et al., 2016).

Dentro do grupo dos folículos classificados com crescimento lento, o tratamento com 200 $\mu\text{L/mL}$ apresentou maior chance de formação e manutenção do antro em relação ao controle. Além disso, o tratamento controle apresentou 6 vezes mais chances de apresentar folículos degenerados e/ou extrusos comparado ao tratamento com 200 $\mu\text{L/mL}$. O crescimento homogêneo associado a proteção da membrana basal observado no cultivo 3D propiciou o ambiente ideal para a formação e manutenção do antro e seu fluido. A formação do antro é considerada fator essencial para o desenvolvimento folicular, pois seus componentes bioquímicos são essenciais para a esteroidogênese, maturação final dos ovócitos, ovulação e transporte do ovócito pela tuba uterina (FAHIMINIYA; GÉRARD, 2010; RODGERS; IRVING RODGERS, 2010).

Neste estudo, ao final do cultivo a maior proporção de formação de antro foi observada no grupo de 200 $\mu\text{L/mL}$ em relação ao controle e 50 $\mu\text{L/mL}$. Além disso, o sistema 3D (100 e 200 $\mu\text{L/mL}$) favoreceu a sobrevivência dos folículos com formação precoce do antro. Folículos pequenos com formação do antro têm a maior possibilidade de sofrer extrusão folicular, pois o fluido folicular exercerá uma pressão interna sobre a membrana basal. Para que ocorra o desenvolvimento do folículo é importante a manutenção das projeções transzonais e a preservação das comunicações bidirecionais entre as células foliculares (WOODRUFF; SHEA, 2011). Adicionalmente, a maior taxa de formação de antro e viabilidade folicular também foram observados no co-cultivo de folículos de ratos no sistema 3D (Tagler et al. (2012).

Ao final do cultivo, os ovócitos foram recuperados e submetidos ao processo de maturação no qual observou-se taxa de viabilidade ovocitária superior no tratamento de 200 $\mu\text{L/mL}$ em relação aos grupos de 50 e 100 $\mu\text{L/mL}$. Em adição, apenas os ovócitos desenvolvidos no cultivo 3D alcançaram a fase de MI após a retomada da meiose. Entende-se que a preservação das principais características morfológicas do folículo durante o cultivo e, conseqüentemente, ovocitárias como as projeções transzonais entre as células do ovócito e da granulosa proporcionam uma percentagem significativamente maior de ovócitos viáveis e maduros (BARRETT; SHEA; WOODRUFF, 2010).

A levitação magnética se mostrou um método mais simples comparado à manipulação das outras matrizes e os resultados são promissores para aperfeiçoar o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais. Por fim, conclui-se que o sistema de cultivo tridimensional com nanopartículas associadas a levitação magnética propiciou o desenvolvimento *in vitro* dos folículos secundários bovinos com taxas superiores de viabilidade folicular, formação e manutenção do antro além de crescimento regular comparado ao sistema convencional.

REFERÊNCIAS

ALVES, K. A. et al. The mare model to study the effects of ovarian dynamics on preantral follicle features. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. 1–18, 2016.

APOLLONI, L. B. et al. Accelerated follicle growth during the culture of isolated caprine preantral follicles is detrimental to follicular survival and oocyte meiotic resumption. **Theriogenology**, v. 86, n. 6, p. 1530–1540, 2016.

ARAÚJO, V. R. et al. Effect of Bone Morphogenetic Protein-7 (BMP-7) on *in vitro* survival of caprine preantral follicles 1. v. 30, n. 4, p. 305–310, 2010.

ARAÚJO, V. R. et al. *In vitro* culture of bovine preantral follicles: a review. **Reproductive biology and endocrinology : RB&E**, v. 12, p. 78, 2014a.

ARAÚJO, V. R. et al. *In vitro* development of bovine secondary follicles in two- and three-dimensional culture systems using vascular endothelial growth factor, insulin-like growth factor-1, and growth hormone. **Theriogenology**, v. 82, n. 9, p. 1246–53, 2014b.

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.

BARRETT, S. L.; SHEA, L. D.; WOODRUFF, T. K. Noninvasive index of cryorecovery and growth potential for human follicles *in vitro*. **Biology of reproduction**, v. 82, p. 1180–1189, 2010.

BECKER, J. L.; SOUZA, G. R. Using space-based investigations to inform cancer research on Earth. **Nature reviews. Cancer**, v. 13, n. 5, p. 315–27, 2013.

BELLI, M. et al. Towards a 3D culture of mouse ovarian follicles. **International Journal of Developmental Biology**, v. 56, n. 10–12, p. 931–937, 2012.

CELESTINO, J. J. H. et al. Steady-state level of epidermal growth factor (EGF) mRNA and effect of EGF on *in vitro* culture of caprine preantral follicles. **Cell Tissue Res**, v. 344, p. 539–550, 2011.

CHOI, J. K. et al. The crucial role of mechanical heterogeneity in regulating follicle development and ovulation with engineered ovarian microtissue. **Biomaterials**, v. 35, n. 19, p. 5122–5128, 2014.

CONCEPTS, C.; JERUSS, J. S.; WOODRUFF, T. K. Preservation of Fertility in Patients with Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 9, 2009.

CUNHA, M. S. C. et al. Influência da temperatura de fecundação *in vitro* e das células do *cumulus oophorus* sobre a taxa de polispermia e desenvolvimento embrionário. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 2, p. 301–306, 2010.

DAQUINAG, A. C.; SOUZA, G. R.; KOLONIN, M. G. Adipose tissue engineering in three-dimensional levitation tissue culture system based on magnetic nanoparticles. **Tissue engineering. Part C, Methods**, v. 19, n. 5, p. 336–44, 2013.

DOBSON, J. Remote control of cellular behaviour with magnetic nanoparticles. **Nature Nanotechnology**, v. 3, n. 3, p. 139–143, 2008. EPPIG, J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**, v. 122, n. 6, p. 829–838, 2001.

FAHIMINIYA, S.; GÉRARD, N. Le liquide folliculaire chez les mammifères. **Gynécologie Obstétrique & Fertilité**, v. 38, n. 6, p. 402–404, 2010.

FAUSTINO, L. R.; ROSSETTO, R.; FIGUEIREDO, J. R. Influência da tensão de oxigênio na maturação oocitária e cultivo *in vitro* de folículos e embriões. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 4, p. 233–242, 2010.

FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; SILVA, J. R. V. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. (Ed.). **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. Roca ed. São Paulo: [s.n.]. p. 303–327.

FIGUEIREDO, J. et al. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção *in vitro* de embriões em larga escala. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 143–152, 2007.

FIGUEIREDO, J. R. et al. Utilização do potencial de oócitos imaturos inclusos em folículos pré-antrais na reprodução de mamíferos. **Ciencia Animal**, v. 8, n. 1, p. 23–29, 1998.

FIGUEIREDO, J. R.; SILVA, J. R. V; RODRIGUES, A. P. R. Estado atual da biotecnia de manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA). **Ciencia Animal**, v. 9, n. 1, p. 11–25, 1999. FIGUEIREDO JR, HULSHOF SC, VAN DEN HURK R, NUSGENS B, BEVERS MM, E. F.; JF, B. *Theriogenology*41:1333-1346,1994. **Theriogenology**, v. 41, p. 1333–1346, 1994.

FILATOV, M. A.; KHRAMOVA, Y. V; SEMENOVA, M. L. *In Vitro* Mouse Ovarian Follicle Growth and Maturation in Alginate Hydrogel: Current State of the Art. **Acta Naturae**, v. 7, n. 2, p. 48–56, 2014.

FRANSOLET, M. et al. Strategies for using the sheep ovarian cortex as a model in reproductive medicine. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 1–7, 2014.

GONÇALVES, P. B. D.; JOSÉ RICARDO DE FIGUEIREDO; VICENTE JOSÉ DE FIGUEIRÊDO FREITAS. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008.

GREEN, L. J.; SHIKANOV, A. *In vitro* culture methods of preantral follicles. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 229–238, 2016.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S.; BARNABE, R. C. **Reprodução animal**. [s.l.] Manole, 2004.

HAISLER, W. L. et al. Three-dimensional cell culturing by magnetic levitation. **Nature Protocols**, v. 8, n. 10, p. 1940–9, 2013.

HATZIRODOS, N. et al. Transcriptome comparisons identify new cell markers for theca interna and granulosa cells from small and large antral ovarian follicles. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–13, 2015.

HAUGLAND, R. P.; MACCOUBREY, I. C.; MOORE, P. L. **Dual-Fluorescence Cell Viability Assay Using Ethidium Homodimer and Calcein Am**. US Pat. 5314805, 24 maio 1994. 12 p.

HENNET, M. L.; COMBELLES, C. M. H. The antral follicle: A microenvironment for oocyte differentiation. **International Journal of Developmental Biology**, v. 56, n. 10–12, p. 819–831, 2012.

HOGAN, M.; SOUZA, G.; BIRLA, R. Assembly of a functional 3D primary cardiac construct using magnetic levitation. **AIMS Bioengineering**, v. 3, n. 3, p. 277–288, 2016.

JAGANATHAN, H. et al. Three-Dimensional *In Vitro* Co-Culture Model of Breast Tumor using Magnetic Levitation. **Scientific Reports**, v. 4, p. 6468, 2014.

JOO, S. et al. The effect of collagen hydrogel on 3D culture of ovarian follicles. **Biomedical Materials**, p. 65009, 2016.

LANGER, R.; TIRRELL, D. A. Designing materials for biology and medicine. **Nature**, v. 428, n. 6982, p. 487–492, 2004.

LIN, H. et al. Nanoparticle Improved Stem Cell Therapy for Erectile Dysfunction in a Rat Model of Cavernous Nerve Injury. **The Journal of urology**, v. 195, n. 3, p. 788–795, 2016.

LOPES, C. A. P. et al. Short-term preservation of canine preantral follicles: Effects of temperature, medium and time. **Animal Reproduction Science**, v. 115, n. 1–4, p. 201–214, 2009.

MAGOFFIN, D. A. Ovarian theca cell. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 37, n. 7, p. 1344–1349, 2005.

MARTINS, F. S. et al. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 1, p. 36–49, 2008.

MATOS, M. et al. Técnicas para avaliação da qualidade de folículos ovarianos pré-antrais cultivados *in vitro*. **Rev Bras Reprod Anim**, p. 433–442, 2007.

NEUBERGER, T. et al. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 293, n. 1, p. 483–496, 2005.

NUTTINCK, F. et al. Characterization of *in Vitro* Growth of Bovine Preantral Follicles: a Preliminary Study. **Theriogenology**, v. 39, p. 811–821, 1993.

PRIZANT, H.; GLEICHER, N.; SEN, A. Androgen actions in the ovary: Balance is key. **Journal of Endocrinology**, v. 222, n. 3, p. 141–151, 2014.

RODRIGUES, J. L.; DE ÁVILA RODRIGUES, B. Evolução da biotecnologia da reprodução no Brasil e seu papel no melhoramento genético. **Ceres**, v. 56, n. 4, 2009.

ROSSETTO, R. et al. Effect of medium composition on the *in vitro* culture of bovine pre-antral follicles: morphology and viability do not guarantee functionality. **Zygote (Cambridge, England)**, v. 21, n. 2, p. 125–8, 2013a.

ROSSETTO, R. et al. Comparative study on the *in vitro* development of caprine and bovine preantral follicles. **Small Ruminant Research**, v. 113, n. 1, p. 167–170, 2013b.

ROSSETTO, R. et al. Impact of insulin concentration and mode of FSH addition on the *in vitro* survival and development of isolated bovine preantral follicles. **Theriogenology**, v. 86, p. 1137–1145, 2016.

ROWGHANI, N. M. et al. Maintenance of morphology and growth of ovarian follicles in suspension culture. **Tissue engineering**, v. 10, n. 3–4, p. 545–552, 2004.

RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca anatomica**, v. 24, p. 77–92, 1983.

SADR, S. Z. et al. Mouse preantral follicle development in two-dimensional and three-dimensional culture systems after ovarian tissue vitrification. **European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology**, v. 194, p. 206–211, 2015.

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

SHEA, L. D.; WOODRUFF, T. K.; SHIKANOV, A. Bioengineering the Ovarian Follicle Microenvironment. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 16, n. 1, p. 29–52, 2014.

SHIKANOV, A. et al. Hydrogel network design using multifunctional macromers to coordinate tissue maturation in ovarian follicle culture. **Biomaterials**, v. 32, n. 10, p. 2524–2531, 2011.

SILVA, C. M. G. et al. The effects of epidermal growth factor (EGF) on the *in vitro* development of isolated goat secondary follicles and the relative mRNA expression of EGF, EGF-R , FSH-R and P450 aromatase in cultured follicles. **Research in Veterinary Science**, v. 94, n. 3, p. 453–461, 2013.

SILVA, C. M. G. et al. Activin-A promotes the development of goat isolated secondary follicles *in vitro*. **Zygote (Cambridge, England)**, v. 23, n. 1, p. 41–52, 2015a.

SILVA, G. M. et al. *In vitro* development of secondary follicles from pre-pubertal and adult goats cultured in two-dimensional or three-dimensional systems. **Zygote (Cambridge, England)**, v. 23, n. 4, p. 475–84, 2015b.

SOUZA, G. R. et al. Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. **Nature Nanotechnology**, v. 5, n. 4, p. 291–6, 2010.

TAGLER, D. et al. Embryonic fibroblasts enable the culture of primary ovarian follicles within alginate hydrogels. **Tissue engineering. Part A**, v. 18, n. 11–12, p. 1229–38, 2012.

TELFER, E. E.; MCLAUGHLIN, M. Strategies to support human oocyte development *in vitro*. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 56, n. 10–12, p. 901–907, 2012.

TELFER, E. E.; ZELINSKI, M. B. Ovarian follicle culture: Advances and challenges for human and nonhuman primates. **Fertility and Sterility**, v. 99, n. 6, p. 1523–1533, 2013.

TSENG, H. et al. Assembly of a three-dimensional multitype bronchiole coculture model using magnetic levitation. **Tissue engineering. Part C, Methods**, v. 19, n. 9, p. 665–75, 2013.

TSENG, H. et al. A three-dimensional co-culture model of the aortic valve using magnetic levitation. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 1, p. 173–182, 2014.

TSENG, H. et al. A spheroid toxicity assay using magnetic 3D bioprinting and real-time mobile device-based imaging. **Scientific reports**, v. 5, p. 13987, 2015.

TSENG, H. et al. A high-throughput *in vitro* ring assay for vasoactivity using magnetic 3D bioprinting. **Scientific reports**, v. 6, n. 8, p. 30640, 2016.

WOODRUFF, T. K.; SHEA, L. D. A new hypothesis regarding ovarian follicle development: Ovarian rigidity as a regulator of selection and health. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 28, p. 3-6, 2011.

XU, J. et al. Fibrin promotes development and function of macaque primary follicles during encapsulated three-dimensional culture. **Human Reproduction**, v. 28, n. 8, p. 2187–2200, 2013.

XU, M. et al. Identification of a Stage-Specific Permissive *In Vitro* Culture Environment for Follicle Growth and Oocyte Development 1. v. 923, n. September, p. 916–923, 2006.

XU, M. et al. Encapsulated Three-Dimensional Culture Supports Development of Nonhuman Primate Secondary Follicles. **Biology of Reproduction**, v. 81, n. 3, p. 587–594, 2009.

YOKOO, M. J. I. et al. Estimativas de parâmetros genéticos para altura do posterior, peso e circunferência escrotal em bovinos da raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 6, p. 1761–1768, dez. 2007.

YOUNG, J. M.; MCNEILLY, A. S. Theca: The forgotten cell of the ovarian follicle. **Reproduction**, v. 140, n. 4, p. 489–504, 2010.