

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

**CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE
FOLICULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIS DE FETOS
BOVINOS E CULTIVO *IN VITRO* DE TECIDO
OVARIANO ASSOCIADO A PROTEÍNA
MORFOGENÉTICA ÓSSEA 9**

Renata de Freitas Ferreira Mohallem

Médica Veterinária/Mestre, em Ciências
Veterinárias

UBERLÂNDIA

2017

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

**CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE
FOLICULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIS DE FETOS
BOVINOS E CULTIVO *IN VITRO* DE TECIDO
OVARIANO ASSOCIADO A PROTEÍNA
MORFOGENÉTICA ÓSSEA 9**

Renata de Freitas Ferreira Mohallem

Orientador: Prof. Dr. José Octávio Jacomini

Coorientador: Dr. Rodrigo Otávio Decaria de Salles Rossi

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

UBERLÂNDIA

2017

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

- M697c 2017 Mohallem, Renata de Freitas Ferreira, 1981
Caracterização da população de folículos ovarianos pré-antrais de fetos bovinos e cultivo in vitro de tecido ovariano associado a proteína morfogenética óssea 9 / Renata de Freitas Ferreira Mohallem. - 2017.
68 f. : il.
- Orientador: José Octávio Jacomini.
Coorientador: Rodrigo Otávio Decaria de Salles Rossi.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.19>
Inclui bibliografia.
1. Veterinária - Teses. 2. Bovino - Reprodução - Teses. 3. Ovários - Teses. 4. Fertilização in vitro - Teses. I. Jacomini, José Octávio. II. Rossi, Rodrigo Otávio Decaria de Salles. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



Ata da defesa de TESE DE DOUTORADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de: TESE DE DOUTORADO Nº PPGCV/018/2017

Data: 29/09/2017

Discente: *Renata de Freitas Ferreira Mohallem* – Matrícula – 11313VET028

Título da Tese: CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRE-ANTRAIS DE FETOS BOVINOS E CULTIVO *IN VITRO* DE TECIDO OVARIANO ASSOCIADO A PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA

Área de concentração: PRODUÇÃO ANIMAL

Linha de pesquisa: BIOTÉCNICAS E EFICIÊNCIA REPRODUTIVA

Projeto de Pesquisa de vinculação: FATORES QUE AFETAM A EFICIÊNCIA REPRODUTIVA DOS REBANHOS BOVINOS

Aos 29 dias do mês de Setembro do ano de 2017 às 09h00 horas na sala 2D54 - Bloco 2D – Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Comissão Julgadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, composta pelos Professores/Doutores: **Kele Amaral Alves** – UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA; **Benner Geraldo Alves** – UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA; **Elisa Sant'Anna Monteiro da Silva** – CENTRO UNIVERSITÁRIO DO TRIÂNGULO; **Dr. Thiago Felipe Braga** – FACULDADE PRESIDENTE ANTONIO CARLOS DE UBERLÂNDIA e **José Octávio Jacomini** orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da comissão Dr./Dra. José Octávio Jacomini concedeu a palavra ao/a candidato(a) para a exposição do seu trabalho, contando com o tempo máximo de 50 minutos. A seguir o(a) senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o(a) candidato(a), durante o prazo máximo de (30) minutos, assegurando-se a mesma igual prazo para resposta. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Comissão Julgadora, em sessão secreta, considerou o(a) candidato(a) APROVADA.

Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme Regulamento do Programa, Legislação e a Regulamentação Interna da UFU.

Os trabalhos foram encerrados às 14 horas e 15 minutos, e para constar, lavrou-se a presente ata que será assinada pelos membros da Comissão Examinadora. Uberlândia, 29 de Setembro de 2017.

Dra. Kele Amaral Alves

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Dr. Benner Geraldo Alves
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Prof.ª Dra. Elisa Sant'Anna Monteiro da Silva
CENTRO UNIVERSITÁRIO DO TRIÂNGULO

Prof. Dr. Thiago Felipe Braga
FACULDADE PRESIDENTE ANTONIO CARLOS DE UBERLÂNDIA

Prof. Dr. José Octávio Jacomini
ORIENTADOR

AGRADECIMENTOS

A Deus, por toda saúde que tenho, e por proporcionar essa pós-graduação, e conviver com pessoas muito especiais.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Octávio Jacomini, pelos ensinamentos, pela atenção e pela enorme paciência a mim concedida.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Rodrigo Rossi, por acreditar no meu trabalho desde o início, sempre atencioso e interessado nos avanços da pesquisa, por infinitos ensinamentos, incentivos, além de um grande amigo.

A Dra. Kele Amaral, a pessoa que me incentivou a finalizar esta caminhada, por todo apoio, conhecimento, pela amizade, paciência, tempo e respeito.

Aos professores do Laboratório de Reprodução da FAMEV-UFU, Dr. Gustavo Macedo e Dra. Teresinha Assumpção pelo apoio e conhecimentos passados, a profa.Dra. Ricarda Maria dos Santos, pela condução do programa de pós-graduação, pelos ensinamentos, pelo respeito e carinho dedicado a nós.

Ao Laboratório de Citologia, Histologia e Embriologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia na pessoa do prof. Dr. Marcelo Beletti e do pós-doutorado Dr. Benner Alves, pelo apoio, conhecimentos transmitidos, análises e materiais cedidos.

Agradeço também às técnicas Maria Silva e Graciele Cardoso, a secretaria da pós-graduação Celia, a doutoranda Nicole, João, Mariana Bueno pela colaboração com o trabalho.

Agradeço aos meus alunos que durante suas férias e horários vagos trabalharam juntos neste experimento, Augusto, Jaíne, Rudgery e Bianca.

Agradeço aos meus queridos amigos do laboratório Deyse, Mayara Mafra, Mayara Oliveira, Jairo, Paula, Carina, obrigada pelos dias bons e pela amizade nos dias mais difíceis. A Laura pelo início de tudo com seu TCC, e sua grande amizade a mim concedida.

À minha família (mãe, pai, Bebel, Fael) e a família que constitui, Fernandinha e Daniel, obrigado pelo apoio em todas as fases deste trabalho, pelo amor e paciência, e pela motivação constante.

A todos vocês meu sincero obrigado.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1. Etapas do processo de ativação e desenvolvimento folicular.....20

Figura 2. A interação entre os receptores de BMP I e II induz a fosforilação de mensageiros intracelulares (Smad) que são movidos para o núcleo para regular a expressão de genes específicos. 26

Capítulo 2

Figura 1. Análise histológica do ovário de um feto do grupo Médio. A fotomicrografia representa um folículo primordial.....47

Figura 2. Análise histológica do ovário de feto bovino. A fotomicrografia representa a região cortical (C), área mais superficial onde se encontra maior quantidade de folículos, e medular (M), área mais profunda, formada por tecido conjuntivo denso, fibras colágenas dispostas em arranjos concêntricos e presença de vasos sanguíneos.....48

Figura 3. População média de folículos secundários, antrais iniciais e antrais no grupo Final.....49

Capítulo 3

Figura 1. Fotomicrografia de secções histológicas de tecido ovariano de feto. A seta indica folículos normais em A e B e folículos degenerados em C e D. A barra corresponde a 20 μm 57

Figura 2. Análise de correlação entre os diâmetros foliculares e ovocitários e a concentração de BMP-9 adicionada ao meio de cultivo.....	62
--	----

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Cronologia da ovogênese e foliculogênese no período fetal na espécie bovina.....	18
---	----

Capítulo 2

Tabela 1. Proporção dos folículos ovarianos dos grupos Inicial, Médio e Final.....	47
---	----

Tabela 2. População média de folículos e desvio padrão nos grupos Médio e Final.....	48
---	----

Capítulo 3

Tabela 1. Percentagens de folículos normais (primordiais, transição, primários e secundários) em fragmentos não cultivados (controle fresco) e cultivados <i>in situ</i> por 7 dias em tratamentos contendo 0 (controle cultivado), 50, 100 ou 200 ng/ml de BMP-9.....	59
---	----

Tabela 2. Percentagem de folículos em fragmentos não cultivados (controle fresco) e cultivados <i>in situ</i> por 7 dias em tratamentos contendo 0 (controle cultivado), 50, 100 ou 200 ng/ml de BMP-9.....	60
--	----

Tabela 3. Média ($\pm$ epm) dos diâmetros dos folículos e dos ovócitos não cultivados (controle fresco) e cultivados <i>in situ</i> por 7 dias em tratamentos contendo 0 (controle cultivado), 50, 100 ou 200 ng/ml de BMP-9.....	61
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - Percentagem

= - Igual a

± - Mais ou menos

× - Vezes

< - Menor que

> - Maior que

°C - Graus Celsius

µg -Microgramas

µm -Micrômetros

α-MEM- *Minimum Essential Medium Eagle* ou meio essencial mínimo

Ac-Anticorpo

AMH- Hormônio anti-mulleriano

BMP- Proteína morfogenética óssea

BSA - Albumina Sérica Bovina

CEUA- Comissão de Ética na Utilização de Animais

CGP- Células germinativas primordiais

CO₂ - Dióxido de Carbono

CR- Distância occípto-sacral ou “*Crown-Rump*”

cm - Centímetros

EGF- Fator de crescimento epidermal

Epm- Erro padrão médio

FOPA - Folículo pré-antral

FGF- Fator de crescimento de fibroblastos

FSH- Hormônio folículo estimulante

g- Gramas

GDF- Fator de crescimento e diferenciação

GH- Hormônio de crescimento

IGF- Fator de crescimento semelhante ao de insulina

KGF- Fator de crescimento de queratinócitos

KL- Kit ligand

LH- Hormônio luteinizante

ml - Mililitros

mm - Milímetro

mM - Milimolar

MOIFOPA - Manipulação de ovócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

ng- Nanograma

PBS - Tampão fosfato-salino

TCM-199- *Tissue Culture Medium* ou Meio de cultivo tecidual 199

TGF- β - Fatores de crescimentos transformantes- β

VEGF- Fator de crescimento endotelial vascular

VIP- Peptídeo intestinal vasoativo

SUMÁRIO

CAPITULO 1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	14
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 FOLÍCULOS OVARIANOS: ORIGEM, FOLICULOGÊNESE, CARACTERÍSTICAS, POPULAÇÃO FOLICULAR	16
2.2 CULTIVO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS.....	22
2.3 PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSSEAS (BMPs)	24
2.4 PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA 9 (BMP-9)	27
3 JUSTIFICATIVA.....	32
4 HIPÓTESES CIENTÍFICAS	33
5 OBJETIVO GERAL.....	33
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
REFERÊNCIAS	34
CAPITULO 2- CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO QUANTITATIVA DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS EM OVÁRIOS DE FETOS BOVINOS.....	42
RESUMO	42
ABSTRACT	43
1 INTRODUÇÃO	44
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	44
2.1 Coleta dos ovários.....	44
2.2 Cálculos da idade dos fetos.....	45
2.3 Processamento dos ovários	45
2.4 Contagem e classificação dos folículos	45
2.5 Análise estatística	46
3 RESULTADOS	47
4 DISCUSSÃO.....	49
REFERÊNCIAS	50
CAPÍTULO 3- CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE TECIDO OVARIANO DE FETOS BOVINOS CONTENDO PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA 9	53
RESUMO	53
ABSTRACT.....	53
1 INTRODUÇÃO	54
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	55
2.1 Reagentes químicos e meios.....	55
2.2 Coleta dos ovários.....	55
2.3 Cultivo dos folículos pré-antrais <i>in situ</i>	56
2.5 Análise histológica e avaliação de crescimento do folículo <i>in situ</i>	56
2.6 Análise estatística	57

3	RESULTADOS	58
4	DISCUSSÃO	63
	REFERÊNCIAS	66

RESUMO

Aumentar a eficácia do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais ainda é um grande desafio pois as condições de desenvolvimento *in vivo* envolvem diversos fatores ainda desconhecidos. Para isso, são necessárias pesquisas visando aperfeiçoar e simplificar a metodologia e as condições de cultivo durante as várias etapas do processo. Diante destes motivos, esta tese compõe-se de três capítulos, que tiveram como objetivo principal avaliar o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais de fetos bovinos inclusos em fragmentos, em meios de cultivo suplementados com a proteína morfogenética óssea 9 (BMP-9) em três concentrações (50, 100 e 200 ng/ml) durante 7 dias. O primeiro capítulo aborda considerações gerais referentes aos temas abordados nos demais capítulos. O segundo capítulo objetivou caracterizar a população folicular pré-antral de fetos bovinos, para servirem de referência para o experimento descrito no terceiro capítulo. Este propôs um meio de cultivo para suportar o crescimento de folículos pré-antrais de fetos bovinos. Adicionou-se a proteína morfogenética óssea 9 (BMP-9) ao meio e mensurou-se seus efeitos nas características histológicas e na sobrevivência e viabilidade *in vitro* de folículos pré-antrais bovinos. Concluímos que fetos bovinos a partir de quatro meses de idade apresentam população de folículos pré-antrais formada com processos de ativação folicular associados, podendo ser utilizados em biotecnias. Concluiu-se também que a adição de 50 ng/ml de BMP-9 ao meio de cultivo exerce uma ação benéfica na preservação da viabilidade de folículos primordiais, além de um efeito inibitório na ativação folicular durante o período de cultivo.

Palavras-Chave: Foliculo, ovário, MOIFOPA, reprodução

ABSTRACT

Increasing the efficiency of in vitro culture of preantral follicles is still a major challenge as in vivo development conditions involve several unknown factors. For this purpose, it is necessary researches aiming to improve and simplify the methodology and conditions of cell culture during the various stages of the process. Due to these reasons, this thesis is composed of three chapters, that had as main objective to evaluate the in vitro development of preantral follicles of bovine fetuses included in fragments, in culture media supplemented with bone morphogenetic protein 9 (BMP-9) at three concentrations (50, 100 and 200 ng/ml) for 7 days. The first chapter addresses general considerations regarding the topics covered in the other chapters. The second chapter aimed to characterize histologically the ovarian development of bovine fetuses, analyzing the morphological and quantitative aspects of the follicular population, to serve as reference for the experiment described in the final chapter. This proposed a culture medium to support the growth of preantral follicles of bovine fetuses. Bone morphogenetic protein 9 (BMP-9) was added to the medium and its effects on the histological characteristics and survival and in vitro viability of bovine preantral follicles were measured. We conclude that bovine fetuses from the age of four months present a population of preantral follicles formed with associated follicular activation processes, and can be used in biotechniques. It was also concluded that the addition of 50 ng/ml of BMP-9 to the culture medium exerts a beneficial effect in preserving the viability of primordial follicles, in addition to an inhibitory effect on follicular activation during the culture period.

Keywords: Follicle, ovary, MOEPF, reproduction

CAPITULO 1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 Introdução

A utilização e o desenvolvimento de biotecnias da reprodução animal são condições indispensáveis para o aumento da eficiência produtiva dos rebanhos e dentre as biotecnias que terão larga aplicabilidade no futuro está a manipulação de ovócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA) (FIGUEIREDO et al., 2008). A MOIFOPA consiste no isolamento ou resgate de folículos pré-antrais a partir de ovários, seguido de etapas de conservação e/ou cultivo folicular, visando à estocagem, bem como, o crescimento, maturação e fecundação *in vitro* dos ovócitos inclusos em folículos pré-antrais (FIGUEIREDO et al., 2008).

O ovário dos mamíferos possui grande reserva de ovócitos inclusos em folículos pré-antrais, contudo, a maioria destes se torna atrésica durante o crescimento e maturação, representando uma perda potencial de material genético para a utilização desses na produção *in vitro* de embriões, transgenia e clonagem (CELESTINO et al., 2011a), preservação de espécies em perigo de extinção e tratamento de algumas formas de infertilidade (PICTON, 2001).

A regulação do processo de foliculogênese não acontece somente por estímulos hormonais endócrinos, mas também por fatores de crescimento produzidos no próprio ovário. Um desses fatores são as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), membros da superfamília dos fatores de crescimento transformantes- β (TGF- β), que exercem um efeito autócrino e/ou parácrino, pois muitas destas moléculas são sintetizadas e secretadas pelos ovócitos, possuindo efeitos positivos no que diz respeito à ativação folicular *in vivo* e *in vitro*. Das 18 BMPs descritas até o momento, apenas oito (BMP-2, -4, -5, -6, -7, -8, -9 e -15) foram descritas no ovário de mamíferos (HOGAN, 1996; DUBE et al., 1998; ARAÚJO et al.,

2010a; ARAÚJO et al., 2010b; GLISTER et al., 2004; HOSOYA et al., 2015; ROSSI et al., 2015; ARAÚJO et al., 2016; ROSSI et al., 2016b).

A BMP-9 ainda não teve sua função descrita no ovário de bovinos, mas segundo Hosoya et al. (2015) atua em células da granulosa de ratas como um regulador na produção de progesterona, mas não como inibidor da produção de estrógeno. A ação da BMP-9 relacionada a proliferação de células tumorais, apoptose e diferenciação no tecido ovariano, da próstata, da mama e da tireoide, leva a sugestão de que esta proteína esteja envolvida na regulação de funções reprodutivas (HERRERA et al., 2009; HOSOYA et al., 2015). Em outros tecidos como os ossos a BMP-9 apresenta maior potencial de proliferação celular comparada com as demais BMPs (LEBLANC et al., 2013).

Este trabalho é o primeiro a estudar os efeitos da BMP-9 no cultivo *in vitro* de tecido de ovário de fetos bovinos. Pelas propriedades de estimular o crescimento e organização das células acredita-se que a adição dessa proteína no meio de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais possa fornecer subsídios para melhor compreensão acerca dos fatores reguladores da ativação e desenvolvimento folicular.

2 Revisão de literatura

2.1 Folículos ovarianos: origem, foliculogênese, características, população folicular

O folículo é a unidade morfofuncional do ovário, sendo constituído por um ovócito circundado por células da teca e granulosa. Esta unidade desempenha duas funções principais, a produção e liberação de hormônios além de proporcionar ambiente ideal para manutenção da viabilidade, crescimento e maturação do ovócito (FIGUEIREDO et al., 2008).

Nos ruminantes, a formação dos folículos ovarianos inicia-se no período pré-natal. A ovogênese e a foliculogênese são dois processos simultâneos que precedem o fenômeno da ovulação (FIGUEIREDO et al., 2008). Ambos são processos regulados por fatores extra e intraovarianos (COSTA et al., 2012).

A ovogênese pode ser definida como o conjunto de processos que compreende o desenvolvimento e diferenciação das células germinativas primordiais (CGP) da fêmea até a formação do ovócito haplóide fecundado e liberação do segundo corpúsculo polar, e inicia-se durante a vida embrionária (HAFEZ; HAFEZ, 2004). A crista gonádica revela-se como a primeira manifestação do desenvolvimento das gônadas de mamíferos, constituindo-se num relevo da parte medial dos túbulos mesonéfricos (FUJIMOTO et al., 1977; MACKAY, 2000). As CGP surgem extragonadalmente no saco vitelino e migram via endoderma do intestino posterior até o mesentério, daí para as pregas mesonéfricas e, finalmente, atingem a crista gonádica. Uma vez neste local, proliferam intensamente entre cinco e seis semanas, aumentam de volume e assumem aspecto amebóide, espalhando-se entre o epitélio celômico e o mesênquima. Já no interior da gônada em formação, as CGP iniciam sua diferenciação em ovogônias e se dividem rapidamente por mitose (FIGUEIREDO et al., 2008), quando as ovogônias entram em prófase I da meiose I, tornam-se por definição ovócitos primários e cessam a atividade mitótica. Em investigações com embriões e fetos bovinos, Erickson (1966)

constatou que a meiose se iniciava nos fetos decorridos 75 a 80 dias pós-coito. A mitose cessava entre 150 e 180 dias, com a maioria dos ovócitos atingindo sua fase de diplóteno, da prófase meiótica, sendo envolvidos nos folículos primordiais. Este estágio de diplóteno na prófase I, permanece até a puberdade do animal, com a liberação do pico pré-ovulatório de hormônio luteinizante (LH), quando essa meiose é retomada, originando assim os ovócitos secundários, ocorrendo uma nova parada da meiose na fase de metáfase I (FIGUEIREDO et al., 2008).

A foliculogênese é um processo fisiológico que se inicia com a formação do folículo primordial e culmina com o estágio de folículo maduro, também conhecido como folículo pré-ovulatório (ROSSETTO et al., 2011). Nas espécies ovina e bovina, inicia-se em torno do 90º e 130º dias de gestação, respectivamente. Uma camada de células somáticas planas ou achatadas, conhecidas como células da pré-granulosa, originárias do mesoderma, circundam o ovócito primário ou imaturo (núcleo em prófase I), formando assim o primeiro e mais primitivo dos estágios foliculares, que é denominado folículo primordial. Após a formação dos folículos primordiais, as células da pré-granulosa param de multiplicar-se e o folículo primordial entra no período de dormência ou quiescência, constituindo o *pool* de reserva de gametas femininos no ovário. A proliferação celular é retomada somente quando o folículo primordial (quiescente) começa a crescer, meses ou anos após a sua formação (HIRSHFIELD, 1991), passando sucessivamente pelos estágios de folículo primário, secundário, terciário e finalmente folículo pré-ovulatório (Tabela 1).

Tabela 1. Cronologia da ovogênese e foliculogênese no período fetal na espécie bovina.

Eventos	Dias de gestação dos Bovinos
Identificação das células germinativas primordiais	35
Diferenciação sexual da gônada	39-40
Desenvolvimento dos grupos de ovogônias	57
Multiplicação das ovogônias: Início	60
Multiplicação das ovogônias: Fim	170
Sincronização da mitose em: 4 ovogônias	62
Sincronização da mitose em: 8 ovogônias	74
Sincronização da mitose em: 16 ovogônias	82
Início da Meiose	75-82
Início da separação dos folículos	90
Surgimento dos folículos primordiais	130
Surgimento dos folículos primários	140
Surgimento dos folículos secundários	210
Surgimento dos folículos terciários	230-250
Nascimento	280

Fonte: Adaptado de FIGUEIREDO et al., 2008.

Os folículos pré-antrais são constituídos pelos folículos primordiais, intermediários, primários e secundários, e são diferenciados entre si basicamente pela forma e número de camadas de células da granulosa que circundam o ovócito imaturo (HULSHOF et al., 1994). Os primordiais são os primeiros a serem formados no ovário, e os menores folículos encontrados. Neles, o ovócito se encontra rodeado por uma camada de células da granulosa pavimentosa, envolta por uma membrana basal (FIGUEIREDO et al., 2008). O diâmetro do folículo primordial bovino varia de 30 a 40 μm , enquanto seu ovócito, entre 20 e 25 μm (BECKERS et al., 1996). Estão localizados na periferia do córtex ovariano e representam 90% da população folicular do ovário (FIGUEIREDO et al., 2008) (Figura 1).

Com o início do crescimento dos folículos primordiais, ocorre a ativação, um crescimento ovocitário com proliferação das células da granulosa e transformação destas de pavimentosas a cúbicas. Quando os folículos possuem ovócito circundado por células da granulosa com os formatos de pavimento e cúbico, são classificados como folículos intermediários ou de transição (FIGUEIREDO et al., 2008).

Os folículos primários, mais avançados, caracterizam-se pela presença de um ovócito imaturo central circundado por uma camada de células da granulosa de forma cúbica, em maior número e mais volumosas (HULSHOF et al., 1994). No bovino, o folículo primário possui um diâmetro de 40 a 60 μm , com um ovócito de 30 a 40 μm (BECKERS et al., 1996). Em bovinos, os folículos primários apresentam os primeiros sinais de formação da zona pelúcida (Figura 1).

Os secundários apresentam um ovócito imaturo central, sendo circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa de forma cúbica (HULSHOF et al., 1994) (Figura 1). Os folículos secundários possuem um diâmetro que varia de 81 μm a 250 μm em bovinos (BRAW-TAL; YOSSEFI, 1997). Nos estádios mais avançados, as fibras de tecido conjuntivo organizam-se paralelamente à membrana basal para formar a camada de células tecaais. Nesses folículos uma estrutura hialinizada, denominada de zona pelúcida também já pode ser evidenciada. São responsivos às gonadotrofinas FSH (hormônio folículo estimulante) e LH (FIGUEIREDO et al., 2008).

São classificados como antrais os folículos terciários e pré-ovulatório. Possuem intensa proliferação de células da granulosa e cavidade antral, uma área preenchida com líquido folicular. Esse líquido é composto por gonadotrofinas, esteroides, fatores de crescimento e algumas enzimas que são derivadas do sangue e das células que integram o folículo (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). O ovócito ainda está imaturo, na maioria das espécies e somente o folículo pré-ovulatório contém um ovócito maturado. Esta maturação

ocorre após o pico de LH, e é o processo de retomada da meiose, que *in vivo* é acompanhado por alterações nucleares e citoplasmáticas, que envolve o rompimento do envoltório nuclear e progressão da meiose (para metáfase I, anáfase I e telófase I com expulsão do primeiro corpúsculo polar, e finalmente atingindo metáfase II). Após a fecundação pelo espermatozoide, o ovócito retoma a meiose II e libera o segundo corpúsculo polar, finalizando a ovogênese com o desenvolvimento do zigoto (FIGUEIREDO et al., 2008).

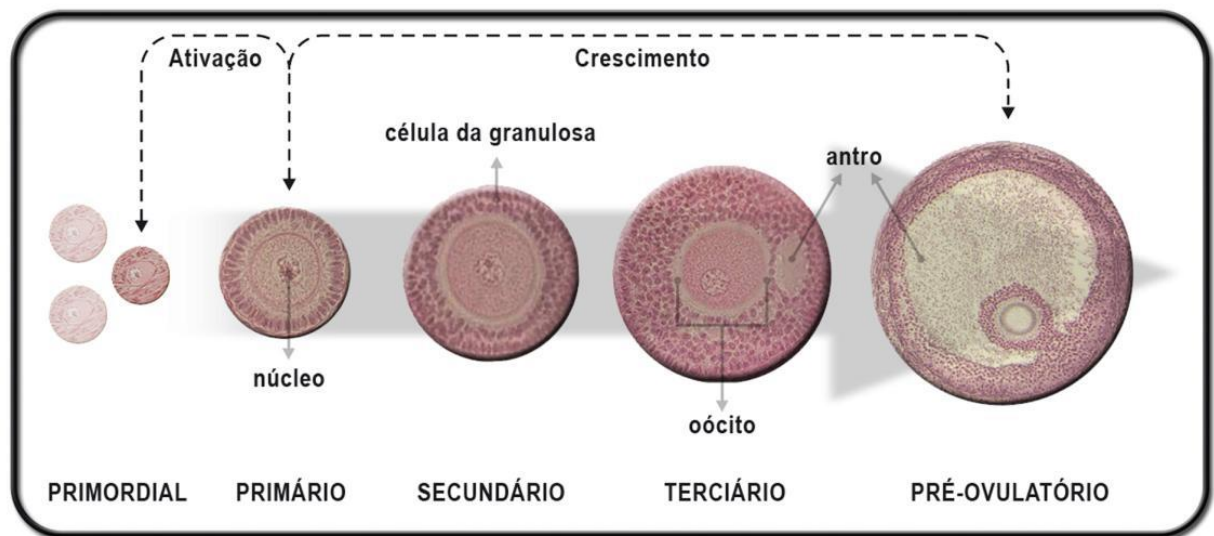


Figura 1. Etapas do processo de ativação e desenvolvimento folicular.

Fonte: ROSSETTO et al., 2011.

Aos 110 dias de gestação, o número médio de folículos nos ovários de um feto bovino é de, aproximadamente, 2.700.000, decrescendo até o nascimento para cerca de 300.000 a 130.000 folículos pré-antrais (ERICKSON, 1966; SILVA-SANTOS et al., 2013) através de processos degenerativos ou apoptóticos. Entretanto a população e a distribuição dos diferentes tipos foliculares nos ovários dos animais podem ser afetadas pela raça do animal (FIGUEIREDO et al., 2008). Recentemente, a existência de um mecanismo para neo-ovogênese nos ovários de mamíferos adultos gerou muita controvérsia na comunidade científica. Este mecanismo propõe que o ovário tenha células capazes de renovar a reserva folicular, devido à descoberta de células com atividade mitótica em ovários adultos de

camundongos, humanos, macacos, porcos e animais selvagens, como os morcegos. Mas até o momento nada foi evidenciado acerca dos bovinos (PORRAZ- GÓMEZ; MORENO-MENDONZA, 2017).

Em diversas espécies de mamíferos, ovócitos e folículos primordiais, após formados, têm seu número consideravelmente reduzido, normalmente a partir da segunda metade da gestação (MOTTA; MAKABE, 1986; CARAMBULA et al., 1999; VAN DEN HURK; ZHAO, 2005; SILVA-SANTOS et al., 2013). Essa perda contínua seria consequência dos mecanismos de atresia folicular (PETERS, 1970; PACKER et al., 1998; MCLAREN, 2000), apoptose ou esfoliação celular na superfície da gônada (MOTTA; MAKABE, 1986). Mbassa (1989) ao estudar fetos zebuínos observou muitos folículos atrésicos e luteinizados em fetos por volta de 165 a 238 dias de gestação. Foi demonstrado que os folículos secundários são mais susceptíveis à atresia que folículos primários e primordiais em cabras (SILVA et al., 2002).

O número de folículos pré-antrais em diferentes estágios de desenvolvimento é diferente em cada idade fetal (CARAMBULA et al., 1999). Em relação a população folicular, Erickson (1966), Mbassa (1989), Carambula et al. (1999), Monteiro et al. (2003) e Monteiro et al., (2009) verificaram que fetos com três meses de gestação, os ovários apresentaram folículos primordiais, a partir dos quatro meses de gestação, os ovários já continham folículos primários, os folículos antrais surgiram nos ovários de fetos a partir de seis meses de gestação. Silva- Santos et al. (2013), verificaram aparecimento de folículos antrais em fetos com cinco meses de gestação. Aos três meses de gestação os folículos primordiais representam a maioria da população folicular, superior ao dos folículos primários e secundários (CARAMBULA et al., 1999; SILVA- SANTOS et al., 2013).

Diniz et al., (2005) observaram folículos primordiais em fetos da raça Nelore com 85 dias de gestação, e aos 94 dias, estavam totalmente formados com diâmetro médio de 35,5µm,

localizados nas regiões mais profundas do córtex ovariano. Em fetos de ± 100 dias foram encontrados 93.806 folículos primordiais. Aos seis meses foram classificados folículos secundários e antrais. Silva-Santos et al. (2011) determinaram média de 143.929 de folículos pré-antrais nos ovários de fetos Nelores e 285.155 em fetos Aberdeen Angus, demonstrando que a maior recuperação de ovócitos em fêmeas indianas, em técnicas de aspiração folicular, não se deve a maior quantidade de folículos pré-antrais.

Uma alta variabilidade de resultados é observada quanto ao surgimento dos folículos e a contagem de cada classe em fetos, relacionada a diferenças no cálculo da idade fetal, diferentes raças de bovinos como fonte destes ovários ou variações individuais dentro de uma população (FIGUEIREDO et al., 2008; SILVA-SANTOS et al., 2013). A proporção, distribuição, quantidade e morfologia de cada tipo de folículo fetal, em função da idade, são dados importantes e poderão servir de subsídio para o desenvolvimento ou aperfeiçoamento de biotecnologias reprodutivas, principalmente aquelas que utilizam folículos pré-antrais de fetos bovinos.

2.2 Cultivo de folículos pré-antrais

Cultivo de folículos *in vitro* já foram demonstrados na literatura com sucesso, como o nascimento de um camundongo a partir de folículos primordiais crescidos, maturados e fecundados *in vitro* (EPPIG; O' BRIEN, 1996; O' BRIEN et al., 2003), embriogênese *in vitro* de ovócitos de folículos pré- antrais cultivados em suínos (WU et al., 2001), bubalinos (GUPTA et al., 2008), e mais recentemente em ovinos (ARUNAKUMARI et al., 2010), porém sem nascimentos até o momento. Na espécie bovina (GUTIERREZ et al., 2000) e felina (JEWGENOW; PITRA, 1993) folículos pré-antrais isolados desenvolveram-se *in vitro* até o estágio antral e em caprinos houve produção de embriões após cultivo *in vitro* de folículos secundários (MAGALHÃES et al., 2011).

O mecanismo responsável pelo crescimento dos folículos pré-antrais ou ativação folicular é pouco conhecido. O uso de gonadotrofinas para cultura *in vitro* tem sido relatada e se mostrado importante para obter o melhor desenvolvimento de folículos pré-antrais (ARAÚJO et al., 2014). O uso de ativinas, insulina e hormônio de crescimento (GH) também mostraram sucesso nos cultivos de folículos pré-antrais, assim como fatores de crescimento semelhantes aos de insulina (IGFs), fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs), fatores de crescimento endotelial vascular (VEGFs), proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs), fatores de crescimento e diferenciação (GDFs) (ARAÚJO et al., 2014), kit ligand (KL), fator de crescimento de queratinócitos (KGF), peptídeo intestinal vasoativo (VIP) e fator de crescimento epidermal (EGF) (FIGUEIREDO et al., 2007).

Além de hormônios e fatores de crescimento, a ativação folicular ainda é influenciada pelo sistema escolhido para cultivo, o meio de cultivo e outros suplementos adicionados a este, a duração deste cultivo, o tempo do cultivo, quando e como acontece a substituição dos meios e o tamanho do folículo a ser cultivado (ARAÚJO et al., 2014). Podemos cultivar os folículos pré-antrais inclusos em fragmentos ovarianos dos córtex (*in situ*) ou isolando os folículos por algumas técnicas (*tissue chopper* e microdissecação estão bem estabelecidas uma vez que promovem a preservação da membrana basal, importante para posterior ligação entre essa e os fatores de crescimento) (ARAÚJO et al., 2014). No entanto, folículos pré-antrais cultivados em fragmentos apresentam vantagens. É o modelo de cultivo onde os folículos ficam mais próximos do que acontece *in vivo*, pela permanência no tecido ovariano, e das possíveis interações que acontecem ali para ativação folicular (FIGUEIREDO et al., 2008). Neste sistema podemos acompanhar os efeitos do tratamento nos estágios iniciais do desenvolvimento folicular, de modo contrário, quando trabalhamos com sistemas de cultivos isolados, só conseguimos observar efeitos em folículos mais avançados no desenvolvimento, como os folículos secundários. O sistema de cultivo *in situ* não favorece o crescimento dos

folículos secundários, portanto após a ativação folicular podemos isolar os folículos secundários e cultivá-los isoladamente, complementando a técnica (ARAÚJO et al., 2014).

Quanto ao meio, existem descritas uma diversidade de meios já testados para cultivo de folículos pré-antrais de bovinos, no entanto nenhum deles ficou estabelecido como padrão, explicando assim também diferentes resultados entre as pesquisas (ARAÚJO et al., 2014). O meio α - MEM (*Minimum Essential Medium Eagle* ou meio essencial mínimo) e TCM-199 (*Tissue Culture Medium ou Meio de cultivo tecidual 199*) obtiveram resultados importantes neste contexto (ARAÚJO et al., 2014; JIMENEZ et al., 2016). Substâncias como piruvato, glutamina, hipoxantina, ácido ascórbico foram usados com sucesso para a cultura dos folículos pré-antrais dos ovários bovinos. Então essas substâncias tornaram-se parte do meio utilizado para cultivar folículos ovarianos de várias espécies. Relacionados ao meio, ainda são necessárias mais pesquisas para determinar uma melhor maneira de cultivar e ativar os folículos (ARAÚJO et al., 2014).

2.3 Proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs)

A superfamília do fator de crescimento transformante (TGF- β) consiste em mais de 35 membros, incluindo os TGF- β s, BMPs, GDFs, ativinas, inibinas, AMH (hormônio anti-mulleriano) e substância de inibição nodal (COSTA et al., 2012). As BMPs são proteínas que regulam uma boa parte de processos ao longo da vida de um mamífero (proliferação, diferenciação, migração, quimiotaxia e morte celular em muitos diferentes tipos de células). Inicialmente os estudos com as BMPs envolveram a importância destas para a formação e manutenção de osso e cartilagem, posteriormente descobriu-se que são essenciais para desenvolvimento esquelético, formação óssea e diferenciação de células mesenquimais (CAO; CHEN, 2005; LAMPLOT et al., 2013; SARTORI; SANDRI, 2015; ROSSI et al, 2016a). Posteriormente, essas proteínas foram associadas a foliculogênese e ovogênese em

mamíferos. Rossi et al. (2016a) descrevem que muitas BMPs estão envolvidas não somente como um fator de crescimento ao folículo, mas também maturação ovocitária e na ovulação, além da formação de CGP.

À medida que os padrões de expressão da família BMP se tornaram conhecidos, elas se tornaram disponíveis comercialmente. Atualmente estão descritas 18 BMPs: BMP -2, -3, -3b (GDF-10), -4, -6, -7, -8a e -8b, -9 (GDF-2), -12 (GDF-7), -13 (GDF-6), -14 (GDF-12), -15, -16 e GDF-3, GDF-5, GDF-15 e MIS (SHIMASAKI et al., 2004).

As BMPs se ligam aos receptores de membrana serina-treonina-quinase, do tipo I e tipo II e traduzem sinais através da via de sinalização de Smad, que são cofatores de transcrição e regulação de genes alvo (ROSSI et al., 2016a). A interação entre receptores induz a fosforilação de mensageiros intracelulares (tipos de Smad 1, 5 e 8), que formam complexos com o cofator Smad (Smad 4), que se acumulam no núcleo para regular a expressão de genes específicos (Figura 2) (ROSSI et al., 2016a). Há primeiro uma ligação com receptores tipo II (comumente o BMPR-II) e em seguida com receptores do tipo I (BMPR-IA ou BMPR-IB) (COSTA et al., 2012). Há expressão de receptores do tipo I e II nos ovários de mamíferos. Já foram descritos receptores do tipo II (BMPR-II) em células da granulosa de folículos primordiais, em ovócitos e células da granulosa de folículos primários e secundários, e ovócitos de folículos antrais, e do tipo I (BMPR- IA), também denominado ALK3) em células da granulosa de folículos antrais (ROSSI et al., 2016a).

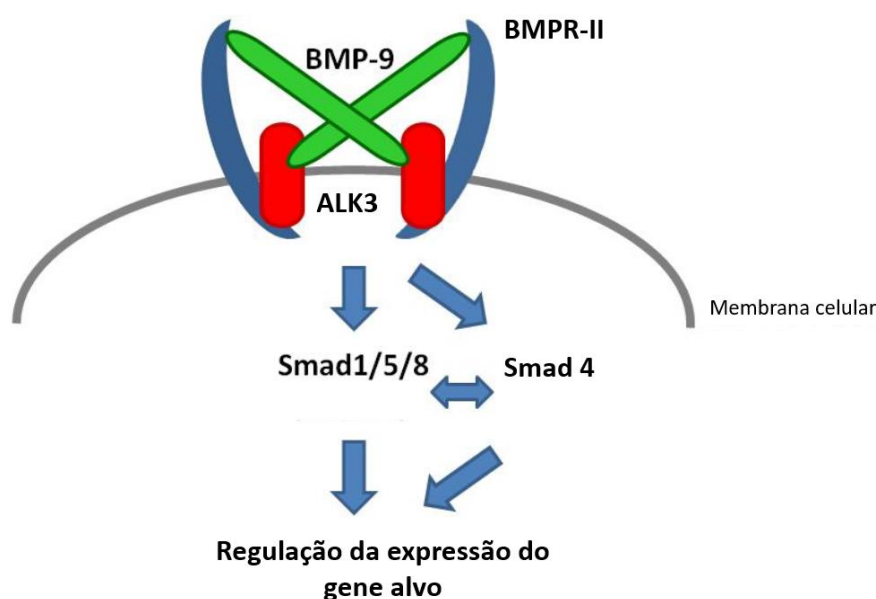


Figura 2. A interação entre os receptores BMP dos tipos I e II induz a fosforilação de mensageiros intracelulares (Smad) que são movidos para o núcleo para regular a expressão de genes específicos.

Fonte: Adaptado de HERRERA et al, 2009.

Já foi demonstrado em algumas espécies, no cultivo *in vitro*, que a BMP-6 atua no desenvolvimento folicular, modulação hormonal nas células da granulosa e formação de antro (GLISTER et al., 2004; FROTA et al., 2013); a BMP-7 promove o crescimento do folículo (ARAÚJO et al, 2010b) e a formação de antro (FROTA et al., 2011) e a BMP-15 influencia positivamente a formação do antro, crescimento do folículo e manutenção da ultraestrutura folicular (JUENGEL et al., 2002; CELESTINO et al., 2011b; PASSOS et al., 2013; SILVA et al., 2016). Esta proteína é considerada um fator-chave obrigatório para a fertilidade feminina de diferentes espécies e já foi demonstrado que a deleção do gene BMP-15 induz a ocorrência de patologias diretamente relacionadas à atividade reprodutiva, tais como síndrome dos ovários policísticos e perda precoce da função ovariana (PASSOS et al., 2013). Em ovinos já foram descritas a expressão de BMP-1, -6, -7 e -15; em caprinos a BMP-6, -7 e -15; em

roedores de BMP-2, -4, -5, -6, -7, -8 e -15; em suínos de BMP-5 e -6 e em humanos BMP-4, -6, -7 e -15 (ROSSI et al., 2016a).

Nos bovinos, existem poucas informações sobre os papéis das BMPs no ovário. Nesta espécie foi relatada a expressão de BMP-2 em células de granulosa de folículos primários, secundários e antrais, e em células da teca de folículos antrais (FATEHI et al., 2005), e esta promove crescimento de folículos primordiais (ROSSI et al., 2016b). A BMP-4 é expressa em células da granulosa, da teca e em ovócitos de folículos antrais, potencializando a ação da FSH, estimula a proliferação de células de granulosa *in vitro* (GLISTER et al., 2004; FATEHI et al., 2005). Rossi et al. (2015) também observaram preservação da viabilidade de folículos secundários, e quando cultivados na presença de FSH, aumentam a expressão de mRNA para BMP-15. Esta BMP promove crescimento folicular, formação de antro folicular e mantém a viabilidade folicular durante a cultura (PASSOS et al., 2013). Da Cunha et al., (2017) observaram aumento do diâmetro folicular além da manutenção da viabilidade folicular e ovocitária, ao adicionar BMP-4 ao meio de cultivo. A BMP-6 está presente nesta espécie em ovócitos de todas as categorias foliculares, em células de granulosa e da teca (GLISTER et al., 2004), e demonstrou ser essencial para regulação da gametogênese em múltiplas fases de desenvolvimento, além de promover a proliferação de CGPs (LEITÃO et al., 2009). Glister et al. (2004) verificaram um pequeno, porém significativo, aumento no número de células da granulosa após cultivo *in vitro* por seis dias em meio adicionado de BMP-6. A BMP-7 é expressa em células de teca (GLISTER et al., 2004), atuando como reguladores de esteroidogênese nas células granulosa, secreção de peptídeos e crescimento do antro.

2.4 Proteína Morfogenética óssea 9 (BMP-9)

BMP-9 ou fator de crescimento e diferenciação 2 (GDF-2) é uma proteína com múltiplos efeitos de proliferação, diferenciação e inibição, em vários tecidos, descritos em camundongos e humanos (LEBLANC et al., 2013). É um poderoso fator de crescimento

osteogênico (HUANG et al., 2012; LI et al., 2012) e demonstrou ser capaz de ativar a diferenciação do osso em diversos estudos em animais. Tem efeito osteogênico maior dentre todas BMPs, em especial por seu envolvimento na regulação da diferenciação dos osteoblastos (LAMPLOT et al., 2013). O potencial osteogênico de BMP-9 foi estudado pela primeira vez por meio da terapia genética, mas atualmente ele é usado por meio de sua forma humana recombinante (rhBMP-9). Como a formação do osso está sempre associada com a reabsorção e remodelação, também tem sido demonstrado que a BMP-9 pode afetar diretamente osteoclastos em humanos, agindo sobre a sua função e a sua sobrevivência. Estudos recentes pesquisaram sua interação com materiais biomiméticos, comprovando que seu alto potencial osteogênico faz esta interagir positivamente em enxertos ósseos, promovendo a adesão das células ósseas, a sobrevivência e a diferenciação destas (BEAUVAIS et al., 2015).

O GH atua sinergicamente com a BMP-9 promovendo a ossificação endocondral em células mesenquimais (HUANG et al., 2012), e o fator de crescimento epidermal (EGF) associado a BMP-9 também aumentam a formação de células ósseas (LIU et al., 2013). Estas características específicas podem, em parte, explicar o forte potencial osteogênico da BMP-9 em comparação com outras BMPs. Na condrogênese, esta BMP age como um modulador de atividade dos condrócitos (MAJUMDAR et al., 2001). Já foi demonstrado a capacidade desta de estimular a proliferação de condrócitos bovinos primários a uma concentração de 1 ng/ml e induzir a hipertrofia de condrócitos e mineralização na concentração de 10 ng/ml (BLUNK et al., 2003). Demonstrou ser a BMP mais potente na indução de diferenciação condrogênica no camundongo (100ng/ml) (CHENG et al., 2016).

A produção da BMP-9 acontece principalmente no fígado (transcrições bem menores em humanos foram descritas no pulmão, cérebro e medula óssea), mas mostrou-se presente no sangue de roedores adultos e seres humanos, estando envolvida em vários tecidos e com

múltiplos efeitos (LAMPLOT et al., 2013). Está presente em níveis mais elevados em torno do nascimento do que durante a idade adulta, foi descrito em ratos um pico três semanas após o nascimento e redução na fase adulta (BIDART et al., 2012). É ligante fisiológico do receptor da ALK1 (tipo I) endotelial em associação com BMPR-II (tipo II) (SCHARPFENECKER, et al., 2007). ALK1 e BMPR-II desempenham papéis essenciais no desenvolvimento. Mutações nestes receptores ou na BMP-9 geram defeitos vasculares em humanos e roedores (WEI et al., 2014). No sangue, esta proteína circula em baixas concentrações mantendo a integridade endotelial (WEI et al., 2014). Os níveis circulantes de BMP-9 estão entre 2-10 ng/ml (BIDART et al., 2012). A alta atividade osteogênica da BMP-9 não acontece nos vasos sanguíneos, possivelmente devido a concentração de BMP-9. A sinalização de BMP-9 nas células endoteliais é mediada pela alta afinidade ao receptor ALK1, enquanto que sinalização de atividade osteogênica da BMP-9 requer ALK1 e outro receptor de baixa afinidade (ALK2) e 50 ng/ml para ativar osteogênese. A localização de seus receptores, ALK2, ALK3, ALK6 e BMPRII são expressos em quase todas as células, enquanto a expressão de ALK1 é principalmente restrita às células endoteliais. As concentrações de BMP-9 circulante talvez sejam um fator importante essencial para a manutenção da especificidade endotelial (BIDART et al., 2012) em oposição a formação (SCHARPFENECKER et al., 2007).

Apesar de ser produzida no fígado, pouco sabemos sobre sua importância a este órgão. Em humanos quando adicionada ao cultivo celular de células normais e tumorais, a BMP-9 se torna um fator proliferativo (com uma concentração de 5ng/ml) e de sobrevivência para células de carcinoma hepatocelular, mas em hepatócitos primários normais não apresenta esta função, causando até mesmo diminuição do número de células. Em um fígado saudável, mantém a integridade dos vasos existentes, em hepatócitos tumorais aumentam a produção (em quantidades elevadas) de BMP-9. Detectando aumento na concentração de BMP-9 e

inibindo esta ou sua sinalização ou seu ligante ALK1, inibe-se o câncer (HERRERA et al., 2013). Em ovários humanos também foi demonstrada as propriedades neo-angiogênicas da BMP-9 para formação de tumores. A angiogênese é um processo de grande importância durante o desenvolvimento embrionário, mas quiescente no estágio adulto. Neste é reativada durante os processos de reparação de feridas e sob várias condições patológicas, como crescimento tumoral e metástase (HERRERA et al., 2014). Herrera et al. (2009) revelaram que houve expressão de BMP-9 em 25% de tecidos epiteliais cancerígenos de ovários humanos de seus experimentos, enquanto células ovarianas de tecidos normais não, reforçando que a inibição desta proteína pode ser um novo alvo terapêutico no câncer de ovário.

A cerca desta BMP foi evidenciada ainda sua importância no sistema nervoso central, que reside na sua capacidade para promover a proliferação e sobrevivência de neurônios colinérgicos, sugestionando a esta BMP um candidato interessante no tratamento inovador na doença de Alzheimer (LEBLANC et al., 2013). Sua ação na homeostase da glicose, comprovada pela aplicação de uma única injeção subcutânea de BMP-9 em camundongos diabéticos alimentados livremente, capaz de reduzir a glicemia a níveis quase normais, com diminuição máxima observada 30 horas após o tratamento, demonstrando que a BMP-9 é o primeiro fator hepático que pode ser explorado para o tratamento da diabetes. A ação da BMP-9 para reduzir os níveis de glicose parece estar associada à sua capacidade de promover a liberação de insulina em células beta pancreáticas (CHEN et al., 2003). Foi demonstrado que a neutralização de BMP-9 com um anticorpo Ac-BMP-9 induz a intolerância à glicose e resistência à insulina (CAPERUTO et al., 2008). A BMP-9 demonstrou ainda capacidade de induzir a diferenciação em cardiomiócitos a partir de células mesenquimais em camundongos, fato importante para reparação cardíaca e regeneração após lesões miocárdicas (CHEN et al., 2015).

No entanto, os efeitos da BMP-9 sobre a função ovariana ainda não foram esclarecidos. A expressão de BMP-9 em células da granulosa de camundongos já foi relatada por Hosoya et al. (2015), mas não em ovócitos. Em camundongos, existem duas possíveis fontes de células de BMP-9, soro e células da granulosa no ovário. Os receptores de BMP-9 nas células da granulosa são provavelmente ALK-1 e BMPRII (mesmos do endotélio vascular). Nesta espécie a BMP-9 suprime a produção de progesterona induzida por FSH, podendo afetar a formação do corpo lúteo, enquanto que não afeta a produção de estradiol induzida por FSH por células da granulosa (HOSOYA et al., 2015).

3 Justificativa

Para aumentar a eficácia do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais são necessárias pesquisas visando aperfeiçoar e simplificar a metodologia e as condições de cultivo. Esta pesquisa, ao propor um meio de cultivo para suportar o crescimento de folículos pré-antrais, busca atenuar os desafios das técnicas de MOIFOPA. Estudos com estas estruturas permitem maior compreensão de mecanismos envolvidos na ativação dos folículos primordiais, crescimento de folículos primários e secundários. Além do que ruminantes, também podem ser considerados modelos de estudo para pesquisas de fertilidade e preservação desta em humanos (LANGBEEN et al., 2015).

Até a presente data, nenhum estudo foi conduzido para investigar os efeitos da BMP-9 na foliculogênese. De acordo com revisão bibliográfica, a BMP-9 demonstrou ser capaz de ativar a proliferação celular em diversos tecidos, principalmente em idade fetal. Os fetos apresentam uma quantidade de folículos superior em relação a animais adultos (MACHADO et al., 2002; SILVA- SANTOS et al., 2011), o que justificaria a utilização de seus folículos em protocolos de isolamento e cultivo para uso posterior como material genético para multiplicação de bovinos, visando diminuir o intervalo entre gerações e progresso no melhoramento genético.

4 Hipóteses Científicas

Os fetos bovinos apresentam folículos pré-antrais formados a partir de três meses de gestação.

A adição de BMP-9 ao meio de cultivo de fragmentos de tecido ovariano influencia o desenvolvimento de folículos pré-antrais de bovinos *in vitro*. Esta proteína pode estimular o crescimento e diferenciação das células da granulosa que circundam ovócitos, promovendo ativação folicular.

5 Objetivo geral

Avaliar a população folículos pré-antrais de fetos bovinos e o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais incluídos em fragmentos, em meios de cultivo suplementados com a proteína morfogenética óssea 9 (BMP-9) em três concentrações (50, 100 e 200 ng/ml) durante 7 dias.

5.1 Objetivos específicos

- Determinar o número de folículos pré-antrais em fetos bovinos no terço inicial, médio e final de desenvolvimento pré-antral, classificando os folículos em primordiais, primários, secundários e antrais.
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de BMP-9 sobre o cultivo *in vitro* de tecido ovariano de fetos bovinos para determinar:
 - Viabilidade folicular;
 - Ativação folicular;
 - Diâmetro folicular e ovocitário.

Referências

- ARAÚJO, V. R.; LIMA-VERDE, I. B.; BÁO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. D. Bone Morphogenetic Protein-6 (BMP-6) induces atresia in goat primordial follicles cultured *in vitro*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 9, p. 770-781, 2010a. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2010000900010>
- ARAÚJO, V. R.; GASTAL, M. O.; FIGUEIREDO, J. R.; GASTAL, E. L. *In vitro* culture of bovine preantral follicles: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.12, p.78, 2014. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-78>
- ARAÚJO, V. R.; SILVA, C. M.; MAGALHÃES, D. M.; SILVA, G. M. D.; BÁO, S. N.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Effect of Bone Morphogenetic Protein-7 (BMP-7) on *in vitro* survival of caprine preantral follicles. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 305-310, 2010b. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2010000400004>
- ARAÚJO, V. R.; SILVA, G. M.; DUARTE, A. B. G.; MAGALHÃES-PADILHA, D. M.; ALMEIDA, A. P.; LUNARDI, F. O.; SERAFIM, M.K.B.; MOURA, A.A.A.; CAMPELLO, C.C.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J. R. Bone Morphogenetic Protein-6 (BMP-6) Stimulates the Antrum Formation by the Regulation of its Signalling Pathway in Caprine Pre-antral Follicles Cultured *In Vitro*. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, n. 1, p. 59-68, 2016. <https://doi.org/10.1111/rda.12646>
- ARUNAKUMARI G.; SHANMUGASUNDARAM N.; RAO V.H. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. **Theriogenology**, v.74, n.5, p.884–894, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.04.013>
- BEAUVAIS, S., DREVELLE, O., LAUZON, M. A., DAVIAU, A., FAUCHEUX, N. Modulation of MAPK signalling by immobilized adhesive peptides: effect on stem cell response to BMP-9-derived peptides. **Acta biomaterialia**, v. 31, p. 241-251, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.12.005>
- BECKERS, J.F.; DRION, P.; FIGUEIREDO, J.R.; GOFFIN, L.; PIROTTIN, D.; ECTORS, F. The ovarian follicle in cow: *in vivo* growth and *in vitro* culture. **Reproduction in Domestic Animals**, v.31, p.543-548, 1996.
- BIDART, M.; RICARD, N.; LEVET, S.; SAMSON, M.; MALLET, C.; DAVID, L.; SUBILEAU, M.; TILLET, E.; FEIGE, J.J.; BAILLY, S. BMP-9 is produced by hepatocytes and circulates mainly in an active mature form complexed to its prodomain. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 69, n.2, p. 313-324, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0751-1>
- BLUNK, T.; SIEMINSKI, A.L.; APPEL, B.; CROFT, C.; COURTER, D.L.; CHIEH, J.J.; GOEPFERICH, A.; KHURANA, J.S.; GOOCH, K.J. Bone morphogenetic protein 9: A potent modulator of cartilage development *in vitro*. **Growth Factors**, v.21, n.2, p.71-77, 2003. <https://doi.org/10.1080/0897719031000148822>

BRAW-TAL, R.; YOSSEFI, S. Studies *in vivo* and *in vitro* on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.109, p. 165-171, 1997. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.1090165>

CAO, X; CHEN, D. The BMP signaling and *in vivo* bone formation. **Gene**, v. 357, n. 1, p. 1-8, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2005.06.017>

CAPERUTO, L. C.; ANHÊ, G. F.; CAMBIAGHI, T. D.; AKAMINE, E. H.; DO CARMO BUONFIGLIO, D.; CIPOLLA-NETO, J.; CURI, R.; BORDIN, S. Modulation of bone morphogenetic protein-9 expression and processing by insulin, glucose, and glucocorticoids: possible candidate for hepatic insulin-sensitizing substance. **Endocrinology**, v. 149, n. 12, p. 6326-6335, 2008. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0655>

CARAMBULA, S. F.; GONCALVES, P. B. D.; COSTA, L. F. S.; FIGUEIREDO, J. R.; WHEELER, M. B.; NEVES, J. P.; MONDADORI, R. G. Effect of fetal age and method of recovery on isolation of preantral follicles from bovine ovaries. **Theriogenology**, v. 52, n. 4, p. 563-571, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00152-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00152-1)

CELESTINO, J. J. H.; BRUNO, J. B.; SARAIVA, M. V. A.; ROCHA, R. M.; BRITO, I. R.; DUARTE, A. B. G.; ARAUJO, V.R.; C.M.G, M.H.T.; CAMPELLO, C.C.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J.R. Steady-state level of epidermal growth factor (EGF) mRNA and effect of EGF on *in vitro* culture of caprine preantral follicles. **Cell and tissue research**, v. 344, n. 3, p. 539, 2011a. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1162-1>

CELESTINO, J.J.H.; LIMA-VERDE, I.B.; BRUNO, J.B.; MATOS, M.H.T.; CHAVES, R.N.; SARAIVA, M.V.A.; SILVA, C.M.; FAUSTINO, L.R.; ROSSETTO, R.; LOPES, C.A.; DONATO, M.A.; PEIXOTO, C.A.; CAMPELLO, C.C.; SILVA, J.R.; FIGUEIREDO, J.R. Steady state level of bone morphogenetic protein-15 in goat ovaries and its influence on *in vitro* development and survival of preantral follicles. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 338, n. 1, p. 1-9, 2011b. <https://doi.org/10.1007/s00441-011-1162-1>

CHEN, C.; GRZEGORZEWSKI, K. J.; BARASH, S.; ZHAO, Q.; SCHNEIDER, H.; WANG, Q.; SINGH, M.; PUKAC, L.; BELL, A. C.; DUAN, R. et al. An integrated functional genomics screening program reveals a role for BMP-9 in glucose homeostasis. **Nature biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 294, 2003. <https://doi.org/10.1038/nbt795>

CHEN, L.; WEI, H.; TAN, J.; CHEN, H.; LIU, Z.; CHEN, Y. Bone morphogenetic protein 9 and 13 induce C3H10T1/2 cell differentiation to cardiomyocyte-like cells *in vitro*. **Cell transplantation**, v. 24, n. 5, p. 909-920, 2015. <https://doi.org/10.3727/096368913X676907>

CHENG, A.; GUSTAFSON, A. R.; TOOLEY, C. E. S.; ZHANG, M. BMP-9 dependent pathways required for the chondrogenic differentiation of pluripotent stem cells. **Differentiation**, v. 92, n. 5, p. 298-305, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2016.03.005>

COSTA, J. J. N.; PASSOS, M. J.; REBOUÇAS, E. L.; SILVA, J. R. V. Proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) e seu papel na regulação da oogênese e da foliculogênese ovariana em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.36, n.4, p.225-238, 2012.

DA CUNHA, E. D. V.; DE SOUZA, G. B.; DE SOUSA PASSOS, J. R.; SILVA, A. W. B.; DAU, A. M.; SARAIVA, M. V. A.; LOBO, R.N.B.; SILVA, J. R. V. Effects of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) on *in vitro* development and survival of bovine preantral follicles enclosed in fragments ovarian tissue. **Zygote**, p. 1-9, 2017. <https://doi.org/10.1017/S0967199417000089>

DINIZ, E. G.; ESPER, C.R.; JACOMINI, J.O.; VIEIRA, R.C. Desenvolvimento morfológico dos ovários em embriões e fetos bovinos da raça Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.57, n.1, p. 70-76, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352005000100010>

DRIANCOURT, M.A. Follicular dynamics in sheep and cattle. **Theriogenology**, n.35, p.55-63, 1991. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(91\)90148-7](https://doi.org/10.1016/0093-691X(91)90148-7)

DUBE J.L.; WANG P.; ELVIN J.; LYONS K.M.; CELESTE A.J.; MATZUK M.M. The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. **Molecular endocrinology**, v. 12, n. 12, p. 1809-1817, 1998. <https://doi.org/10.1210/mend.12.12.0206>

EPPIG, J.J.; O'BRIEN, M.J. Development *in vitro* of mouse oocytes from primordial follicles. **Biology of Reproduction**, v.54, n.1, p.197-207, 1996. <https://doi.org/10.1095/biolreprod54.1.197>

ERICKSON, B.H. Development and radioresponse of the prenatal bovine ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.10, 97-105, 1966. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0110097>

FATEHI, A.N; VAN DEN HURK, R.; COLENBRANDER, B.; DAEMEN, A.J.;VAN TOL, H.T.; MONTEIRO, R.M.;ROELEN, B.A.; BEVERS, M.M. Expression of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2), 4 (BMP-4) and BMP receptors in the bovine ovary but absence of effects of BMP-2 and BMP-4 during IVM on bovine oocyte nuclear maturation and subsequent embryo development. **Theriogenology**, v.63, p.872-889, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.05.013>

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

FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; SILVA, J.R.V. Manipulação de ovócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. In: GONÇALVES, P.B. D; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J. de F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Roca, cap. 16, p. 303-328, 2008.

FROTA, I. M.; LEITÃO, C. C.; COSTA, J. J.; VAN DEN HURK, R.;BRITO, I. R.; SARAIVA, M. V. A.; FIGUEIREDO, J.R.; SILVA, J. R. V. Effects of BMP-7 and FSH on the development of goat preantral follicles and levels of mRNA for FSH-R, BMP-7 and BMP receptors after in-vitro culture. **Animal Reproduction**, v. 8, n. 1/2, p. 25-31, 2011.

FROTA, I. M.; LEITÃO, C. C.; COSTA, J. J.; VAN DEN HURK, R.; SARAIVA, M. V.; FIGUEIREDO, J. R.; SILVA, J. R. Levels of BMP-6 mRNA in goat ovarian follicles and in

vitro effects of BMP-6 on secondary follicle development. **Zygote**, v. 21, n. 3, p. 270-278, 2013. <https://doi.org/10.1017/S0967199411000542>

FUJIMOTO, T.; YUKIHIRO, M.; MASATOSHI, F. The origin, migration and fine morphology of human primordial germ cells. **Anatomical Record**, Philadelphia, v.188, p.315-330, 1977. <https://doi.org/10.1002/ar.1091880305>

GLISTER, C.; KEMP, C.F.; KNIGHT, P.G. Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: actions of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin. **Reproduction**, v.127, n.2, p. 239-254, 2004. <https://doi.org/10.1530/rep.1.0009>

GUPTA, P.S.P.; RAMESH, H.S.; MANJUNATHA, B.M.; NANDI, S.; RAVINDRA, J.P. Production of buffalo embryos using oocytes from *in vitro* grown preantral follicles. **Zygote**, v.16, n.1, p.57– 63, 2008. <https://doi.org/10.1017/S096719940700442X>

GUTIERREZ, C.G.; RALPH, J.H.; TELFER, E.E.; WILMUT, I.; WEBB, R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 5, p. 1322- 1328, 2000. <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.5.1322>

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. Barueri: Manole, p.523, 2004.

HERRERA, B.; DOOLEY, S.; BREITKOPF-HEINLEIN, K. Potential roles of bone morphogenetic protein (BMP)-9 in human liver diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v.15, p.5199–5220, 2014. <https://doi.org/10.3390/ijms15045199>

HERRERA, B.; GARCÍA-ÁLVARO, M.; CRUZ, S.; WALSH, P.; FERNÁNDEZ, M.; RONCERO, C.; FABREGAT, I.; ARANZAZU, S.; INMAN, G. J. BMP-9 is a proliferative and survival factor for human hepatocellular carcinoma cells. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e69535, 2013. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069535>

HERRERA, B.; VAN DINTHER, M.; DIJKE, P.; INMAM, G.J. Autocrine Bone Morphogenetic Protein-9 signals via Activin Receptor Like Kinase-2/Smad1/Smad4 to promote ovarian cancer cell proliferation. **Cancer Research**, v.69, n.24, p. 9254–9262, 2009. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2912>

HIRSHFIELD, A. N. Development of follicles in the mammalian ovarian. **International Review of Cytology**, New York v. 124, p. 43-101, 1991. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61524-7](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61524-7)

HOGAN, B. L. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. **Genes & development**, v. 10, n. 13, p. 1580-1594, 1996. <https://doi.org/10.1101/gad.10.13.1580>

HOSOYA,T.; OTSUKA, F.; NAKAMURA, E.; TERASAKA T.; INAGAKI, K.; TSUKAMOTO-YAMAUCHI, N.; HARA, T.; TOMA, K.; KOMATSUBARA, M.; MAKINO, H. Regulatory role of BMP-9 in steroidogenesis by rat ovarian granulosa cells. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.147, p.85–9, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.12.007>

HUANG, E.; ZHU, G.; JIANG, W.; YANG, K.; GAO, Y.; LUO, Q.; et al. Growth hormone synergizes with BMP-9 in osteogenic differentiation by activating the JAK/STAT/ IGF1 pathway in murine multilineage cells. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.27, n.7, p. 1566-1575, 2012. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1622>

HULSHOF, S. C. J.; FIGUEIREDO, J. R.; BECKERS, J. F.; BEVERS, M. M.; VAN DEN HURK, R. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **Veterinary Quarterly**, Boston v. 16, p. 78-80, 1994. <https://doi.org/10.1080/01652176.1994.9694423>

JEWGENOW, K.; PITRA, C. Hormone controiled culture of secondary follicles of domestic cats. **Theriogenology**, v. 39, p. 527-535, 1993. [HTTPS://DOI.ORG/10.1016/0093-691X\(93\)90394-K](https://doi.org/10.1016/0093-691X(93)90394-K)

JIMENEZ, C. R.; AZEVEDO, J. L.; SILVEIRA, R. G.; PENITENTE-FILHO, J.; CARRASCAL-TRIANA, E. L.; ZOLINI, A. M.; ARAÚJO, V.R.; TORRES, C. A. A.; GONÇALVES, W.G. Effects of Growth Hormone on *In Situ* Culture of Bovine Preantral Follicles are Dose Dependent. **Reproduction in Domestic Animals**, n.51, v.4, p.575-584, 2016. <https://doi.org/10.1111/rda.12722>

JUENGEL, J. L.; HUDSON, N. L.; HEATH, D. A.; SMITH, P.; READER, K. L.; LAWRENCE, S. B.; O'CONNELL, A.R.; LAITINEN, M.P.E.; CRANFIELD, M.; P.; GROOME, N.P.; RITVOS, O; MCNATTY, K.P. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. **Biology of reproduction**, v. 67, n. 6, p. 1777-1789, 2002. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.007146>

LAMPLLOT, J.D.; QIN, J.; NAN, G.; WANG, J.; LIU, X.; YIN, L.; et al. BMP-9 signaling in stem cell differentiation and osteogenesis. **American Journal of Stem Cells**, v.2, n.1, p.1-21, 2013.

LANGBEEN, A., BARTHOLOMEUS, E., LEROY, J. L., BOLS, P. E. Bovine *in vitro* reproduction models can contribute to the development of (female) fertility preservation strategies. **Theriogenology**, v. 84, n. 4, p. 477-489, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.04.009>

LEBLANC, E.; DROUIN, G.; GRENIER, G.; FAUCHEUX, N.; HAMDY, R. From skeletal to non-skeletal: The intriguing roles of BMP-9: A literature review. **Advances in Bioscience and Biotechnology**, v. 4, n.10C, p. 31-46, 2013. <https://doi.org/10.4236/abb.2013.410A4004>

LEITÃO, C. C. F.; BRITO, I. R.; FROTA, I. M. A.; SILVA, J. R. V. Importância dos fatores de crescimento locais na regulação da foliculogênese ovariana em mamíferos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, p. 215-224, 2009.

LI, C.; YANG, X.; HE, Y.; YE, G.; LI, X.; ZHANG, X.; DENG, F. Bone morphogenetic protein-9 induces osteogenic differentiation of rat dental follicle stem cells in P38 and ERK1/2 MAPK dependent manner. **International journal of medical sciences**, v. 9, n. 10, p. 862, 2012. <https://doi.org/10.7150/ijms.5027>

LIU, X.; QIN, J.; LUO, Q.; BI, Y.; ZHU, G.; JIANG, W.; et al. Cross talk between EGF and BMP-9 signalling pathways regulates the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.10, n. 9, p. 1181-1192, 2013.

MBASSA, G.K. Studies on the ovarian development in Zebu Cattle (*Bos indicus*). **Anatomia, histologia, embryologia**, v.18, p.143-149, 1989. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.1989.tb00590.x>

MACHADO, V.P.; RODRIGUES, A.P.R.; BRASIL, A.F.; AMORIM, C.A.; MATOS, M.H.T.; SANTOS, R.R. dos; FIGUEIREDO, J.R. de. Isolamento mecânico e enzimático de folículos ovarianos pré- antrais de fetos caprinos. **Ciência Animal**, Fortaleza, v.12, n.2, p.83-91, 2002.

MACKAY, S. Gonadal development in mammals at the cellular and molecular levels. **International review of cytology**, v.200, p.47-99, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(00\)00002-4](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(00)00002-4)

MAGALHÃES, D. M.; DUARTE, A. B. G.; ARAÚJO, V. R.; BRITO, I. R.; SOARES, T. G.; LIMA, I. M. T.; LOPES, C.A.P.; CAMPELLO, C.C.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J. R. *In vitro* production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. **Theriogenology**, v. 75, n. 1, p. 182-188, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.08.004>

MAJUMDAR, M. K.; WANG, E.; MORRIS, E. A. BMP-2 and BMP-9 promotes chondrogenic differentiation of human multipotential mesenchymal cells and overcomes the inhibitory effect of IL-1. **Journal of cellular physiology**, v. 189, n. 3, p. 275-284, 2001. <https://doi.org/10.1002/jcp.10025>

MCLAREN, A. Germ and somatic cell lineages in fine developing gonad. **Endocrinology**, v.163, p.3-9, 2000.

MONTEIRO, C. M. R.; BIAGI, M.B.; PERRI, S. H. V.; CARVALHO, R.G.; NOGUEIRA, G.P. Desenvolvimento folicular em ovários de fetos zebuínos (*Bos taurus indicus*). **Biotemas**, Florianópolis, v.22, n. 3, p.185-191, 2009.

MONTEIRO, C.M.R.; CARVALHAL, R.; PERRI, S. H. V. Análise morfológica dos ovários de fetos bovinos da raça Nelore (*Bos primigenius indicus*) em diferentes fases de gestação. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, São Paulo, n. 40, v.6, p.409-415, 2003. <https://doi.org/10.1590/S1413-95962003000600004>

MOTTA, P.M.; MAKABE, S. Germ cells in the ovarian surface during fetal development in humans. A three dimensional microanatomical study by scanning and transmission electron microscopy. **Journal of submicroscopic cytology and pathology**, v.81, p.271-276, 1986.

O'BRIEN, M. J.; PENDOLA, J. K.; EPPIG, J. J. A revised protocol for *in vitro* development of mouse oocyte from primordial follicles dramatically improves their development competence. **Biology of Reproduction**, v.68, n.5, p.1682-1686, 2003. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.013029>

PACKER, C.; TATAR, M.; COLLINS, A. Reproductive cessation in female mammals. **Nature**, London, v. 392, p. 807-811, 1998. <https://doi.org/10.1038/33910>

PASSOS, M.J.; VASCONCELOS, G.L.; SILVA, A.W.; BRITO, I.R.; SARAIVA, M.V.; MAGALHÃES, D.M.; et al. Accelerated growth of bovine preantral follicles *in vitro* after stimulation with both FSH and BMP-15 is accompanied by ultrastructural changes and increased atresia. **Theriogenology**, v. 79, p. 1269-1277, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.02.023>

PETERS, H. Migration of gonocytes in to mammalian gonad and their differentiation. Philosophical transactions of the Royal Society of London, **London B**, v.259, p.91-101, 1970.

PICTON, H.M. Activation of follicle development: The primordial follicle. **Theriogenology**, v.55, n.6, p.1193-1210, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00478-2](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00478-2)

PORRAS-GÓMEZ, T. J.; MORENO-MENDOZA, N. Neo-oogenesis in mammals. **Zygote**, v. 25, n. 4, p. 404-422, 2017. <https://doi.org/10.1017/S0967199417000363>

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

ROSSI, R. O. D. S.; COSTA, J. J. N.; SILVA, A. W. B.; SARAIVA, M.V.A.; VAN DER HURK, J.R.V.; SILVA, J.R.V. The bone morphogenetic protein system and the regulation of ovarian follicle development in mammals. **Zygote**, v. 24, n. 1, p. 1-17, 2016a. <https://doi.org/10.1017/S096719941400077X>

ROSSI, R. O.; DA CUNHA, E. V.; PORTELA, A. M.; PASSOS, J. R.; COSTA, J. J.; SILVA, A. W.; SARAIVA, M.V.; PEIXOTO, C.A.; DONATO, M.A.; VAN DER HURK, R.; SILVA, J. R. Influence of BMP-2 on early follicular development and mRNA expression of oocyte specific genes in bovine preantral follicles cultured in vitro. **Histology and histopathology**, v. 31, n. 3, p. 339-348, 2016b.

ROSSI, R. O. D. S.; PORTELA, A. M. L. R.; PASSOS, J. R. S.; CUNHA, E. V.; SILVA, A. W. B.; COSTA, J. J. N.; SARAIVA, M.V.A.; DONATO, M.A.M.; PEIXOTO, C.A.; VAN DER HURK, J.R.V.; SILVA, J.R.V. Effects of BMP-4 and FSH on growth, morphology and mRNA expression of oocyte-secreted factors in cultured bovine secondary follicles. **Animal Reproduction**, v. 12, n. 4, p. 910-919, 2015.

SARTORI, R.; SANDRI, M. BMPs and the muscle–bone connection. **Bone**, v. 80, p. 37-42, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.05.023>

SCHARPFENECKER, M.; VAN DINTHER, M.; LIU, Z.; VAN BEZOOIJEN, R.L.; ZHAO, Q.; PUKAC, L.; LO´ WIK, C.W.; TEN DIJKE, P. BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. **Journal of Cell Science**, v.120, n.6, p.964-972, 2007. <https://doi.org/10.1242/jcs.002949>

SHIMASAKI, S.; MOORE, R. K.; OTSUKA, F.; ERICKSON, G. F. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. **Endocrine reviews**, v. 25, n. 1, p. 72-101, 2004. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0007>

SILVA, J.R.V.; FERREIRA, M.A.L.; COSTA, S. H. F.; SANTOS, R. R.; CARVALHO, F. C. A.; RODRIGUES, A. P. R.; LUCCI, C. M.; BÃO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Degeneration rate of preantral follicles in the ovaries of goats. **Small Ruminant Research**, v. 43, p. 203-209, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(02\)00017-2](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(02)00017-2)

SILVA, J.R.V.; VAN DEN HURK, R.; FIGUEIREDO, J. R. Ovarian follicle development *in vitro* and oocyte competence: advances and challenges for farm animals. **Domestic animal endocrinology**, v. 55, p. 123-135, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2015.12.006>

SILVA-SANTOS, S.S.D.; FERREIRA, M.A.P.; PINTO, J.A.; SAMPAIO, R.V.; CARVALHO, A.C.; SILVA, T.V.G.; COSTA, N.N.; CORDEIRO, M.S.; MIRANDA, M.S.; RIBEIRO, H.F.L.; OHASHI, O.M. Characterization of folliculogenesis and the occurrence of apoptosis in the development of the bovine fetal ovary. **Theriogenology**, v. 79, p. 344–350, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.09.026>

SILVA-SANTOS, K. C.; SANTOS, G. M.; SILOTO, L. S.; HERTEL, M. F.; ANDRADE, E. R.; RUBIN, M. I.; STURION, L.; MELO-STERZA, F.A.; SENEDA, M. M. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. **Theriogenology**, 76, p. 1051-1057, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.05.008>

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, n.6, p.1717-1751, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.08.005>

WEI, Z.; SALMON, R. M.; UPTON, P. D.; MORRELL, N. W.; LI, W. Regulation of bone morphogenetic protein 9 (BMP-9) by redox-dependent proteolysis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 45, p. 31150-31159, 2014. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.579771>

WU, J.W.; EMERY, B.R.; CARRELL, D.T. *In vitro* growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. **Biology of Reproduction**, v.64, n.1, p.375-381, 2001. <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.1.375>

CAPITULO 2- CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO QUANTITATIVA DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS EM OVÁRIOS DE FETOS BOVINOS

Resumo

Objetivou-se com o presente estudo caracterizar os folículos em fetos bovinos, analisando-se os aspectos quantitativos da população folicular. Para isso foram utilizados 18 ovários de fetos provindos de abatedouro, agrupando-os em três grupos (6 ovários em cada grupo): Inicial– terço inicial de gestação (fetos de 30 a 120 dias de idade), Médio- terço médio de gestação (fetos de 120 a 180 dias de idade) e Final– terço final de gestação (fetos de 180 a 270 dias de idade). Para as análises histológicas e morfométricas, os ovários foram processados em parafina, seguidos de cortes com 5 μ m de espessura em micrótomo manual e submetidos à coloração com hematoxilina e eosina. As análises e quantificações foliculares foram feitas em microscopia óptica. Os fetos do grupo Inicial não apresentaram nenhum tipo de estrutura folicular. Por outro lado, no grupo Médio observaram-se apenas folículos primordiais e primários com $34.014,8 \pm 34.798,5$ (85,8%) e $5.614,9 \pm 6.925,8$ (14,2%) respectivamente. No grupo Final observou-se média de $19.944,6 \pm 15.624,5$ folículos primordiais (73%), $7.082,2 \pm 8424,1$ folículos primários (26%), $35,9 \pm 35,4$ folículos secundários (0,13%), $135,4 \pm 148,9$ folículos antrais iniciais (0,5%) e $7,4 \pm 10$ folículos antrais (0,03%). Não houve diferença estatística ($P < 0,05$) entre as contagens de folículos primordiais e primários dos grupos Médio e Final. Foi verificada uma redução do número de folículos primordiais no grupo Final e aumento dos folículos primários. Em conclusão, pode-se afirmar que fetos bovinos a partir de quatro meses de idade apresentam população de folículos pré-antrais formada com diversos graus de desenvolvimento folicular.

Palavras-chave: pré-antral, histologia, MOIFOPA, reprodução

Abstract

The present study aimed to histologically characterize the ovarian development of bovine fetuses, analyzing the morphological and quantitative aspects of the follicular population. For this purpose, 18 ovaries of fetuses sampled at a slaughterhouse were used, grouping them into three groups (6 ovaries in each group): Initial- first third of gestation (fetuses from 30 to 120 days of age), Middle- middle third of gestation (fetuses from 120 to 180 days of age) and Final - final third of gestation (fetuses from 180 to 270 days of age). For the histological and morphometric analyzes, the ovaries were processed in paraffin, then sectioned in 5 μ m thick slides using a hand microtome and submitted to staining with hematoxylin and eosin. Follicular analysis and quantification were performed under light microscopy. The fetuses of the Initial group did not present any type of follicle or apparent oocyte structure. On the other hand, in the Middle group, only primordial and primary follicles were observed, with $34,014.8 \pm 34,798.5$ (85.8%) and $5,614.9 \pm 6,925.8$ (14.2%), respectively. In the Final group, it was observed a mean of $19,944.6 \pm 15,624.5$ primordial follicles (73%), $7,082.2 \pm 8424.1$ primary follicles (26%), 35.9 ± 35.4 secondary follicles (0.13 %), 135.4 ± 148.9 small antral follicles (0.5%) and 7.4 ± 10 antral follicles (0.03%). There was no statistical difference ($P < 0.05$) between the counts of primordial and primary follicles of the Medium and Final groups. There was a reduction in the number of primordial follicles in the Final third and increase in the primary follicles. In conclusion, it can be stated that bovine fetuses from the age of four months present a population of preantral follicles formed with associated follicular activation processes.

Keywords: preantral, histology, MOEPF, reproduction

1 Introdução

As variações morfológicas que as estruturas dos órgãos reprodutores sofrem nos diferentes estágios fetais, merecem um estudo mais detalhado, uma vez que a população folicular ovariana fetal é superior àquela observada em animais adultos, o que justificaria o estudo de protocolos de isolamento folicular de fetos em diferentes estágios de desenvolvimento (MACHADO et al., 2002; SILVA-SANTOS et al., 2011).

A determinação do desenvolvimento pré-natal dos ovários de fetos contribui com as técnicas de manipulação de ovócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA). Também contribui para melhorar o entendimento da foliculogênese e para tentar verificar o período de surgimento de folículos ovarianos e seus estágios de crescimento

Portanto, objetivou-se com este trabalho, determinar o número de folículos pré-antrais em fetos bovinos mestiços durante o terço inicial, médio e final do desenvolvimento pré-natal, classificando os folículos em primordiais, primários, secundários e antrais.

2 Material e métodos

Este estudo foi submetido à Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia, com certificado número 021/14.

2.1 Coleta dos ovários

Foram colhidos ovários (n=18) de fetos de vacas mestiças, abatidas em frigorífico. Em seguida foram agrupados de acordo com o desenvolvimento pré-natal em Inicial – terço inicial de gestação (fetos de 30 a 120 dias de idade), Médio- terço médio de gestação (fetos de 120 a 180 dias de idade) e Final– terço final de gestação (fetos de 180 a 270 dias de idade).

2.2 Cálculos da idade dos fetos

A idade fetal foi estimada, utilizando-se do comprimento dos fetos, com mensuração da distância occípito-sacral (“*Crown-Rump*”/CR), tomando-se como referência a crista nugal e a última vértebra sacral. As mensurações dos CR embrionários e fetais foram realizadas utilizando-se um paquímetro com divisão em milímetros (150x0,02mm). De acordo com o comprimento foram estimados estágios gestacionais baseando-se na fórmula $DG = 8,4 + 0,087C + 5,46\sqrt{C}$, em que DG= dias de gestação e C= comprimento do embrião ou feto, (REXROAD et al., 1974).

2.3 Processamento dos ovários

Após a coleta, os ovários foram mensurados quanto ao comprimento (cm), largura (cm), espessura (cm), e peso (g). Para o processo de histologia clássica, foram lavados em solução de PBS e acondicionados em solução de formol por 24 horas com posterior armazenamento em álcool 70° até o momento da fixação em parafina. Após a fixação os blocos de parafina foram seccionados a 5µm de espessura. Os cortes teciduais foram colocados em lâminas histológicas, desparafinados e corados com hematoxilina eosina.

2.4 Contagem e classificação dos folículos

A quantificação e classificação dos folículos foram realizadas utilizando o Microscópio Diagtech XJD403® em aumento de 40x. A classificação dos folículos foi feita de acordo Hulsholf et al. (1994), em primordial, primário, secundário, antrais iniciais e antrais.

Para a contagem dos folículos três cortes foram analisados e estimada a população de acordo com Diniz et al. (2005). Como a espessura do corte foi menor que o diâmetro dos folículos, e para evitar duplicidade na contagem folicular em cada seção, o número total de

folículos (Nt) foi resultado do número de folículos (Nf) multiplicado pela razão da quantidade de cortes do ovário (Co) dividido pelo número de cortes do folículo (Cf). Para calcular o Co, foi encontrada a espessura do ovário e dividido pela espessura do corte da lâmina (Ec) que corresponde a 5µm. Para calcular as quantidades de cortes necessários para seccionar todo um folículo (Cf), foi dividido o diâmetro de cada folículo pela espessura do corte da lâmina (Ec) (SILVA-SANTOS et al., 2013).

Temos:

$$Co = Eo/Ec$$

$$Cf = Ef/Ec$$

$$Nt = Nf \times (Co/Cf) \text{ onde,}$$

Nt= Número total de folículos

Nf= Número de folículos

Co= Quantidades de cortes que rende um ovário.

Cf= Quantidades de cortes necessários para seccionar todo um folículo.

Ec= Espessura do corte da lâmina (5µ).

Ef= Diâmetro do folículo.

Eo= Espessura do Ovário.

2.5 Análise estatística

Dados de cada grupo foram tabulados e submetidos a estatística descritiva, com cálculo de porcentagem de cada folículo (primordial, primário, secundário, terciário e pré-ovulatório). As contagens dos folículos primordiais e primários nos terços Médio e Final foram submetidas ao teste “t” (Student) a nível de 5% de significância ($P < 0,05$) ((EQUIPE ESTATCAMP, 2014).

3 Resultados

Os folículos ovarianos pré-antrais (FOPA) representaram mais que 90% (Tabela 1) da população folicular. Os folículos primordiais compreendem a maior proporção em ambos grupos médio e final.

Em fetos do grupo Inicial, os ovários não possuíam nenhum tipo de folículos.

Tabela 1. Proporção dos folículos ovarianos dos grupos Inicial, Médio e Final.

Folículo ovariano	Grupo Inicial (%)	Grupo Médio (%)	Grupo Final (%)
Primordiais	0,00	85,83	73,31
Primários	0,00	14,17	26,03
Secundários	0,00	0,00	0,13
Antrais iniciais	0,00	0,00	0,50
Antrais	0,00	0,00	0,03

A partir do grupo Médio de gestação, folículos primordiais foram identificados morfológicamente (Figura 1). Nestes o núcleo do ovócito ocupava uma posição central com nucléolo evidente.

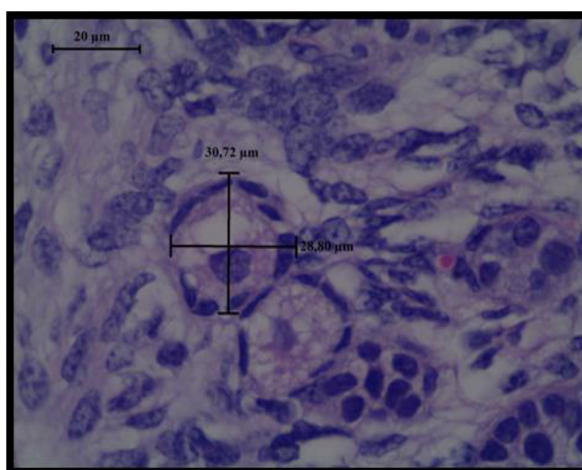


Figura 1. Análise histológica do ovário de um feto do grupo Médio. A fotomicrografia representa um folículo primordial.

O cálculo da população folicular demonstrou maior proporção de folículos no estágio primordial em ambos grupos médio e final de desenvolvimento fetal. Nos fetos analisados, a população de folículos primordiais e primários, do grupo Médio foi semelhante ($P > 0,05$) ao grupo Final (Tabela 2).

Tabela 2. População média de folículos por ovário e desvio padrão nos grupos Médio e Final.

Folículo ovariano	Grupo Médio	Grupo Final
Primordiais	34.014, $8 \pm 34.798,5a$	19.944,6 $\pm 15.624,5a$
Primários	5.614, $9 \pm 6.925,8a$	7.082,2 $\pm 8424,1a$
Secundários	0	35,9 $\pm 35,4$
Antrais iniciais	0	135,4 $\pm 148,9$
Antrais	0	7,4 ± 10
Total	39.629,67a	27.205,62a

*Médias seguidas por letras iguais na linha não diferem entre si pelo teste “t” (Student) a nível de 5% de significância ($P > 0,05$).

Foram encontrados folículos primários em fetos do grupo Médio (Figura 2).

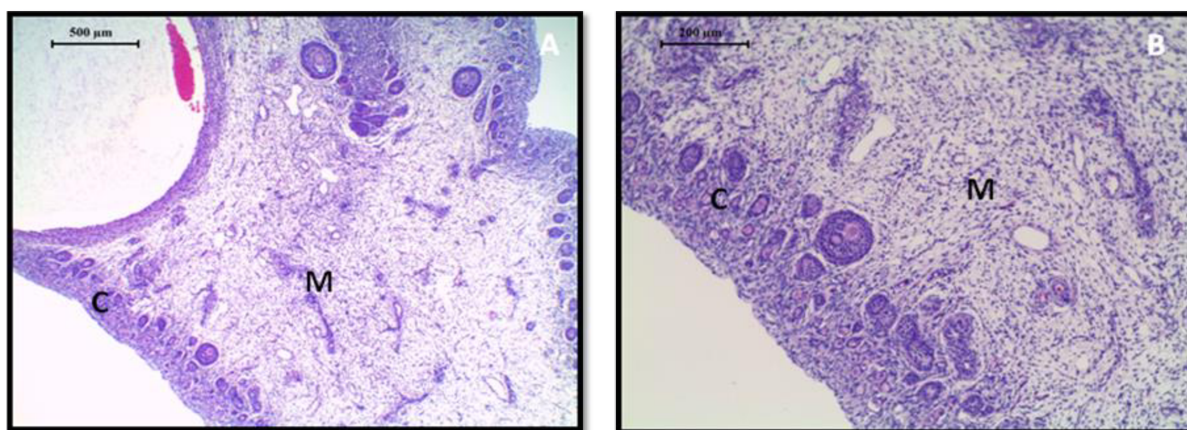


Figura 2. Análise histológica do ovário de feto bovino. A fotomicrografia A representa a região cortical (C), área mais superficial onde se encontra maior quantidade de folículos, e medular (M), área mais profunda, formada por tecido conjuntivo denso, fibras colágenas dispostas em arranjos concêntricos e presença de vasos sanguíneos.

Os folículos antrais iniciais foram identificados em fetos do grupo Final, se destacando dos folículos secundários e os demais antrais (Figura 3).

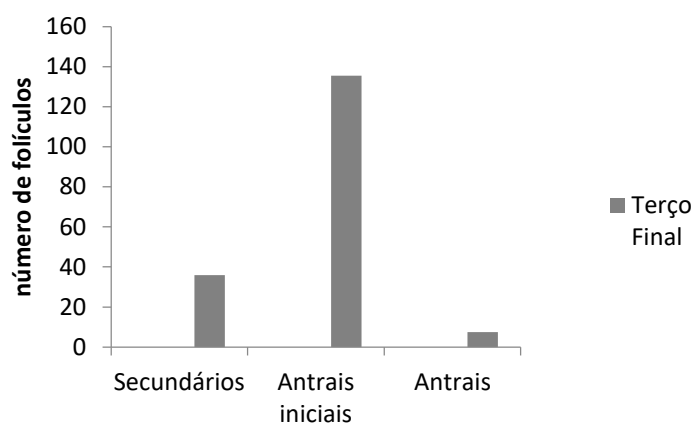


Figura 3. População média de folículos secundários, antrais iniciais e antrais no grupo Final.

4 Discussão

A maior população de folículos ovarianos avaliados neste estudo foi classificada no estágio pré-antral. Adicionalmente, os folículos foram observados a partir de 120 dias de gestação. Tanaka et al., (2001), Monteiro et al. (2009) e Silva- Santos et al. (2013) também verificaram ausência de folículos até 90 dias, contrariando os dados de Diniz et al. (2005) que observaram em fetos da raça Nelore a partir de 85 dias gestacionais, o início do surgimento de folículos primordiais e aos 94 dias, estavam totalmente formados. Mbassa (1989) relatou que em fetos zebuínos, os folículos primordiais são formados a partir de 60 dias gestacionais.

No grupo Final da gestação, houve uma diminuição numérica na população de folículos primordiais (reduziram de 34.014 para 19.944 folículos). Em diversas espécies de mamíferos, ovócitos e folículos primordiais, depois de formados, têm seu número consideravelmente reduzido, normalmente a partir da segunda metade da gestação (ERICKSON, 1966; SILVA- SANTOS et al., 2013). Essa perda contínua seria consequência dos mecanismos de atresia folicular (PETERS, 1970; PACKER et al., 1998; MCLAREN, 2000) e apoptose (SILVA- SANTOS et al., 2013). Diniz et al. (2005) encontraram um total de 93.806 folículos primordiais em fetos no terço médio da gestação, um número bastante

elevado comparado a este trabalho, com um crescimento linear até o terço médio de gestação e um declínio evidente até o terço final.

Em relação aos folículos primários, o grupo Médio apresentou 5.614, 9 folículos primários, e no grupo Final 7.082, 2. Diniz et al. (2005) também descreveram que essa classe folicular aumentou em quantidade, nos fetos no início do terço final, alcançando 163.216 folículos.

No grupo final surgiram os folículos secundários, antrais iniciais e os antrais. A maior proporção foi de antrais iniciais. Dados semelhantes foram observados por Monteiro et al., (2009) e Silva- Santos et al. (2013), ainda na fase Média da gestação.

A contagem folicular pré-antral deste experimento apresentou algumas divergências em relação a outros trabalhos, em relação ao surgimento dos folículos e em números. Possíveis explicações para essa alta variabilidade de resultados, podem ser relacionadas a diferentes raças de bovinos como fonte destes ovários ou variações individuais dentro de uma população (ERICKSON, 1966; CARAMBULA et al., 1999; FIGUEIREDO et al., 2008; SILVA-SANTOS et al., 2011; SILVA-SANTOS et al., 2013). Em conclusão, pode-se afirmar que fetos bovinos a partir de quatro meses de idade apresentam a população de folículos pré-antrais evidente com processos de ativação folicular associado.

Referências

- CARAMBULA, S. F.; GONCALVES, P. B. D.; COSTA, L. F. S.; FIGUEIREDO, J. R.; WHEELER, M. B.; NEVES, J. P.; MONDADORI, R. G. Effect of fetal age and method of recovery on isolation of preantral follicles from bovine ovaries. **Theriogenology**, v. 52, n. 4, p. 563-571, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00152-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00152-1)
- DINIZ, E. G.; ESPER, C.R.; JACOMINI, J.O.; VIEIRA, R.C. Desenvolvimento morfológico dos ovários em embriões e fetos bovinos da raça Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.1, p. 70-76, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352005000100010>

EQUIPE ESTATCAMP. **Software Action**. Estatcamp- Consultoria em estatística e qualidade, São Carlos - SP, Brasil. URL <http://www.portaction.com.br/>. 2014

ERICKSON, B.H. Development and radioresponse of the prenatal bovine ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.10, 97-105, 1966. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0110097>

FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; SILVA, J.R.V. Manipulação de ovócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J. de F. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo: Roca, cap. 16, p. 303-328, 2008.

HULSHOF, S. C. J.; FIGUEIREDO, J. R.; BECKERS, J. F.; BEVERS, M. M.; VAN DEN HURK, R. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **Veterinary Quarterly**, Boston v. 16, p. 78-80, 1994. <https://doi.org/10.1080/01652176.1994.9694423>

MACHADO, V.P.; RODRIGUES, A.P.R.; BRASIL, A.F.; AMORIM, C.A.; MATOS, M.H.T.; SANTOS, R.R. dos; FIGUEIREDO, J.R. de. Isolamento mecânico e enzimático de folículos ovarianos pré- antrais de fetos caprinos. **Ciência Animal**, v.12, n.2, p.83-91, 2002.

MBASSA, G.K. Studies on the ovarian development in Zebu Cattle (*Bos indicus*). **Anatomia, histologia, embryologia**, v.18, p.143-149, 1989. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0264.1989.tb00590.x>

MCLAREN, A. Germ and somatic cell lineages in fine developing gonad. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.163, p.3-9, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(99\)00234-8](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(99)00234-8)

MONTEIRO, C. M. R.; BIAGI, M.B.; PERRI, S. H. V.; CARVALHO, R.G.; NOGUEIRA, G.P. Desenvolvimento folicular em ovários de fetos zebuínos (*Bos taurus indicus*). **Biotemas**, v.22, n. 3, p.185-191, 2009.

PACKER, C.; TATAR, M.; COLLINS, A. Reproductive cessation in female mammals. **Nature**, London, v. 392, p. 807-811, 1998. <https://doi.org/10.1038/33910>

PETERS, H. Migration of gonocytes in to mammalian gonad and their differentiation. **Philosophical transactions of the Royal Society of London**, London B, v.259, p.91-101, 1970.

REXROAD, C.E.; CASIDA, L.E.; TYLER, W.J.M. Crown-rump length of fetuses in purebred Holstein-Friesian cows. **Journal of dairy science**, v.57, p.346-347, 1974. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(74\)84891-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(74)84891-5)

SILVA- SANTOS, S.S.D.; FERREIRA, M.A.P.; PINTO, J.A.; SAMPAIO, R.V.; CARVALHO, A.C.; SILVA, T.V.G.; COSTA, N.N.; CORDEIRO, M.S.; MIRANDA, M.S.; RIBEIRO, H.F.L.; OHASHI, O.M. Characterization of folliculogenesis and the occurrence of apoptosis in the development of the bovine fetal ovary. **Theriogenology**, v. 79, p. 344–350, 2013.

SILVA-SANTOS, K. C.; SANTOS, G. M.; SILOTO, L. S.; HERTEL, M. F.; ANDRADE, E. R.; RUBIN, M. I.; STURION, L.; MELO-STERZA, F. A.; SENEDA, M. M. .Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. **Theriogenology**, 76, p. 1051- 1057, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.05.008>

TANAKA, Y.; NAKADA, K.; MORIYOSHI, M. Appearance and number of follicles and change in the concentration of serum FSH in female bovine fetuses. **Reproduction**, v. 121, n. 5, p. 777-782, 2001. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1210777>

CAPÍTULO 3- CULTIVO *IN VITRO* DE TECIDO OVARIANO DE FETOS BOVINOS CONTENDO PROTEÍNA MORFOGENÉTICA ÓSSEA 9

Resumo

Com esta pesquisa propôs-se um meio de cultivo para suportar o crescimento de folículos pré-antrais de fetos bovinos. Fragmentos do córtex ovariano (3x3x1mm) foram cultivados em meio de cultivo TCM- 199 (grupo controle cultivado) e cultivados em meio suplementado com 50, 100 e 200 ng/ml de BMP-9 e comparados a um controle fresco. Após sete dias de cultivo, a percentagem de folículos morfologicamente normais foi superior no tratamento com 50 ng/ml de BMP-9 ($P<0,05$) comparado ao demais tratamentos. A concentração de 200 ng/ml proporcionou a menor taxa de folículos normais. Verificou-se que o diâmetro dos folículos primordiais dos tratamentos com acréscimo de 50 e 200 ng/ml de BMP-9 apresentaram-se inferior ao grupo controle fresco ($P<0,05$). Conclui-se que a adição de 50 ng de BMP-9 ao meio de cultivo exerceu uma ação benéfica na preservação da viabilidade de folículos primordiais, e que a BMP-9 exerce um efeito inibitório na ativação folicular durante o período de cultivo.

Palavras-chave: BMP-9, foliculogênese, MOIFOPA, folículos primários

Abstract

With this research, a culture medium was proposed to support the growth of preantral follicles of bovine fetuses. Fragments of the ovarian cortex (3x3x1mm) were cultured in TCM-199 culture medium (cultured control group) supplemented with 50, 100 and 200 ng/ml

BMP-9 and compared to a fresh control. After seven days of culture, the percentage of morphologically normal follicles was higher in the treatment with 50 ng/ml BMP-9 ($P<0.05$) compared to the other treatments. The concentration of 200 ng/ml presented the lowest rate of normal follicles. It was verified that the primordial follicles of the treatments with addition of 50 and 200 ng/ml of BMP-9 presented follicular diameter lower than the control group ($P<0.05$). It is concluded that addition of 50ng/ml of BMP-9 maintains the survival of transitional follicles after seven days of culture of ovarian tissue fragments from bovine fetuses and that BMP-9 exerts an inhibitory effect on follicular activation during the culture period.

Keywords: BMP-9, folliculogenesis, MOEPF, primary follicles

1 Introdução

A foliculogênese é regulada por estímulos hormonais endócrinos e também por fatores de crescimento produzidos no próprio ovário. Um desses fatores são as BMPs (proteínas morfogenéticas ósseas), membros da superfamília dos fatores de crescimentos transformantes- β (TGF- β), que exercem efeito autócrino e/ou parácrino, uma vez que muitas destas moléculas são sintetizadas e secretadas pelos ovócitos, possuindo efeitos positivos no que diz respeito à ativação folicular in vivo e in vitro (SHIMAZAKI et al., 2004).

A BMP-9 ainda não teve sua função descrita no ovário de bovinos, mas segundo Hosoya et al. (2015) em células da granulosa de ratas, atua como um regulador na produção de progesterona, mas não atua como inibidor da produção de estrógeno. Foi relatada associação da BMP-9 a proliferação de células de tumorais, apoptose e diferenciação no tecido de ovário, da próstata, da mama e da tireoide, levando a constatação de que esta proteína possa estar envolvida na regulação de funções reprodutivas (HERRERA et al., 2009; HOSOYA et al., 2015). Em outros tecidos a BMP-9 apresenta múltiplos efeitos de

proliferação e inibição, sendo o melhor fator de crescimento osteogênico dentre todas as BMPs (HUANG et al., 2012; LI et al., 2012).

Com esta pesquisa propõe-se um novo meio de cultivo para suportar o crescimento de folículos pré-antrais de fetos bovinos ao estudar os efeitos da BMP- 9 pela primeira vez em bovinos.

2 Material e métodos

Este estudo foi submetido à Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia, com certificado número 021/14.

2.1 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) e R&D Systems, a menos que indicado de outra forma.

2.2 Coleta dos ovários

Ovários (n=6) de fetos bovinos sem raça definida, com aproximadamente 7 a 9 meses de idade foram coletados em abatedouros locais. A idade fetal foi estimada considerando o comprimento desde região cefálica até a base da cauda conforme a fórmula: $DG = 8,4 + 0,087C + 5,46\sqrt{C}$, em que DG= dias de gestação e C= comprimento do embrião ou feto (REXROAD et al., 1974). Após a coleta, os ovários foram lavados com álcool 70% por 10 segundos, e duas vezes com α -MEM, suplementado com 100 μ g/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina e 25 mM de HEPES. Os ovários foram transportados no mesmo meio para o laboratório a 4°C, no período máximo de 3 horas.

2.3 Cultivo dos folículos pré-antrais *in situ*

No laboratório, o tecido conjuntivo e a gordura dos ovários foram removidos e fatias do córtex ovariano (3x3x1mm) foram produzidas utilizando uma lâmina cirúrgica.

De um *pool* de fragmentos feitos com os seis ovários, quatro foram imediatamente fixados em paraformaldeído a 4% para controle fresco. Os fragmentos foram cultivados em gotas de 1 ml de meio de cultivo TCM- 199 (meio base) suplementado com selênio (4 ng/ml), insulina (10 ng/ml), ácido ascórbico (50 µg/ml), transferrina (2,5 µg/ml), glutamina (3mM), hipoxantina (2 mM), albumina sérica bovina (BSA) (1%), penicilina (100 µg/ml) e estreptomicina (100 µg/ml). Para os tratamentos, o meio de base foi suplementado com 50, 100 e 200 ng/ml de BMP-9. Houve um grupo de fragmentos cultivados sem adição de BMP-9 (0 ng/ml), denominado controle cultivado. As concentrações utilizadas de BMP-9 neste estudo foram determinadas conforme a concentrações estabelecidas de BMP-15 em caprinos (CELESTINO et al., 2011) para cultivo *in vitro* de folículos. Para o cultivo, cinco fragmentos por tratamento foram aleatoriamente escolhidos e incubados por 7 dias (CELESTINO et al., 2011) em estufa com 5% de CO₂ no ar, à 39°C. Foram feitas 3 réplicas. O meio de cultivo foi substituído a cada dois dias. O efeito dos tratamentos sobre os fragmentos cultivados foi avaliado por meio de análise histológica.

2.5 Análise histológica e avaliação de crescimento do folículo *in situ*

Após a preparação histológica padrão (desidratação e emblocagem em parafina), as amostras foram seccionadas a 7µm de espessura, colocadas em lâminas de vidro, e coradas com eosina e hematoxilina (ALVES et al., 2015).

Os seguintes parâmetros foram avaliados: número de folículos por fragmento; classificação quanto ao estágio de desenvolvimento em primordial: folículo com ovócito imaturo localizado no centro do folículo e rodeado por uma camada de células da granulosa de formato pavimentoso; transição: folículo com crescimento ovocitário e mudança

morfológica de pavimentoso para cubóide; primário: folículo com ovócito imaturo e central rodeado por uma camada de células da granulosa de formato cuboide e secundário: ovócito imaturo central, circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa de forma cúbica); classificação morfológica onde folículos foram considerados normais ou degenerados conforme padrão descrito por Alves et al., (2015). (Figura 1)

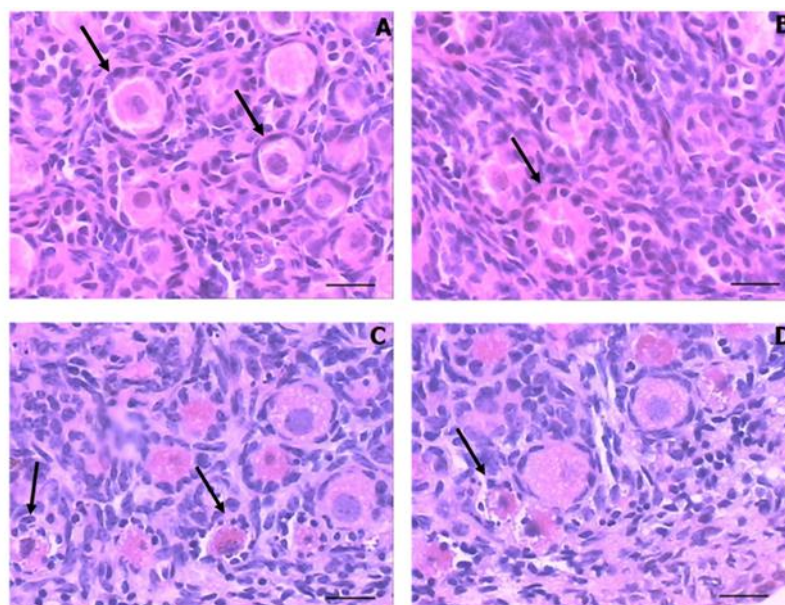


Figura 1. Fotomicrografia de secções histológicas de tecido ovariano de feto. A seta indica folículos normais em A e B e folículos degenerados em C e D. A barra corresponde a 20 μ m.

A quantificação e classificação dos folículos foram realizadas utilizando o Microscópio Diagtech XJD403® em aumento de 40x. Para avaliar a ativação folicular, o número de folículos primordiais e em desenvolvimento (de transição, primários e secundários) normais foram determinados antes e depois do cultivo *in vitro*.

2.6 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas pelo programa Sigma Plot 11.0 (Systat Software, California, EUA). A porcentagem de folículos normais e ativados entre os

tratamentos foi analisada pelo teste do qui-quadrado enquanto o teste t comparou os diâmetros folicular e ovocitário. A associação entre a concentração de BMP-9 e os diâmetros folicular e ovocitário foram determinadas pelo teste de correlação de Pearson. Os dados foram reportados na forma de porcentagem e média ($\pm$ erro padrão da média) e as diferenças consideradas significativas quando $P < 0,05$ (bilateral).

3 Resultados

De um total de 75 fragmentos ovarianos, foram avaliados 8.560 folículos, com a predominância de folículos em estágio primordial. A Tabela 1 exibe os percentuais de folículos pré-antrais em fragmentos do grupo controle e grupos cultivados por sete dias nos diversos tratamentos. De uma maneira geral, a porcentagem total de folículos morfológicamente normais foi superior no tratamento com 50 ng/ml de BMP-9 ($P < 0,05$) comparado ao demais tratamentos. A concentração de 200 ng/ml proporcionou a menor ($P < 0,05$) taxa de folículos normais.

Comparando os folículos primordiais, o tratamento com 50 ng/ml de BMP-9 proporcionou melhor viabilidade desta classe que os demais ($P < 0,05$). Adicionando 200 ng/ml de BMP-9 ao meio houve uma significativa redução ($P < 0,05$) na porcentagem de folículos primordiais normais em relação aos outros (a menor viabilidade de primordiais dentre todos tratamentos). Na classe dos folículos de transição o tratamento contendo 200ng/ml de BMP-9 apresentou menor taxa de viabilidade folicular ($P < 0,05$) comparados ao grupo controle fresco e as demais concentrações de BMP-9 testadas. Observando as taxas de folículos primários em relação a viabilidade, o grupo contendo 200 ng/ml de BMP-9 apresentou menor taxa de folículos normais ($P < 0,05$) em comparação ao controle fresco. A classe de folículos secundários apresentou proporções de viabilidade similares ($P > 0,05$) entre os grupos em que estes folículos foram visualizados (Tabela 1).

Tabela 1. Percentagens de folículos normais (primordiais, transição, primários e secundários) em fragmentos não cultivados (controle fresco) e cultivados *in situ* por 7 dias em tratamentos contendo 0 (controle cultivado), 50, 100 ou 200 ng/ml de BMP-9.

Tratamento	Folículos normais (%)				
	Primordial	Transição	Primário	Secundário	Total
Controle fresco	88,5 ^a (1794/2026)	81,1 ^a (133/164)	82,6 ^a (57/69)	-	87,8 ^a (1984/2259)
Controle cultivado	87,5 ^a (1340/1531)	79,6 ^{a, b} (43/54)	83,3 ^{a, b} (5/6)	-	87,2 ^a (1388/1591)
50 ng/ml	91,2 ^b (1721/1886)	81,8 ^a (63/77)	61,7 ^{b, c} (21/34)	66,6 ^a (2/3)	90,3 ^b (1807/2000)
100 ng/ml	88,1 ^a (1429/1621)	83,9 ^a (110/131)	82,7 ^{a, c} (24/29)	100,0 ^a (1/1)	87,7 ^a (1564/1782)
200 ng/ml	83,6 ^c (718/858)	63,6 ^b (28/44)	52,3 ^b (11/21)	40,0 ^a (2/5)	81,7 ^c (759/928)

^{a, b, c}- letras diferentes para a mesma coluna, diferem estatisticamente entre si (P<0,05).

As menores taxas de ativação folicular foram observadas no grupo controle cultivado sem a BMP-9 (0ng/ml), e com adição de 50 ng/ml e 200 ng/ml (P<0,05) (Tabela 2). O tratamento com 100ng/ml da proteína apresentou taxas de ativação semelhantes ao controle fresco (P>0,05).

Tabela 2. Percentagem de folículos normais em fragmentos não cultivados (controle fresco) e cultivados *in situ* por 7 dias em tratamentos contendo 0 (controle cultivado), 50, 100 ou 200 ng/ml de BMP-9.

Tratamento	Ativação folicular (%)	
	Primordial	Em desenvolvimento
Controle fresco	90,4 (1794/1984)	9,5 ^a (190/1984)
Controle cultivado	96,5 (1340/1388)	3,5 ^b (48/1388)
50 ng/ml	95,4 (1721/1807)	4,7 ^{bc} (86/1807)
100 ng/ml	91,3 (1429/1564)	8,6 ^a (135/1564)
200 ng/ml	94,6 (718/ 759)	5,4 ^c (41/759)

^{a,b,c}- letras diferentes para mesma coluna, diferem estatisticamente entre si (P<0,05).

Os diâmetros dos folículos e dos ovócitos das classes foliculares analisadas estão demonstrados (Tabela 3). Verificou-se que o diâmetro dos folículos primordiais dos tratamentos com acréscimo de 200 ng/ml de BMP-9 foi inferior ao controle fresco (P<0,05). Os folículos de transição cultivados com BMP-9 (50, 100 e 200 ng/ml) mostraram diâmetro inferiores ao controle fresco e controle cultivado (P<0,05). Além disso, o diâmetro do controle sem cultivo (0 ng/ml BMP-9) foi inferior a todos os grupos (P<0,05). Na classe de folículos primários todos os grupos cultivados (com 0, 50, 100 e 200 ng/ml) apresentaram diâmetro menor que o controle fresco (P<0,05). Os diâmetros dos ovócitos dos folículos primordiais dos tratamentos com 50 e 200 ng/ml de BMP-9 foram semelhantes entre si (P> 0,05) e o tratamento com 200 ng/ml foi inferior ao controle fresco, controle cultivado e tratamento com adição de 100ng/ml da proteína. (P<0,05). Os ovócitos dos folículos de transição e primários de todos os tratamentos que foram cultivados apresentaram-se menores que o controle fresco (P<0,05). A análise de correlação entre o diâmetro folicular primordial e

a concentração de BMP-9 utilizada no cultivo demonstrou associação negativa ($r = -0,27$) entre o diâmetro dos folículos primordiais e concentração de BMP-9 (Figura 2A).

Tabela 3- Média ($\pm$ epm) dos diâmetros dos folículos e dos ovócitos não cultivados (controle fresco) e cultivados *in situ* por 7 dias em tratamentos contendo 0 (controle cultivado), 50, 100 ou 200 ng/ml de BMP-9.

	Primordial		Transição		Primário	
	Folículo	Ovócito	Folículo	Ovócito	Folículo	Ovócito
Controle fresco	26,8 $\pm$ 0,7 ^a	22,8 $\pm$ 0,4 ^a	36,6 $\pm$ 0,6 ^a	27,9 $\pm$ 0,6 ^a	47,1 $\pm$ 1,6 ^a	37,6 $\pm$ 1,2 ^a
Controle cultivado	26,8 $\pm$ 0,7 ^{a,b}	22,1 $\pm$ 0,8 ^a	30,2 $\pm$ 0,9 ^b	22,6 $\pm$ 0,6 ^b	40,3 $\pm$ 1,8 ^b	29,7 $\pm$ 1,7 ^b
50 ng/ml	25,2 $\pm$ 0,8 ^b	20,2 $\pm$ 0,8 ^{ab}	33,2 $\pm$ 0,9 ^c	25,5 $\pm$ 0,9 ^c	41,4 $\pm$ 1,6 ^b	29,2 $\pm$ 1,1 ^b
100 ng/ml	26,4 $\pm$ 0,5 ^{a,b}	21,6 $\pm$ 0,4 ^a	32,6 $\pm$ 0,8 ^c	25,3 $\pm$ 0,9 ^b	41,2 $\pm$ 1,6 ^b	28,6 $\pm$ 1,1 ^b
200 ng/ml	24,1 $\pm$ 0,6 ^b	20,3 $\pm$ 0,6 ^b	31,8 $\pm$ 0,7 ^c	24,8 $\pm$ 0,9 ^{bc}	38,9 $\pm$ 1,6 ^b	27,5 $\pm$ 1,0 ^b

^{a,b,c}- letras diferentes para mesma coluna, diferem estatisticamente entre si ($P < 0,05$).

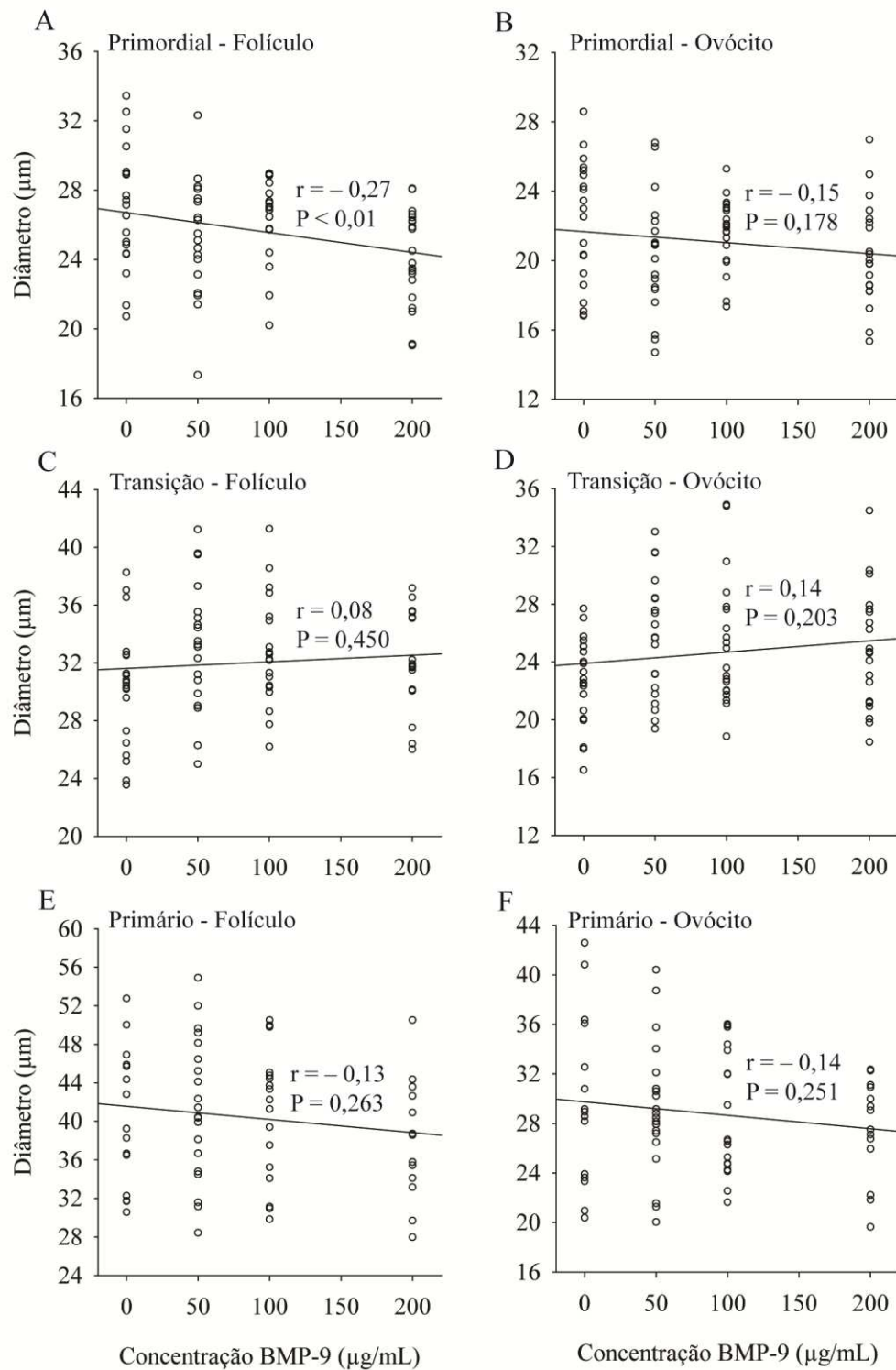


Figura 2. Análise de correlação entre os diâmetros foliculares e ovocitários e a concentração de BMP-9 adicionada ao meio de cultivo.

4 Discussão

Este trabalho é o primeiro a estudar os efeitos da BMP-9 no cultivo *in vitro* de tecido de ovário de fetos bovinos.

Após o cultivo *in situ* de fragmentos de ovários de fetos, a viabilidade folicular foi superior no tratamento acrescido de 50 ng/ml BMP-9. Por outro lado, a maior concentração da proteína (200ng/ml) apresentou a menor taxa de folículos normais. Considerando as classes foliculares, os primordiais apresentaram a mesma condição acima, enquanto os folículos primários tiveram menor taxa de folículos normais com 50 e 200 ng/ml em relação ao controle fresco. Tais fatos sugerem que a BMP-9 pode estar relacionada com melhor conservação e/ou proteção de folículos das classes iniciais. As diferentes concentrações de BMP-9 também podem apresentar efeitos distintos sobre o tecido ovariano, concentrações menores são benéficas para viabilidade folicular, enquanto concentrações altas prejudicam a viabilidade (SCHARPFENECKER et al., 2007; BIDART et al., 2012). Rossi et al. (2016) ao adicionarem a maior concentração de BMP-2 no cultivo de folículos primordiais em relação ao controle, também obtiveram redução de folículos normais, e maior viabilidade quando utilizadas menores concentrações. Blunk et al. (2003) também observaram diferentes efeitos da BMP-9 em cartilagem, de acordo com a dose fornecida. A BMP-15 promoveu proliferação das células da granulosa e estimulou o desenvolvimento dos folículos primordiais, além de manter a viabilidade destes em cabras (CELESTINO et al., 2011). Em ovelhas demonstrou também ser essencial ao desenvolvimento folicular normal, incluindo os estágios inicial e posterior do crescimento (JUENGEL et al., 2002). Em bovinos, Passos et al., (2013) observaram manutenção das taxas de viabilidade de folículos secundários em comparação ao controle utilizando BMP-15. Outras BMPs estudadas também mostraram sua importância ao manter a taxa de folículos normais cultivados comparados a um controle fresco. Nilsson et al. (2003) relataram que ao adicionar a BMP-4 nos seus meios de cultivo, esta desempenhou um

papel importante na sobrevivência de folículos primordiais de ovários de ratas logo após o nascimento, assim como encontrado nos nossos resultados. A BMP-7 na menor concentração após 7 dias de cultivo manteve a taxa de folículos normais em comparação com os outros tratamentos (ARAÚJO et al, 2010b), o que também foi observado com as menores concentrações de BMP-9 no mesmo estudo. Contrariando os resultados apresentados neste estudo, Araújo et al. (2010a) demonstraram que o percentual de folículos morfolologicamente normais cultivados *in situ*, diminuiu significativamente em todos os tratamentos adicionados de BMP-6 quando comparados ao controle. Em estudo posterior, ao cultivar folículos isolados secundários com BMP-6 foi observada a manutenção das taxas de viabilidade desta em comparação ao controle (ARAÚJO et al., 2016), o que sugere que o sistema de cultivo (*in situ* ou isolado) e a classe folicular podem interferir na ação das BMPs sobre a conservação do folículo.

Somente o tratamento com 100 ng/ml de BMP-9 apresentou proporção de folículos ativados semelhante ao controle fresco. A BMP-9 provavelmente preserva os folículos primordiais bloqueando o crescimento folicular, semelhante a ação do AMH (hormônio anti-mulleriano), também pertencente a superfamília do TGF- β . Em bovinos foi observada a mesma inibição pelo AMH em folículos primordiais em fragmentos de fetos cultivados *in situ*, além de diminuir o crescimento de folículos ativados *in vitro* (YANG et al., 2017). Durlinger et al. (1999) confirmaram este fato ao cultivar folículos ovarianos de ratas recém-nascidas com ou sem a presença de AMH, após 2 ou 4 dias, por não verificarem crescimento folicular. Estas substâncias inibitórias da foliculogênese podem também contribuir para serem usadas como agente terapêuticos em tumores ovarianos humanos (DURLINGER et al., 2002) bloqueando o desenvolvimento destes e também podem ser utilizadas para preservar a reserva folicular de algum animal a ser estudado e até mesmo em mulheres. Em revisão, Araújo et al. (2014) constataram que não houve meio de cultura padrão e confiável entre os diferentes

meios comerciais usados no cultivo de folículos pré-antrais bovinos *in vitro*. O efeito da ativação folicular provocado pela ação de uma BMP ainda é controverso. Avaliando o efeito do BMP-7 e BMP-6 na ativação do folículo, essas não afetaram o número de folículos em desenvolvimento (ARAÚJO et al., 2010a; ARAÚJO et al., 2010b).

Os diâmetros dos folículos primordiais nos tratamentos com adição de 50 e 200 ng/ml diminuíram em relação ao controle fresco, e o diâmetro ovocitário com acréscimo de 200 ng/ml foi inferior em relação aos demais tratamentos. Adicionalmente, os folículos de transição e primários em todos tratamentos cultivados mostraram menor diâmetro destas estruturas em relação ao controle fresco. Em adição, uma correlação negativa foi observada entre o diâmetro do folículo primordial e a concentração da BMP-9. Por talvez ter ação mais concentrada na viabilidade de folículos primordiais, esta BMP pode inibir o crescimento das demais classes foliculares. Segundo Bertoldo et al. (2014) o diâmetro do folículo secundário e ovócito pré-antrais de ovelhas foi influenciado positivamente pela adição de BMP- 4. No entanto, não houve efeito de BMP-4 na ativação do folículo primordial de ovinos. De acordo com Rossi et al. (2015) os folículos secundários bovinos isolados cultivados com adição de BMP-4 não apresentaram aumento nos seus diâmetros. Os diâmetros foliculares de fragmentos cultivados *in situ* em meios McCoy e TCM- 199 foram menores em comparação com o controle e α -MEM (JIMENEZ et al., 2016).

Finalmente, os resultados observados neste estudo nos permitem concluir que: 1) A adição de 50 ng de BMP-9 ao meio de cultivo exerceu uma ação benéfica na preservação da viabilidade de folículos primordiais 2) A BMP-9 exerce um efeito inibitório na ativação folicular durante o período de cultivo.

Referências

- ALVES, K.A.; ALVES, B.G.; ROCHA, C.D.; VISONNA, M.; MOHALLEM, R.F.F.; GASTAL, M.O.; JACOMINI, J.O.; BELETTI, M.E.; FIGUEIREDO, J.R.; GAMBARINI, M.L.; GASTAL, E. L. Number and density of equine preantral follicles in different ovarian histological section thicknesses. **Theriogenology**, v.83, n.6, p.1048 – 1055, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.12.004>
- ARAÚJO, V. R.; LIMA-VERDE, I. B.; BÁO, S. N., CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. D. Bone Morphogenetic Protein-6 (BMP-6) induces atresia in goat primordial follicles cultured *in vitro*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 9, p. 770-781, 2010a. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2010000900010>
- ARAÚJO, V. R.; GASTAL, M. O.; FIGUEIREDO, J. R.; GASTAL, E. L. *In vitro* culture of bovine preantral follicles: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.12, p.78, 2014. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-12-78>
- ARAÚJO, V. R.; SILVA, G. M.; DUARTE, A. B. G.; MAGALHÃES-PADILHA, D. M.; ALMEIDA, A. P.; LUNARDI, F. O; SERAFIM, M.K.B.; MOURA, A.A.A.; CAMPELLO, C.C.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J. R. Bone Morphogenetic Protein-6 (BMP-6) Stimulates the Antrum Formation by the Regulation of its Signalling Pathway in Caprine Pre-antral Follicles Cultured *In Vitro*. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, n. 1, p. 59-68, 2016. <https://doi.org/10.1111/rda.12646>
- ARAÚJO, V. R.; SILVA, C. M.; MAGALHÃES, D. M.; SILVA, G. M. D.; BÁO, S. N., SILVA, J. R. V., FIGUEIREDO, J.R., RODRIGUES, A. P. R. Effect of Bone Morphogenetic Protein-7 (BMP-7) on *in vitro* survival of caprine preantral follicles. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 305-310, 2010b. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2010000400004>
- BERTOLDO, M. J.; DUFFARD, N.; BERNARD, J.; FRAPSAUCE, C.; CALAIS, L.; RICO, C.; MERMILLOD, P.; LOCATELLI, Y. Effects of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) supplementation during culture of the sheep ovarian cortex. **Animal Reproduction Science**, v. 149, n. 3, p. 124-134, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.07.010>
- BIDART, M.; RICARD, N.; LEVET, S.; SAMSON, M.; MALLET, C.; DAVID, L.; SUBILEAU, M.; TILLET, E.; FEIGE, J.J.; BAILLY, S. BMP-9 is produced by hepatocytes and circulates mainly in an active mature form complexed to its prodomain. **Cellular and Molecular Life Science**, v. 69, n.2, p. 313-324, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0751-1>
- BLUNK, T.; SIEMINSKI, A.L.; APPEL, B.; CROFT, C.; COURTER, D.L.; CHIEH, J.J.; GOEPFERICH, A.; KHURANA, J.S.; GOOCH, K.J. Bone morphogenetic protein 9: A potent modulator of cartilage development *in vitro*. **Growth Factors**, v.21, n.2, p.71-77, 2003. <https://doi.org/10.1080/0897719031000148822>
- CELESTINO, J.J.H.; LIMA-VERDE, I.B.; BRUNO, J.B.; MATOS, M.H.T.; CHAVES, R.N.; SARAIVA, M.V.A.; SILVA, C.M.; FAUSTINO, L.R.; ROSSETTO, R.; LOPES, C.A.;

DONATO, M.A.; PEIXOTO, C.A.; CAMPELLO, C.C.; SILVA, J.R.; FIGUEIREDO, J.R. Steady state level of bone morphogenetic protein-15 in goat ovaries and its influence on *in vitro* development and survival of preantral follicles. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 338, n. 1, p. 1-9, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.02.007>

DURLINGER, A. L.; KRAMER, P.; KARELS, B.; DE JONG, F. H.; UILENBROEK, J. T. J.; GROOTEGOED, J. A.; THEMMEN, A. P. Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. **Endocrinology**, v. 140, n. 12, p. 5789-5796, 1999. <https://doi.org/10.1210/endo.140.12.7204>

DURLINGER, A. L.; VISSER, J. A.; THEMMEN, A. P. Regulation of ovarian function: the role of anti-Mullerian hormone. **Reproduction**, v. 124, n. 5, p. 601-609, 2002. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1240601>

HERRERA, B.; VAN DINTHER, M.; DIJKE, P.; INMAM, G.J. Autocrine Bone Morphogenetic Protein-9 signals via Activin Receptor Like Kinase-2/Smad1/Smad4 to promote ovarian cancer cell proliferation. **Cancer Research**, v.69, n.24, p. 9254–9262, 2009. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2912>

HOSOYA, T.; OTSUKA, F.; NAKAMURA, E.; TERASAKA, T.; INAGAKI, K.; TSUKAMOTO-YAMAUCHI, N.; HARA, T.; TOMA, K.; KOMATSUBARA, M.; MAKINO, H. Regulatory role of BMP-9 in steroidogenesis by rat ovarian granulosa cells. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v.147, p.85–9, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2014.12.007>

HUANG, E., ZHU, G., JIANG, W., YANG, K., GAO, Y., LUO, Q., *et al.* Growth hormone synergizes with BMP-9 in osteogenic differentiation by activating the JAK/STAT/ IGF1 pathway in murine multilineage cells. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.27, n.7, p. 1566-1575, 2012. <https://doi.org/10.1002/jbmr.1622>

JIMENEZ, C. R.; AZEVEDO, J. L.; SILVEIRA, R. G.; PENITENTE-FILHO, J.; CARRASCAL-TRIANA, E. L.; ZOLINI, A. M.; ARAÚJO, V.R.; TORRES, C. A. A.; GONÇALVES, W.G. Effects of Growth Hormone on *In Situ* Culture of Bovine Preantral Follicles are Dose Dependent. **Reproduction in Domestic Animals**, n.51, v.4, p.575-584, 2016. <https://doi.org/10.1111/rda.12722>

JUENGEL, J. L.; HUDSON, N. L.; HEATH, D. A.; SMITH, P.; READER, K. L.; LAWRENCE, S. B.; O'CONNELL, A.R.; LAITINEN, M.P.E.; CRANFIELD, M.; P.; GROOME, N.P.; RITVOS, O.; MCNATTY, K.P. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. **Biology of reproduction**, v. 67, n. 6, p. 1777-1789, 2002. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.007146>

LI, C., YANG, X., HE, Y., YE, G., LI, X., ZHANG, X., DENG, F. Bone morphogenetic protein-9 induces osteogenic differentiation of rat dental follicle stem cells in P38 and ERK1/2 MAPK dependent manner. **International journal of medical sciences**, v. 9, n. 10, p. 862, 2012. <https://doi.org/10.7150/ijms.5027>

NILSSON, E.E.; SKINNER, M.K. Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 4, p. 1265-1272, 2003. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.018671>

PASSOS, M.J.; VASCONCELOS, G.L.; SILVA, A.W.; BRITO, I.R.; SARAIVA, M.V.; MAGALHÃES, D.M.; *et al.* Accelerated growth of bovine preantral follicles *in vitro* after stimulation with both FSH and BMP-15 is accompanied by ultrastructural changes and increased atresia. **Theriogenology**, v. 79, p. 1269-1277, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.02.023>

REXROAD, C.E.; CASIDA, L.E.; TYLER, W.J.M. Crown-rump length of fetuses in purebred Holstein-Friesian cows. **Journal of dairy science**, v.57, p.346-347, 1974. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(74\)84891-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(74)84891-5)

ROSSI, R. O.; DA CUNHA, E. V.; PORTELA, A. M.; PASSOS, J. R.; COSTA, J. J.; SILVA, A. W.; SARAIVA, M.V.; PEIXOTO, C.A.; DONATO, M.A.; VAN DER HURK, R.; SILVA, J. R. Influence of BMP-2 on early follicular development and mRNA expression of oocyte specific genes in bovine preantral follicles cultured in vitro. **Histology and histopathology**, v. 31, n. 3, p. 339-348, 2016.

ROSSI, R. O. D. S.; PORTELA, A. M. L. R.; PASSOS, J. R. S.; CUNHA, E. V.; SILVA, A. W. B.; COSTA, J. J. N.; SARAIVA, M.V.A.; DONATO, M.A.M.; PEIXOTO, C.A.; VAN DER HURK, J.R.V.; SILVA, J.R.V. Effects of BMP-4 and FSH on growth, morphology and mRNA expression of oocyte-secreted factors in cultured bovine secondary follicles. **Animal Reproduction**, v. 12, n. 4, p. 910-919, 2015.

SCHARPFENECKER, M., VAN DINTHER, M., LIU, Z., VAN BEZOOIJEN, R.L., ZHAO, Q., PUKAC, L., LOO WIK, C.W., AND TEN DIJKE, P. BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. **Journal of Cell Science**, v.120, n.6, p.964-972, 2007. <https://doi.org/10.1242/jcs.002949>

SHIMASAKI, S.; MOORE, R. K.; OTSUKA, F.; ERICKSON, G. F. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. **Endocrine reviews**, v. 25, n. 1, p. 72-101, 2004. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0007>

YANG, M.Y., FORTUNE, J.E. Vascular endothelial growth factor stimulates the primary to secondary follicle transition in bovine follicles *in vitro*. **Molecular reproduction and development**, v. 74, n. 9, p. 1095-1104, 2017. <https://doi.org/10.1002/mrd.20633>