

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA ANIMAL

**AVALIAÇÃO DE FATORES ENVOLVIDOS NA FOLICULOGÊNESE DE
BÚFALAS COM A UTILIZAÇÃO DE PRIMERS DELINEADOS PARA
BOVINOS**

EDJALMA RODRIGUES DA SILVA-JUNIOR

BOTUCATU-SP
Outubro/2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA VETERINÁRIA E REPRODUÇÃO ANIMAL

**AVALIAÇÃO DE FATORES ENVOLVIDOS NA
FOLICULOGÊNESE DE BÚFALAS COM A UTILIZAÇÃO
DE PRIMERS DELINEADOS PARA BOVINOS**

EDJALMA RODRIGUES DA SILVA-JUNIOR

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP, Campus de Botucatu-SP, para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia Animal, Área de Reprodução Animal

Orientador: Prof. Dra. Eunice Oba

BOTUCATU-SP

Outubro/2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Silva-Junior, Edjalma Rodrigues da.

Avaliação de fatores envolvidos na foliculogênese de búfalas com a utilização de primers delineados para bovinos / Edjalma Rodrigues da Silva-Junior. - Botucatu, 2021

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Eunice Oba

Capes: 50504002

1. Substancias de crescimento. 2. Fator de crescimento epidérmico. 3. Fator 2 de crescimento de fibroblastos. 4. Ovário. 5. Bovino.

Palavras-chave: EGF; FGF2; FSHR; IGF; Ovário.

Nome do autor: Edjalma Rodrigues da Silva-Junior

Título: AVALIAÇÃO DE FATORES ENVOLVIDOS NA FOLICULOGÊNESE DE BÚFALAS COM A UTILIZAÇÃO DE PRIMER DELINEADOS PARA BOVINOS

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dra. Eunice Oba

Presidente e orientadora

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal – FMVZ, UNESP
Botucatu-SP

Prof.^a. Dra. Maria Denise Lopes

Membro

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal – FMVZ, UNESP
Botucatu-SP

Prof.^a. Dra. Maria Inês Lenz Souza

Membro

Instituto de Biociências / Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS,
Campo Grande-MS

Prof.^a. Dra. Paula Fernanda de Lima

Membro

Faculdade de Ciências Sociais e Agrárias de Itapeva – FAIT, Itapeva-SP

Prof.^a. Dra. Priscilla do Nascimento Guasti

Membro

Sociedade Cultural e Educacional de Garça – Faculdade de Ensino Superior e
Formação Integral – FAEF, Garça-SP

Data da Defesa: 06 de Outubro de 2021.

Tutto è bene quel che finisce bene

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a DEUS, que esteve presente em todos os momentos de nossas vidas, que proporcionou mais uma vitória e nos manteve seguros nessa grande aventura, chamada vida. Que nos apoia, suporta e fortalece nos momentos mais conturbados... Sem ELE, nada disso seria possível...

Inegavelmente, o trabalho do pós-graduando não é somente submeter-se a aventura da pesquisa, ensino e extensão universitária. Essa é a fração do trabalho mais fácil a ser executada dentro da nossa responsabilidade.

Desapegar-se do seu programa de pós-graduação, sem dúvida será a tarefa mais árdua que nos é determinada. Nos últimos anos, fomos pisoteados e aniquilados por todos os lados, tanto pelas instituições de fomento à pesquisa, quanto pelo próprios líderes do nosso país. Mesmo assim... O programa de pós-graduação permanece firme, porém... até quando?

Seria injusto de minha parte não agradecer a todos que fizeram e fazem o dia a dia mais feliz dentro da Universidade. Sim, “Universidade” no geral, pois são muitas em nosso país que ainda sucumbem ao amargor dos poucos recursos, falta de valorização e créditos aos docentes...

Logo, meu primeiro agradecimento será aos docentes que fizeram de mim o professor e futuro pesquisador que serei. Em especial, agradeço aos docentes de minha egressa escola, a Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), a qual me abriu os horizontes na pesquisa científica, apadrinhado pelos professores:

Carmem Estefânia Serra Neto Zúccari – minha eterna orientadora da iniciação científica, amiga e motivadora das principais aventuras científicas que vivi e viverei;

Maria Inês Lenz Souza – exemplo de professora e pessoa a qual proporcionou o primeiro contato com a Reprodução Animal no ano de 2009;

Juliana Arena Galhardo – com seu jeito peculiar de ensinar, proporcionou momentos inegáveis de aprendizado e empatia com os alunos e orientados;

Breno Fernandes Barreto Sampaio – companheiro de ensinamentos e amigo, o qual proporcionou o conhecimento além da Reprodução Animal e terapia complementar Chinesa.

Daniela Brandão Nunes – a quem me ensinou grande parte do conhecimento a campo, e que desafiou meus conhecimentos sobre a

reprodução animal, sendo enorme incentivadora e hoje amiga presente nas horas boas e ruins.

Aos demais professores da UFMS, que por motivo de esquecimento, não foram citados, mas que carrego um pedacinho dos senhores, do lado esquerdo do peito. Agradeço-lhes.

Não obstante e no patamar acima, os familiares que representaram toda a articulação da personalidade, modulação do caráter e me fizeram ser peculiar a minha maneira. Aos meus pais, Edjalma Silva e Shirley Ibrahim que, com pulso firme, disciplina e horas de estudos me incentivaram e desafiaram nessa empreitada do ensino. À minha irmã, Julie Gabrielle, que optou pela Medicina Veterinária antes de mim mostrando o quão bonita e rentável a carreira pode se tornar. Agradeço-lhes.

Em especial, a amiga, companheira inseparável Suzane Brochine, que nos momentos conturbados de pandemia, foi o meu porto seguro e motivadora para o delineamento experimental, execução e escrita... sendo a minha inspiração diária. Agradeço-lhe.

Aos animais, que são a razão do estudar do Médico Veterinário, com sua benevolência, paciência e pureza de viver. Em especial aos meus pets...

Profissionalmente, não posso negar que fui recebido de braços abertos, por uma das instituições que mais contribuíram para o meu crescimento. A Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, minha segunda casa... Que me fez crescer, pesquisar, amadurecer no pensamento crítico, filosófico, matemático e experimental. Orgulho-me de poder ter feito parte de 1% da sua história... acredito que depois de quase oito anos... posso ter a ousadia de chamar de “casa”.

Com esse mesmo pensamento, agradeço aos meus orientadores na pós-graduação Prof. Frederico Ozanam Papa (residência e mestrado) e Profa. Eunice Oba (doutorado), que tiveram paciência durante meu ensino, mesmo com esse “jeito peculiar”. Agradeço-lhes.

Não poderia deixar de citar a “velha guarda” do Dpto. De Reprodução Animal e hoje professores do ensino superior: Gabriel Augusto Monteiro, Yamê Fabres Robaina Sancler Silva, Priscilla do Nascimento Guasti, Camila de Paula Freitas Dell’Aqua e José Antônio Dell’Aqua Jr, os quais foram minha referência

desde 2013, exemplos a serem seguidos e, que aos poucos foram tornando-se amigos na querida cidade botucatuense.

Aos amigos, também unespianos, que fizeram-se presentes durante a pós-graduação: Thaisy Dellaqua, Ludmilla Zoccal, Lucas Monteiro, Stella Tironi, Beatriz Lippe, Alessandra Gomes, Andreza e tantos outros que passaram e fizeram parte da história dessa nossa pequena vida acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES), pela concessão da Bolsa de Estudos. Ao programa de Pós-Graduação de Biotecnologia Animal e todos seus funcionários que sempre foram muito solícitos em todos os atendimentos. Agradeço-lhes.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001".

Se, por ventura, alguém for esquecido... peço-lhe desculpas e sinta-se agradecido.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	13
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1. Ovários	16
2.2. Foliculogênese durante a embriogênese	17
2.2.1. Folículos primordiais e primários	20
2.2.2. Folículos secundários	21
2.3. Foliculogênese durante a puberdade	22
2.4. Fatores de crescimento no parênquima ovariano	24
2.6. Foliculogênese e apoptose ovariana	29
2.7. Utilização de PCR na avaliação da foliculogênese	30
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
5. HIPÓTESES	41
6. OBJETIVOS	41
CAPÍTULO 2	42

RESUMO

SILVA-JUNIOR, E.R. **AVALIAÇÃO DE FATORES ENVOLVIDOS NA FOLICULOGÊNESE DE BÚFALAS COM A UTILIZAÇÃO DE PRIMERS DELINEADOS PARA BOVINOS.** Botucatu-SP. 2021, p.47-. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

O conhecimento da fisiologia ovariana é importante durante a aplicação de biotécnicas assistidas de reprodução, tanto animal quanto humana. Durante a foliculogênese, os folículos apresentam aumento em número e diferenciação morfológica das células que circundam o oócito e, com a progressão do desenvolvimento, se tornam unidades funcionais no parênquima ovariano. Esses folículos podem ser considerados como *pool* de reserva e, na dependência do estímulo, podem permanecer quiescentes, sofrerem atresia ou chegar até a ovulação. Durante esse desenvolvimento, podemos ter a presença de fatores de crescimento produzidos no parênquima ovariano, que são modulados pela presença dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH). Além disso, o FSH e o LH também apresentam ação direta durante todo o curso da foliculogênese. Dentre os fatores de crescimento mais comuns, podemos citar o fibroblástico (FGF), insulínico (IGF), epidermal (EGF) e seus respectivos receptores que atuam na diferenciação e progressão do desenvolvimento folicular, desde as fases iniciais até a ovulação. Sendo assim, os objetivos do presente trabalho foram revisar a regulação parácrina dos fatores de crescimento durante a foliculogênese, atresia folicular, descrever e quantificar a expressão gênica desses fatores (FGF2, IGF1 e EGF), seus receptores (FSHR, FGFR2C e FGFR3C) e agentes envolvidos na apoptose (CASP3) presentes no ovário de búfalas vazias e gestantes. Em abatedouros, coletaram-se ovários de búfalas vazias (n=12) e gestantes (n=12), que se encontravam no terço final da gestação. Para a padronização das amostras, todas as búfalas vazias se encontravam cíclicas, com a presença de folículos em desenvolvimento e corpo lúteo evidente no parênquima. As amostras foram encaminhadas ao laboratório em tempo máximo de uma hora após a coleta. Todos os ovários foram dissecados, os folículos antrais aspirados e as amostras de tecido ovariano coletadas e armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C) para posterior análise. No laboratório, foram utilizados *primers* delineados para bovinos na utilização do RT-qPCR na quantificação gênica das amostras. Após a padronização técnica, normalização das amostras e transformações dos valores em bases logarítmicas foi realizado a quantificação por RT-qPCR das amostras dos ovários de búfalas. Foram consideradas com diferença estatística, as amostras que apresentaram significância em 5% no pós-teste de Wilcoxon. Todos os *primers* foram expressos no RT-qPCR, entretanto, apenas o FSHR apresentou diferença significativa entre os grupos experimentais. O FSH atua na estimulação e regulação dos fatores parácrinos na regulação da foliculogênese, uma vez que houve variação da expressão de seu receptor (FSHR) entre os grupos experimentais. No grupo experimental de búfalas vazias, houve oscilação na expressão do FSHR decorrente das diferentes fases do ciclo estral que as fêmeas se encontravam, pois a modulação da secreção de esteroides pode afetar o desenvolvimento e progressão do desenvolvimento folicular. A presença do receptor FSHR no parênquima ovariano é um dos pontos iniciais para o início da foliculogênese e progressão do seu desenvolvimento, através da modulação

de outros fatores de crescimento. Já nas búfalas gestantes, não houve essa variação, decorrente da atuação hormonal da progesterona. Sendo assim, conclui-se que houve expressão gênica dos fatores de crescimento testados estão presentes no tecido ovariano e são responsáveis pela modulação e progressão da foliculogênese em búfalas gestantes e vazias. Não foi possível visualizar a diferença na expressão do fator apoptótico pesquisado (CASP3) entre os grupos experimentais e, em adição, é viável a utilização de primers desenhados para bovinos na pesquisa de fatores de crescimento em ovário de búfalas.

Palavras-chave: EGF, FGF2, FSHR, IGF, ovário, PCR

ABSTRACT

SILVA-JUNIOR, E.R. EVALUATION OF FACTORS INVOLVED IN THE FOLLICULOGENESIS OF BUFFALOES USING PRIMERS DESIGNED FOR CATTLE. Botucatu-SP. 2021, p.47. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Knowledge of ovarian physiology is important when applying assisted reproductive biotechniques, both animal and human. During folliculogenesis, the follicles show an increase in number and morphological differentiation of the cells that surround the oocyte and, with the progression of development, they become functional units in the ovarian parenchyma. These follicles can be considered as a reserve pool and, depending on the stimulus, can remain quiescent, suffer atresia or reach ovulation. During this development, we may have the presence of growth factors produced in the ovarian parenchyma, which are modulated by the presence of follicle-stimulating (FSH) and luteinizing (LH) hormones. Furthermore, FSH and LH also have a direct action throughout the course of folliculogenesis. Among the most common growth factors, we can mention fibroblastic (FGF), insulin (IGF), epidermal (EGF) and their respective receptors that act in the differentiation and progression of follicular development, from the initial stages to ovulation. Therefore, the objectives of this study were to review the paracrine regulation of growth factors during folliculogenesis, follicular atresia, describe and quantify the gene expression of these factors (FGF2, IGF1 and EGF), their receptors (FSHR, FGFR2C and FGFR3C) and agents involved in apoptosis (CASP3) present in the ovary of empty and pregnant buffaloes. In abattoirs, ovaries from empty buffaloes (n=12) and pregnant women (n=12), which were in the final third of gestation, were collected. For sample standardization, all empty buffaloes were cyclic, with the presence of developing follicles and corpus luteum evident in the parenchyma. The samples were sent to the laboratory within a maximum of one hour after collection. All ovaries were dissected, antral follicles aspirated and ovarian tissue samples collected and stored in liquid nitrogen (-196°C) for further analysis. In the laboratory, primers designed for cattle were used in the use of RT-qPCR for gene quantification of the samples. After technical standardization, normalization of samples and transformation of values into logarithmic bases, quantification by RT-qPCR of samples from buffalo ovaries was performed. The samples that presented significance in 5% in the Wilcoxon post-test were considered with statistical difference. All primers were expressed in RT-qPCR, however, only FSHR showed a significant difference between experimental groups. FSH acts in the stimulation and regulation of paracrine factors in the regulation of folliculogenesis, since there was variation in its receptor (FSHR) expression between the experimental groups. In the experimental group of empty buffaloes, there was an oscillation in the expression of the FSHR due to the different phases of the estrous cycle that the females were in, as the modulation of steroid secretion can affect the development and progression of follicular development. The presence of the FSHR receptor in the ovarian parenchyma is one of the starting points for the beginning of folliculogenesis and progression of its development, through the modulation of other growth factors. In pregnant buffaloes, however, there was no such variation, due to the hormonal action of progesterone. Thus, it is concluded that there was gene expression of the growth factors tested are present in ovarian

tissue and are responsible for the modulation and progression of folliculogenesis in pregnant and empty buffaloes. It was not possible to visualize the difference in the expression of the investigated apoptotic factor (CASP3) between the experimental groups and, in addition, it is feasible to use primers designed for cattle in the research of growth factors in buffalo ovary.

Key-words: EGF, FGF2, FSHR, IGF, ovary, PCR

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A bubalinocultura vem apresentando destaque comercial no aumento da produção e número absoluto de animais, podendo ser explorada a produção de carne e leite. Entretanto, as biotecnologias reprodutivas aplicadas a essa espécie, ainda não estão bem fundamentadas e, muitas vezes, são aplicadas técnicas utilizadas em bovinos, sem conhecimento prévio das particularidades de sua fisiologia.

Dentre essas peculiaridades reprodutivas da búfala, podemos citar o menor tamanho dos ovários, baixa reserva gonadal, e variação entre os ciclos estrais em relações às fêmeas bovinas. Tais características fisiológicas podem ser responsáveis pelos baixos índices reprodutivos inerentes à espécie (1). Ainda como adição a essas peculiaridades, as búfalas apresentam a influência da estacionalidade reprodutiva, marcada pelos ciclos estrais regulares nos períodos de menor luminosidade ao longo do ano, mais evidentes em regiões que se afastam da linha do equador (2,3).

Já nas fêmeas bovinas submetidas a aspiração folicular, seguida pela maturação oocitária, fertilização *in vitro* e a transferência de embrião, são biotecnologias que estão consolidadas e possuem índices reprodutivos satisfatórios. Entretanto, para a espécie bubalina, há alterações anatômicas e fisiológicas que tornam a técnica mais laboriosa, diminuindo a obtenção de óocitos recuperados pela aspiração folicular, quando comparado aos bovinos (4).

Uma alternativa para a obtenção de um maior número de oócitos para a produção *in vitro* de embriões bubalinos é o isolamento e cultivo de folículos pré-antrais. Essa biotécnica permite que sejam obtidos oócitos proveniente de abatedouros e seu cultivo até a fertilização, aumentando o potencial comercial da técnica de transferência de embriões em búfalas.

Além disso, os folículos pré-antrais constituem o *pool* de reserva das fêmeas mamíferas, que podem se desenvolver até folículo ovulatório, ou sofrer atresia, na dependência do tipo de estímulo recebido. Ainda hoje, as pesquisas são realizadas com o objetivo de esclarecer o funcionamento e os mecanismos de controle da regulação da fisiologia ovariana. Dentre estes fatores que atuam no ovário, a expressão de receptores e fatores de crescimento, influenciam na

ativação, manutenção e seleção dos folículos pré-antrais durante as ondas de recrutamento e seleção.

Sendo assim, a compreensão dos fatores envolvidos na fisiologia ovariana podem esclarecer os eventos que ocorrem no início da foliculogênese nas fêmeas, auxiliando no momento da aplicação de biotécnicas de reprodução assistida, não só em animais domésticos de interesse reprodutivo, mas em animais ameaçados de extinção, na espécie humana buscando melhores meios de maturação, fertilização e cultivo de oócitos e embriões.

Entretanto, para melhorar a qualidade dos meios (5) utilizados em laboratórios de cultivo celular, a produção dos mesmos deve manter características semelhantes ao líquido folicular fisiológico. Com isso, os meios se tornariam mais próximos aos sintetizados pelos ovários e individualizados por espécie.

Dessa forma, a investigação de fatores de crescimento que atuam no parênquima ovariano através de metodologias de biologia molecular, metabolômica e proteômica, podem esclarecer as intimas relações moleculares no desenvolvimento folicular. Como ferramenta complementar, o desenvolvimento de sequências gênicas (também conhecido como *primer*) de fatores de crescimento que podem atuar no parênquima e folículo ovariano trazem informações sobre o funcionamento dessas relações. Assim, o delineamento e desenho de um *primer* pode influenciar na pesquisa de determinado fator de crescimento no tecido ou célula-alvo.

Dessa maneira, os objetivos dessa revisão são discorrer sobre os fatores de crescimento envolvidos no desenvolvimento de folículos pré-antrais e caracterizar a expressão gênica desses fatores envolvidos na dinâmica de crescimento folicular de ovários fetais, búfalas gestantes e não-gestantes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ovários

Os ovários são os órgãos responsáveis pela produção hormonal e da unidade estrutural denominada de folículos, que são compostos pelo oócito, células da granulosa e da teca. O parênquima pode ser dividido anatomicamente em córtex (externo) e medula (interno), envolto totalmente por epitélio germinativo, que é constituído por uma camada de células cúbicas, em sua maioria. Logo abaixo do epitélio germinativo, há a túnica albugínea, seguida pelo estroma (ou parênquima) ovariano. Por sua vez, os folículos ovarianos são as unidades estruturais, os quais dependem da relação hormonal para o início e progressão de seu desenvolvimento ao longo de toda a foliculogênese, que ocorre exclusivamente no ovário (6).

O desenvolvimento dos folículos ocorre no parênquima ovariano e, histologicamente é composto por fibroblastos e tecido conjuntivo, que apresentam comunicações celulares íntimas entre si (6,7). Após a diferenciação gonadal fetal (8), as oogônias se diferenciarão em folículos primordiais, primários, secundários e terciários.

Além disso, a sua classificação pode estabelecer dois padrões clássicos, em folículos pré-antrais (FOPA) e folículos antrais (FPA). Complementando, os folículos pré-antrais podem ser nomeados com relação a quantidade de células que circundam o núcleo do oócito em três subdivisões: primordiais, primários e secundários iniciais (6,7). Já os folículos antrais, são aqueles que apresentam a presença de cavidade (ou antro) com líquido folicular nos estágios secundário final, terciário (folículos de Graaf) e pré-ovulatório (6,9).

Morfologicamente, os folículos primordiais apresentam apenas uma camada e poucas células pavimentosas (células da granulosa) circundando o oócito, com a unidade folicular ainda pequena. Com a progressão do desenvolvimento da foliculogênese, o oócito aumenta em diâmetro, assim como a quantidade de células da granulosa (CG). Nessa etapa, as CG já apresentam morfologia cuboide e maior quantidade, assim como aumento no diâmetro do núcleo do oócito, sendo denominados de folículos primários. Assim, com o aumento da quantidade de CG cuboidais em mais de uma camada, aumento do

diâmetro do núcleo do oócito, o folículo já passa a ser classificado como secundário (10,11).

Com o aumento da estimulação hormonal sistêmica, mecanismos de feedback, comunicação celular justácrina e parácrina, há aumento da quantidade de líquido circundando o oócito dos folículos secundários (12,13), e toda a unidade estrutural evolui e denomina-se como folículo terciário (ou folículo de Graaf), que são classificados funcionalmente como folículos antrais iniciais, em desenvolvimento ou pré-ovulatórios (14), os quais apresentam potencial fertilizante (15).

Após o completo desenvolvimento folicular e maturação oocitária, os mesmos podem ser utilizados na geração de novos indivíduos, sejam pelas vias naturais (monta natural) ou artificiais, como a inseminação artificial (IA) (16), inseminação artificial em tempo-fixo (IATF) (17,18), produção *in vitro* de embriões (PIVE) (1), clonagem (19,20) e injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) (21).

Entretanto, todo o desenvolvimento folicular depende de fatores de crescimento (22–24), que podem ser estimulados pelas gonadotrofinas (25), hormônios ovarianos e estímulos de comunicação secundária mediada por receptores (26).

Os fatores de crescimento tem atuação na modulação da replicação celular (27), ativação do metabolismo oocitário (27,28), e aumento de mitoses das células da granulosa e teca (29). Complementando, ainda temos a dependência da quantidade de folículos (30) que podem ser determinados geneticamente durante a migração de células embrionárias do saco vitelínico até a região da crista gonadal do feto (31). Essa migração promoverá o desenvolvimento da gônada indiferenciada e posteriormente a quantidade de folículos que a fêmea apresentará como *pool* de reserva até a sua ativação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, que ocorre durante puberdade (32).

2.2. Foliculogênese durante a embriogênese

A diferenciação da gônada fetal ocorre na presença ou ausência do fator determinante testicular (TDF – *Testis Determining Factor*), presente no cromossomo Y, carregado pelo seu respectivo espermatozoide, durante a

fertilização (9). No caso do desenvolvimento do indivíduo do sexo feminino, há ausência do TDF e do hormônio anti-Mülleriano (AMH – *Anti-Müllerian hormone*, sintetizado pelas células de Sertoli) (33). Assim, há migração das células do saco vitelínico para a região da crista gonadal e formação da matriz ovariana (também conhecida como *rete ovarii*) (31). Além disso, a ação dos genes presentes no braço curto do cromossomo SRY (*sex determining region of Chromosome Y*, responsável pela síntese de TDF) (34) e sua ação em conjunto com os genes SOX9, WNT4, RSPO1, FOXL2 possibilitaram uma nova interpretação da diferenciação ovariana em um metabolismo ativo e, não somente a ausência de fatores para a sua diferenciação (8,31).

Ainda em complemento, a diferenciação da gônada feminina no período embrionário depende da ação do gene DAX1, que atua na regulação do AMH produzido pelas primordiais das CG (35) e modulam a ação da enzima P450 aromatase (36), promovendo seus efeitos nos futuros tipos celulares presentes no folículo

O desenvolvimento e progressão da migração das células embrionárias do saco vitelínico determinarão a quantidade de oogônias (37) e, futuramente poderão determinar a quantidade de oócitos em estágios iniciais do desenvolvimento, até o retorno da sua atividade no início da puberdade (31).

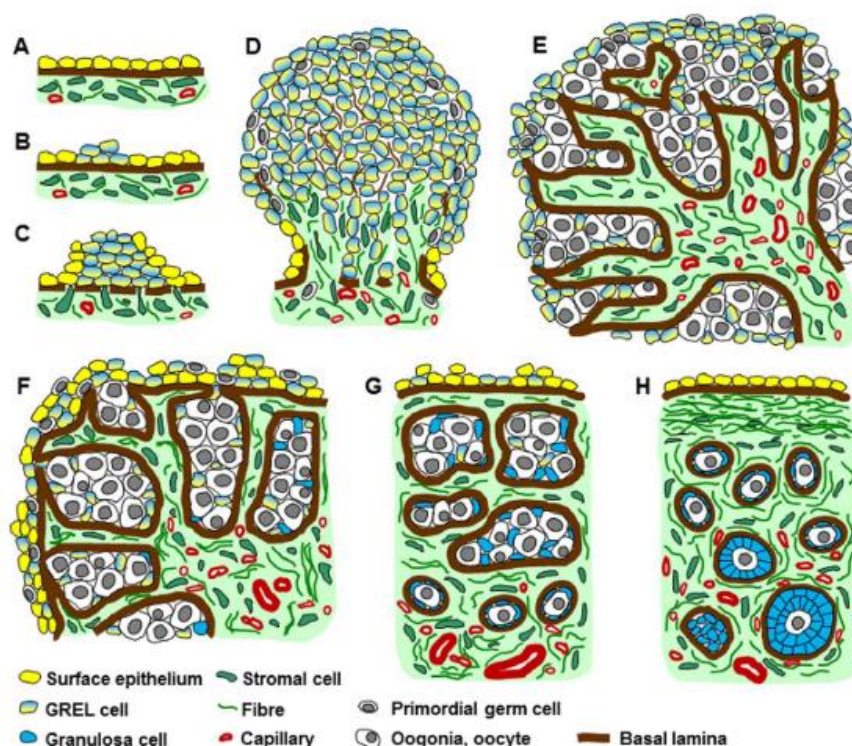


Figura 1. Diagrama esquemático do desenvolvimento ovariano na embriogênese (31)

A estruturação do ovário depende da migração de células que se localizam no epitélio superficial para a futura medula do ovário (38), assim como as demais estruturas também dependem da diferenciação de vários tipos celulares originados do mesonévro e dos cordões de células germinativas (31,38).

Essa migração celular está associada com a ativação e regulação de genes que induzem a diferenciação e proliferação celular durante o desenvolvimento fetal do ovário (39). Entretanto, nem sempre os genes responsáveis pela foliculogênese fetal estão presentes na vida pós-fetal e adulta (39,40).

Durante a modulação gênica e diferenciação celular, há a produção de fatores de crescimento que promovem a proliferação e diferenciação celular que podem induzir a esteroidogênese fetal (41). Entretanto, há diferença na expressão desses fatores durante o estágio de desenvolvimento do ovário fetal (29).

Fisiologicamente, já foi observada a presença da família dos fatores de crescimento fibroblástico (FGF – *Fibroblastic growth factor*), sendo os principais

o FGF-2, CYP19A1, FGF-8 (29) que são mais evidentes aos 60 dias; FGF-18 e FGF-10 evidentes aos 90 dias de desenvolvimento fetal (42).

Assim, a diferenciação celular ovariana é multifatorial, em que os fatores de crescimento (29,41), a modulação gênica (43–45) e proteica (46) também participam do desenvolvimento e migração das células embrionárias para a região da crista gonadal.

Essas características são importantes, pois há fatores epigenéticos (47) que estão envolvidos na metilação do DNA (48), que podem atuar nessa regulação. Da mesma forma, quando a fêmea gestante sofre com estresse (49) ou apresenta enfermidades (50), a modulação e número absoluto de futuras oogônias, assim como o desenvolvimento embrionário poderão ser afetados (51).

Em adição, quando há manipulação do ciclo estral e tratamentos medicamentosos, podemos incluir essa relação epigenética na qualidade e fertilidade da prole (52). Em humanos, ratas e em animais domésticos, há uma relação entre a evidencia de distúrbios gonadais na prole de gestoras que apresentaram distúrbios ovarianos (53).

Dessa maneira, a manipulação e reprogramação de clones em busca da produção de animais superiores também podem ser comprometidas, uma vez que as alterações secundárias e a metilação do DNA podem ser perceptíveis através de experimentação para verificar os efeitos das alterações epigenéticas (54).

Essa íntima relação multifatorial não ocorre somente na vida fetal ovariana, podendo se estender até a vida adulta; passando por fases do desenvolvimento considerados crítico para início da foliculogênese (55).

2.2.1. Folículos primordiais e primários

Após a migração das futuras oogônias para a região da crista gonadal, ainda na vida fetal, há reorganização das células ao redor da oogônia que varia de acordo com a espécie e idade gestacional. Pode-se observar a presença de folículos primordiais entre 60 e 75 dias de gestação no bovino (11,29,56) e aos 90 dias no búfalo (10,57).

Inicialmente, a oogônia está presente no futuro parênquima ovariano, de maneira desorganizada e em cordões, com o oócito em estágio primário de desenvolvimento, com algumas células somáticas ao seu redor. Observa-se também, a presença de oôgonias degeneradas ou em degeneração (CARVALHO, 2005). Em búfalos, podemos observar essa morfologia de oôgonias e ovócitos primários no primeiro terço da gestação no desenvolvimento do ovário fetal (CARVALHO, 2005).

Com o avanço do desenvolvimento da gestação e desenvolvimento do ovário fetal, seu parênquima já apresenta outros tipos de padrões celulares (fibroblastos, epitélio germinativo e uma fina camada de CG ao redor do oócito I). Essa organização estrutural já pode ser visualizada no período médio de gestação de búfalas (6 meses), com a presença de folículos primordiais e primários (CARVALHO, 2005). Com essa nova organização tecidual do ovário fetal (31,38), há ativação de genes que modulam a síntese de colágeno para manter a estruturação do ovário fetal, principalmente no terço final da gestação (58).

Histologicamente, os folículos primordiais e primários se diferenciam pelo formato das células da granulosa, que são pavimentosas e cuboides, respectivamente. No início do desenvolvimento do ovário fetal, são pequenos e com diâmetro reduzido, que vão aumentando em tamanho, quantidade e números de CG (11,59).

2.2.2. Folículos secundários

Como os folículos ovarianos fetais continuam seu desenvolvimento, com o avanço da gestação, podemos observar o aumento no número de camadas das CG ao redor do oócito. Essa progressão do desenvolvimento se inicia aos 90 dias de gestação (59) e se dá no terço final da gestação (CARVALHO, 2005).

Com esse avanço no desenvolvimento, podemos observar uma redução numérica dos folículos primordiais e primários, consequência da sua evolução em folículos secundários (29,59). Em adição, podemos observar o aumento considerável das CG em várias camadas e o início da organização e surgimento das células da teca (6,9,59).

À partir desse estágio do desenvolvimento, as CG estarão em comunicação celular com as células da teca e o oócito para a progressão do desenvolvimento e reativação do metabolismo oocitário (que ocorre na puberdade), resultando em aumento das suas secreções e presença de líquido entre as células formando uma cavidade (ou antro), inicialmente denominados de folículos secundários iniciais (10,11,56,59). Então, os folículos já são classificados como antrais e podem ser visualizados nos ovários fetais, no terço final da gestação, porém ainda quiescentes (CARVALHO, 2005).

Os folículos secundários permanecem em quiescência até a puberdade. Com a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal durante a fase púbere, há estimulação hormonal em alça longa e curta, para a progressão da maturação oocitária e do folículo secundário em terciário e pré-ovulatório (6,9)

2.3. Foliculogênese durante a puberdade

Após o completo desenvolvimento do ovário fetal, a progressão meiótica do oócito bloqueada na fase de diplóteno da prófase I da meiose I, até o seu reinício do desenvolvimento durante a puberdade, terminando com a quebra da vesícula germinativa (VG) próximo à ovulação (60).

Para que haja o reinício da atividade oocitária e término do seu desenvolvimento para a ovulação, o oócito necessita de fatores de crescimento (32) que são ativados quando há interação do eixo hipotalâmico hipofisário gonadal.

Dessa forma, como consequência à ativação do eixo, onde a produção FSH e LH pela hipófise, estrógeno e progesterona pelos ovários, haverá aumento sérico dos hormônios citados e mecanismo de feedback, com a produção dos seus efeitos em cascata (61), para a retomada da meiose e continuação da foliculogênese.

Não somente o estrógeno (62) atua nessa modulação, mas a progesterona (61) e os fatores de crescimento intraovarianos (FGF, IGF, EGF, KL e AMH) de ação parácrina, intrácrina e autócrina promovem a retomada do desenvolvimento oocitário (32). Sendo assim, os mecanismos que envolvem a ativação do metabolismo para a transcrição de proteínas que atuam no

desenvolvimento ovariano e corpóreo (63) no momento da passagem para vida adulta (64,65).

Em complemento, as funcionalidades reprodutivas estão em sinergismo com o desenvolvimento corporal do animal (66), e o aumento da secreção do hormônio de crescimento (GH – *Growth hormone*) também atuam nesses mecanismos cíclicos no início da puberdade (61,64–66), e em menor quantidade, na foliculogênese no animal adulto.

Assim, a puberdade se inicia com o aumento da secreção do GH, juntamente com a ativação da leptina (63), responsável por promover atividades ovarianas parácrinas (32), com hormônios sintetizados no parênquima ovariano e nas células foliculares (CG e teca). Atuando dessa maneira, haverá a produção de estrógenos pelas células da granulosa (62), secundário ao estímulo que os fatores de crescimento parácrinos (FGF2, IGF1 e EGF) proporcionarão às mesmas.

Além disso, o GH (62) também atua na hipófise para ativação da produção de hormônio liberador de gonadotrofinas (*Gonadotropin release hormone* – GnRH), que atua na cascata de ativação, porém, com o mesmo objetivo de estimular a atividade oocitária (quebra da vesícula germinativa) e folicular (secreção de andrógenos pelas células da teca) (67).

Não obstante, esses fatores para a ativação do início da puberdade também são determinados por fatores genéticos, nutricionais e metabólicos individuais de cada animal (63,66), havendo dependência da maturidade e do peso vivo individual, nos quais são dependentes da atuação do GH (64). Em conjunto, a secreção de Leptina (tecido adiposo) e IGF-1 (tecido hepático), regulam a atividade dos neurônios no hipotálamo para a síntese de GnRH (68). Além de atuarem em conjunto na síntese de GnRH e GH, há aumento da secreção pulsátil de LH pela hipófise anterior, o qual terá reflexo no aumento das células da teca no folículo secundário e aumento da quantidade de líquido folicular no ovário, resultando na primeira ovulação da fêmea e aumento da sensibilidade dos receptores hormonais nos demais folículos em desenvolvimento (69).

Concomitantemente, a ativação do metabolismo corporal do animal, auxilia na ativação metabólica hepática, que também atua na síntese de fatores de crescimento (67). Em especial, a síntese hepática de fatores de crescimento

da família IGF (Insulin growth factor – IGF), FGF (*Fibroblastic growth factor* - FGF) e EGF (Epidermal growth factor - EGF), podem atuar diretamente na ativação do metabolismo gonadal (27,32,67,70), no aumento das mitoses das células da granulosa, aumento das junções do tipo GAP para comunicação celular, aumento da angiogênese do folículo e alterações morfológicas das células da teca.

Em consequência à retomada da foliculogênese, nota-se o aumento da atividade hipotalâmica e hipofisária (67), responsáveis pela síntese e secreção dos principais hormônios hipofisários reprodutivos (FSH e LH) que desencadeiam a proliferação celular nos folículos (aumentando a secreção de estrógeno e progesterona) e ativação dos oócitos que se encontravam quiescentes.

2.4. Fatores de crescimento no parênquima ovariano

A puberdade é a transição em que o animal se encontra na vida infantil para o início da vida adulta, com aceleração do crescimento corporal, reinício das funções reprodutivas, que resultam na ovulação e aumento progressivo da progesterona durante a fase luteal (61), seguido pelo novo ciclo estral após a luteólise.

Essa atividade ovariana se tornará cíclica e regular (62), e a fêmea produzirá oócitos competentes para serem fertilizados (6). Entretanto, essa maturação e ativação da diferenciação celular dos folículos pré-antrais em antrais, necessitam de fatores de crescimento que atuam na atividade folicular, desde o seu surgimento (na embriogênese) (31) até a sua maturação (ovulação) por regulação parácrina (71) e endócrina (72,73).

Ao contrário do macho, a fêmea apresenta produção limitada na síntese de novos gametas, sendo a quantidade de oogônias determinada durante a migração das células primordiais até a crista gonadal e das células determinadas na diferenciação como GREL cells (31,74). Assim, o pool de reserva gonadal da fêmea mamífera é denominado de folículos pré-antrais (FOPA) (6,75)

Os FOPA se encontram inclusos no tecido ovariano, envoltos pelo parênquima, os quais necessitam de suporte para o seu crescimento, proveniente do hilo do órgão e irrigação sistêmica (6,75). Apesar de os FOPA

constituírem o *pool* de reserva, correspondendo entre 90% a 95% de todos os folículos ovarianos, apenas 1% dessa população chegará ao processo de ovulação (76).

Para que ocorra recrutamento dos folículos primordiais, é necessário que haja uma reserva de folículos que seja responsiva aos estímulos hormonais, iniciados durante a puberdade e crescimento da fêmea (66). A seleção e o desenvolvimento folicular se dá pelo aumento da secreção do FSH (22).

O FSH é produzido pela hipófise anterior (adeno-hipófise), secundário ao estímulo hipotalâmico do GnRH (6,9), os quais atingem a circulação sistêmica e chega até o ovário. No ovário, o FSH modula várias ações em cascata, que são responsáveis pela ativação do metabolismo celular dos folículos pré-antrais, porém, sua ação é limitada nos folículos antrais *in vivo*, fase mais sensível a atuação do LH (22).

A atuação do FSH no parênquima ovariano (fibroblastos, CG e células teca) é multifatorial, modulando e estimulando a secreção da ativina (hormônio proteico, um dos responsáveis pela reativação do crescimento folicular) e fatores de crescimento, como os FGFs, IGFs (77), TGFs (Fator de crescimento transformante – *Transforming Growth factor*) e atuam ainda na síntese de andrógenos (73) e do hormônio anti-Mülleriano, os quais podem induzir apoptose dos FOPA (25). Além disso, há uma íntima dependência dos folículos primordiais, em relação ao FSH, onde aqueles que se encontram próximo a medula do ovário podem apresentar maior exposição dos receptores ao hormônio e rápida evolução para folículo primário (76). Apesar de ser importante, o FSH não é exclusivo no desenvolvimento dos folículos pré-antrais, mas é considerado como um de seus facilitadores (78), uma vez que ratas hipofisectomizadas ainda apresentam crescimento folicular até o estágio de folículo secundário (79). Para que sua ação seja concretizada, os folículos, principalmente os pré-antrais, necessitam expressar nas CG e teca, a presença dos receptores de FSH (FSHR), para que as alterações morfológicas e mitoses possam ocorrer e, assim a progressão do desenvolvimento folicular na dependência de fatores de crescimento ovarianos.

Esse fato nos remete que há uma dependência de fatores parácrinos importantes para essa regulação. Assim, a ativação e modulação do metabolismo para o desenvolvimento do oócito podem ser divididas em três

fases: desenvolvimento do folículo primordial em primário, do folículo primário em folículo secundário inicial e de transição e, por fim, em folículos antrais (78,79) que seguirão seu desenvolvimento até ovulação ou atresia.

Como um dos fatores iniciais à ativação do desenvolvimento do folículo primordial em primário, a enzima fosfoinositídeo 3-quinase p110 (PI3K), estimulada pela presença do FSH, possui uma subunidade catalítica, na qual estimula o crescimento das futuras células da granulosa ao redor do oócito (26). Em adição a ação da PI3K, há um sinergismo no início da síntese de andrógenos e estrógenos, pelas células da futura granulosa e da teca, respectivamente; as quais também são moduladas pela ação do FSH e LH (26,80).

Apesar da sua importância no desenvolvimento dos folículos primordiais, primários e até limitado nos secundários e antrais iniciais, o FSH pode não exercer tanta influência sobre os folículos antrais já desenvolvidos (81,82). Esse fato pode ser associado com a dependência dos folículos antrais pelo LH e AMH, os quais o FSH pode apresentar efeito regulatório, mantendo os folículos nos estágios pré-antrais do desenvolvimento (25,73).

Em adição à ação multifatorial do FSH, a proliferação das células que circundam o oócito (futuras células da granulosa) (83), desempenham papel importante no aumento da secreção de estrógeno, progesterona e vários fatores de crescimento da família FGF, IGF e TGF (73,84–87).

Individualmente, cada fator citado apresenta a sua atuação molecular nas células que se encontram ao redor do oócito. A progesterona permite um aumento da fagocitose (autofagossomo), o qual aumenta sua disponibilidade no ambiente ovariano (84). Da mesma forma, o FSH pode controlar outros esteroides, como o estrógeno, pelo aumento da expressão gênica correlacionado à enzima aromatase (73). Podemos observar ainda, que essa modulação gênica do FSH não está associada somente aos hormônios esteroides (73,84), mas pode apresentar ações sobre o parênquima ovariano e estimular os fatores de crescimento importantes no desenvolvimento dos folículos pré-antrais (85,86,88,89).

Com a evolução folicular e aumento das células da granulosa, há alteração morfológica da forma pavimentosa para cuboidal. Assim, além do estímulo causado pela presença do FSH, as células que circundam o parênquima ovariano também apresentam seus efeitos nessas cascatas de

alterações metabólicas (25,73). Dentre os fatores de crescimento temos algumas famílias que são importantes para o desenvolvimento e progressão do tamanho dos folículos pré-antrais e por fim, seu desenvolvimento em folículos antrais (86,89,90).

Os fatores de crescimento fibroblásticos básicos (bFGF) são os que apresentam maiores representantes e, que possuem ação direta sobre a proliferação das células da granulosa dos folículos pré-antrais em desenvolvimento (86). Após a progressão do folículo primordial para primário, há diminuição da dependência do crescimento folicular em resposta ao FSH e aumenta a ação dos bFGF, IGFs e, até mesmo a ação do kit Ligante (KL), GDF e BMP (71).

Nos folículos pré-antrais de búfalas, podemos observar que há a mesma tendência na dependência do FSH (89) para o crescimento folicular. Entretanto, quando há apenas o FSH, o crescimento é limitado. Em contrapartida, a associação de fatores de crescimento (IGF-1, TGF- α e TGF- β 1), proporcionaram aumento significativo no tamanho e quantidade de células (granulosa e *cumulus*) (86). Porém, nem todos os estágios do desenvolvimento dos FOPA apresentam receptores para o IGF-1, mas sim para IGF-2, que pode modular o seu crescimento sem alterações (28).

É viável a associação de fatores de crescimento para promoção do desenvolvimento dos folículos, os quais são mais expressivos em um ambiente ovariano FSH-dependente (22). Sabe-se que os fibroblastos são as células mais abundantes no parênquima ovariano, e são responsáveis pela produção dos FGFs, que modulam a atividade das células que circundam o oócito nos folículos pré-antrais, para o início do seu desenvolvimento (27).

Em geral, o FGF-2 é um dos fatores mais encontrados nos tecidos ovarianos (27,91,92). Porém, podemos encontrar outros membros da família, como os FGFs 7, 8, 10 e 18, os quais são encontrados tanto em folículos pré-antrais como nos folículos antrais (27–29,86).

A partir do aumento do número de células da granulosa ao redor do oócito, os folículos já passam a ser denominados de folículos secundários e estes são o último estágio do desenvolvimento até iniciarem a secreção de líquido folicular. Com o aumento do líquido folicular, há uma nova reorganização para o desenvolvimento folicular e com isso, ocorre a perda da dependência do FSH,

em que a unidade folicular (oócito, células da teca e granulosa), passa a responder aos estímulos hormonais e locais (ovarianos) de fatores de crescimento.

Em adição, biotécnicas de manipulação ovariana estão em constante evolução e, são consideradas tecnologias promissoras na obtenção de folículos viáveis para a geração de descendentes (humanos) e produtos de qualidade (animais).

Essa manipulação do tecido ovariano tem como objetivo o aumento do número de oócitos disponíveis para a produção *in vitro* de embriões (PIVE) ou a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (93)

Basicamente, a obtenção dos folículos pode ser realizada com o isolamento mecânico, enzimático ou a associação de ambos, que deverão ser encaminhados ao cultivo (10,94,95).

Após a obtenção dos folículos pré-antrais, os mesmos podem ser cultivados em sistemas simples (86) ou em esquema de co-cultivo (90,96).

O objetivo do cultivo dos FOPA é um maior aproveitamento de todo material genético de fêmeas consideradas superiores, porém que apresentam idade mais avançada ou não estão responsivas aos protocolos de superestimulação hormonal (30,85).

A utilização de FSH no meio de cultivo é importante em folículos que se encontram anteriormente ao desenvolvimento do antro folicular (90). Após o surgimento do antro folicular, para que haja uma maturação adequada do folículo, é necessário que sejam adicionados de fatores de crescimento aos meios de cultivo (81), uma vez que proporcionam o desenvolvimento das células da granulosa (86). Em contrapartida, com o avanço do tamanho do folículo e antro folicular, o FSH pode se tornar um hormônio que pode induzir a apoptose celular ou até mesmo manter os folículos sem progressão de desenvolvimento (22,30,81,84).

Além disso, há necessidade da troca dos meios de cultivo, com o objetivo de mimetizar os efeitos complexos proporcionados pelo ambiente ovariano (8). Dessa forma, os FOPA cultivados apresentarão melhor desenvolvimento e maturidade que poderão ser utilizados para a PIVE (21,97).

Não obstante, o estímulo à produção de andrógenos e estrógenos pelas células da granulosa e teca, também são passos importantes para o desenvolvimento folicular (81,84,98). E, com o surgimento do antro folicular, as células da granulosa se tornam dependentes de fatores de crescimento são sintetizados pelos folículos pré-antrais, como o KL e o AMH (73,74,99–101). Essas moléculas atuam na regulação e modulação de efeitos em cascata que contribuem, não somente para alteração morfológica do oócito, mas para a maturação molecular, importante para aumentar os índices de fertilidade (86,102).

Como o microambiente ovariano é extremamente complexo, os meios de cultivo proporcionam crescimento aceitável dos FOPAs nas condições laboratoriais e tal técnica permitiu a seleção e compreensão do comportamento das moléculas em diferentes fases do desenvolvimento ovariano (86).

Entretanto, as induções fisiológicas deletérias, como a senescência e produção de espécies reativas de oxigênio, que induzem o estresse oxidativo (103).

2.6. Foliculogênese e apoptose ovariana

A senescência ovariana é definida como a perda da viabilidade e produção oocitária do ovário. Ela é decorrente da apoptose (morte celular programada), de todos os sistemas corporais, os quais influenciam os aspectos reprodutivos (55). Nesta linha de pensamento, os ovários são órgãos dependentes da manutenção da homeostase corporal e dos fatores de crescimento sintetizados à partir do funcionamento dos demais sistemas corporais (66,77).

Assim, o envelhecimento dos animais está correlacionado com a inatividade celular e metilação do DNA e RNA, os quais implicam numa deficiência fisiológica e esperada do sistema reprodutivo (104).

No caso do ovário, há número limitado de oogônias, como já visto no item de embriologia ovariana, assim, é esperado que as oogônias sofram apoptose e/ou não sejam mais responsivas aos estímulos hormonais (105,106) e dos fatores de crescimento locais (107)

Assim, um dos critérios para o descarte das fêmeas reprodutoras e o abate das mesmas, pode estar correlacionado com a exaustão das reservas gonadais ou inibição da atividade folicular não responsiva a hormonioterapia (108).

Dessa maneira, uma das formas de avaliação da atividade apoptótica ovariana pode ser pela mensuração de proteases no parênquima ovariano. Dentre essas proteases, a caspase é uma moduladora da apoptose que é encontrada frequentemente nos tecidos ovarianos (109).

Não somente como moduladora de apoptose, as caspases também atuam nas CG como mediadoras de pequenas reações durante o processo de ovulação, que podem modular a liberação do oócito e diminuindo a proliferação celular (110).

2.7. Utilização de PCR na avaliação da foliculogênese

Com o surgimento de ferramentas de biologia molecular, o estudo da fisiologia ovariana permitiu o conhecimento de eventos em cascatas que antes não eram conhecidos, sendo visualizados apenas os seus efeitos celulares.

Com a evolução dos exames de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase – *Polymerase Chain Reaction*), houve a possibilidade da investigação de genes que se encontram nas CG, assim como todo mecanismo molecular no envolvimento da embriogênese, foliculogênese e ovulação, propriamente dito (27–29,111,112).

Entretanto, a utilização de sequências gênicas (primers) na expressão dos fatores de crescimento, reconhecidamente, presentes nos tecidos ovarianos dependem da qualidade e quantidade dos mesmos (113,114).

Para isso, a padronização dos primers deve ser realizada antes do processamento das amostras, para a visualização de dímeros de primers, observação da curva Melt e status de amplificação dos genes em questão (115).

Não é incomum, em espécies que as sequências gênicas são desconhecidas e há comparação entre as bases de primers já publicadas, para a síntese de uma nova sequência para a espécie em questão, ou utilização de primers já desenhados para espécies diferentes.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A atividade ovariana é multifatorial, sendo que os fatores de crescimento exercem uma importante atividade no parênquima ovariano, entretanto, são dependentes da estimulação do FSH e LH. Os protocolos para indução de maior quantidade de folículos (pré-antrais e antrais), ainda estão dependentes da quantidade das reservas gonadais adquiridas durante o desenvolvimento fetal. Sendo assim, a compreensão da fisiologia ovariana é um dos primeiros passos para o entendimento da foliculogênese, para a produção de meios de cultivo semelhantes ao líquido folicular e, conseqüentemente promover melhorias nos resultados das biotécnicas de reprodução assistida.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Marin DFD, de Souza EB, de Brito VC, Nascimento CV, Ramos AS, Filho STR, et al. In vitro embryo production in buffaloes: From the laboratory to the farm. *Anim Reprod*. 2019;16(2):260–6.
2. Perera BMAO. Reproductive cycles of buffalo. *Anim Reprod Sci*. 2011 Apr 1;124(3–4):194–9.
3. D'Occhio MJ, Ghuman SS, Neglia G, della Valle G, Baruselli PS, Zicarelli L, et al. Exogenous and endogenous factors in seasonality of reproduction in buffalo: A review. *Theriogenology*. 2020 Jul 1;150:186–92.
4. Baruselli PS, Carvalho JGS de, Elliff FM, Silva JCB da, Chello D, Carvalho NAT de. Embryo transfer in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*. 2020 Jul 1;150:221–8.
5. Maksura H, Akon N, Islam MN, Akter I, Modak AK, Khatun A, et al. Effects of estradiol on in vitro maturation of buffalo and goat oocytes. *Reprod Med Biol*. 2021 Jan 1;20(1):62–70.
6. HAFEZ ESE, HAFEZ B. Reprodução Animal. In: 7th ed. Barueri: São Paulo; 2004. p. 13–29.
7. Silva-Santos KC, Santos GMG, Siloto LS, Hertel MF, Andrade ER, Rubin MIB, et al. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. *Theriogenology*. 2011;76(6):1051–7.
8. Lamothe S, Bernard V, Christin-Maitre S. Gonad differentiation toward ovary. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2020 Jun 1;81(2–3):83–8.
9. Senger PL. Senger, Pathways to Pregnancy and Parturition, 2nd Ed, 2003,

373p.pdf. 2005. p. 381.

10. Mondadori RG, Luque MCA, Santin TR, Báo SN. Ultrastructural and morphometric characterization of buffalo (*Bubalus bubalis*) ovarian preantral follicles. *Anim Reprod Sci.* 2007;97(3–4):323–33.
11. Kacinskis MÁ, Lucci CM, Luque MCA, Báo SN. Morphometric and ultrastructural characterization of *Bos indicus* preantral follicles. *Anim Reprod Sci.* 2005 Jun 1;87(1–2):45–57.
12. Basuino L, Silveira CF. Human follicular fluid and effects on reproduction. *J Bras Reprod Assist.* 2016;20(1):38–40.
13. Bersinger NA, Eisenhut M, Stute P, von Wolff M. Gonadotropin Stimulation Has Only a Limited Effect on the Concentration of Follicular Fluid Signalling Proteins: An Antibody Array Analysis. *Int J Reprod Med.* 2021;2021:1–7.
14. Mansour MM, Zeitoun MM, Hussein FM. Mastitis outcomes on pre-ovulatory follicle diameter, estradiol concentrations, subsequent luteal profiles and conception rate in Buffaloes. *Anim Reprod Sci.* 2017;181:159–66.
15. Ghuman SPS, Singh J, Honparkhe M, Dadarwal D, Dhaliwal GS, Jain AK. Induction of ovulation of ovulatory size non-ovulatory follicles and initiation of ovarian cyclicity in summer anoestrous buffalo heifers (*Bubalus bubalis*) Using melatonin implants. *Reprod Domest Anim.* 2010;45(4):600–7.
16. Neglia G, de Nicola D, Esposito L, Salzano A, D'Occhio MJ, Fatone G. Reproductive management in buffalo by artificial insemination. *Theriogenology.* 2020;150:166–72.
17. Rathore R, Sharma RK, Phulia SK, Mudgal V, Jerome A, Ghuman SPS, et al. Comparative efficacy of oestrus synchronization protocols in buffalo (*Bubalus bubalis*). Vol. 49, *Tropical Animal Health and Production.* 2017. p. 1377–82.
18. Karuppanasamy K, Sharma RK, Phulia SK, Jerome A, Kavya KM, Ghuman SPS, et al. Ovulatory and fertility response using modified Heatsynch and Ovsynch protocols in the anovular Murrah buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology.* 2017;95:83–8.
19. Selokar naresh L, Sharma P, Saini M, Sheoran S, Rajendran R, Kumar D, et al. Successful cloning of a superior buffalo bull. *Sci Rep.* 2019;9(1).
20. Saini M, Selokar NL, Palta P, Chauhan MS, Manik RS, Singla SK. An update: Reproductive handmade cloning of water buffalo (*Bubalus bubalis*). Vol. 197, *Animal Reproduction Science.* Elsevier; 2018. p. 1–9.
21. Galli C, Duchi R, Colleoni S, Lagutina I, Lazzari G. Ovum pick up, intracytoplasmic sperm injection and somatic cell nuclear transfer in cattle, buffalo and horses: From the research laboratory to clinical practice. Vol. 81, *Theriogenology.* *Theriogenology*; 2014. p. 138–51.

22. Hsueh AJW, Kawamura K, Cheng Y, Fauser BCJM. Intraovarian control of early folliculogenesis. *Endocr Rev.* 2015;36(1):1–24.
23. Richani D, Gilchrist RB. The epidermal growth factor network: Role in oocyte growth, maturation and developmental competence. *Hum Reprod Update.* 2018;24(1):1–14.
24. Chen Y, Yang W, Shi X, Zhang C, Song G, Huang D. The Factors and Pathways Regulating the Activation of Mammalian Primordial Follicles in vivo. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8(September):1–11.
25. Devillers MM, Petit F, Cluzet V, François CM, Giton F, Garrel G, et al. FSH inhibits AMH to support ovarian estradiol synthesis in infantile mice. *J Endocrinol.* 2019;240(2):215–28.
26. Li Q, He H, Zhang YL, Li XM, Guo X, Huo R, et al. Phosphoinositide 3-kinase p110 δ mediates estrogen and FSH-stimulated ovarian follicle growth. *Mol Endocrinol.* 2013;27(9):1468–82.
27. Chaves RN, Tavares De Matos MH, Buratini J, Ricardo De Figueiredo J. The fibroblast growth factor family: Involvement in the regulation of folliculogenesis. *Reprod Fertil Dev.* 2012;24(7):905–15.
28. Dubey PK, Nath A, Chandra V, Sarkar M, Saikumar G, Sharma GT. Expression of mRNA Encoding IGF-I, IGF-II, Type-I, and II IGF-Receptors and IGF-Binding Proteins-1-4 during Ovarian Follicular Development in Buffalo (*Bubalus bubalis*). *Anim Biotechnol.* 2015;26(2):81–91.
29. Castilho ACS, Bueno da Silva R, Price CA, Machado MF, Amorim RL, Buratini J. Expression of fibroblast growth factor 10 and cognate receptors in the developing bovine ovary. *Theriogenology.* 2014;81(9):1268–74.
30. Santos SSD, Biondi FC, Cordeiro MS, Miranda MS, Dantas JK, Figueiredo JR, et al. Isolation, follicular density, and culture of preantral follicles of buffalo fetuses of different ages. *Anim Reprod Sci.* 2006 Sep 1;95(1–2):1–15.
31. Hummitzsch K, Irving-Rodgers HF, Hatzirodos N, Bonner W, Sabatier L, Reinhardt DP, et al. A New Model of Development of the Mammalian Ovary and Follicles. *PLoS One.* 2013;8(2).
32. Fortes MRS, Li Y, Collis E, Zhang Y, Hawken RJ. The IGF1 pathway genes and their association with age of puberty in cattle. *Anim Genet.* 2013;44(1):91–5.
33. Umer S, Zhao SJ, Sammad A, Sahlu BW, Yunwei P, Zhu H. AMH: Could it be used as a biomarker for fertility and superovulation in domestic animals? Vol. 10, *Genes.* Genes (Basel); 2019.
34. She ZY, Yang WX. Sry and SoxE genes: How they participate in mammalian sex determination and gonadal development? Vol. 63, *Seminars in Cell and Developmental Biology.* Academic Press; 2017. p.

13–22.

35. Puttabyatappa M, Matiller V, Stassi AF, Salvetti NR, Ortega HH, Padmanabhan V. Developmental Programming: Prenatal Testosterone Excess on Ovarian SF1/DAX1/FOXO3. *Reprod Sci*. 2020 Jan 1;27(1):342–54.
36. Nakamoto M, Wang DS, Suzuki A, Matsuda M, Nagahama Y, Shibata N. Dax1 suppresses P450arom expression in medaka ovarian follicles. *Mol Reprod Dev*. 2007 Oct;74(10):1239–46.
37. Paulini F, Silva RC, De Paula Rôlo JLJ, Lucci CM. Ultrastructural changes in oocytes during folliculogenesis in domestic mammals. *J Ovarian Res*. 2014;7(1):1–12.
38. Hartanti MD, Hummitzsch K, Bonner WM, Bastian NA, Irving-Rodgers HF, Rodgers RJ. Formation of the Bovine Ovarian Surface Epithelium during Fetal Development. *J Histochem Cytochem*. 2020;68(2):113–26.
39. Hatzirodos N, Hummitzsch K, Irving-Rodgers HF, Breen J, Perry VEA, Anderson RA, et al. Transcript abundance of stromal and thecal cell related genes during bovine ovarian development. *PLoS One*. 2019;14(3):1–16.
40. Chen H, Palmer JS, Thiagarajan RD, Dinger ME, Lesieur E, Chiu H, et al. Identification of novel markers of mouse fetal ovary development. *PLoS One*. 2012;7(7).
41. da Silva RB, Yang MY, Caixeta ES, Castilho AC, Amorim RL, Price CA, et al. Fibroblast growth factor 18 regulates steroidogenesis in fetal bovine ovarian tissue in vitro. *Mol Reprod Dev*. 2019 Feb 1;86(2):166–74.
42. da Silva RB, Yang MY, Caixeta ES, Castilho AC, Amorim RL, Price CA, et al. Fibroblast growth factor 18 regulates steroidogenesis in fetal bovine ovarian tissue in vitro. *Mol Reprod Dev*. 2019;86(2):166–74.
43. Lecluze E, Rolland AD, Filis P, Evrard B, Leverrier-Penna S, Maamar M Ben, et al. Dynamics of the transcriptional landscape during human fetal testis and ovary development. *Hum Reprod*. 2020;35(5):1099–119.
44. Hummitzsch K, Hatzirodos N, Irving-Rodgers HF, Hartanti MD, Perry VEA, Anderson RA, et al. Morphometric analyses and gene expression related to germ cells, gonadal ridge epithelial-like cells and granulosa cells during development of the bovine fetal ovary. *PLoS One*. 2019;14(3):1–20.
45. Hartanti MD, Hummitzsch K, Irving-Rodgers HF, Bonner WM, Copping KJ, Anderson RA, et al. Morphometric and gene expression analyses of stromal expansion during development of the bovine fetal ovary. *Reprod Fertil Dev*. 2019;31(3):482–95.
46. Bayne RA, Donnachie DJ, Kinnell HL, Childs AJ, Anderson RA. BMP signalling in human fetal ovary somatic cells is modulated in a gene-specific fashion by GREM1 and GREM2. *Mol Hum Reprod*. 2016 Sep 1;22(9):622–

33.

47. Gunes SO, Mahmutoglu M., Agarwal A. Genetic and epigenetic effects in sex determination. Vol. 108, Birth Defects Research Part C - Embryo Today: Reviews. Birth Defects Res C Embryo Today; 2016. p. 321–36.
48. Sharma P, Yadav AS, Selokar NL, Kumar D, Dhaka SS, Yadav PS. Epigenetic status of buffalo fibroblasts treated with sodium butyrate a chromatin remodeling agent. Tissue Cell. 2018 Feb 1;50:51–8.
49. Roth Z. Stress-induced alterations in oocyte transcripts are further expressed in the developing blastocyst. Vol. 85, Molecular Reproduction and Development. Mol Reprod Dev; 2018. p. 821–35.
50. Tan Q. Deciphering the DNA Methylome of Polycystic Ovary Syndrome. Mol Diagnosis Ther. 2020 Apr 15;24(3):245–50.
51. Sirard MA. Distribution and dynamics of mitochondrial DNA methylation in oocytes, embryos and granulosa cells. Sci Rep. 2019 Dec 1;9(1).
52. Pohler KG, Geary TW, Atkins JA, Perry GA, Jinks EM, Smith MF. Follicular determinants of pregnancy establishment and maintenance. Vol. 349, Cell and Tissue Research. Cell Tissue Res; 2012. p. 649–64.
53. Thompson RP, Nilsson E, Skinner MK. Environmental epigenetics and epigenetic inheritance in domestic farm animals. Vol. 220, Animal Reproduction Science. Elsevier; 2020. p. 106316.
54. Saini M, Selokar NL. Approaches used to improve epigenetic reprogramming in buffalo cloned embryos. Vol. 148, Indian Journal of Medical Research. Indian J Med Res; 2018. p. 115–9.
55. Klinger FG, Rossi V, De Felici M. Multifaceted programmed cell death in the mammalian fetal ovary. Int J Dev Biol. 2015;59(1–3):51–4.
56. da Silva RB, Yang MY, Caixeta ES, Castilho AC, Amorim RL, Price CA, et al. Fibroblast growth factor 18 regulates steroidogenesis in fetal bovine ovarian tissue in vitro. Vol. 86, Molecular Reproduction and Development. 2019. p. 166–74.
57. De Moraes R, Nogueira Da Costa N, Ohashi OM, Do S, Santos SD, Monteiro BM, et al. Hormônio antimülleriano: pode uma realidade usada em seres humanos ser transferida a bovinos e búfalos Antimüllerian Hormone: can a reality in humans translate to bovine and buffalos. Rev Bras Reprod Anim. 2017;41(4):693–8.
58. Franchi FF, Hernandez MP, Coelho Ferreira AL, Vieira de Lima VA, de Oliveira Mendes L, Musa de Aquino A, et al. Fractal analysis and histomolecular phenotyping provides insights into extracellular matrix remodeling in the developing bovine fetal ovary. Biochem Biophys Res Commun. 2020;523(4):823–8.

59. Santos SSD, Ferreira MAP, Lima MYS, Sampaio R V., Cordeiro MS, Silva TVG, et al. Quantification, Morphology and Ultrastructure of Preantral Follicles of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Foetuses. *Reprod Domest Anim*. 2011 Feb;46(1).
60. Baillet A, Mandon-Pepin B. Mammalian ovary differentiation - A focus on female meiosis. Vol. 356, *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2012. p. 13–23.
61. Mondal M, Prakash BS. Effects of long-term growth hormone-releasing factor treatment on growth, feed conversion efficiency and dry matter intake in growing female buffaloes (*Bubalus bubalis*). *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2005 Aug;89(7–8):260–7.
62. Perry GA. Factors affecting puberty in replacement beef heifers. Vol. 86, *Theriogenology*. *Theriogenology*; 2016. p. 373–8.
63. Deb R, Chakraborty S, Mahima, Kumar Verma A, Tiwari R, Dhama K. Nutrigenomics and its role in male puberty of cattle: A mini review. *Pakistan J Biol Sci*. 2014;17(3):329–34.
64. Haldar A, Prakash BS. Effect of exogenous growth-hormone-releasing factor on blood metabolites and minerals in late maturing buffalo heifers (*Bubalus bubalis*). *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2007 Aug;91(7–8):326–32.
65. Haldar A, Prakash BS. Growth hormone-releasing factor (GRF) induced growth hormone advances puberty in female buffaloes. *Anim Reprod Sci*. 2006 May 1;92(3–4):254–67.
66. Esposito L, de Nicola D, Balestrieri A, Petrovas G, Licitra F, Salzano A, et al. Effect of live body weight and method of synchronization on ovulation, pregnancy rate and embryo and fetal loss in buffalo heifers. *Anim Reprod*. 2019;16(4):859–63.
67. Lirón JP, Prando AJ, Fernández ME, Ripoli M V., Rogberg-Muñoz A, Goszczynski DE, et al. Association between GNRHR, LHR and IGF1 polymorphisms and timing of puberty in male Angus cattle. *BMC Genet*. 2012 Apr 5;13.
68. D'Occhio MJ, Baruselli PS, Campanile G. Influence of nutrition, body condition, and metabolic status on reproduction in female beef cattle: A review. Vol. 125, *Theriogenology*. Elsevier; 2019. p. 277–84.
69. Williams GL, Amstalden M, Garcia MR, Stanko RL, Nizielski SE, Morrison CD, et al. Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle. In: *Domestic Animal Endocrinology*. Elsevier; 2002. p. 339–49.
70. Tran L V., Malla BA, Sharma AN, Kumar S, Tyagi N, Tyagi AK. Effect of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acid enriched diet on plasma IGF-1 and testosterone concentration, puberty and semen quality in male buffalo. *Anim Reprod Sci*. 2016 Oct 1;173:63–72.

71. Nilsson E, Parrott JA, Skinner MK. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Mol Cell Endocrinol.* 2001 Apr 25;175(1–2):123–30.
72. Robker RL, Hennebold JD, Russell DL. Coordination of ovulation and oocyte maturation: A good egg at the right time. *Endocrinology.* 2018;159(9):3209–18.
73. Dewailly D, Robin G, Peigne M, Decanter C, Pigny P, Catteau-Jonard S. Interactions between androgens, FSH, anti-Müllerian hormone and estradiol during folliculogenesis in the human normal and polycystic ovary. *Hum Reprod Update.* 2016;22(6):709–24.
74. Monniaux D, Clément F, Dalbiès-Tran R, Estienne A, Fabre S, Mansanet C, et al. The ovarian reserve of primordial follicles and the dynamic reserve of antral growing follicles: What is the link? Vol. 90, *Biology of Reproduction.* 2014. p. 1–11.
75. Figueiredo JR De, Jales J, Celestino DH, Paula A, Rodrigues R. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção in vitro de embriões em larga escala 1. 2007;(Xvii):143–52.
76. Fortune JE, Cushman RA, Wahl CM, Kito S. The primordial to primary follicle transition. *Mol Cell Endocrinol.* 2000;163(1–2):53–60.
77. Ipsa E, Cruzat VF, Kagize JN, Yovich JL, Keane KN. Growth Hormone and Insulin-Like Growth Factor Action in Reproductive Tissues. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2019;10(November).
78. Fortune JE. The early stages of follicular development: Activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci.* 2003;78(3–4):135–63.
79. Vo KCT, Kawamura K. In vitro activation early follicles: From the basic science to the clinical perspectives. *Int J Mol Sci.* 2021;22(7).
80. Andersen CY. Inhibin-B secretion and FSH isoform distribution may play an integral part of follicular selection in the natural menstrual cycle. *Mol Hum Reprod.* 2017;23(1):16–24.
81. Sakaguchi K, Yanagawa Y, Yoshioka K, Suda T, Katagiri S, Nagano M. Relationships between the antral follicle count, steroidogenesis, and secretion of follicle-stimulating hormone and anti-Müllerian hormone during follicular growth in cattle. *Reprod Biol Endocrinol.* 2019;17(1):1–13.
82. Baba T, Ting AY, Tkachenko O, Xu J, Stouffer RL. Direct actions of androgen, estrogen and anti-Müllerian hormone on primate secondary follicle development in the absence of FSH in vitro. *Hum Reprod.* 2017;32(12):2456–64.
83. Wang X, Wang L, Sun Y, Wu D, Li J, Zhu L, et al. The optimized research of the in vitro culture of preantral follicles in mice. *J Clin Lab Anal.*

2020;34(11):1–11.

84. Liu Q, Gao H, Yang F, Zhang H, Zeng S. FSH Promotes Progesterone Synthesis by Enhancing Autophagy to Accelerate Lipid Droplet Degradation in Porcine Granulosa Cells. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9(February):1–14.
85. Silva JRV, van den Hurk R, Figueiredo JR. Ovarian follicle development in vitro and oocyte competence: Advances and challenges for farm animals. *Domest Anim Endocrinol.* 2016;55:123–35.
86. Sharma GT, Dubey PK, Kumar GS. Effects of IGF-1, TGF- α plus TGF- β 1 and bFGF on in vitro survival, growth and apoptosis in FSH-stimulated buffalo (*Bubalis bubalis*) preantral follicles. *Growth Horm IGF Res.* 2010;20(4):319–25.
87. Sharma RK, Singh JK, Khanna S, Singh I. Ovarian response of prepubertal Murrah heifers to exogenous GnRH. *Anim Reprod Sci.* 2012;133(3–4):153–8.
88. Price CA. Mechanisms of fibroblast growth factor signaling in the ovarian follicle. *J Endocrinol.* 2016;228(2):R31–43.
89. Taru Sharma G, Dubey PK, Sai Kumar G. Localization and Expression of Follicle-Stimulating Hormone Receptor Gene in Buffalo (*Bubalus bubalis*) Pre-Antral Follicles. *Reprod Domest Anim.* 2011 Feb 1;46(1):114–20.
90. Sharma GT, Dubey PK, Nath A, Saikumar G. Co-culture of buffalo (*Bubalus bubalis*) preantral follicles with antral follicles: A comparative study of developmental competence of oocytes derived from in vivo developed and in vitro cultured antral follicles. *Zygote.* 2013;21(3):286–94.
91. da Silva RB, Yang MY, Caixeta ES, Castilho AC, Amorim RL, Price CA, et al. Fibroblast growth factor 18 regulates steroidogenesis in fetal bovine ovarian tissue in vitro. *Mol Reprod Dev.* 2019;86(2):166–74.
92. Santos J, Menezes V, Barberino R, Macedo T, Lins T, Gouveia B, et al. Immunohistochemical Localization of Fibroblast Growth Factor-2 in the Sheep Ovary and its Effects on Pre-antral Follicle Apoptosis and Development In Vitro. *Reprod Domest Anim.* 2014;49(3):522–8.
93. Campanile G, Baruselli PS, Neglia G, Vecchio D, Gasparrini B, Gimenes LU, et al. Ovarian function in the buffalo and implications for embryo development and assisted reproduction. *Anim Reprod Sci.* 2010;121(1–2):1–11.
94. Rafael Rossetto, Lima IMHT, Saraiva MVA, Lima-Verde IB, Sales ET, De Figueiredo JR. Avanços no isolamento e sistemas de cultivo de folículos pré-antrais. *Acta Vet Bras.* 2011;5(1):15–23.
95. Mondadori RG, Santin TR, Fidelis AAG, Porfírio EP, Bão SN. Buffalo (*Bubalus bubalis*) pre-antral follicle population and ultrastructural

- characterization of antral follicle oocyte. *Reprod Domest Anim.* 2010;45(1):33–7.
96. Ramesh HS, Gupta PSP, Nandi S, Manjunatha BM, Kumar VG, Ravindra JP. Co-culture of Buffalo preantral follicles with different somatic cells. *Reprod Domest Anim.* 2008;43(5):520–4.
 97. Sampaio P. Biotecnologias da reprodução em bubalinos (*Bubalus bubalis*). *Rev Bras Reprod Anim.* 2005;29(1):4–17.
 98. Suzuki N, Yoshioka N, Takae S, Sugishita Y, Tamura M, Hashimoto S, et al. Successful fertility preservation following ovarian tissue vitrification in patients with primary ovarian insufficiency. *Hum Reprod.* 2015;30(3):608–15.
 99. Baldrighi J, Sá Filho MF, Batista EOS, Lopes RNVR, Visintin JA, Baruselli PS, et al. Anti-Mullerian hormone concentration and antral ovarian follicle population in Murrah heifers compared to Holstein and Gyr kept under the same management. *Reprod Domest Anim.* 2014;49(6):1015–20.
 100. Monniaux D, Clément F, Dalbiès-Tran R, Estienne A, Fabre S, Mansanet C, et al. The ovarian reserve of primordial follicles and the dynamic reserve of antral growing follicles: What is the link? Vol. 90, *Biology of Reproduction*. Oxford Academic; 2014. p. 85–6.
 101. Gautam D, Vats A, Pal P, Haldar A, De S. Characterization of Anti-Müllerian Hormone (AMH) Gene in Buffaloes and Goats. *Front Vet Sci.* 2021;8(March).
 102. Gershon E, Dekel N. Newly identified regulators of ovarian folliculogenesis and ovulation. *Int J Mol Sci.* 2020;21(12):1–18.
 103. Dubey PK, Tripathi V, Singh RP, Sharma GT. Influence of nitric oxide on in vitro growth, survival, steroidogenesis, and apoptosis of follicle stimulating hormone stimulated buffalo (*Bubalus bubalis*) preantral follicles. *J Vet Sci.* 2011;12(3):257–65.
 104. Wardowska A. M6a rna methylation in systemic autoimmune diseases—a new target for epigenetic-based therapy? *Pharmaceuticals.* 2021;14(3).
 105. Kawamura K, Cheng Y, Suzuki N, Deguchi M, Sato Y, Takae S, et al. Hippo signaling disruption and Akt stimulation of ovarian follicles for infertility treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(43):17474–9.
 106. Sun SY, Zhang W, Han X, Huang RH, Shi FX. Cell proliferation and apoptosis in the fetal and neonatal ovary of guinea pigs. *Genet Mol Res.* 2014;13(1):1570–8.
 107. Sharma GT, Dubey PK, Kumar GS. Effects of IGF-1, TGF- α plus TGF- β 1 and bFGF on in vitro survival, growth and apoptosis in FSH-stimulated buffalo (*Bubalis bubalus*) preantral follicles. *Growth Horm IGF Res.* 2010 Aug 1;20(4):319–25.

108. Jiang Y, Xin X, Pan X, Zhang A, Zhang Z, Li J, et al. STAT4 targets KISS1 to promote the apoptosis of ovarian granulosa cells. *J Ovarian Res.* 2020;13(1):1–12.
109. AL J, JT B. Caspase-mediated apoptosis in the vertebrate ovary. *Reproduction.* 2002;124(1):19–27.
110. F S, S F, A BB, H Z, M B-M, H D. Caspase-7 deficiency in Chinese hamster ovary cells reduces cell proliferation and viability. *Biol Res.* 2020;53(1).
111. Pellatt L, Rice S, Dilaver N, Heshri A, Galea R, Brincat M, et al. Anti-Müllerian hormone reduces follicle sensitivity to follicle-stimulating hormone in human granulosa cells. *Fertil Steril.* 2011;96(5):1246-1251.e1.
112. Devi HL, Kumar S, Konyak YY, Bharati J, Bhimte A, Pandey Y, et al. Expression and functional role of fibroblast growth factors (FGF) in placenta during different stages of pregnancy in water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology.* 2020 Feb 1;143:98–112.
113. Garafutdinov RR, Galimova AA, Sakhabutdinova AR. The influence of quality of primers on the formation of primer dimers in PCR. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids.* 2020 Sep 1;39(9):1251–69.
114. Rodríguez A, Rodríguez M, Córdoba JJ, Andrade MJ. Chapter 3 Design of Primers and Probes for Quantitative Real-Time PCR Methods. *Methods Mol Biol.* 1275.
115. LC L, R D. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics.* 2002 Nov 1;18(11):1427–31.

5. HIPÓTESES

O desenvolvimento ovariano necessita de fatores de crescimento parácrinos presentes no tecido ovariano, que são determinantes para a seleção e progressão do desenvolvimento da foliculogênese, mediante estímulos hormonais endócrinos (hipofisários) e hipotalâmicos. Sendo assim, os fatores parácrinos ovarianos envolvidos na foliculogênese são importantes na modulação local da determinação da onda de recrutamento, crescimento folicular comum, seleção do folículo dominante até a ovulação.

6. Objetivos

Gerais

Determinar a expressão dos fatores de crescimento (FGF2, IGF1, EGF) e receptores hormonais (FSHR, FHFR2C FGFR3C) presentes parênquima ovariano de búfalas adultas gestantes e não gestantes, e avaliar a relação dos FGFs com o desenvolvimento dos folículos pré-antrais.

Específicos

Avaliar a expressão gênica do FSHR, FGF2, EGF, IGF1, FGFR2C e FGFR3C no parênquima de ovários de búfalas adultas (gestantes e não gestantes) e a relação com o crescimento e desenvolvimento de folículos pré-antrais.

Avaliar a expressão gênica dos primers delineados para a utilização em tecidos bovinos podem ser utilizados para avaliação da expressão gênica das amostras em tecido ovariano de búfalas.

CAPÍTULO 2

Artigo redigido de acordo com as normas da revista *Theriogenology*.

Qualis CAPES A2, fator de impacto 2.740

Fatores de crescimento e seus receptores hormonais expressos no tecido ovariano de búfalas (*Bubalo buballis*) não gestantes e no terço final da gestação

Silva-Junior, E.R.; Dellaqua, T.T.; Brochine, S.; Tironi, S.M.T.; Oba, E.

Author Contribution Statement

Silva-Junior, E.R.: Conceptualization, Methodology, Investigation, Data Curation; Writing - Original Draft; Writing - Review & Editing;

Dellaqua, T.T.: Methodology, Investigation, Data Curation;

Brochine, S.: Methodology, Investigation;

Tironi, S.M.T.: Methodology, Investigation;

Oba, E.: Supervision; Project administration.

Fatores de crescimento e seus receptores hormonais expressos no tecido ovariano de búfalas (*Bubalo buballis*) não gestantes e no terço final da gestação

Silva-Junior, E.R.; Dellaqua, T.T.; Brochine, S.; Tironi, S.M.T.; Oba, E.

1. State University of São Paulo, Department of Veterinarian Surgery and Animal Reproduction, UNESP, Botucatu/SP, Brazil

*Corresponding author at: Edjalma Rodrigues da Silva-Junior, State University of São Paulo, Department of Veterinarian Surgery and Animal Reproduction, Botucatu/SP, Brazil. E-mail address: edjalma@gmail.com

Resumo

O conhecimento da fisiologia ovariana é importante durante a aplicação de biotécnicas assistidas de reprodução, tanto animal quanto humana. Durante a foliculogênese, os folículos apresentam aumento em número e diferenciação morfológica das células que circundam o oócito e, com a progressão do desenvolvimento, se tornam unidades funcionais no parênquima ovariano. Esses folículos podem ser considerados como *pool* de reserva e, na dependência do estímulo, podem permanecer quiescentes, sofrerem atresia ou chegar até a ovulação. Durante esse desenvolvimento, podemos ter a presença de fatores de crescimento produzidos no parênquima ovariano, que são modulados pela presença dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH). Além disso, o FSH e o LH também apresentam ação direta durante todo o curso da foliculogênese. Dentre os fatores de crescimento mais comuns, podemos citar o fibroblástico (FGF), insulínico (IGF), epidermal (EGF) e seus respectivos receptores que atuam na diferenciação e progressão do desenvolvimento folicular, desde as fases iniciais até a ovulação. Sendo assim, os objetivos do presente trabalho foram revisar a regulação parácrina dos fatores de crescimento durante a foliculogênese, atresia folicular, descrever e quantificar a expressão gênica desses fatores (FGF2, IGF1 e EGF), seus receptores (FSHR, FGFR2C e FGFR3C) e agentes envolvidos na apoptose (CASP3) presentes no ovário de búfalas vazias e gestantes. Em abatedouros, coletaram-se ovários de búfalas vazias (n=12) e gestantes (n=12), que se encontravam no terço final da gestação. Para a padronização das amostras, todas as búfalas vazias se encontravam cíclicas, com a presença de folículos em desenvolvimento e corpo lúteo evidente no parênquima. As amostras foram encaminhadas ao laboratório em tempo máximo de uma hora após a coleta. Todos os ovários foram

80 dissecados, os folículos antrais aspirados e as amostras de tecido ovariano
81 coletadas e armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C) para posterior análise.
82 No laboratório, foram utilizados *primers* delineados para bovinos na utilização do
83 RT-qPCR na quantificação gênica das amostras. Após a padronização técnica,
84 normalização das amostras e transformações dos valores em bases logarítmicas
85 foi realizado a quantificação por RT-qPCR das amostras dos ovários de búfalas.
86 Foram consideradas com diferença estatística, as amostras que apresentaram
87 significância em 5% no pós-teste de Wilcoxon. Todos os *primers* foram
88 expressos no RT-qPCR, entretanto, apenas o FSHR apresentou diferença
89 significativa entre os grupos experimentais. O FSH atua na estimulação e
90 regulação dos fatores parácrinos na regulação da foliculogênese, uma vez que
91 houve variação da expressão de seu receptor (FSHR) entre os grupos
92 experimentais. No grupo experimental de búfalas vazias, houve oscilação na
93 expressão do FSHR decorrente das diferentes fases do ciclo estral que as
94 fêmeas se encontravam, pois a modulação da secreção de esteroides pode
95 afetar o desenvolvimento e progressão do desenvolvimento folicular. A presença
96 do receptor FSHR no parênquima ovariano é um dos pontos iniciais para o início
97 da foliculogênese e progressão do seu desenvolvimento, através da modulação
98 de outros fatores de crescimento. Já nas búfalas gestantes, não houve essa
99 variação, decorrente da atuação hormonal da progesterona. Sendo assim,
100 conclui-se que houve expressão gênica dos fatores de crescimento testados
101 estão presentes no tecido ovariano e são responsáveis pela modulação e
102 progressão da foliculogênese em búfalas gestantes e vazias. Não foi possível
103 visualizar a diferença na expressão do fator apoptótico pesquisado (CASP3)
104 entre os grupos experimentais e, em adição, é viável a utilização de *primers*
105 desenhados para bovinos na pesquisa de fatores de crescimento em ovário de
106 búfalas.

107

108 **Palavras-chave:** EGF, FGF2, FSHR, IGF, ovário, PCR

109

110 **1. Introdução**

111 A bubalinocultura vem apresentando destaque comercial no aumento da
112 produção e número absoluto de animais, podendo ser explorada a produção de
113 carne e leite. Entretanto, as biotecnologias reprodutivas aplicadas a essa
114 espécie, ainda não estão bem fundamentadas e, muitas vezes, são aplicadas
115 técnicas utilizadas em bovinos, sem conhecimento prévio das particularidades
116 de sua fisiologia.

117 Dentre essas peculiaridades reprodutivas da búfala, podemos citar o
118 menor tamanho dos ovários, baixa reserva gonadal, e variação entre os ciclos

119 estrais em relações às fêmeas bovinas. Tais características fisiológicas podem
120 ser responsáveis pelos baixos índices reprodutivos inerentes à espécie (1).
121 Ainda como adição a essas peculiaridades, as búfalas apresentam a influência
122 da estacionalidade reprodutiva, marcada pelos ciclos estrais regulares nos
123 períodos de menor luminosidade ao longo do ano, mais evidentes em regiões
124 que se afastam da linha do equador (2,3).

125 Já nas fêmeas bovinas submetidas a aspiração folicular, seguida pela
126 maturação oocitária, fertilização in vitro e a transferência de embrião, são
127 biotecnologias que estão consolidadas e possuem índices reprodutivos
128 satisfatórios. Entretanto, para a espécie bubalina, há alterações anatômicas e
129 fisiológicas que tornam a técnica mais laboriosa, diminuindo a obtenção de
130 óocitos recuperados pela aspiração folicular, quando comparado aos bovinos
131 (4).

132 Uma alternativa para a obtenção de um maior número de oócitos para a
133 produção in vitro de embriões bubalinos é o isolamento e cultivo de folículos pré-
134 antrais. Essa biotécnica permite que sejam obtidos oócitos proveniente de
135 abatedouros e seu cultivo até a fertilização, aumentando o potencial comercial
136 da técnica de transferência de embriões em búfalas.

137 Além disso, os folículos pré-antrais constituem o pool de reserva das
138 fêmeas mamíferas, que podem se desenvolver até folículo ovulatório, ou sofrer
139 atresia, na dependência do tipo de estímulo recebido. Ainda hoje, as pesquisas
140 são realizadas com o objetivo de esclarecer o funcionamento e os mecanismos
141 de controle da regulação da fisiologia ovariana. Dentre estes fatores que atuam
142 no ovário, a expressão de receptores e fatores de crescimento, influenciam na

143 ativação, manutenção e seleção dos folículos pré-antrais durante as ondas de
144 recrutamento e seleção.

145 Sendo assim, a compreensão dos fatores envolvidos na fisiologia
146 ovariana podem esclarecer os eventos que ocorrem no início da foliculogênese
147 nas fêmeas, auxiliando no momento da aplicação de biotécnicas de reprodução
148 assistida, não só em animais domésticos de interesse reprodutivo, mas em
149 animais ameaçados de extinção, na espécie humana buscando melhores meios
150 de maturação, fertilização e cultivo de oócitos e embriões.

151 Entretanto, para melhorar a qualidade dos meios (5) utilizados em
152 laboratórios de cultivo celular, a produção dos mesmos deve manter
153 características semelhantes ao líquido folicular fisiológico. Com isso, os meios
154 se tornariam mais próximos aos sintetizados pelos ovários e individualizados por
155 espécie.

156 Dessa forma, a investigação de fatores de crescimento que atuam no
157 parênquima ovariano através de metodologias de biologia molecular,
158 metabolômica e proteômica, podem esclarecer as intimas relações moleculares
159 no desenvolvimento folicular. Como ferramenta complementar, o
160 desenvolvimento de sequências gênicas (também conhecido como primer) de
161 fatores de crescimento que podem atuar no parênquima e folículo ovariano
162 trazem informações sobre o funcionamento dessas relações. Assim, o
163 delineamento e desenho de um primer pode influenciar na pesquisa de
164 determinado fator de crescimento no tecido ou célula-alvo.

165 Dessa maneira, os objetivos dessa revisão são discorrer sobre os fatores
166 de crescimento envolvidos no desenvolvimento de folículos pré-antrais e

167 caracterizar a expressão gênica desses fatores envolvidos na dinâmica de
168 crescimento folicular de ovários fetais, búfalas gestantes e não-gestantes.

169 **2. Material e Método**

170 O experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação
171 Animal institucional e todo procedimento metodológico foi desenvolvido de
172 acordo com as normas de experimentação científica, aprovado pelo protocolo nº
173 0268/2018-CEUA.

174

175 *2.1. Ovários*

176 Foram coletados ovários de búfalas de abatedouro comercial na cidade
177 de Boituva/SP (Latitude 23°17'00" sul e longitude 47°40'20" leste, a uma altitude
178 de 637 metros), e transportados (15°C) ao Laboratório de Endocrinologia da
179 Universidade Estadual Paulista, campus de Botucatu, num intervalo de 2 horas
180 após o abate. Os ovários foram coletados entre os meses de Julho e Setembro.

181 Após a chegada ao laboratório, todos os ovários foram higienizados com
182 cloreto de Sódio (NaCl 0,9%, temperatura ambiente) e álcool (70%). Os ovários
183 foram dissecados para a retirada de todo tecido adiposo. Para as amostras de
184 RT-qPCR, os folículos antrais foram aspirados e uma secção (1 mg) da região
185 cranial do ovário foi retirada e armazenada a -196°C, sem a adição de proteases
186 ou tampão RNase.

187 Para o processamento das amostras de RT-qPCR, apenas o tecido
188 ovariano foi encaminhado para a extração do RNA, e as amostras que continham
189 folículos antrais foram desprezadas.

190

191 2.2. RT-qPCR

192 O processo de todas as amostras foi realizado após a lavagem e
193 dissecação dos e ligamentos e tecido conjuntivo. A amostra de RT-qPCR foi
194 obtida por 1 mg de tecido ovariano e armazenada diretamente em criotubos (-
195 196 ° C), sem qualquer solução.

196 A investigação da expressão do mRNA do parênquima do ovário foi
197 realizada por RT-qPCR, por meio do SybrGreen PCR Master Mix (Applied
198 Biosystems) no equipamento StepOnePlus. O tecido ovariano foi submetido à
199 extração de RNA total com TRIzol (Invitrogen) seguindo as instruções do
200 fabricante. As concentrações de RNA total foram medidas pelo NanoDrop 2000
201 Spectrophotometer (Thermo Scientific). Após, toda a amostra de RNA foi tratada
202 com DNase I (1 UI / µg; Invitrogen, São Paulo, Brasil) como protocolo de fábrica
203 para eliminação de todas as contaminações com DNA genômico e, em seguida,
204 foi realizada a transcrição reversa utilizando o cDNA reverso de alta capacidade
205 Kit de Transcrição (Applied Biosystems), conforme instruções de fábrica.

206 Os dados dos genes (Tabela 1) foram analisados e padronizados pelo
207 software LinReg. Os valores médios de eficiência para cada gene foram
208 calculados pelo perfil de amplificação de amostras individuais. Em seguida, os
209 dados fornecem um gráfico e três pontos de cada coordenada da reta dada pelo
210 software.

211 Para cada gene, a linha de limiar foi fixada em um ponto médio da
212 linearidade, determinado pelos valores mínimo e máximo de fluorescência. A
213 expressão relativa de cada gene foi calculada usando o $\Delta\Delta C_t$ e os dados foram
214 corrigidos com as médias geométricas dos genes de referência mais estáveis,

ACTB e GAPDH (testados pelo software GeNorm), usando a equação descrita por Pfaffl (2001).

217

Tabela 1. FSH e primers de gene básico (RT-qPCR) usados para avaliação de tecido ovariano de búfalas vazias e gestantes (n = 24)

GENE	SEQUÊNCIA	REFERÊNCIA
ACTB	F: F: ATGAGCTGCCCCGATGGTC R: GGATGTCCACGTCACACTTC	Costine et al., 2007
GAPDH	F: GGC GTGAACCACGAGAAGTATAA R: CCCTCCACGATGCCAAAGT	Caixeta et al., 2013
FGF2	F: GCAAACCGTTACCTTGCTATG R: ACCACCTGGAGTATTTCTTGA	Barros et al., 2019
FSHR	F: AGCCCCTTGTCACAACTCTATGTC R: GTTCCTCACCGTGAGGTAGATGT	Caixeta et al., 2009
EGFR	F: AAAGTTTGCCAAGGGACAAG R: AAAGCACATTTCTCGGATG	Caixeta et al., 2013
IGF-1	F: ACCCTGGAGTTGGTAGATTGCTGT R: CACCCATGCATTTGTGGCTCTTGA	Satrapa et al., 2013
CASP3	F: AAGCCATGGTGAAGAAGGAA R: GGCAGGCCTGAATAATGAAA	Moraes et al., 2015
FGFR2C	F: CACCACGGACAAAGAAATTG R: ATGCAGAGTGAAAGGATATCC	Caixeta et al., 2013
FGFR3C	F: ACTGGTACAACACCTATGCCTCCA R: TCTGGACATGGTGGGCAACTTAGA	Caixeta et al., 2013

F: forward primer; R: reverse primer

221

Após padronização e correção dos dados, os valores foram analisados pelo programa GraphPad Prism versão 5.0 (software GraphPad, San Diego, Califórnia, EUA), com pós-teste de Wilcoxon, com 5% de significância.

3. Resultados

Não houve diferença entre os grupos experimentais, exceto para a expressão gene FSHR.

O FSHR mostra diferença entre as fêmeas de búfalas gestantes e não gestantes, e seus valores e erro padrão são apresentados na Tabela 2.

230

231

232

233 Tabela 2. Expressão gênica (RT-qPCR) no tecido ovariano (n = 24) de búfalas
 234 gestantes e não gestantes
 235

	Gestante	Não gestante
FSHR	0,15 ± 0,04a	4,95 ± 1,57b
FGF2	0,72 ± 0,16	1,62 ± 0,49
EGFR	1,09 ± 0,25	1,45 ± 0,30
IGF1	0,77 ± 0,24	1,62 ± 0,49
CASP3	1,22 ± 0,17	1,41 ± 0,37
FGFR2C	1,06 ± 0,20	1,61 ± 0,49
FGFR3C	0,01 ± 0,003	0,01 ± 0,007

236 * Letras diferentes indicam diferença estatística, teste de Wilcoxon com significância de 5%.

237

238 4. Discussão

239 O FSH é um dos hormônios mais importantes com ação no tecido
 240 ovariano (1,8), promovendo o desenvolvimento folicular (9). De fato, os valores
 241 apresentados na Tabela 2 e na Figura 1 evidenciam a diferença na expressão
 242 gênica em búfalos ovarianos. Porém, apenas a expressão do FSHR apresentou
 243 diferença entre os grupos.

244 No início do crescimento folicular, o FSH é um importante fator indutor de
 245 resposta dos folículos pré-antrais em búfalos (10), podendo preparar todo o
 246 tecido ovariano para induzir os demais fatores de crescimento a dar continuidade
 247 ao desenvolvimento (3,11,12).

248 Portanto, nossos resultados reforçam a presença de FSH em búfalos
 249 fêmeas gestantes e não gestantes. Além disso, mostramos as diferenças na
 250 expressão de FSH durante a gestação, sugerindo crescimento folicular além da
 251 presença de progesterona, feto e placenta. Mesmo assim, nenhum crescimento
 252 folicular significativo e ovulação é possível, como a ação bloqueadora da
 253 progesterona (13). Ainda que a progesterona diminua a ação dos hormônios
 254 reprodutivos, é a sua presença que apóia a proliferação das células da granulosa
 255 no início do desenvolvimento folicular (14).

256 Esta relação entre FSH e esteróides, poderia melhorar e ativar o
257 desenvolvimento precoce em folículos pré-antrais. Porém, essa evidência está
258 associada à ativação de outros fatores de crescimento, como o FGF e o TGF (3).

259 As variâncias dos valores de FSH em vacas não gestantes compartilham
260 evidências do ciclo estral, pois todo tecido ovariano deve promover um bom
261 ambiente para melhorar o crescimento folicular (9,15).

262 Mesmo não havendo diferença estatística nos demais genes, sua
263 presença é importante para o desenvolvimento inicial em cada fase da dinâmica
264 folicular (16). Dessa forma, a família FGF poderia ter influência nos folículos pré-
265 ovulatórios, como a regulação e início da síntese de esteróides que atuam no
266 desenvolvimento e diferenciação morfológica da célula da granulosa (6).

267 Portanto, os resultados mostram que a interação do FGF2 pode ser mais
268 evidente com o FGFR2C do que com o FGFR3C, devido à diferença na
269 expressão de ambos os grupos nos ovários bubalinos. Além disso, outros fatores
270 de crescimento da família FGF podem estar relacionados à regulação,
271 proliferação e diferenciação das células da granulosa (6,17,18). Além disso,
272 ainda há o morfofisiológico na síntese de fatores parácrinos, estimulados pela
273 ação do FSH (1).

274 De fato, o FGF2 é mais evidente na célula da granulosa no folículo antral,
275 que se localiza com a avaliação imunohistoquímica e PCR (19), e corrobora com
276 nossos resultados da presença e ação interativa do FGF2 e FGFR2C no búfalo
277 ovariano tecido.

278 Assim, os folículos pré-antrais são estimulados pelo FSH no início do
279 desenvolvimento e promove o crescimento folicular (9), em contribuição também
280 estimula a expressão no tecido ovariano de IGF (20), TGF e KL (21)

281 independente da condição reprodutiva (grávida ou não grávidas), em nossos
282 resultados.

283 Com o passar do tempo, com o desenvolvimento folicular e morfológico
284 das células da granulosa e da teca, a presença de IGF, KL e outros FGF auxilia
285 na esteroidogênese e no acúmulo de fluido folicular (6,9,21,22). Em
286 contrapartida, a presença do IGF-1 mostra uma relação importante nas
287 influências do tecido ovariano na unidade do folículo, uma vez que os folículos
288 pré-antrais não possuem o receptor para o IGF-1 (3). Além disso, a menor
289 expressão nos ovários grávidas pode ser uma interrupção do desenvolvimento,
290 talvez em resposta à menor quantidade de FSH.

291 Assim como os demais fatores de crescimento, o EGF tem ação interativa
292 com o FSH e pode promover um melhor ambiente para o desenvolvimento
293 folicular (23), como no aumento da expressão de EGF-R, FSH-R e dos genes
294 associados à esteroidogênese, como P450 aromatase (24).

295 Caso contrário, o EGF pode ter um efeito protetor sobre os folículos pré-
296 antrais (5), pois as células ovarianas apresentam os efeitos da metilação do DNA
297 e RNA (25) e a evidência da expressão do CASP, em nossos resultados.

298 Assim, o desenvolvimento dos folículos pré-antrais de búfalos é uma área
299 obscura para os pesquisadores devido a todos os mecanismos sensíveis de
300 controle molecular. Mais estudos são necessários para avaliar o impacto desses
301 mecanismos no desenvolvimento ovariano de búfalos e, posteriormente, podem
302 ser explorados para melhorar os resultados de PIV.

303

304

305

306 5. Conclusão

307 Os dados mostraram variação na expressão do FSHR em búfalas não
 308 gestantes e, os baixos valores nas vacas gestantes podem ser ação da
 309 progesterona. Não houve diferença na expressão do FGF, IGF, EGF, CASP3, e
 310 seus FGFR2C e FGFR3C em búfalos gestantes e não gestantes, o que indica o
 311 desenvolvimento folicular em todos os grupos. Além disso, os primers bovinos
 312 são capazes de avaliar a expressão gênica por RT-qPCR em bubalinos.

313

314

315 6. Referências

- 316 1. Taru Sharma G, Dubey PK, Sai Kumar G. Localization and Expression of Follicle-
 317 Stimulating Hormone Receptor Gene in Buffalo (*Bubalus bubalis*) Pre-Antral
 318 Follicles. *Reprod Domest Anim* [Internet]. 2011 Feb 1 [cited 2021 Jul
 319 19];46(1):114–20. Available from:
 320 <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1439-0531.2010.01604.x>
- 321 2. Sharma GT, Dubey PK, Meur SK. Survival and developmental competence of
 322 buffalo preantral follicles using three-dimensional collagen gel culture system.
 323 *Anim Reprod Sci*. 2009;114(1–3):115–24.
- 324 3. Dubey PK, Nath A, Chandra V, Sarkar M, Saikumar G, Sharma GT. Expression
 325 of mRNA Encoding IGF-I, IGF-II, Type-I, and II IGF-Receptors and IGF-Binding
 326 Proteins-1-4 during Ovarian Follicular Development in Buffalo (*Bubalus bubalis*).
 327 *Anim Biotechnol*. 2015;26(2):81–91.
- 328 4. da Silva RB, Yang MY, Caixeta ES, Castilho AC, Amorim RL, Price CA, et al.
 329 Fibroblast growth factor 18 regulates steroidogenesis in fetal bovine ovarian tissue
 330 in vitro. Vol. 86, *Molecular Reproduction and Development*. 2019. p. 166–74.
- 331 5. Max MC, Bizarro-Silva C, Búfalo I, González SM, Lindquist AG, Gomes RG, et
 332 al. In vitro culture supplementation of EGF for improving the survival of equine

- 333 preantral follicles. *Vitr Cell Dev Biol - Anim* [Internet]. 2018 Dec 1 [cited 2021
334 Sep 28];54(10):687–91. Available from:
335 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30284096/>
- 336 6. Chaves RN, Tavares De Matos MH, Buratini J, Ricardo De Figueiredo J. The
337 fibroblast growth factor family: Involvement in the regulation of folliculogenesis.
338 *Reprod Fertil Dev*. 2012;24(7):905–15.
- 339 7. Sharma GT, Dubey PK, Nath A, Saikumar G. Co-culture of buffalo (*Bubalus*
340 *bubalis*) preantral follicles with antral follicles: A comparative study of
341 developmental competence of oocytes derived from in vivo developed and in vitro
342 cultured antral follicles. *Zygote*. 2013;21(3):286–94.
- 343 8. Gupta PSP, Nandi S. Isolation and culture of preantral follicles for retrieving
344 oocytes for the embryo production: Present status in domestic animals. *Reprod*
345 *Domest Anim*. 2012;47(3):513–9.
- 346 9. Hsueh AJW, Kawamura K, Cheng Y, Fauser BCJM. Intraovarian control of early
347 folliculogenesis. *Endocr Rev*. 2015;36(1):1–24.
- 348 10. Dubey PK, Tripathi V, Singh RP, Sharma GT. Influence of nitric oxide on in vitro
349 growth, survival, steroidogenesis, and apoptosis of follicle stimulating hormone
350 stimulated buffalo (*Bubalus bubalis*) preantral follicles. *J Vet Sci* [Internet]. 2011
351 [cited 2021 Jul 19];12(3):257–65. Available from:
352 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21897099/>
- 353 11. McNatty KP, Fidler AE, Juengel JL, Quirke LD, Smith PR, Heath DA, et al.
354 Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function.
355 *Mol Cell Endocrinol* [Internet]. 2000 May 25 [cited 2021 Jul 14];163(1–2):11–20.
356 Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10963868/>
- 357 12. Santos J, Menezes V, Barberino R, Macedo T, Lins T, Gouveia B, et al.

- Immunohistochemical Localization of Fibroblast Growth Factor-2 in the Sheep Ovary and its Effects on Pre-antral Follicle Apoptosis and Development In Vitro. *Reprod Domest Anim.* 2014;49(3):522–8.
13. Senger PL. Senger, Pathways to Pregnancy and Parturition, 2nd Ed, 2003, 373p.pdf. 2005. p. 381.
 14. Liu Q, Gao H, Yang F, Zhang H, Zeng S. FSH Promotes Progesterone Synthesis by Enhancing Autophagy to Accelerate Lipid Droplet Degradation in Porcine Granulosa Cells. *Front Cell Dev Biol.* 2021;9(February):1–14.
 15. Gupta PSP, Nandi S, Ravindranatha BM, Sarma P V. In vitro culture of buffalo (*Bubalus bubalis*) preantral follicles. *Theriogenology.* 2002;57(7):1839–54.
 16. Ahn JI, Lee ST, Park JH, Kim JY, Park JH, Choi JK, et al. In vitro-growth and gene expression of porcine preantral follicles retrieved by different protocols. *Asian-Australasian J Anim Sci.* 2012;25(7):950–5.
 17. Price CA. Mechanisms of fibroblast growth factor signaling in the ovarian follicle. *J Endocrinol.* 2016;228(2):R31–43.
 18. Kumar S, Singla SK, Manik R, Palta P, Chauhan MS. Effect of basic fibroblast growth factor (FGF2) on cumulus cell expansion, in vitro embryo production and gene expression in buffalo (*Bubalus bubalis*). *Reprod Biol [Internet].* 2020 Dec 1 [cited 2021 Jul 13];20(4):501–11. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32921625/>
 19. Mishra SR, Thakur N, Somal A, Parmar MS, Reshma R, Rajesh G, et al. Expression and localization of fibroblast growth factor (FGF) family in buffalo ovarian follicle during different stages of development and modulatory role of FGF2 on steroidogenesis and survival of cultured buffalo granulosa cells. *Res Vet Sci.* 2016 Oct 1;108:98–111.

- 383 20. Kwintkiewicz J, Giudice LC. The interplay of insulin-like growth factors,
384 gonadotropins, and endocrine disruptors in ovarian follicular development and
385 function. *Semin Reprod Med.* 2009;27(1):43–51.
- 386 21. Nilsson E, Parrott JA, Skinner MK. Basic fibroblast growth factor induces
387 primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Mol Cell*
388 *Endocrinol.* 2001 Apr 25;175(1–2):123–30.
- 389 22. Rafael Rossetto, Lima IMHT, Saraiva MVA, Lima-Verde IB, Sales ET, De
390 Figueiredo JR. Avanços no isolamento e sistemas de cultivo de folículos pré-
391 antrais. *Acta Vet Bras.* 2011;5(1):15–23.
- 392 23. Andrade ER, Seneda MM, Alfieri AA, De Oliveira JA, Loureiro Bracarense
393 APFR, Figueiredo JR, et al. Interactions of indole acetic acid with EGF and FSH
394 in the culture of ovine preantral follicles. *Theriogenology.* 2005;64(5):1104–13.
- 395 24. Silva CMG, Castro S V., Faustino LR, Rodrigues GQ, Brito IR, Rossetto R, et al.
396 The effects of epidermal growth factor (EGF) on the in vitro development of
397 isolated goat secondary follicles and the relative mRNA expression of EGF, EGF-
398 R, FSH-R and P450 aromatase in cultured follicles. *Res Vet Sci [Internet].*
399 2013;94(3):453–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2012.12.002>
- 400 25. Wardowska A. M6a rna methylation in systemic autoimmune diseases—a new
401 target for epigenetic-based therapy? *Pharmaceuticals.* 2021;14(3).