

Fator de crescimento e diferenciação – 9 (GDF-9) aumenta a taxa de crescimento *in vitro* de folículos antrais iniciais caprinos isolados

Growth and differentiation factor – 9 (GDF-9) increases the *in vitro* growth rates of isolated goat early antral follicles

André Luiz da Conceição Santos^{1*}, Anna Clara Accioly Ferreira¹, Naiza Arcângela Ribeiro de Sá¹, Renato Félix da Silva¹, Gaby Judith Quispe Palomino¹, Éverton Pimentel Ferreira Lopes¹, Jesús Cadenas², Benner Geraldo Alves³, Juliana Jales de Hollanda Celestino⁴, Ana Paula Ribeiro Rodrigues¹, José Ricardo de Figueiredo¹

¹Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, Ceará, Brasil

²University Hospital of Copenhagen, Rigshospitalet, Copenhagen, Dinamarca

³Conception Biosciences, Berkeley, California, Estados Unidos

⁴Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro Brasileira (UNILAB), Redenção, Ceará, Brasil

*Autor correspondente: andreconceicao.mv@gmail.com

Resumo

Este estudo teve como objetivo investigar o efeito do GDF-9 durante o cultivo *in vitro* de folículos antrais iniciais caprinos isolados. Os folículos antrais iniciais isolados e selecionados foram cultivados individualmente por 18 dias, e os seguintes tratamentos foram testados: α MEM+ (tratamento controle) ou α -MEM+ suplementado com 200 ng/mL de GDF-9 (tratamento GDF-9). Os seguintes parâmetros foram avaliados: crescimento e morfologia folicular, produção de estradiol, maturação nuclear do oócito e expressão relativa de genes-chave relacionados a esteroidogênese (*CYP19A1*, *CYP17* e *receptor de insulina*) e remodelamento da membrana basal (*MMP-9* e *TIMP-2*). Em ambos os tratamentos, observou-se diminuição na porcentagem de folículos morfologicamente intactos com aumento concomitante nas taxas de folículos extrusos e degenerados ($P < 0,05$). O tratamento GDF-9 apresentou maiores taxas de folículos extrusos apenas no 6º dia de cultivo ($P < 0,05$). O diâmetro do folículo aumentou progressivamente ao longo do período de cultivo ($P < 0,05$) com diâmetros semelhantes entre os tratamentos em todos os tempos de cultivo ($P > 0,05$). O GDF-9 aumentou a taxa de crescimento diário do primeiro para o segundo terço de cultivo, sendo maior ($P < 0,05$) que o controle no segundo terço. A taxa de maturação oocitária assim como os níveis de estradiol e a expressão relativa de RNAm para os genes *CYP19A1*, *CYP17*, *MMP-9*, *TIMP-2* e *receptor de insulina* foram similares entre os tratamentos ($P > 0,05$). Em conclusão, este estudo mostra pela primeira vez que GDF-9 adicionado a um meio de cultivo aumentou a taxa de crescimento de folículos antrais iniciais caprinos cultivados *in vitro*.

Palavras-chave: cultivo *in vitro*; folículo antral; cabra; GDF-9

Abstract

This study aimed to investigate the effect of growth and differentiation factor 9 (GDF-9) during the *in vitro* culture of isolated caprine early antral follicles. The isolated and selected early antral follicles were individually cultured for 18 days, and the following treatments were tested: α -MEM⁺ (control treatment) or α -MEM⁺ supplemented with 200 ng/mL GDF-9. The following endpoints were evaluated: follicular growth and morphology, estradiol production, oocyte nuclear maturation, and relative expression of key genes related to steroidogenesis (*CYP19A1*, *CYP17*, and *insulin receptor*) and basement membrane remodeling (*MMP-9* and *TIMP-2*). In both treatments, a decrease was observed in the percentage of morphologically intact follicles with a concomitant increase in the rates of extruded and degenerated follicles ($P < 0.05$). The GDF-9 treatment showed higher rates of extruded follicles only on day 6 of culture ($P < 0.05$). Follicle diameter increased progressively throughout the culture period ($P < 0.05$) with similar diameters between treatments at all culture times ($P > 0.05$). Growth and differentiation factor 9 increased the daily growth rate from the first to the second third of culture, with higher values ($P < 0.05$) than control in the second third. Oocyte maturation rate as well as estradiol levels and relative mRNA expression for *CYP19A1*, *CYP17*, *MMP-9*, *TIMP-2*, and *insulin receptor* genes were similar between treatments ($P > 0.05$). This study shows for the first time that GDF-9 added to a culture medium increased the follicle growth rate of goat early antral follicles cultured *in vitro*.

Keywords: *in vitro* culture; antral follicle; goat; GDF-9

Recebido: 13 de janeiro de 2023. Aceito: 2 de junho de 2023. Publicado: 14 de agosto de 2023.



Este é um artigo de Acesso Aberto distribuído sob os termos da Creative Commons Attribution License, que permite uso, distribuição e reprodução irrestritos em qualquer meio, desde que o trabalho original seja devidamente citado.

<https://revistas.ufg.br/vet/index>

1. Introdução

A biotecnologia de cultivo folicular *in vitro* (CFIV) tem por objetivo recuperar e cultivar *in vitro* folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento para utilizá-los em tecnologias de reprodução assistida. Durante o CFIV, vários antioxidantes e fatores de crescimento como o anetol e o fator de crescimento e diferenciação-9 (GDF-9), respectivamente, têm um papel fundamental na foliculogênese *in vitro* quando adicionados aos meios de cultivo. O anetol ou *trans*-anetol (1-Metoxi-4[1-propenil]benzeno) é um fenilpropanóide natural com várias propriedades relacionadas, como a antioxidante, que pode ser obtido a partir de várias espécies de plantas⁽¹⁾. Recentemente, tem sido relatado resultados promissores com a adição de anetol durante o cultivo *in vitro* de folículos secundários caprinos, que aumentou as taxas de retomada da meiose dos oócitos e reduziu a concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs) quando comparado com outros antioxidantes, como o ácido ascórbico⁽¹⁾. Além disso, foi relatado pela primeira vez uma gestação após o cultivo *in vitro* de folículos antrais iniciais caprinos em meio contendo anetol⁽²⁾.

Outro aditivo que tem ganhado atenção para a utilização nos meios de CFIV é o fator de crescimento e diferenciação-9 (GDF-9), um membro da superfamília do fator de crescimento transformador-beta (TGF- β) derivado dos oócitos⁽³⁾ que está presente em todas as fases da foliculogênese *in vivo*⁽⁴⁾. *In vitro*, o GDF-9 manteve a sobrevivência, estimulou o crescimento do oócito e do folículo e promoveu a ativação do folículo primordial quando os folículos foram cultivados *in situ*, isto é, inseridos nos fragmentos de ovários de mulheres⁽⁵⁾ e de cabras⁽⁶⁾. Quando folículos pré-antrais foram cultivados na forma isolada, o GDF-9 estimulou o crescimento de folículos e oócitos de camundongos⁽⁷⁾. De acordo com isso, nosso grupo relatou os efeitos benéficos da adição de 200 ng/mL de GDF-9 a um meio contendo ácido ascórbico na sobrevivência de folículos pré-antrais caprinos isolados cultivados *in vitro*⁽⁸⁾. No entanto, ao nosso conhecimento, não existe informação sobre a influência do GDF-9 no cultivo *in vitro* de folículos antrais iniciais isolados em mamíferos.

Portanto, o presente estudo teve como objetivo investigar o efeito do GDF-9 durante o cultivo *in vitro* de folículos antrais iniciais caprinos isolados. Para tanto, os seguintes parâmetros foram avaliados: (1) crescimento e morfologia folicular, (2) produção de estradiol, (3) maturação nuclear do oócito e (4) expressão relativa de RNA mensageiro para genes relacionados com a esteroidogênese e o remodelamento da membrana basal.

2. Material e métodos

Todas as diretrizes internacionais, nacionais e/ou institucionais aplicáveis para o cuidado e uso de animais

foram seguidas. Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil - número 2422377/2016.

2.1 Produtos químicos e meios

Os reagentes e produtos químicos utilizados neste estudo foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA), salvo indicação em contrário.

2.2 Coleta de ovários, isolamento e seleção de folículos antrais iniciais

Os ovários (n = 60) de 30 cabras adultas e mestiças foram coletados em abatedouro local. Imediatamente após o abate, foram lavados em álcool (70%), seguido de duas lavagens em meio essencial mínimo (MEM) suplementado com penicilina (100 μ g/mL), estreptomicina (100 μ g/mL) e HEPES (25 mM), denominado MEM-HEPES. Os ovários foram transportados para o laboratório em meio MEM-HEPES no intervalo de 1 h, a 4 °C⁽⁹⁾. No laboratório, a gordura e o tecido conjuntivo que rodeiam os ovários foram mecanicamente removidos. Em seguida, foram obtidos fragmentos corticais (1 a 2 mm de espessura) com auxílio de uma lâmina cirúrgica (em condições estéreis). Os fragmentos foram colocados em meio MEM-HEPES. Os folículos antrais iniciais, com cerca de 300-350 μ m de diâmetro, foram visualizados em estereomicroscópio (SMZ 645 Nikon, Tóquio, Japão) e microdissecados manualmente a partir de fragmentos do córtex ovariano com agulhas de calibre 26 (26 G). Apenas os folículos morfologicamente viáveis foram selecionados para o cultivo *in vitro*⁽¹⁰⁾.

2.3 Meio de cultivo e cultivo *in vitro*

Os folículos selecionados foram cultivados individualmente em gotas de 100 μ L de meio de cultivo α -MEM (M5650, pH 7,2-7,4) suplementado com 3 mg/mL de albumina de soro bovino (BSA), 10 ng/mL de insulina, 5,5 μ g/mL de transferrina, 5 ng/mL de selênio, 2 mM de glutamina, 2 mM de hipoxantina, 0,911 mM de piruvato, 50 ng/mL de hormônio do crescimento (GH) e 300 μ g/mL de anetol, designado por α -MEM⁺⁽²⁾. A concentração de anetol (300 μ g/mL) foi utilizada com base em estudo anterior realizado pelo nosso grupo⁽¹⁾. Os seguintes tratamentos foram testados: α -MEM⁺ (controle) ou α -MEM⁺ suplementado com 200 ng/mL de GDF-9 (GDF-9). Nestas condições, os folículos foram cultivados durante 18 dias a 38,5°C e 7,5% de CO₂ sob óleo mineral. O meio fresco foi preparado antes da utilização e pré-equilibrado *overnight*, sendo substituído 60 μ L de meio em cada gota a cada dois dias de cultivo⁽²⁾. O experimento foi repetido cinco vezes e uma média de 12 ovários foram utilizados por réplica, sendo utilizados aproximadamente 65 folículos por tratamento.

2.4 Avaliação do desenvolvimento folicular

A morfologia e o crescimento folicular foram

avaliados a cada seis dias (dias 6, 12 e 18). Durante e após o cultivo, os folículos foram classificados de acordo com as suas características morfológicas em: folículos extrusos, caracterizados por terem a membrana basal rompida; folículos degenerados, quando apresentavam contorno irregular, oócito e/ou células da granulosa escurecidos e diâmetro reduzido; e folículos intactos, caracterizados quando translúcidos, com membrana basal intacta e rodeados por células da granulosa homogêneas e brilhantes, sem sinais de degeneração ou extrusão⁽¹¹⁾. A taxa de crescimento folicular em cada intervalo de cultivo (dias 0-6, 6-12 e 12-18) foi calculada considerando-se o diâmetro dos folículos durante o período em que permaneceram morfológicamente intactos, ou seja, o diâmetro final menos o diâmetro inicial do período considerado, dividido pelo número de dias de cultivo (6 dias). O diâmetro folicular foi medido apenas nos folículos intactos a partir da membrana basal e calculado utilizando-se a média de duas medidas perpendiculares de cada folículo por uma ocular micrométrica (aumento de 100X) inserido em um estereomicroscópio (SMZ 645 Nikon, Tóquio, Japão) a cada seis dias de cultivo (nos dias 0, 6, 12 e 18 de cultivo).

2.5 Maturação in vitro (MIV)

Ao final do cultivo, todos os folículos morfológicamente viáveis foram cuidadosa e mecanicamente abertos. Os complexos cumulus-oócitos (CCO) contendo oócitos com citoplasma homogêneo e rodeados por, pelo menos, uma camada compacta de células do cumulus foram selecionados para a MIV⁽¹¹⁾. O meio de MIV consistiu em meio de cultivo de tecidos-199 (TCM-199) suplementado com 1 µg/mL de 17β-estradiol, 5 µg/mL de hormônio luteinizante (LH), 0,5 µg/mL de rFSH, 10 ng/mL de fator de crescimento epidérmico (EGF), 1 mg/mL de BSA, 22 µg/mL de piruvato, 50 ng/mL de fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-I) e 100 µM de cisteamina⁽²⁾. Os CCO foram maturados individualmente a 38,5 °C em 7,5% de CO₂ durante 32 horas⁽¹¹⁾. O meio de MIV e o óleo mineral frescos foram preparados antes da utilização e pré-equilibrados *overnight*.

2.6 Avaliação da viabilidade e configuração da cromatina do oócito

Após a MIV, os CCO foram mecanicamente desnudados e incubados individualmente em gotas de 10 µL de PBS suplementado com 5,5 µg/mL de Hoechst 33342 e 1% de glutaraldeído, em temperatura ambiente, durante 30 minutos. Em seguida, os oócitos foram processados como descrito anteriormente⁽¹⁰⁾. Após a incubação, os oócitos foram lavados três vezes em PBS e montados com meio de montagem contendo 5 µg/mL de Hoechst 33342. A viabilidade dos oócitos e a configuração da cromatina foram avaliadas em microscópio de fluorescência (Nikon, Eclipse 80i,

Tóquio, Japão). De acordo com a configuração da cromatina, os oócitos foram classificados como vesícula germinal (VG), metáfase I (MI), metáfase II (MII) ou degenerados (DEG).

2.7 Extração de RNA da parede folicular e PCR em tempo real (RT-qPCR)

As amostras foram processadas como descrito anteriormente⁽¹²⁾. Foram coletados três *pools* de 10 paredes foliculares (células da granulosa e células teca) de folículos antrais iniciais de cada tratamento após o período de cultivo para isolamento do RNA total com o método do reagente Trizol[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A purificação do RNA total foi realizada com o PureLink[™] RNA Mini Kit (Ambion[®], Carlsbad, CA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Após a extração, a concentração de RNA foi determinada utilizando o sistema NanoDrop (Thermo Scientific NanoDrop Products), efetuada com 2 µL do material. Antes da síntese do cDNA, todas as amostras foram padronizadas com a mesma quantidade de RNA para minimizar a variabilidade da qPCR. Para a síntese de cDNA, foram seguidas as instruções do manual Superscript III RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), utilizando primers aleatórios (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) a partir de 1 ng de RNA total.

Os primers foram desenhados para efetuar a amplificação do RNAm da aromatase (*CYP19A1*), do citocromo P450 17α-hidroxilase/17,20-liase (*CYP17*), da metaloproteinase-9 (*MMP-9*), do inibidor tecidual de metaloproteinases-2 (*TIMP-2*) e do receptor de insulina (Tabela 1). Como controles endógenos, foram selecionados dois genes de referência para estudar a expressão e a estabilidade e normalizar a expressão dos genes em todas as amostras: gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (*GAPDH*) e peptidilproil isomerase A (*PPIA*). As reações foram realizadas com um Sistema de Detecção de PCR em tempo real IQ5 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). A detecção dos produtos de PCR foi medida através da monitorização do aumento da fluorescência emitida pelo marcador Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA). Para todas as amplificações, foi realizada uma curva de dissociação (curva de fusão) para a verificação de amplificações inespecíficas resultantes de contaminação. O ciclo térmico da qPCR foi o seguinte: desnaturação inicial e ativação da polimerase durante 15 min a 94°C, seguida de 40 ciclos de 15 s a 94°C, 30 s a 60°C e 45 s a 72°C. A extensão final foi de 10 min a 72°C. A quantificação das transcrições dos genes alvo foi calculada a partir da diferença dos valores dos valores Cq (threshold cycle PCR) em relação às transcrições do gene endógeno, *PPIA*. Inicialmente, foi determinada a média dos Cqs das três leituras de cada amostra, tanto do gene alvo como do gene endógeno. De cada amostra, a subtração do valor médio do Cqgene-alvo ao Cqgene-

endógeno forneceu o ΔCq . Subsequentemente, foi escolhido um ΔCq correspondente a um calibrador, normalizando todos os valores através da subtração do ΔCq resultante escolhido, para obter o $\Delta\Delta Cq$. Finalmente,

o valor final da quantificação relativa foi dado por $2^{\Delta\Delta Cq}$, em que o calibrador ou a amostra padrão escolhida foi igual a um⁽¹³⁾.

Tabela 1. Primers de oligo nucleotídeos utilizados para a análise PCR de folículos caprinos

Gene alvo	Sequência do primer (5'→3')	Sentido/anti-sentido *	Acesso ao banco de genes n°
<i>Receptor de insulina</i>	ATGCCCTGGTGTCACTTTCTTCT	S	XM_012177947.3 (<i>Ovis aries</i>)
	TTAGGTCTGGTTGTCCAAGGCGT	AS	
<i>CYP19A1</i>	CGGCATGCATGAGAAAGGCATCAT	S	NM_001285747.1 (<i>Capra hircus</i>)
	ACACGTCCACATAGCCCAAGTCAT	AS	
<i>CYP17</i>	ACTGAATGCCTTTGCCCTGT	S	NM_001314145.1 (<i>Capra hircus</i>)
	CTGATTATGTTGGTGATCC	AS	
<i>MMP9</i>	TTTCTCTGGCTCAGGCATCA	S	NM_001314269.1 (<i>Capra hircus</i>)
	GTTTCCGAAGTAGTTCGGGATCACA	AS	
<i>TIMP2</i>	AGAAGAAGAGCCTGAACCACAGGT	S	XM_018063674.1 (<i>Capra hircus</i>)
	TGATGTTCTTCTCCGTGACCCAGT	AS	
<i>GAPDH</i>	ATGCCTCCTGCACCACCA	S	XM_027541122.1 (<i>Ovis aries</i>)
	AGTCCCTCCACGATGCCAA	AS	
<i>PPIA</i>	TCATTTGCACTGCCAAGACTG	S	XM_018047035.1 (<i>Capra hircus</i>)
	TCATGCCCTCTTCACTTTGC	AS	

S, Sentido; AS, Anti-sentido. Fonte: Dados da própria investigação.

2.8 Ensaio de estradiol

A relação potencial entre o desenvolvimento folicular e a produção de estradiol nos folículos antrais iniciais foi investigada utilizando o meio de cultivo coletado no dia 18 do cultivo *in vitro* de cada tratamento e armazenado a -80 °C até a análise. Os níveis de estradiol foram medidos apenas no meio de cultivo a partir do qual os folículos produziram oócitos que retomaram a meiose após a maturação *in vitro*⁽¹⁴⁾. Foi utilizado um ensaio fluorescente ligado a uma enzima (ELFA), (Vidas® Estradiol II - 30431), e um analisador automático miniVIDAS® (bioMérieux SA, Lyon, França), para determinar as concentrações de estradiol. O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 5%.

2.9 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o programa Sigma Plot 11 (Systat Software Inc., EUA). A normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e a homogeneidade da variância (teste de Levene) foram previamente avaliadas. A comparação das médias foi analisada por ANOVA, seguida do teste posthoc de Student-Newman-Keuls. As variáveis proporcionais (intactos, degenerados, extrusos e retomada da meiose) foram analisadas entre os tratamentos e dias de cultivo pelo teste do qui-quadrado ou teste G. As diferenças foram consideradas significativas com $P < 0,05$ e os valores são apresentados como média (\pm erro padrão da média, EPM) ou porcentagens.

3. Resultados e discussão

Em ambos os tratamentos, observou-se uma diminuição na porcentagem de folículos morfológicamente intactos (Fig. 1A) com um aumento

concomitante nas taxas de folículos extrusos (Fig. 1B) e degenerados (Fig. 1C) ($P < 0,05$). Observou-se também que o tratamento com GDF-9 não afetou a porcentagem de folículos intactos em comparação com o tratamento controle nos diferentes intervalos de cultivo avaliados ($P > 0,05$). Num estudo recente, a adição de GDF-9 na mesma concentração que a utilizada neste estudo também não afetou a viabilidade de folículos pré-antrais incluídos em fragmentos ovarianos de cabras⁽¹⁵⁾. Além disso, a suplementação de GDF-9 durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos acrescida de concentrações fisiológicas de insulina (10 ng/mL) igualmente contidas no meio, parece ter sido desnecessária para o desenvolvimento folicular⁽¹⁶⁾. O resultado obtido neste estudo é semelhante aos resultados de trabalhos anteriores em que a adição de insulina (10 ng/mL), por si só, mostrou-se capaz de manter a viabilidade de folículos antrais isolados^(17,18). Isto sugere que a manutenção da viabilidade dos folículos antrais durante o cultivo *in vitro* não depende apenas de fatores específicos, como o GDF-9, mas está também relacionada com a riqueza da composição do meio como um todo, incluindo a insulina, a transferrina, o selênio e a suplementação com anetol. De fato, o anetol é um antioxidante promissor e estudos recentes demonstraram que o anetol aumentou a porcentagem de retomada da meiose de oócitos maduros após o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais tardios isolados de cabras⁽¹⁾. Além disso, o anetol foi capaz de aumentar a produção *in vitro* de embriões após a fertilização *in vitro* de oócitos caprinos provenientes do cultivo *in vitro* de folículos antrais iniciais⁽²⁾.

Em comparação com o tratamento controle, o tratamento com GDF-9 apresentou taxas mais elevadas de folículos extrusos apenas no sexto dia de cultivo ($P < 0,05$).

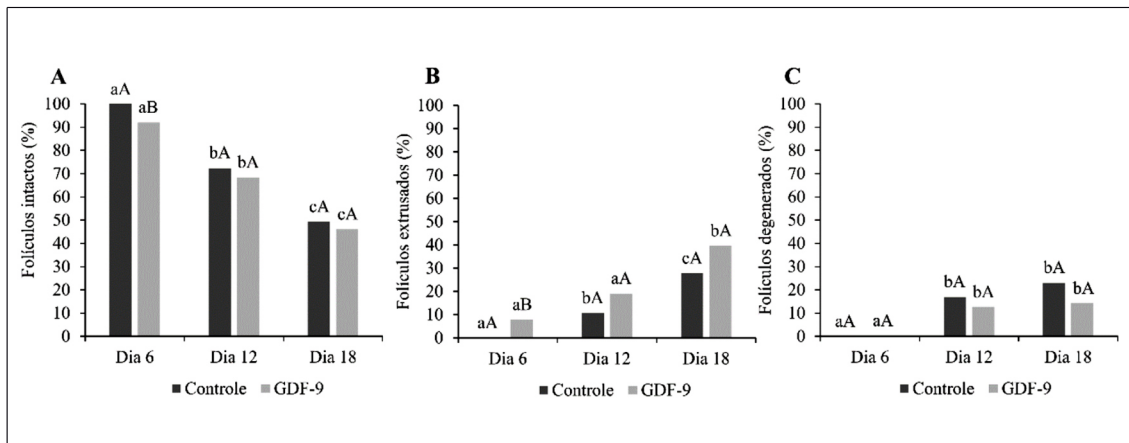


Figura 1. Percentagem de folicúlos antrais iniciais caprinos morfologicamente (A) íntegros, (B) extrusos e (C) degenerados nos dias 6, 12 e 18 de cultivo na ausência (tratamento controle) ou presença de GDF-9 (tratamento GDF-9). ^{a-c} Valores sem uma letra comum indicam uma diferença entre dias dentro do mesmo tratamento ($P < 0,05$). ^{A,B} Os valores sem uma letra comum indicam uma diferença entre os tratamentos ($P < 0,05$).

A preservação da parede folicular durante o crescimento do foliculo depende de um equilíbrio fino entre os fatores envolvidos no remodelamento da membrana basal, por exemplo, a metaloproteinase-9 da matriz (MMP-2 e MMP-9) e o inibidor tecidual de metaloproteinases-2 (TIMP-1 e TIMP-2)⁽¹⁹⁾. Embora o tratamento com GDF-9 tenha apresentado taxas mais elevadas de foliculos extrusos no sexto dia de cultivo, no final do período de cultivo (18º dia), as taxas de extrusão de foliculos eram semelhantes ($P > 0,05$) entre os

tratamentos. Estes resultados estão de acordo com a análise da expressão dos genes realizada no 18º dia de cultura que mostrou níveis equivalentes ($P > 0,05$) de mRNA para MMP-9 e TIMP-2 entre os tratamentos (figura 2). O diâmetro do foliculo aumentou progressivamente ao longo do período de cultura ($P < 0,05$) com diâmetros semelhantes entre os tratamentos em todos os intervalos de cultivo ($P > 0,05$), conforme mostrado na tabela 2.

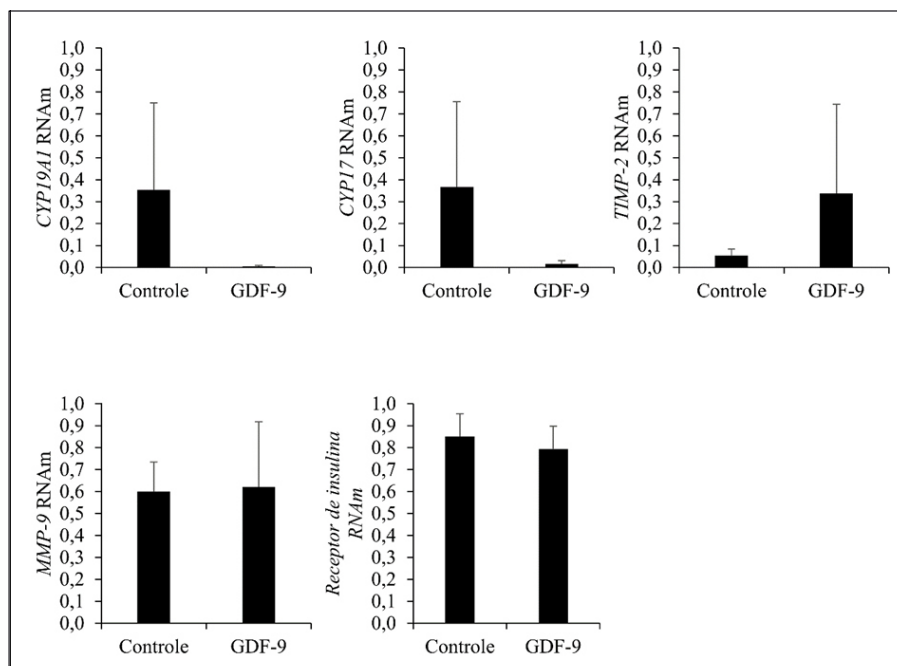


Figura 2. Expressão média (\pm EPM) relativa do RNAm de *CYP19A1*, *CYP17*, *TIMP-2*, *MMP-9* e *receptor de insulina* em foliculos antrais iniciais de cabras cultivados durante 18 dias na ausência (tratamento controle) ou na presença de GDF-9 (tratamento GDF-9). Entre os tratamentos ($P > 0,05$).

Tabela 2. Diâmetro folicular médio (\pm EPM) dos folículos antrais iniciais caprinos cultivados na ausência (tratamento controle) ou na presença de GDF-9 (tratamento GDF-9)

Tratamentos (n)	Diâmetro folicular (mm)			
	Dia 0	Dia 6	Dia 12	Dia 18
Controle (63)	328.2 \pm 3.7 ^{ab}	384.4 \pm 8.3 ^{ba}	425.8 \pm 11.6 ^{ca}	477.6 \pm 16.8 ^{da}
GDF-9 (65)	323.4 \pm 2.8 ^{ab}	365.9 \pm 5.9 ^{ba}	436.4 \pm 10.1 ^{ca}	474.0 \pm 15.4 ^{da}

Abreviações: EPM, erro padrão da média. ^{a-d} Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os períodos de cultivo dentro do mesmo tratamento ($P < 0,05$). Fonte: Dados da própria pesquisa.

Por outro lado, o GDF-9 aumentou a taxa de crescimento diário do primeiro para o segundo terço do cultivo, sendo superior ($P < 0,05$) ao controle no segundo terço (Tabela 3). No entanto, essa diferença se dissipou no último terço do cultivo (dias 12-18). Diferentemente do nosso estudo, um trabalho anterior demonstrou que o GDF-9 promoveu o crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais humanos inclusos em tecido ovariano, estimulando a proliferação e diferenciação das células da granulosa⁽⁵⁾. As diferenças entre o sistema de cultivo (isolado *vs.* *in situ*) e as fases do folículo (pré-antral *vs.* antral inicial) podem explicar estes resultados. Adicionalmente, o efeito do GDF-9 promovendo um aumento na taxa de crescimento dos folículos antrais do

primeiro para o segundo terço do cultivo *in vitro* pode estar associado ao efeito mitogênico desta substância nas células da granulosa. Em um estudo prévio, observou-se que o GDF-9 estimulou a progressão das fases G0 e G1 para a fase S, e da fase S para a fase M do ciclo celular de células da granulosa luteinizadas humanas cultivadas *in vitro*⁽²⁰⁾. Uma possível resposta para o efeito transitório do GDF-9 para esse parâmetro pode estar ligada ao perfil transcricional das células da granulosa e do oócito, embora apresentem receptores BMPR-II em todos os estágios foliculares⁽⁴⁾, o GDF-9 parece ser mais requerido nas fases iniciais do desenvolvimento folicular, e durante os eventos de ovulação e maturação do oócito, na espécie caprina.

Tabela 3. Média (\pm EPM) das taxas de crescimento folicular em cada intervalo de cultivo ($\mu\text{m}/\text{dia}$) e concentração de estradiol (pg/mL) de folículos antrais iniciais caprinos cultivados na ausência (tratamento controle) ou na presença de GDF-9 (tratamento GDF-9)

Tratamentos (n)	Taxas médias de crescimento folicular em cada intervalo de cultivo (μm)			E2 (pg/mL)
	Dias 0-6	Dias 6-12	Dias 12-18	Dia 18
Controle (65)	9.4 \pm 1.0 ^{ab}	7.0 \pm 0.8 ^{ab}	6.7 \pm 1.0 ^{ab}	146.4 \pm 32.2 ^A
GDF-9 (63)	7.2 \pm 0.7 ^{ab}	11.6 \pm 1.0 ^{bb}	7.2 \pm 1.1 ^{ab}	146.8 \pm 54.8 ^A

Abreviaturas: EPM, erro padrão da média. ^{ab} Letras diferentes dentro de uma coluna denotam diferenças significativas entre os tratamentos no mesmo ponto de tempo ($P < 0,05$). ^{ab} Letras diferentes denotam diferenças significativas entre os períodos de cultivo dentro do mesmo tratamento ($P < 0,05$). Fonte: Dados da própria pesquisa.

Todos os outros parâmetros avaliados no dia 18 foram comparáveis entre os dois tratamentos, ou seja, a produção de estradiol (Tabela 3), os níveis de RNAm para o receptor de insulina, *CYP19A1*, *CYP17* (Figura 2) e as taxas de sobrevivência, crescimento e maturação de oócitos ($P > 0,05$), os últimos mostrados na tabela 4. A

expressão de RNAm para genes-chave relacionados com a esteroidogênese, bem como a produção de estradiol⁽²¹⁾, mostrou que tanto o controle como o tratamento com GDF-9 proporcionaram condições adequadas para o desenvolvimento folicular *in vitro*.

Tabela 4. Média (\pm EPM) do diâmetro dos oócitos e percentagens de oócitos degenerados, vesícula germinativa, retomada da meiose, metáfase I e metáfase II de folículos antrais iniciais de cabras cultivados durante 18 dias na ausência (tratamento controle) ou na presença de GDF-9 (tratamento GDF-9)

Tratamentos (n)	Diâmetro do oócito (μm)	DEG (%)	VG (%)	Retomada da meiose (%)	MI (%)	MII (%)
Controle (65)	113.8 \pm 2.3 ^A	49.23 (32/65) ^A	13.85 (9/65) ^A	36.92 (24/65) ^A	9.23 (6/65) ^A	23.08 (15/65) ^A
GDF-9 (63)	108.5 \pm 2.2 ^A	38.10 (24/63) ^A	19.05 (12/63) ^A	42.86 (27/63) ^A	19.05 (12/63) ^A	19.05 (12/63) ^A

Abreviaturas: EPM, erro padrão da média; vesícula germinativa, VG; oócito degenerado, DEG; metáfase I, MI; e metáfase II, MII. Fonte: Dados da própria pesquisa.

No presente estudo, a adição de GDF-9 estimulou o crescimento folicular durante o cultivo, mas não afetou nenhum outro parâmetro estudado. Uma possível explicação para estes resultados é a elevada qualidade do meio de base utilizado no presente estudo, que continha,

entre outros suplementos, anetol. De fato, o anetol adicionado durante o CFIV de folículos antrais iniciais caprinos já havia demonstrado aumentar o crescimento folicular, a produção de estradiol, o crescimento de oócitos, a maturação e a produção de embriões *in vitro*⁽²⁾.

4. Conclusão

Em conclusão, este estudo mostrou pela primeira vez que o GDF-9 adicionado a um meio de cultura contendo anetol aumentou a taxa de crescimento folicular de folículos antrais iniciais isolados de cabras e cultivados *in vitro*. No entanto, não teve qualquer efeito na produção de estradiol ou na maturação de oócitos *in vitro*. Tendo em conta a importância fisiológica do GDF-9 durante a ativação e o desenvolvimento folicular subsequente *in vivo*, seria muito importante que futuros estudos investigassem o efeito da adição de GDF-9 durante o cultivo *in vitro* de folículos na produção *in vitro* de embriões.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Contribuições do autor

Conceituação: A. L. C. Santos, A. C. A. Ferreira, J. R. Figueiredo. **Curadoria de dados:** A. L. C. Santos, A. C. A. Ferreira, J. J. H. Celestino e J. R. Figueiredo. **Análise formal:** B. G. Alves. **Metodologia:** A. L. C. Santos, A. C. A. Ferreira, N. A. R. Sá, R. F. Silva, G. J. Q. Palomino, J. Cadenas, E. P. F. Lopes. **Supervisão:** A. P. R. Rodrigues e J. R. Figueiredo. **Redação, revisão e edição:** A. L. C. Santos, J. Cadenas, A. C. A. Ferreira, J. J. H. Celestino e J. R. Figueiredo.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer às agências de fomento à pesquisa do Brasil. Esta pesquisa foi financiada por bolsas do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-79/2013 área 3 - Rede Nordeste de Biotecnologia, e Rede de Pesquisa em Ovários Artificiais, processo no. 407594/2013-2). André Santos foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil.

Referências

- Sá NAR, Araújo VR, Correia HHV, Ferreira ACA, Guerreiro DD, Sampaio AM, et al. Anethole improves the *in vitro* development of isolated caprine secondary follicles. *Theriogenology*. 2017;1(89):226–34. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.12.014>
- Sá NAR, Ferreira ACA, Sousa FGC, Duarte ABG, Paes VM, Cadenas J, et al. First pregnancy after *in vitro* culture of early antral follicles in goats: Positive effects of anethole on follicle development and steroidogenesis. *Mol Reprod Dev*. 2020;87(9):966–77. <https://doi.org/10.1002/mrd.23410>
- Elvin JA, Clark AT, Wang P, Wolfman NM, Matzuk MM. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Mol Endocrinol*. 1999;13(6):1035–48. <https://doi.org/10.1210/mend.13.6.0310>
- Silva JRV, Van Den Hurk R, Van Tol HTA, Roelen BAJ, Figueiredo JR. Expression of growth differentiation factor 9 (GDF9), bone morphogenetic protein 15 (BMP15), and BMP receptors in the ovaries of goats. *Mol Reprod Dev*. 2005;70(1):11–

9. <https://doi.org/10.1002/mrd.20127>

- Hreinsson JG, Scott JE, Rasmussen C, Swahn ML, Hsueh AJW, Hovatta O. Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(1):316–21. <https://doi.org/10.1210/jcem.87.1.8185>
- Martins FS, Celestino JJH, Saraiva MVA, Matos MHT, Bruno JB, Rocha CMC, et al. Growth and differentiation factor-9 stimulates activation of goat primordial follicles *in vitro* and their progression to secondary follicles. *Reprod Fertil Dev*. 2008;20(8):916–24. <https://doi.org/10.1071/RD08108>
- Cook-Andersen H, Curnow KJ, Su HI, Chang RJ, Shimasaki S. Growth and differentiation factor 9 promotes oocyte growth at the primary but not the early secondary stage in three-dimensional follicle culture. *J Assist Reprod Genet*. 2016;33(8):1067–77. <https://doi.org/10.1007/s10815-016-0719-z>
- Almeida AP, Saraiva MVA, Araújo VR, Magalhães DM, Duarte ABG, Frota IMA, et al. Expression of growth and differentiation factor 9 (GDF-9) and its effect on the *in vitro* culture of caprine preantral ovarian follicles. *Small Rumin Res*. 2011;100(2–3):169–76. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2011.06.001>
- Chaves RN, Martins FS, Saraiva MVA, Celestino JJH, Lopes CAP, Correia JC, et al. Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured *in vitro*. *Reprod Fertil Dev*. 2008;20(5):640–7. <https://doi.org/10.1071/RD07195>
- Cadenas J, Leiva-Revilla J, Vieira LA, Apolloni LB, Aguiar FLN, Alves BG, et al. Caprine ovarian follicle requirements differ between preantral and early antral stages after IVC in medium supplemented with GH and VEGF alone or in combination. *Theriogenology*. 2017;87:321–32. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.008>
- Cadenas J, Maside C, Ferreira ACA, Vieira LA, Leiva-Revilla J, Paes VM, et al. Relationship between follicular dynamics and oocyte maturation during *in vitro* culture as a non-invasive sign of caprine oocyte meiotic competence. *Theriogenology*. 2018;107:95–103. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.10.038>
- Jiatsa Donfack N, Alves KA, Alves BG, Pedrosa Rocha RM, Bruno JB, Lobo CH, et al. Xenotransplantation of goat ovary as an alternative to analyse follicles after vitrification. *Reprod Domest Anim*. 2019;54(2):216–24. <https://doi.org/10.1111/rda.13340>
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*. 2001;25(4):402–8. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Ferreira ACA, Cadenas J, Sá NAR, Correia HHV, Guerreiro DD, Lobo CH, et al. *In vitro* culture of isolated preantral and antral follicles of goats using human recombinant FSH: Concentration-dependent and stage-specific effect. *Anim Reprod Sci*. 2018;196:120–9. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.07.004>
- Campos LB, Silva AM, Praxedes ÉCG, Bezerra LGP, Freitas JLS, Melo LM, et al. Effect of growth differentiation factor 9 (GDF-9) on *in vitro* development of collared peccary preantral follicles in ovarian tissues. *Anim Reprod Sci*. 2021;226:106717. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106717>
- Dipaz-Berrocá DJ, Sá NAR, Guerreiro DD, Celestino JJH, Leiva-Revilla J, Alves BG, et al. Refining insulin concentrations in culture medium containing growth factors BMP15 and GDF9: An *in vitro* study of the effects on follicle development

of goats. *Anim Reprod Sci.* 2017;185:118–27. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2017.08.011>

17. Chaves RN, Duarte ABG, Rodrigues GQ, Celestino JJH, Silva GM, Lopes CAP, et al. The Effects of Insulin and Follicle-Simulating Hormone (FSH) During *In vitro* Development of Ovarian Goat Preantral Follicles and the Relative mRNA Expression for Insulin and FSH Receptors and Cytochrome P450 Aromatase in Cultured Follicles1. *Biol Reprod.* 2012;87(3):1–11. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.099010>

18. Ferreira ACA, Maside C, Sá NAR, Guerreiro DD, Correia HHV, Leiva-Revilla J, et al. Balance of insulin and FSH concentrations improves the *in vitro* development of isolated goat preantral follicles in medium containing GH. *Anim Reprod Sci.* 2016;165:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2015.10.010>

19. Peralta MB, Baravalle ME, Belotti EM, Stassi AF, Salvetti NR, Ortega HH, et al. Involvement of Matrix Metalloproteinases and their Inhibitors in Bovine Cystic Ovarian Disease. *J Comp Pathol.* 2017;156(2–3):191–201. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2016.10.012>

20. Huang Q, Cheung AP, Zhang Y, Huang HF, Auersperg N, Leung PCK. Effects of growth differentiation factor 9 on cell cycle regulators and ERK42/44 in human granulosa cell proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;296(6):1344–53. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90929.2008>

21. Farkas S, Szabó A, Hegyi AE, Török B, Fazekas CL, Ernszt D, Kovács T, Zelena D. Estradiol and Estrogen-like Alternative Therapies in Use: The Importance of the Selective and Non-Classical Actions. *Biomedicines.* 2022;10(4):861. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10040861>