

# MANIPULAÇÃO DE OÓCITOS INCLUSOS EM FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIS E A IMPORTÂNCIA DOS ANTIOXIDANTES – REVISÃO DE LITERATURA

Larissa Zamparone Bergamo<sup>1</sup>  
Cecilia Aparecida Spada<sup>2</sup>  
Nathalia Souza Jamarchi<sup>3</sup>  
Camila Bizarro da Silva<sup>4</sup>  
Denis Vinicius Bonato<sup>5</sup>  
Marcelo Marcondes Seneda<sup>6</sup>

BERGAMO, L. Z.; SPADA, C. A.; JAMARCHI, N. S.; SILVA, C. B. DA.; BONATO, D. V.; SENEDA, M. M. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais e a importância dos antioxidantes – revisão de literatura. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**. Umuarama. v. 26, n. 3, p. 1313-1324, set./dez. 2022.

**RESUMO:** A manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA) vem sendo estudada pensando na perspectiva futura de aplicação direta na reprodução humana, principalmente para mulheres que sofrem de doenças ou que precisam passar por tratamentos que interferem na função ovariana. Nesse contexto, o objetivo deste trabalho é revisar aspectos relacionados com a biotécnica de MOIFOPA e a importância dos antioxidantes no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais. Foi realizada uma pesquisa na base de dados PubMed, buscando artigos sobre a biotécnica, principalmente relacionados com a necessidade do uso de antioxidantes no cultivo. A grande maioria dos estudos sobre a biotécnica utilizam como modelo experimental os folículos ovarianos de diferentes espécies de animais. A MOIFOPA compreende o isolamento e o resgate de folículos ovarianos pré-antrais provenientes de ovários, seguido da conservação através da técnica de resfriamento ou congelamento e o cultivo folicular *in vitro*, a fim de promover o crescimento, a maturação e a fecundação *in vitro* (FIV) dos oócitos inclusos nesses folículos, maximizando o potencial reprodutivo feminino e diminuindo a atresia folicular que acontece *in vivo*. Um aspecto que pode interferir no sucesso do cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais é a produção em excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs). Os ácidos ascórbico e alfa lipóico vem demonstrando resultados interessantes para reduzir os efeitos que as EROs causam sobre os folículos ovarianos pré-antrais cultivados *in vitro*.

**PALAVRAS-CHAVE:** Biotecnologias reprodutivas; Cultivo de folículos ovarianos pré-antrais; Espécies reativas de oxigênio.

## MANIPULATION OF OOCYTES INCLUDED IN PREANTRAL OVARIAN FOLLICLES AND THE IMPORTANCE OF ANTIOXIDANTS – LITERATURE REVIEW

**ABSTRACT:** The manipulation of oocytes included in preantral ovarian follicles (MOEPF) has been studied considering the future perspective of direct application in human reproduction, especially for women who suffer from diseases or who need to undergo treatments that interfere with ovarian function. In this context, the objective of this paper is to review aspects related to the biotechnology

DOI: [10.25110/arqsaude.v26i3.20228997](https://doi.org/10.25110/arqsaude.v26i3.20228997)

<sup>1</sup> Doutora em Ciência Animal. Universidade Estadual de Londrina (UEL). E-mail: [larissabergamo1@hotmail.com](mailto:larissabergamo1@hotmail.com)

<sup>2</sup> Doutoranda em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos. Universidade Paranaense (UNIPAR).

E-mail: [cecilia.spada@edu.unipar.br](mailto:cecilia.spada@edu.unipar.br)

<sup>3</sup> Mestranda em Ciência Animal com Ênfase em Produtos Bioativos. Universidade Paranaense (UNIPAR).

E-mail: [n.jamarchi@edu.unipar.br](mailto:n.jamarchi@edu.unipar.br)

<sup>4</sup> Doutora em Ciência Animal. Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR).

E-mail: [camilabizarros@gmail.com](mailto:camilabizarros@gmail.com)

<sup>5</sup> Doutor em Ciência Animal. Universidade Paranaense (UNIPAR). E-mail: [denisbonato@prof.unipar.br](mailto:denisbonato@prof.unipar.br)

<sup>6</sup> Doutor em Medicina Veterinária. Universidade Estadual de Londrina (UEL). E-mail: [marcelo.seneda@uel.br](mailto:marcelo.seneda@uel.br)

of MOIFOPA and the importance of antioxidants. A search was carried out in the PubMed database, searching for articles on biotechnology, mainly related to the need to use antioxidants in cultivation. The vast majority of studies on biotechnology use ovarian follicles from different species of animals as an experimental model. MOIFOPA comprises the isolation and rescue of preantral ovarian follicles from ovaries, followed by conservation through the cooling or freezing technique and *in vitro* follicular cultivation, in order to promote growth, maturation and *in vitro* fertilization (IVF) of the oocytes included in these follicles, maximizing the female reproductive potential and decreasing the follicular atresia that occurs *in vivo*. One aspect that may interfere with the success of *in vitro* culture of preantral ovarian follicles is the excess production of reactive oxygen species (ROS). Ascorbic and alpha lipoic acids have shown interesting results in reducing the effects that ROS cause on *in vitro* cultured preantral ovarian follicles.

**KEYWORDS:** Reproductive biotechnology; Cultivation of preantral ovarian follicles; Reactive oxygen species.

## MANIPULACIÓN DE OVOCITOS INCLUIDOS EN FOLÍCULOS OVÁRICOS PREANTRALES E IMPORTANCIA DE LOS ANTIOXIDANTES - REVISIÓN DE LA LITERATURA

**RESUMEN:** La manipulación de ovocitos incluidos en folículos ováricos preantrales (MOIFOPA) se ha estudiado con la perspectiva futura de su aplicación directa en la reproducción humana, especialmente en mujeres que padecen enfermedades o que necesitan someterse a tratamientos que interfieren en la función ovárica. En este contexto, el objetivo de este trabajo es revisar los aspectos relacionados con la biotécnica de MOIFOPA y la importancia de los antioxidantes en el cultivo *in vitro* de los folículos pré-antrais. Se realizó una investigación en la base de datos PubMed, buscando artículos sobre la biotecnología, principalmente relacionados con la necesidad del uso de antioxidantes en el cultivo. La mayoría de los estudios sobre biotecnología utilizan como modelo experimental los folículos ováricos de diferentes especies de animales. El MOIFOPA incluye el aislamiento y rescate de los folículos ováricos preantrales de los ovarios, seguido de su conservación mediante la técnica de enfriamiento o congelación y el cultivo folicular *in vitro*, con el fin de promover el crecimiento, la maduración y la fecundación *in vitro* (FIV) de los ovocitos incluidos en estos folículos, maximizando el potencial reproductivo femenino y disminuyendo la atresia folicular que se produce *in vivo*. Un aspecto que puede interferir en el éxito del cultivo *in vitro* de folículos ováricos preantrales es la producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS). El ácido ascórbico y el ácido alfa lipoico han mostrado resultados interesantes para reducir los efectos que causan las ERO en los folículos ováricos preantrales cultivados *in vitro*.

**PALABRAS CLAVE:** Biotecnologías reproductivas; Cultivo de folículos ováricos preantrales; Especies reactivas de oxígeno.

---

### 1. INTRODUÇÃO

As biotécnicas de inseminação artificial e fertilização *in vitro* são amplamente empregadas com intuito de possibilitar que mulheres com problemas de fertilidade consigam desenvolver com sucesso a gestação (LÁNSKÁ et al., 2015; KUSHNIR et al., 2022). Entretanto, outras biotécnicas, como a manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA), vem sendo estudadas pensando na perspectiva futura de aplicação direta na reprodução humana, principalmente para mulheres que sofrem de doenças ou que precisam passar por tratamentos que interferem na função ovariana, como por exemplo a quimioterapia para tratamento de câncer (BIZARRO-SILVA; SENEDA, 2021). Contudo, a grande maioria dos estudos sobre a biotécnica utilizam como modelo

experimental os folículos ovarianos de diferentes espécies de animais (DANIEL; ARMSTRONG; GORELANGTON, 1989; ROSSETTO *et al.*, 2013; DE SÁ *et al.*, 2020). Isso ocorre principalmente devido a maior facilidade de conseguir ovários de animais para realização de pesquisas (BERGAMO *et al.*, 2021a).

Estudos relacionados com a MOIFOPA objetivam incrementar a eficiência reprodutiva, sendo a chave para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na foliculogênese e no desenvolvimento dos folículos ovarianos pré-antrais (ANDRADE *et al.*, 2012; ARAÚJO *et al.*, 2014; DE SÁ *et al.*, 2020). A MOIFOPA compreende o isolamento e o resgate de folículos ovarianos pré-antrais provenientes de ovários, seguido da conservação através da técnica de resfriamento ou congelamento e cultivo folicular *in vitro*, a fim de promover o crescimento, a maturação e a fecundação *in vitro* (FIV) dos oócitos inclusos nesses folículos, maximizando o potencial reprodutivo feminino e diminuindo a atresia folicular que acontece *in vivo* (FIGUEIREDO *et al.*, 2007). Oócitos provenientes de folículos ovarianos pré-antrais podem crescer, adquirir competência meiótica, serem fecundados *in vitro* e chegar até o estágio de blastocisto (HIRAO *et al.*, 1994; HUANMIN; YONG, 2000; WU; CARREL; WILCOX, 2001; GUPTA RAMESH; MANJUNATHA, 2008; ARUNAKUMARI; SHANMUGASUNDARAM; RAO, 2010; MAGALHÃES *et al.*, 2010; SARAIVA *et al.*, 2010).

O cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais é utilizado para elucidar as diferentes substâncias envolvidas no desenvolvimento folicular. Adicionalmente, para que biotécnicas relacionadas com o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais sejam aplicadas em larga escala, ainda são necessários estudos que avaliem os meios de cultivo e as demais substâncias necessárias para o desenvolvimento folicular, tais como os fatores de crescimento, antioxidantes e hormônios (SILVA *et al.*, 2017; DE SÁ *et al.*, 2020).

Outro aspecto que pode interferir no sucesso e na aplicabilidade prática da biotécnica de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais é a produção em excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs). Desta forma, a suplementação do meio de cultivo *in vitro* com substâncias antioxidantes, como o Ácido Ascórbico e o Ácido Alfa Lipóico, objetiva equilibrar a formação de EROs produzidas em maiores quantidades no cultivo *in vitro* (ROSSETTO *ET AL.*, 2009; SILVA *et al.*, 2011; TALEBI *et al.*, 2012; GOMES *et al.*, 2015; 2018). Substâncias antioxidantes proporcionam benefícios nos estágios iniciais de desenvolvimento dos folículos ovarianos, diminuindo os danos causados pelos radicais livres, tanto *in vivo* como *in vitro* (BERGAMO *et al.* 2021b). O Ácido Ascórbico e o Ácido Alfa Lipóico são substâncias que promovem a diminuição dos níveis de EROs presentes nas células, capazes de prevenir tanto a apoptose folicular espontânea como a induzida por estresse (WANG *et al.*, 2002). Nesse contexto, o objetivo desse trabalho é revisar aspectos relacionados com a biotécnica de MOIFOPA e a importância dos antioxidantes.

## 2. MANIPULAÇÃO DE OÓCITOS INCLUSOS EM FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIS (MOIFOPA)

A MOIFOPA é uma biotécnica da reprodução que vem sendo amplamente estudada. O principal objetivo da técnica é promover o desenvolvimento e a maturação dos oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais, bem como manter sua viabilidade, a fim de se evitar a atresia folicular e possibilitar sua utilização em diversas biotécnicas como a FIV, transgenia e clonagem (FIGUEIREDO et al., 2008; LIMA; SANTOS, 2010). A MOIFOPA também contribui para o esclarecimento de mecanismos envolvidos na foliculogênese inicial, visando a multiplicação de animais de alto valor zootécnico ou em risco de extinção.

A base da técnica consiste na obtenção de folículos pré-antrais de ovários a partir de fragmentos ovarianos ou isolamento folicular para serem cultivados *in vitro* até a completa maturação (FIGUEIREDO et al., 2008). As recentes melhorias nos métodos disponíveis para o estudo da ativação do folículo primordial e o conhecimento dos processos celulares e vias de sinalização envolvidos abriram novas perspectivas. Em espécies domésticas, este é um processo longo e exige a compreensão dos efeitos fisiológicos e farmacológicos. Para muitas espécies, os resultados *in vitro* ainda são limitados, provavelmente devido à falta de harmonia entre crescimento e diferenciação do oócito e das células somáticas que o circundam durante o processo de desenvolvimento do folículo ovariano pré-antral (SILVA; VAN DEN HURK; FIGUEIREDO, 2016).

Os primeiros estudos referentes à biotécnica da MOIFOPA datam da década de 80, apresentando resultados satisfatórios em diversas espécies, como por exemplo, em suínos (HIRAO ET AL., 1994; WU; CARREL; WILCOX, 2001), bubalinos (GUPTA RAMESH; MANJUNATHA, 2008), ovinos (ARUNAKUMARI; SHANMUGASUNDARAM; RAO, 2010) e caprinos (HUANMIN; YONG, 2000; MAGALHÃES et al., 2010; SARAIVA et al., 2010). Já foi demonstrado que os oócitos provenientes de folículos ovarianos pré-antrais podem crescer, adquirir competência meiótica, serem fecundados *in vitro* e chegar até o estágio de blastocisto. Para a espécie humana (ROY; TREACY, 1993) e bovina (MCCAFERRY et al., 2000; ROSSETTO et al., 2013), folículos ovarianos pré-antrais foram isolados e cultivados até a fase de folículo antral. Em ratos relatou-se a produção *in vitro* de embriões (DANIEL; ARMSTRONG; GORELANGTON, 1989) e em camundongos obtiveram o nascimento a partir de folículos ovarianos pré-antrais que foram maturados e fecundados *in vitro* (EPPIG; SCHROEDER, 1989). E mais recentemente, foi relatada a primeira gestação em cabras após o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais (DE SÁ et al., 2020).

### 3. CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIOS

Vários foram os sistemas de cultivo desenvolvidos variando de acordo com a espécie estudada, o tipo de meio e o sistema utilizados (FORTUNE, 1994). Para que o sistema de cultivo promova um eficiente desenvolvimento dos folículos ovarianos pré-antrais pelo menos três condições básicas devem ser fornecidas pelo modelo “ideal” de cultivo. Entre essas, o sistema de cultivo deve manter a viabilidade dos folículos, preservar sua morfologia pré-existente *in vivo* e proporcionar o crescimento e a maturação folicular. Apesar dos avanços já obtidos, principalmente em animais domésticos, os sistemas de cultivo existentes ainda não atendem completamente todos os requisitos “ideais” de cultivo (FIGUEIREDO *et al.*, 2008; NÓBREGA JUNIOR *et al.*, 2014).

Os sistemas de cultivo comumente utilizados compreendem o cultivo *in situ*, em que fragmentos do córtex ovariano são obtidos dos ovários, ou ainda, é realizado o cultivo isolado do folículo. O cultivo *in situ* tem o objetivo de avaliar a ativação dos folículos primordiais e posteriormente o crescimento dos folículos primários. Além de trazer vantagens como praticidade, o cultivo *in situ* proporciona a manutenção da integridade dos folículos inclusos nos fragmentos dos ovários e a interação destes com as células do estroma ovariano (ABIR *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2015). Já o cultivo de folículos ovarianos pré-antrais isolados utiliza métodos mecânicos e/ou enzimáticos para realizar o isolamento dos folículos. Esse sistema apresenta como vantagem o acompanhamento individual dos folículos durante o período de cultivo, além de favorecer uma maior está faltando um pedaço do paragrafo manutenção do meio para o folículo (ABIR *et al.*, 2006).

Outro fator que influencia a capacidade do folículo em responder aos diversos estímulos é o substrato com que o folículo mantém contato. No sistema bidimensional, o folículo é cultivado sobre uma placa de cultivo, envolto ou não por ágar, por compostos da matriz extracelular purificados (colágeno do tipo I, fibronectina ou matrigel), ou ainda por uma monocamada de células somáticas (CGs, fibroblastos e outros componentes do tecido ovariano)(FIGUEIREDO *et al.*, 2008). No modelo de sistema tridimensional, o folículo é cultivado no interior do substrato, ou seja, o folículo fica completamente envolto pelo substrato utilizado, desta forma, o crescimento do oócito e a proliferação das células da granulosa ocorre de forma radial, iniciando no centro do folículo. Os substratos mais usados, nesse sistema, são: colágeno do tipo I, ágar ou polissacarídeo biocompatível, conhecido como hidrogel de alginato (BRITO *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2015;).

A composição do meio de cultivo também é fator essencial para obtenção do sucesso durante o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais, que geralmente, tendem a impedir a atresia folicular, através da inclusão de diversas substâncias, como uma fonte de proteína, antibióticos (penicilina e estreptomicina), selênio, piruvato, glutamina, fatores de crescimento (IGF, EGF, ativina-A, GDF-9 e FGFb), hormônios (insulina, FSH, GH e TSH) e esteroides (estradiol, testosterona ou androstenediona)(RODRIGUES *et al.*, 2010; ANDRADE *et al.*, 2012; LEITÃO *et al.*, 2014).

O Meio Essencial Mínimo (MEM+) é utilizado tanto para o cultivo de tecido ovariano quanto de folículos pré-antrais isolados (SILVA et al., 2004; MATOS et al., 2007; ROSSETTO et al., 2013). No entanto, quando os folículos ovarianos são cultivados *in vitro*, são expostos a grande estresse oxidativo em consequência à exposição à luz, às elevadas concentrações de oxigênio e às concentrações variáveis de substratos metabólicos. A adição de antioxidantes ao meio de cultivo pode ser a chave para proteger os folículos das espécies reativas de oxigênio durante o desenvolvimento *in vitro* (GOMES et al., 2018).

A biotécnica do cultivo *in vitro* é de alta importância para a pesquisa básica, na elucidação dos mecanismos presentes na fase pré-antral da foliculogênese e para a reprodução animal (LIMA; SANTOS, 2010; SÁNCHEZ; SMITZ, 2012), assim como na reprodução humana, uma vez que muitas mulheres sofrem de doenças que comprometem direta ou indiretamente a fertilidade. O cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais ainda não é uma técnica amplamente utilizada na prática devido aos métodos de desenvolvimento folicular estarem longe de ser perfeitos. No entanto, o desenvolvimento de um modelo “ideal” de cultivo folicular para investigar a foliculogênese resultaria em grande aporte de subsídios para a prospecção científica das biotécnicas reprodutivas nas ciências biomédicas.

#### 4. ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo é definido como uma excessiva produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou um desequilíbrio causado entre a produção de EROs e os sistemas de defesa antioxidante (AGARWAL et al., 2003). As EROs presentes em excesso no sistema reprodutivo das fêmeas promovem ações deletérias, alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares, formação de produtos citotóxicos, podendo levar à apoptose (SILVA et al., 2011). Esses radicais estão presentes nos ovários, tuba uterina e embriões, e ainda, de forma positiva, estão envolvidos em processos fisiológicos responsáveis pela maturação oocitária, esteroidogênese e nas funções envolvendo o corpo lúteo (AGARWAL; GUPTA; SHARMA, 2005; ANDRADE et al., 2010).

Ao longo do cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais as EROs podem ser geradas pelo metabolismo das células, altas concentrações de oxigênio, luminosidade do ambiente e manipulação dos fragmentos ovarianos *in vitro*, influenciando o metabolismo geral das células. O resultado do excesso de produção de radicais livres leva a um desequilíbrio no qual uma quantidade excessiva de EROs é liberada, levando ao estresse oxidativo (GOTO et al., 1992; COMBELLES; GUPTA; AGARWAL, 2009; GOMES et al., 2018).

O estresse oxidativo pode afetar o desenvolvimento dos oócitos durante a maturação *in vitro* e, o excesso da produção de EROs pelas células da granulosa causa efeitos deletérios sobre a fecundação dos oócitos e o desenvolvimento embrionário futuro (BEDAIWY et al., 2004). Devido à

ausência de sofisticados mecanismos de defesa e excessiva produção de EROs durante o cultivo *in vitro* de gametas ou embriões, a suplementação do meio com substâncias antioxidantes passa a ser crucial (BEDAIWY *et al.*, 2004).

## 5. SUPLEMENTAÇÃO DO MEIO DE CULTIVO *IN VITRO* COM ANTIOXIDANTES

O cultivo *in vitro* resulta em maiores concentrações de oxigênio do que o ambiente *in vivo*, levando um aumento das EROs (LUVONI *et al.*, 1996). Apesar da concentração de oxigênio normalmente usada nas estufas de cultivo *in vitro* ser de 20% (mesma concentração presente no ar atmosférico), esta é consideravelmente superior à encontrada na tuba uterina e no útero dos mamíferos (FISCHER; BAVISTER, 1993). Sendo assim, a suplementação do meio de cultivo *in vitro* se torna essencial. Tanto o Ácido Ascórbico como o Ácido Alfa Lipóico são substâncias capazes de promover a diminuição das EROs presentes nas células tanto *in vivo* como *in vitro*.

O potencial reprodutivo dos animais é diretamente influenciado pelos danos causados pelo estresse oxidativo. Os resultados obtidos sobre os benefícios proporcionados pelos antioxidantes sobre o desenvolvimento folicular, são de extrema importância para o direcionamento de trabalhos futuros que viabilizem as biotécnicas reprodutivas economicamente viáveis (ANDRADE *et al.*, 2010).

## 6. ÁCIDO ASCÓRBICO

O Ácido Ascórbico, também denominado vitamina C ou ascorbato, é uma vitamina hidrossolúvel que reduz  $\alpha$ -tocoferol, peróxidos e as EROs em superóxido. Possui como uma de suas principais funções a ação antioxidante, reduzindo os níveis de radicais livres presentes nas células. Este antioxidante se acumula nos oócitos, células da granulosa, células luteais e nas células da teca interna. Adicionalmente, é capaz de reduzir os danos causados pelo estresse oxidativo, resultado do desequilíbrio da produção das EROs presente nas células, influenciando positivamente o processo de esteroidogênese (THOMAS *et al.*, 2001; LUTSENKO *et al.*, 2002). O Ácido Ascórbico também exerce ação benéfica em folículos ovarianos pré-antrais de camundongos, bovinos, equinos e caprinos (MURRAY *et al.*, 2001; THOMAS *et al.*, 2001; ROSSETTO *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2011; ANDRADE *et al.*, 2012; GOMES *et al.*, 2015).

Em concentrações fisiológicas, o Ácido Ascórbico contribui para o crescimento folicular nos estágios iniciais de desenvolvimento, atua removendo os radicais livres e protegendo as células foliculares contra os danos causados pelas EROs (CARR; FREI, 1999). Como já descrito por Thomas *et al.* (2001), em bovinos, o Ácido Ascórbico contribui na redução da apoptose de folículos ovarianos pré-antrais, mantém a sobrevivência e promove o crescimento e ativação de folículos primordiais caprinos (ROSSETTO *et al.*, 2009). No entanto, a presença de altas concentrações de Ácido

Ascórbico pode inibir processos fisiológicos do ovário, culminando com uma degeneração folicular (MURRAY et al., 2001), devido ao dano oxidativo ao DNA causado pela presença de íons  $Fe^{2+}$  e  $Cu^{2+}$ , que reagem com peróxido de hidrogênio levando a formação de radicais livres causando danos às células (LI; SCHELLHORN, 2007).

## 7. ÁCIDO ALFA LIPÓICO

O Ácido Alfa Lipóico é um composto natural, cofator essencial em complexos multienzimáticos, que catalisa a descarboxilação dos  $\alpha$ -cetoácidos no ciclo de Krebs (SILVA et al., 2011). Este é um antioxidante conhecido pela sua ação em diversos processos biológicos, atuando diretamente na eliminação das EROs e quelação de metais (PACKER; WITT; TRITSCHLER, 1995).

Diversos benefícios já foram relatados com a suplementação do Ácido Alfa Lipóico em diversas espécies, mas em quantidades excessivas, o Ácido Alfa Lipóico pode ser prejudicial para as células foliculares. Talebi et al. (2012) observaram que a suplementação de 500  $\mu$ M de Ácido Alfa Lipóico ocasionou um aumento na taxa de degeneração de folículos ovarianos pré-antrais de ratas. Outros estudos também relataram que uma exposição prolongada ao Ácido Alfa Lipóico resultou em um aumento da peroxidação lipídica, danos mitocondriais e ainda uma inibição da síntese de glicogênio, além de interromper ciclos celulares e provocar a morte celular (MOINI; PACKER; SARIS, 2002; MARSH et al., 2005; WENZEL; NICKEL; DANIEL, 2005; CAKATAY, 2006).

## 8. CONCLUSÃO

A MOIFOPA é uma biotécnica com grande potencial para auxiliar na compreensão dos eventos que ocorrem fisiologicamente no ovário, principalmente relacionado com folículos ovarianos pré-antrais, além da perspectiva futura de auxiliar na reprodução humana, principalmente para mulheres que sofrem de doenças que afetam a população folicular e que podem causar infertilidade. Tendo em vista que, usando a biotécnica já foi descrito em alguns poucos trabalhos a produção de embriões viáveis em diferentes espécies animais. No entanto, ainda existem desafios que devem ser pesquisados para que a biotécnica seja aplicada em larga escala na espécie humana futuramente, como é o caso dos efeitos prejudiciais das EROs. Contudo, antioxidantes como o ácido alfa lipóico e o ácido ascórbico possuem potencial e tem demonstrado resultados importantes para auxiliar no desenvolvimento da biotécnica.

## REFERÊNCIAS

- ABIR, R. *et al.* *In vitro* maturation of human primordial ovarian follicles: clinical significance, progress in mammals, and methods for growth evaluation. **Histology and Histopathology**, v. 26, p. 887-898, 2006.
- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R. Oxidative stress and its implications in female infertility - a clinician's perspective. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 11, p. 641-650, 2005.
- AGARWAL, A.; SALEH, R. A.; BEDAIWY, M. A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and Sterility**, v. 79, p. 829-843, 2003.
- ANDRADE, E. R. *et al.* Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, p. 79-85, 2010.
- ANDRADE, E. R. *et al.* Interactions of indole acetic acid with EGF and FSH in the culture of ovine preantral follicles. **Theriogenology**, v. 64, p. 1104-1113, 2012.
- ARAÚJO, V. R. *et al.* *In vitro* culture of bovine preantral follicles: a review. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 12, p. 1-14, 2014.
- ARUNAKUMARI, G.; SHANMUGASUNDARAM, N.; RAO, V. H. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. **Theriogenology**, v. 74, p. 884-894, 2010.
- BEDAIWY, M. A. *et al.* Differential growth of human embryos *in vitro*: role of reactive oxygen species. **Fertility and Sterility**, v. 82, p. 593-600, 2004.
- BERGAMO, L. Z. *et al.* Culture of preantral ovarian follicles of *Bos taurus indicus* with alpha-lipoic acid. **Zygote**, v. 25, p. 1-7, 2021a.
- BERGAMO, L. Z. *et al.* Follicular development, morphological integrity, and oxidative stress in bovine preantral follicles cultured *in vitro* with ascorbic acid. **Zygote**, v. 1, p. 1-7, 2021b.
- BIZARRO-SILVA, C.; SENEDA, M. M. Cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais bovinos: revisão, desafios, conquistas e perspectivas futuras. **Revista Brasileira De Reprodução Animal**, v. 45, p. 131-147, 2021.
- BRITO, I. R. *et al.* Alginate hydrogel matrix stiffness influences the *in vitro* development of caprine preantral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v. 81, p. 636-645, 2014.
- CAKATAY, U. Pro-oxidant actions of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. **Medical hypotheses**, v. 66, p. 110-117, 2006.
- CARR, A.; FREI, B. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? **The FASEB Journal**, v. 13, p. 1007-1024, 1999.
- COMBELLES, C. M.; GUPTA, S.; AGARWAL, A. Could oxidative stress influence the *in vitro* maturation of oocytes? **Reproductive BioMedicine Online**, v. 18, p. 864-880, 2009.
- DANIEL, S. A. J.; ARMSTRONG, D. T.; GORELANGTON, R. E. Growth and development of rat oocytes *in vitro*. **Gamete Research**, v. 24, p. 109-121, 1989.

DE SÁ, N. A. R. *et al.* First pregnancy after *in vitro* culture of early antral follicles in goats: Positive effects of anethole on follicle development and steroidogenesis. **Molecular Reproduction and Development**, v. 87, p. 1-12, 2020.

EPPIG, J. J.; SCHOEDER, A. C. Capacity of mouse oocyte from preantral follicles undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 268-276, 1989.

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

FIGUEIREDO, J. R. *et al.* Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. Ed. 2. São Paulo: Roca, 2008, p. 303–327.

FISCHER, B.; BAVISTER, B. D. Oxygen tension in the oviduct and uterus of hesus monkeys, hamsters and rabbits. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, p. 673-679, 1993.

FORTUNE, J. E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biology of Reproduction**, v. 50, p. 225-232, 1994.

GOMES, R. G. *et al.* Improvement of development of equine preantral follicles after 6 days of *in vitro* culture with ascorbic acid supplementation. **Theriogenology**, v. 84, p. 750-755, 2015.

GOMES, R. G. *et al.* Alpha lipoic acid (ALA) effects on developmental competence of equine preantral follicles in short-term culture. **Theriogenology**, v. 105, p. 169-173, 2018.

GOTO, Y. *et al.* Oxidative stress on mouse embryo development *in vitro*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 13, p. 47-53, 1992.

GUPTA, P. S. P.; RAMESH, H. S.; MANJUNATHA, B. M. Production of buffalo embryos using oocytes from *in vitro* grown preantral follicles. **Zygote**, v. 16, p. 57–63, 2008.

Ok HIRAO *et al.* *In vitro* growth and maturation of pig oocytes. **Journal Reproduction & Fertility**, v. 100, p. 333-339, 1994.

Ok HUANMIN, Z.; YONG, Z. *In vitro* development of caprine ovarian preantral follicles. **Theriogenology**, v. 54, p. 641-650, 2000.

LEITÃO, C. C. F. *et al.* Effects of GDF-9 and FSH on mRNA Expression for FSH-R, GDF-9 and BMPs *in vitro* cultured goat preantral follicles. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, p. 200-208, 2014.

LI, Y.; SCHELLHORN, H. E. New developments and novel therapeutic perspectives for vitamin C. **The Journal of Nutrition**, v. 137, p. 2171-2184, 2007.

LIMA, G. L.; SANTOS, E. A. A. Aplicação das biotécnicas de MOIFOPA, transgênese e clonagem na reprodução de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 4, p. 36–42, 2010.

LUTSENKO, E. A.; CÁRCAMO, J. M.; GOLDE, D. W. Vitamin C prevents DNA mutation induced by oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 19, p. 16895-16899, 2002.

LUVONI, G. C.; KESKINTEPE, L.; BRACKETT, B. G. Improvement in bovine embryo production *in vitro* by glutathione-containing culture media. **Molecular Reproduction & Development**, v. 43, p. 437-443, 1996.

MAGALHÃES, D. M. *et al.* *In vitro* production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. **Theriogenology**, v. 75, p. 182-188, 2010.

MARSH, S. A. *et al.* Evidence for a non-antioxidant, dose-dependent role of alpha-lipoic acid in caspase-3 and ERK2 activation in endothelial cells. **Apoptosis**, v. 10, p. 657-665, 2005.

MATOS, M. H. T. *et al.* Técnicas para avaliação da qualidade de folículos ovarianos pré-antrais cultivados *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 433-442, 2007.

MATSUDA, F. *et al.* Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: Regulation by survival and death of granulosa cells, review. **Journal of Reproduction and Development**, v. 58, p. 44-50, 2012.

McCAFFERY, F. H. *et al.* Culture of bovine preantral follicles in a serum-free system: Markers for assessment of growth and development. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 267-273, 2000.

MOINI, H.; PACKER, L.; SARIS, N. E. Antioxidant and prooxidant activities of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 182, p. 84-90, 2002.

MURRAY, A. A. *et al.* Role of ascorbic acid in promoting follicle integrity and survival in intact mouse ovarian follicles *in vitro*. **Reproduction**, v. 121, n. 1, p. 89-96, 2001.

NÓBREGA JUNIOR, J. E. *et al.* Participação da esfingosina 1-fosfato e do fator inibidor de leucemia no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais de cabras. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, p. 75-79, 2014.

PACKER, L.; WITT, E. H.; TRITSCHLER, H. J. Alpha-Lipoic acid as a biological antioxidant. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 19, p. 227-250, 1995.

RODRIGUES, G. Q. *et al.* Efeito de diferentes concentrações de hormônio folículo-estimulante recombinante sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos e ovinos isolados. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 4, p. 144-152, 2010.

ROSSETTO, R. *et al.* Interaction between ascorbic acid and follicle stimulating hormone maintains follicular viability after long-term *in vitro* culture of caprine preantral follicles. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 37, p. 112-123, 2009.

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

ROY, S. K.; TREACY, B. J. Isolation and long-term culture of human preantral follicles. **Fertility and Sterility**, v. 59, p. 783-790, 1993.

SÁNCHEZ, F.; SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1822, p. 1896-1912, 2012.

SARAIVA, M. V. A. *et al.* Dynamic medium produces caprine embryo from preantral follicles grown *in vitro*. **Reproductive Sciences**, v. 12, p. 1135-1143, 2010.

SILVA, A. W. B. *et al.* Expression of TNF- $\alpha$  system members in bovine ovarian follicles and the effects of TNF- $\alpha$  or dexamethasone on preantral follicle survival, development and ultrastructure *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v.182, p. 56-68, 2017.

SILVA, G. M. *et al.* Papel dos antioxidantes no cultivo *in vitro* de células ovarianas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, p. 315-326, 2011.

SILVA, G. M. *et al.* *In vitro* development of secondary follicles from pre-pubertal and adult goats cultured in two-dimensional or three-dimensional systems. **Zygote**, v. 23, p. 475-484, 2015.

SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; FIGUEIREDO, J. R. Ovarian follicle development *in vitro* and oocyte competence: advances and challenges for farm animals. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 55, p. 123-135, 2016.

SILVA, J. R. V. *et al.* Influences of FSH and EGF on primordial follicles during *in vitro* culture of caprine ovarian cortical tissue. **Theriogenology**, v. 61, p. 1691-1704, 2004.

TALEBI, A. *et al.* The effect of alpha lipoic acid on the developmental competence of mouse isolated preantral follicles. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 29, p. 175-183, 2012.

THOMAS, F. H. *et al.* Effect of ascorbic acid on health and morphology of bovine preantral follicles during long-term culture. **Reproduction**, v. 122, p. 487-495, 2001.

WANG, X. *et al.* Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. **Fertility and Sterility**, v. 78, p. 1272-1277, 2002.

WENZEL, U.; NICKEL, A.; DANIEL, H. Alpha-Lipoic acid induces apoptosis in human colon cancer cells by increasing mitochondrial respiration with a concomitant O<sub>2</sub>-\*-generation. **Apoptosis**, v. 10, p. 359-368, 2005.

Recebido em: 28/10/2022

Aceito em: 02/12/2022