

OLGA JULIANA ROLDÁN CASTAÑEDA

**ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP 406®) COMO MEIO DE CULTIVO BASE
PARA O CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS
INCLUSOS NO TECIDO OVARIANO.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

R744a
2018 Roldán Castañeda, Olga Juliana, 1990-
Água de coco em pó (ACP 406 ®) como meio de cultivo
base para o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos
inclusos no tecido ovariano / Olga Juliana Roldán Castañeda. –
Viçosa, MG, 2018.
vii, 46 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Ciro Alexandre Alves Torres.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Caprinos - Reprodução. 2. Folículos ovarianos.
3. Fertilização *in vitro*. 4. Água-de-coco. 5. Ovários.
I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Zootecnia.
Program de Pós-Graduação em Zootecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 636.30821

OLGA JULIANA ROLDÁN CASTAÑEDA

**ÁGUA DE COCO EM PÓ (ACP 406®) COMO MEIO DE CULTIVO BASE
PARA O CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS
INCLUSOS NO TECIDO OVARIANO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 12 de junho de 2018.

José Ricardo Figueiredo

José Domingos Guimarães

Yamê Fabres Robaina Santcler da
Silva

Jurandy Mauro Penitente Filho

Ciro Alexandre Alves Torres
(Orientador)

*A Deus e Nossa Senhora, por sempre me concederem sabedoria nas escolhas
dos melhores caminhos, coragem para acreditar, força para não desistir e
proteção para me amparar.*

*Aos meus pais Ricardo e Olga, pelo amor, incentivo e apoio durante minha vida
e na busca pelo conhecimento.*

Ao meu irmão Jesus pela força.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, por tantas bênçãos concedidas, me iluminando diariamente, pela possibilidade de empreender esse caminho evolutivo e por colocar pessoas incríveis em meu caminho.

A Universidade Federal de Viçosa (UFV), ao Departamento de Zootecnia e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia por todo esse tempo de ensino e aprendizagem.

Ao Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-Antrais (LAMOFOPA) da Universidade Estadual do Ceará, por toda aprendizagem durante esse período do experimento e pelo suporte para execução do presente projeto.

Ao meu pai Ricardo Roldán e à minha mãe Olga Mercedes Castañeda, meus motores de vida, por todo amor, apoio frente às adversidades da vida, paciência e esforço dedicado a mim, mesmo nos dias em que eu não merecia tanto assim. Por sempre ter acreditado em mim e principalmente pelo exemplo de perseverança.

Aos meus irmãos Jesus Alfonso Roldán e Luis Miguel Pirela por todo amor e, principalmente, força que me deram nesse tempo que fiquei longe.

Ao meu orientador, Professor Ciro Alexandre Alves Torres, por compartilhar os seus conhecimentos, por tanta paciência e dedicação, por todos os papos que a gente bateu sobre a vida e principalmente, por acreditar no meu potencial.

Ao Lucas por sempre me apoiar, por tantos conselhos nas horas difíceis, pelo companheirismo, por tanta ajuda também na execução do trabalho. Muito obrigada.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Jose Ricardo de Figueiredo por ter aberto as portas do seu laboratório, por todo o tempo dedicado a mim e pela ajuda que foi essencial para essa trajetória.

Ao meu Pós Doutorando, Dr. Francisco Léo Nascimento Aguiar que tanto me ajudou, por acreditar sempre em mim, por tantos conselhos, paciência e dedicação.

À minha equipe Naiza Arcângela de Sá e Maria Luana Galdencio dos Santos Moraes, pelo auxílio e suporte técnico, pela dedicação para a realização deste trabalho, pelo companheirismo, carinho e conselhos.

A todos os membros do LAMOFOPA, pela colaboração direta e indireta para a realização deste trabalho, pelo compartilhamento de idéias e lições de vida.

A todos meus amigos,Manu, Luisa, Edgar, Denise, El Profe, Natalia, German, que a vida cruzou no meu caminho e que se tornaram minha família no tempo

que passei em Viçosa, obrigada por tanto carinho e tantos momentos compartilhados

Enfim, agradeço a todos os que contribuíram de alguma maneira para que esse trabalho fosse realizado e que torceram pelo meu êxito.

SUMÁRIO

RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	2
Ováriomamífero	2
Foliculogênese ovariana	3
População e atresia folicular.....	5
Biotécnica da MOIFOPA (ovário artificial)	6
Sistemas de cultivo <i>in vitro</i> de folículos pré-antrais	6
Estado atual do cultivo <i>in vitro</i> de folículos pré-antrais.....	7
Importância da composição do meio de cultivo de base.....	8
Métodos de avaliação folicular e oocitária.....	9
Água de coco em pó (ACP®).....	11
OBJETIVOS.....	15
Objetivo Geral	15
Objetivos Específicos	15
Comparar a eficiência ACP® e α -MEM com ou sem suplementação sobre a viabilidade, ativação e crescimento <i>in vitro</i> de folículos primordiais caprinos.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
Article	24
POWDERED COCONUT WATER (ACP 406®) AS A BASE CULTURE MEDIUM FOR <i>IN VITRO</i> CULTURE OF GOAT PRE-ANTRAL FOLLICLES ENCLOSED IN OVARIAN TISSUE.....	24
CONTENTS.....	24
INTRODUCTION	25
MATERIAL AND METHODS	27
RESULTS	31
DISCUSSION	38
REFERENCES	41

RESUMO

ROLDÁN, Olga Juliana Castañeda, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2018. **Água de coco em pó (ACP 406®) como meio de cultivo base para o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos inclusos no tecido ovariano.** Orientador: Ciro Alexandre Alves Torres. Coorientador: José Ricardo Figueiredo

O objetivo do presente estudo foi investigar efeito do ACP 406® como meio de cultivo base na sobrevivência e desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais de cabra inclusos em tecido ovariano. Realizou-se a coleta de 2 ovários em cada um dos 4 animais fornecidos pelo abatedouro. Em cada par de ovários coletados foram extraídos 18 fragmentos onde 2 fragmentos selecionados aleatoriamente foram imediatamente fixados para avaliação histológica de rotina (controle não cultivado). Os fragmentos restantes (n=16) foram individualmente cultivados *in vitro* durante 2 ou 6 dias. Os seguintes meios de cultivo foram avaliados: α -MEM (α -MEM isoladamente, sem suplementação adicional); α -MEM+ (α -MEM suplementado); ACP (unicamente água de coco em pó - ACP®406); ou ACP+ (ACP 406® suplementado). O meio de cultivo foi substituído totalmente os dias 2 e 4. Os parâmetros avaliados foram os seguintes: (i) sobrevivência folicular, (ii) crescimento folicular, (iii) produção hormonal e (iv) produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) no meio de cultivo. Após o cultivo, quando o ACP e α -MEM foram comparados na mesma condição, isto é, com ou sem suplementação, a percentagem de folículos morfológicamente normais foi semelhante ($p > 0,05$) entre os tratamentos. No geral, em comparação ao tratamento controle não-cultivado, observou-se uma redução ($p < 0,05$) na percentagem de folículos primordiais, concomitante a um aumento ($p < 0,05$) na taxa de desenvolvimento de folículos, indicando que ocorreu ativação do folículo primordial. No entanto, no dia 6 de cultivo, a percentagem de ativação de folículos primordiais, a produção de espécies reativas de oxigênio e os diâmetros foliculares e oocitários foram semelhantes ($p > 0,05$) entre os tratamentos. Em conclusão, o ACP+ tem uma eficiência equivalente ao MEM+ em manter a sobrevivência e o desenvolvimento de folículos pré-antrais caprinos *in vitro*. No entanto, o ACP tem a vantagem de ser um produto natural a um custo menor e pode ser um meio alternativo para a cultura de folículos *in vitro*.

ABSTRACT

ROLDÁN, Olga Juliana Castañeda, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2018. **Powdered coconut water (ACP 406®) as an base culture medium for in vitro culture of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue.** Advisor: Ciro Alexandre Alves Torres. Co-Advisor: José Ricardo Figueiredo.

The aim of the present study was to investigate the effect of ACP 406® as a base culture medium on the survival and *in vitro* development of preantral follicles of goat included in ovarian tissue. Two ovaries were collected in each of the four animals provided by the slaughterhouse. In each pair of ovaries were collected 18 fragments where 2 randomly selected fragments were immediately fixed for routine histological evaluation (uncultivated control). The remaining fragments (n=16) were individually cultured *in vitro* for 2 or 6 days. The following culture media were evaluated: α -MEM (α -MEM alone, without additional supplementation); α -MEM+ (α -MEM supplemented); ACP (only coconut water powder - ACP®406); or ACP+ (ACP 406® supplemented). The parameters evaluated were: (i) follicular survival, (ii) follicular growth, (iii) hormonal production and (iv) production of reactive oxygen species (ROS) in the culture medium. After culture, when ACP and α -MEM were compared in the same condition, with or without supplementation, the percentage of morphologically normal follicles was similar ($p > 0.05$) between treatments. In general, in comparison to the uncultivated control treatment, a reduction ($p < 0.05$) in the percentage of primordial follicles was observed, concomitant with an increase ($p < 0.05$) in the rate of follicle development, indicating that activation of the primordial follicle. However, on day 6 of culture, the percentage of activation of primordial follicles, the production of reactive oxygen species, and follicular and oocyte diameters were similar ($p > 0.05$) between treatments. In conclusion, ACP+ has an equivalent efficiency to MEM+ in maintaining the survival and development of goat preantral follicles *in vitro*. However, ACP has the advantage of being a natural product at a lower cost and may be an alternative means for *in vitro* follicle culture.

INTRODUÇÃO GERAL

A utilização das biotecnologias reprodutivas objetiva a obtenção do melhoramento genético dos animais de interesse econômico, visando três objetivos fundamentais: o aumento do número de animais disponíveis para a seleção e, por consequência, a diminuição do intervalo de geração, e a obtenção de ganho genético, o que se dá pelo aumento da eficiência reprodutiva de machos e fêmeas.

Dentre as principais biotécnicas utilizadas, são destacadas a Inseminação Artificial (IA), a Transferência de Embriões (TE), a Fecundação In vitro (FIV), a Transgenese, a Clonagem e a Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais (MOIFOPA).

Os folículos pré-antrais são a fonte potencial para fertilização *in vitro* e a produção de embriões. No entanto, atualmente os resultados do crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais estão limitados na produção de poucos embriões em algumas espécies, tais como murinos (DANIEL *et al.*, 1989), porcinos (WU *et al.*, 2001), bufalinos (GUPTA *et al.*, 2008), ovinos (ARUNAKUMARI, 2010), caprinos (MAGALHÃES *et al.*, 2011b) e primatas não humanos (XU *et al.*, 2011). Embora esses resultados sejam significativos, ainda não foi estabelecido um meio de cultura ideal para assegurar o crescimento e maturação adequados de oócitos de folículos pré-antrais ovarianos.

A espécie caprina pode ser utilizada como modelo experimental para espécie humana, visto que, a mesma apresenta semelhanças morfofisiológicas no ovário, com o ovário humano em termos de tempo de duração da foliculogênese e consistência do ovário.

No que diz respeito às inovações biotecnológicas, a busca por produtos naturais, exclusivamente de origem vegetal, com baixo risco de transmissão de doenças e capacidade de maturar e incrementar viabilidade dos gametas levou os pesquisadores a buscarem um diluente alternativo espermático. Assim, a água de coco tem sido usada desde os anos 80 e 90, principalmente na conservação de células espermáticas, com resultados significativos (NUNES, 1998).

Para uma melhor compreensão da relevância desta pesquisa, a seguir serão abordados temas como aspectos morfológicos e estruturais do ovário mamífero, foliculogênese, população e atresia folicular, estado atual da biotécnica de MOIFOPA, sistemas de cultivo *in vitro*, importância da composição do meio de cultivo para o desenvolvimento folicular *in vitro*, propriedades da água de coco em pó como substância alternativa na preservação de gametas e os métodos de avaliação celular.

REVISÃO DE LITERATURA

Ovário mamífero

O ovário mamífero é um dos órgãos do sistema reprodutor feminino, cujas principais funções para a manutenção da fertilidade são a formação e diferenciação de células germinativas (função gametogênica ou exócrina) e a produção de hormônios esteroides e peptídeos (função endócrina) (EDSON *et al.*, 2009).

A dimensão do ovário dos mamíferos varia dependendo da espécie e da fase do ciclo ovariano (HAFEZ; HAFEZ, 2004). O ovário é um órgão heterogêneo, que pode ser dividido em duas regiões, uma medular e outra cortical. A medular, que na maioria das espécies localiza-se na região interna do ovário, é composta principalmente de vasos sanguíneos e linfáticos, nervos e tecido conjuntivo, responsáveis pela nutrição e estruturação do ovário (LEITÃO *et al.*, 2009; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004,). Já a cortical encontra-se mais externamente e é formada por tecido conjuntivo (fibroblastos, colágeno e fibras reticulares), contendo folículos ovarianos e corpos lúteos em diferentes estádios de desenvolvimento ou regressão. (LEITÃO *et al.*, 2009; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

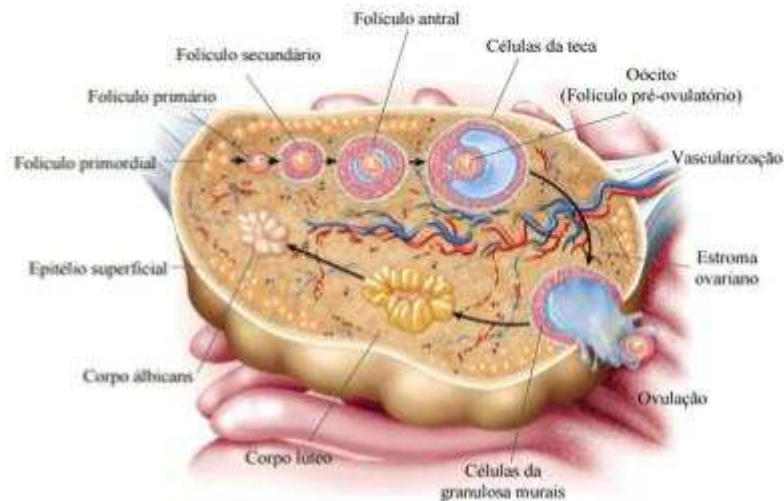


Figura 1: Representação esquemática do ovário mamífero (Silva et al., 2005)

Foliculogênese ovariana

A foliculogênese nas espécies é um evento iniciado na fase pré-natal e pode ser definida como o processo contínuo de formação, crescimento e maturação folicular, tendo início com a gênese do folículo primordial e culminando com o estágio de folículo pré-ovulatório (VAN DEN HURK E ZHAO, 2005).

O folículo é considerado a unidade morfológica e funcional do ovário, e está constituído, basicamente, por um oócito circundado por células somáticas (células da granulosa e da teca) demarcadas por uma membrana basal, e tem duas importantes funções, uma endócrina, que se refere a produção e liberação de esteroides e alguns peptídeos, e ainda uma função gametogênica, sendo a primeira essencial na promoção de um ambiente ideal para manter a viabilidade, crescimento e liberação de um oócito maduro no processo de ovulação (CORTVRINDT e SMITZ, 2001; FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

Em mamíferos, a formação dos folículos ovarianos e, conseqüentemente, a dos oócitos ovarianos é marcada pela migração das células germinativas primordiais (CGP), a partir do saco vitelínico para gônada primitiva, seguida de sua colonização (BRISTOL-GOULD e WOODURFF, 2006). Em caprinos, os folículos primordiais são gerados a partir do processo em que uma camada de células somáticas pavimentosas, denominadas de células da pré-granulosa, derivadas do epitélio celômico, circundam os oócitos

por volta do 62º dia de vida fetal desta espécie (BEZERRA et al., 1998). No momento em que as células somáticas envolvem o oócito, ocorre uma parada da meiose no estágio de diplóteno da prófase I, chamado vesícula germinal (BAKER e FRANCHI, 1967; PICTON; BRIGGS e GOSDEN, 1998). Nos folículos primordiais as células da pré-granulosa param sua atividade mitogênica e entram num período de quiescência juntamente com o oócito (SAWYER et al., 2002).

Com o desenvolvimento, o folículo passa por mudanças morfológicas, resultando em diferentes categorias foliculares, conforme o seu estágio evolutivo. De acordo com a presença de uma cavidade repleta de líquido, denominada antro, os folículos podem ser classificados em (a) folículos pré-antrais (primordiais, transição, primários e secundários) e (b) folículos antrais (terciários e pré-ovulatórios) (SILVA et al., 2005; FIGUEIREDO et al., 2008).

O fenômeno do início do crescimento dos folículos primordiais é denominado ativação (MCLAUGHLIN e MCIVER, 2009). Este fenômeno é resultado de um balanço entre fatores inibitórios e estimulatórios, com origens tanto do ovário quanto de outras glândulas endócrinas (VAN DEN HURK E ZHAO, 2005). Os Folículos primordiais são constituídos por um oócito central circundado por uma camada de células da pré-granulosa de forma pavimentosa. Quando algumas células da pré-granulosa se tornam cuboidais o folículo é classificado como “folículo de transição” ou “folículo intermediário” (SMITZ e CORTVRINDT, 2002).

Os folículos primários são constituídos por uma única camada de células da granulosa que cobrem o oócito e torna-se mais volumosa devido ao seu aumento em número (VAN DEN HURK et al., 1997), permitindo desenvolvimento dos chamados folículos secundários (PICTON et al., 1998). Tais folículos são caracterizados pela presença de duas ou mais camadas de células da granulosa cúbicas localizadas em torno do oócito, bem como pela formação de uma camada de células tecais envolvendo a membrana basal folicular (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005). Nos estádios mais avançados, é possível notar que os folículos secundários possuem fibras do tecido conjuntivo organizadas paralelamente à membrana basal. Esta organização forma uma camada de células tecais externa altamente vascularizada, e proporciona

fatores endócrinos que permitem a expansão volumétrica exponencial do folículo (SMITZ e CORTVRINDT, 2002). Neste estágio, a zona pelúcida é claramente identificada ao redor do oócito. Os folículos recebem o nome de antrais porque após o crescimento dos folículos secundários e a organização das células da granulosa em várias camadas, ocorre a formação de uma cavidade repleta de líquido folicular denominada antro. O fluido folicular é um exsudato do plasma sanguíneo com diferentes fatores proteicos, glicoproteínas, glicosaminoglicanos, esteróides e muitos outros metabólitos sintetizados pelas células da parede folicular (GORDON, 1994).

Os Folículos antrais podem ser classificados como folículos terciários e folículos de DeGraaf, sendo estes últimos denominados ainda como maduros ou pré-ovulatórios. O desenvolvimento dos folículos antrais é caracterizado por uma fase de crescimento, recrutamento, seleção e dominância (VAN DEN HURK E ZHAO, 2005), sendo a formação de folículos pré-ovulatórios um pré-requisito para a ovulação e formação do corpo lúteo, bem como da manutenção da fertilidade (DRUMMOND, 2006).

População e atresia folicular

Quantitativamente, a população folicular é bastante variável entre as espécies, podendo-se encontrar um número de folículos pré-antrais (FOPAs) de aproximadamente 89.000 em bovinos (SILVA-SANTOS *et al.*, 2011), 16.000 em ovinos (AMORIM *et al.*, 2000) e 53.000 em caprinos (LUCCI *et al.*, 1999).

Independente da espécie, o percentual de folículos pré-antrais representa aproximadamente 95% da reserva folicular presente no ovário, enquanto os folículos antrais compreendem somente cerca de 5 a 10% (ERICKSON, 1986; FIGUEIREDO *et al.*, 2008). Outro dado relevante, comum a todos os mamíferos, é que a maioria (99,9%) dos folículos presentes em mamíferos não chegam à ovulação, devido a um processo fisiológico conhecido como atresia, que pode ocorrer por degeneração necrótica (BRAS QUEENAN; SUSIN, 2005) e/ou apoptótica (HUSSEIN, 2005).

O processo de apoptose ou morte celular programada depende da expressão de genes pró e anti-apoptóticos e tem como principal característica

a fragmentação do DNA a cada 180-200 pares de base (HUSSEIN et al., 2005). A apoptose ocorre de acordo com o estímulo inicial, podendo ocorrer por meio da mitocôndria, constituindo a via intrínseca, ou ainda por intermédio de receptores de superfície celular (receptores de morte), constituindo a via extrínseca (JOZA et al., 2002; ELMORE, 2007).

Os folículos pré-antrais são menos susceptíveis à atresia do que os folículos antrais e, à medida que ascendem para esta categoria, tornam-se também mais vulneráveis à morte folicular. (FAUSTINO *et al.*, 2011). Esta morte folicular explica a ovulação de apenas um ócito por ciclo na maioria das espécies. A morte natural da grande maioria dos folículos, representa uma limitação para as técnicas de reprodução assistida.

Biotécnica da MOIFOPA (ovário artificial)

A manipulação de ócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA) é uma biotécnica da reprodução que vem sendo aprimorada nos últimos tempos e consiste numa excelente ferramenta para acompanhar o crescimento de folículos ovarianos desde a fase pré-antral até a fase antral. Esta biotécnica consiste basicamente no i) resgate de FOPAs, ii) conservação visando à estocagem por um curto (resfriamento) ou longo período (congelamento) e iii) cultivo folicular *in vitro* para promoção do crescimento, maturação e fecundação oocitária (FIGUEIREDO *et al.*, 2007). O cultivo *in vitro* de FOPAs, também conhecido como “Ovário artificial”, vem sendo amplamente empregado com o intuito de avaliar o efeito de diferentes substâncias, concentrações e fases do desenvolvimento folicular, a fim de mimetizar *in vitro* o que ocorre com os folículos em diferentes fases de desenvolvimento e que não entram em processo de atresia (FIGUEIREDO *et al.*, 2011). O sistema de cultivo ideal deve preencher três requisitos básicos e sequenciais: preservar a viabilidade dos folículos, conservar a morfologia pré-existente *in vivo* e, assegurar o crescimento e a maturação folicular (FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

Sistemas de cultivo in vitro de folículos pré-antrais

O cultivo de folículos pré-antrais pode ser feito de duas formas: cultivo *in situ* que corresponde a fragmentos do córtex ovariano ou ainda do ovário

inteiro; e cultivo de folículos na forma isolada, podendo serem cultivados em diferentes sistemas de acordo com a forma de contato do folículo com o substrato, podem-se classificar em bidimensional (2D) ou tridimensional (3D). No modelo 2D, os folículos são cultivados diretamente sobre uma superfície plástica ou sobre uma matriz extra celular e, no modelo 3D, os folículos são cultivados inclusos em uma matriz extracelular (FIGUEIREDO et al., 2008).

O cultivo *in situ* é interessante pois proporciona a manutenção da integridade tridimensional dos folículos e por mantê-los interagindo com as células do estroma, ficando mais próximo da condição *in vivo* (THOMAS et al., 2003). Quando os folículos são cultivados de forma isolada, permite-se o acompanhamento individual do folículo, bem como uma maior perfusão do meio, ajudando na elucidação dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento oocitário, na diferenciação das células da granulosa, e também nos fatores autócrinos e parácrinos envolvidos na foliculogênese (THOMAS et al., 2003).

Existe a possibilidade de ser realizado o cultivo em dois passos, onde primeiramente os folículos primordiais são cultivados *in situ* até alcançar o estágio de folículos secundário, e em seguida, os folículos são isolados e cultivados individualmente até o estágio antral (TELFER et al., 2008).

Estado atual do cultivo in vitro de folículos pré-antrais

O'BRIEN et al., 2003 obtiveram o resultado mais promissor proveniente da MOIFOPA, até o momento, com o nascimento de um camundongo a partir de folículos primordiais crescidos, maturados e fecundados *in vitro*.

Outros estudos foram desenvolvidos em outras espécies visando produzir embriões a partir de FOPAs e grandes progressos têm sido observados no cultivo *in vitro* em diferentes espécies animais. Na espécie bovina (GUTIERREZ et al., 2000; McCAFFERY et al., 2000) FOPAs isolados desenvolveram-se *in vitro* até o estágio antral. Resultados mais satisfatórios foram obtidos com suínos (WU et al., 2007), ovinos (ARUNAKUMARI et al., 2010) e caprinos (MAGALHÃES et al., 2011), e obtiveram a produção de um pequeno e variável número de embriões após cultivo *in vitro* de folículos secundários.

Embora esses resultados sejam promissores, estudos acerca dos fatores e processos que afetam o desenvolvimento dos FOPAs são imprescindíveis para aumentar as taxas de maturação com a finalidade de obter oócitos competentes para melhorar a eficiência na produção *in vitro* de embriões.

Importância da composição do meio de cultivo de base

Tendo em vista a ampla diversidade do metabolismo celular, são utilizados vários tipos de meios de cultivo para satisfazer os requisitos nutricionais e dar suporte ao desenvolvimento folicular e produção de oócitos competentes crescidos *in vitro*, transformando-se no atual desafio dos pesquisadores para a obtenção de sucesso durante o cultivo *in vitro* de FOPAs.

Sabe-se que os folículos podem ser potencialmente influenciados por fatores de crescimento produzidos pelas células do estroma e por outros folículos, ou por fatores produzidos dentro dos próprios folículos (hormônios e fatores de crescimento) (FORTUNE, 2003). Além disso, como já foi demonstrado na espécie bovina para folículos pré-antrais iniciais (CASTRO et al., 2014) e avançados (ROSSETTO et al., 2012), o próprio meio de base pode interferir no desenvolvimento folicular.

É necessário adequar suplementos como aminoácidos, eletrólitos, antioxidantes, substratos energéticos, hormônios e fatores de crescimento em todos os protocolos, e também determinar quais são os suplementos essenciais que garantem a viabilidade e o crescimento folicular *in vitro* (PICTON et al., 2008). Os meios mais utilizados para cultivo *in vitro* de FOPAs são meio essencial mínimo alfa (α -MEM) (SARAIVA et al., 2010), McCoy (MCLAUGHLIN et al., 2010) e o meio de cultivo de tecido 199 (TCM-199) (ARUNAKUMARI et al., 2010).

O α -MEM vem sendo utilizado como meio de base por diversos autores para o cultivo de tecido ovariano bovino (BRAW-TAL e YOSSE FI, 1997) e caprino (SILVA et al., 2004), tendo alcançado a produção de embrião caprino a partir de FOPAS (MAGALHÃES et al., 2011b), contudo, com baixas taxas de maturação oocitária. Por outro lado, o meio TCM-199 resultou em excelentes

taxas de maturação com a produção de embriões na espécie ovina (ARUNAKUMARI *et al.*, 2010). Entretanto, na espécie caprina ainda não é conhecido o meio de cultivo ideal (α MEM vs TCM199) para folículos pré-antrais isolados. Diversos autores têm estudado diferentes componentes e seus efeitos no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, tanto em animais de laboratório (O'BRIEN *et al.*, 2003) como em animais domésticos, incluindo a espécie caprina (BRITO *et al.*, 2014).

Para prevenir a atresia de folículos, estes meios contem principalmente uma fonte de proteína (como albumina, soro de vitelo fetal ou soro homogêneo), antibióticos, antimicóticos, transferrina (para ligar os íons metálicos), selênio (para ligar os radicais livres), glutamina, piruvato (fontes de energia) e ocasionalmente um ou mais fatores de crescimento como, fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1), fator de crescimento epidérmico (EGF), activina-A, fator de diferenciação de crescimento 9 (GDF-9) e fator de crescimento fibroblástico 2 (FGF-2), hormônios tais como insulina, hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio do crescimento, hormônio estimulante da tireoide (TSH) e esteroides como estradiol, testosterona ou androstenediona (SMITZ *et al.*, 2010).

No entanto, com base em relatos da literatura, não houve nenhum padrão no meio de cultivo ideal para FOPAs caprinos. Além disso, nos últimos anos, os pesquisadores intensificaram seus esforços na procura de novos meios de base, bem como novos suplementos.

Métodos de avaliação folicular e oocitária

Existem diversas técnicas para avaliar a morfologia dos folículos ovarianos pré-antrais e analisar se um meio de cultivo é mais adequado que outro, considerando parâmetros como ativação, crescimento e viabilidade folicular ao longo do período de cultivo.

Após o desenvolvimento *in vitro*, é necessária a manutenção da qualidade folicular para que se tenham oócitos aptos a serem maturados e fecundados *in vitro*, ou que possam ser utilizados em outras biotécnicas relacionadas à reprodução animal.

A grande maioria dos estudos realizados sobre cultivo utilizam no mínimo duas técnicas em conjunto, visando obter uma maior precisão sobre a qualidade do folículo (MATOS *et al.*, 2007). Dentre os métodos, pode-se destacar a reação em cadeia da polimerase (PCR), microscopia de fluorescência, microscopia eletrônica de transmissão, análise proteômica e os métodos que foram utilizados no presente estudo e que serão detalhados abaixo, como a histologia clássica, a mensuração de espécies reativas de oxigênio e a dosagem de estradiol.

A primeira aproximação se faz por histologia clássica, seguindo critérios morfológicos. Avalia-se os folículos baseando na integridade do oócito, das células da granulosa que o rodeiam e da membrana basal (SANTOS *et al.*, 2006). Além de permitir verificar o número e a mudança na morfologia das células da granulosa de pavimentosa para cúbica, por ocasião da ativação folicular (MATOS *et al.*, 2007). Na análise histológica, as alterações indicativas de atresia em folículos pré-antrais ocorrem primariamente no oócito, sendo a picnose nuclear o primeiro sinal de atresia (WOOD *et al.*, 1997).

Apesar dessa técnica não permitira avaliação da integridade das organelas citoplasmáticas, tem uma grande vantagem, que é possibilitar a avaliação de um grande número de folículos que permite a realização de uma análise quantitativa.

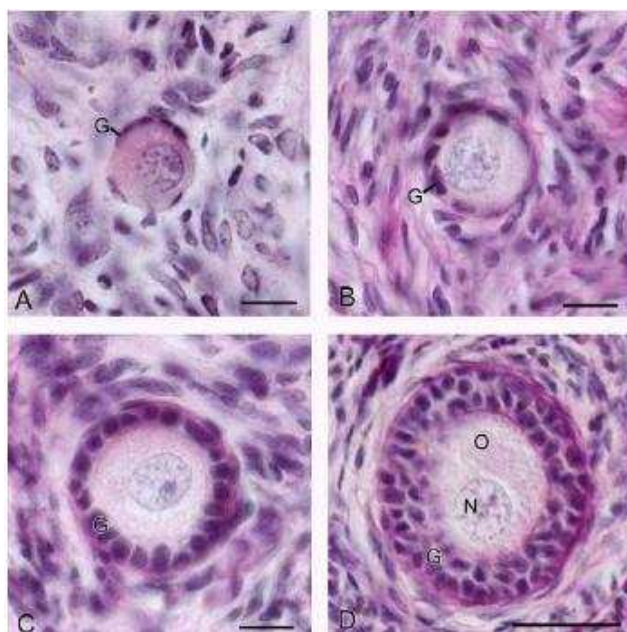


Figura 2. Estrutura histológica de folículos pré-antrais caprinos após coloração com ácido periódico de Schiff-hematoxilina, mostrando: (A) folículo primordial (oócito circundado por uma camada de células da granulosa pavimentosas), (B) transição (oócito circundado por uma camada de células da granulosa pavimentosas e cúbicas), (C) primário (oócito circundado por uma camada de células da granulosa cúbicas) e (D) secundário (oócito circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa cúbicas). O: oócito; N: núcleo; G: células da granulosa. Silva *et al.*, (2004a).

O crescimento e a diferenciação folicular durante o cultivo *in vitro* podem ser avaliados pela secreção de esteroides (LIU *et al.*, 2001). Embora de pequeno tamanho, os folículos secretam relativamente grandes quantidades de esteroides, tais como o estrógeno e a progesterona. A produção de estrógeno é um indicador da proliferação e diferenciação das células da granulosa. Liu *et al.*, (2002) cultivaram folículos pré-antrais isolados (100 – 120 µm) de camundongas e observaram que, do dia 4 ao 10 de cultivo *in vitro*, à medida que as células da granulosa proliferavam a produção de estrógeno aumentava. Esses mesmos autores mostraram que a atresia das células da granulosa está geralmente associada com a queda na produção folicular de estrógeno (LIU *et al.*, 2002).

A funcionalidade dos folículos e sua viabilidade, podem ser avaliados via quantificação de espécies reativas de oxigênio (ERO's). As ERO's envolvem todos os produtos derivados de oxigênio. São altamente reativas e têm a possibilidade de reagir com vários compostos que se encontram próximos (AGARWAL *et al.*, 2005).

Água de coco em pó (ACP®)

A água de coco originada do coqueiro *Cocos nucifera*L. (subfamília, Cocosidea, família Palmae) é uma solução estéril e levemente ácida. No seu conteúdo há proteínas, aminoácidos (aspartato, glutamato, alanina, arginina, fenilalanina, histidina, isoleucina, leucina, metionina, lisina, prolina, serina, tirosina, treonina e valina), sais (potássio, sódio, cálcio, selênio, manganês e zinco), carboidratos (frutose e glicose), vitaminas (B1, B2, B3, B6 e C), fatores de crescimento (fitohormônios), fibras alimentares e uma pequena quantidade (<1%) de ácidos graxos (ácido oléico monossaturado, ácido linoléico

poliinsaturado, ácido caprílico, cáprico, láurico, mirístico e ácido palmítico) (LAGUNA, 1996).

Na década de 80 a água de coco *in natura* passou a ser utilizada como diluidor do sêmen de caprinos (NUNES, 1984) e de outras espécies. Contudo, a água de coco *in natura* sofre mudanças na sua composição durante o desenvolvimento do fruto além de ser uma substância extremamente perecível. Fatores diretamente relacionados às condições às quais os frutos ficam expostos durante a colheita, pós-colheita e comercialização como grau de maturação, variedade, região e época do ano de produção têm influência sobre as suas características físico-químicas (RESENDE *et al.*, 2008).

Diante disto, foi então desenvolvido um diluidor comercial, a água de coco em pó (ACP®) (SALGUEIRO *et al.*, 2002) sendo este, um pó resultante do processo de desidratação da água de coco e ajustado quanto ao pH e osmolaridade para cada espécie a ser utilizado. Segundo as recomendações do fabricante, o pó é reconstituído em água destilada e adicionado de protetores de resfriamento e/ou congelação de acordo com a finalidade, podendo ou não ser adicionado antibiótico.

Na área da biotecnologia da reprodução uma solução à base de água de coco foi comparada à solução salina, quanto a sua eficiência na preservação de folículos pré-antrais (COSTA *et al.*, 2002). Os resultados mostraram que ambas apresentaram eficiência similar para conservar FOPAS caprinos a temperatura de 4°C. Estes mesmos resultados mostraram que para conservá-los em temperaturas mais altas, a solução à base de água de coco é mais recomendada (COSTA *et al.*, 2002). Ainda nesta área, a água de coco, em virtude da presença de açúcares, foi testada como meio de cultivo *in vitro* para embriões de *Jatropha curcas* L. (pinhão-mansão). Sua utilização permitiu um melhor crescimento das plântulas (NUNES *et al.*, 2008). Lima *et al.*, (2010) utilizaram ACP® como meio base para armazenamento de FOPAS caninos durante 12, 24 e 36 horas em 3 a 9° C, sendo observado uma melhor conservação da morfologia folicular nas 24 horas.

Devido a suas características que a classificam como um bom diluente de sêmen, a água de coco teve efeito em estudos realizados em várias espécies como: suínos (AIRES e TONIOLLI, 2005), bovinos (ALBERTI, 2004), bubalinos (ZORZETTO et al., 2017), caprinos (AZEVEDO e TONIOLLI, 1999; NUNES e SALGUEIRO, 1999), ovinos (BRAZ et al., 2003), felinos (SILVA et al., 2007), caninos (CARDOSO et al., 2005), macacos (ARAÚJO et al., 2007) e humanos (NUNES, 1998).

Segundo Mantena et al. (2003), a água de coco *in natura* apresenta propriedades antioxidantes que podem ser atribuídas à presença de vitamina C em sua composição, embora mais de um princípio ativo possa estar envolvido. Segundo Loki e Rajamohan (2003), a água de coco apresenta efeitos positivos contra o estresse oxidativo, e comprovado efeito hepato protetor.

A utilização da água de coco mantém a longevidade de células como de córneas humanas para transplante, cultivo de tecido, meio de cultivo para vírus e bactérias, e para obtenção de vacinas contra febre aftosa, raiva e leishmaniose. Tem se mostrado eficiente ainda na utilização como meio de cultivo para células vegetais, como embriões e pólen (ARAGÃO et al., 2001).

JUSTIFICATIVA

A cultura de pequenos ruminantes na região Nordeste brasileira é de grande interesse para a economia, o que tem impulsionado grandes esforços para melhorar a produção dessas espécies com a aplicação de diversas biotécnicas da reprodução, como é o caso da MOIFOPA. Essa biotécnica permite o aproveitamento dos milhares de oócitos imaturos inclusos em folículos pré-antrais presentes no ovário mamífero, que seriam naturalmente perdidos ao longo da vida do animal. Contudo, até a data ainda não foi estabelecido um meio de cultivo ideal para assegurar o crescimento e maturação adequados de oócitos de folículos pré-antrais ovarianos (FIGUEIREDO et al., 2008).

A busca incessante de produtos naturais que possam melhorar os meios de cultivo e que tenham a capacidade de garantir a sobrevivência, ativação e maturação folicular em cultivos *in vitro* levou os pesquisadores a testar a água de coco como meio de manutenção de oócitos imaturos de ovários bovinos (CORDEIRO *et al.*, 2006), em adição no meio de maturação *in vitro* (MIV) para oócitos bovinos (BLUME *et al.*, 1997a), caninos (SILVA *et al.*, 2010) e no cultivo de embriões de ratos (BLUME e MARQUES, 1994) e bovinos (BLUME *et al.* 1997b).

Embora se tenha resultados satisfatórios de pesquisas anteriores, sabe-se que as propriedades bioquímicas dos cocos podem variar entre os frutos, afetando diretamente a capacidade de sustentar as células em cultivo, adicionalmente o tempo de armazenamento é restrito a um intervalo de tempo definido devido à manutenção das características biológicas (CARDOSO *et al.*, 2005).

Para reduzir essa variabilidade, diferentes estudos foram conduzidos para desenvolver uma água de coco em pó (ACP®) (CARDOSO *et al.*, 2005). A ACP é uma formula de água de coco em pó desidratada obtida após a seleção dos frutos, coleta do líquido endospermico e submissão à desidratação por calor. Após sua ressuspensão, apresenta características bioquímicas muito similares às aquelas encontradas no fruto *in natura*. Além disso, a ACP pode ser facilmente armazenada e enviada para regiões onde o coco não é encontrado (BARROS e TONIOLLI, 2011).

Existem várias formas de ACP, cada uma com pH e osmolaridade ajustados de acordo com a finalidade de utilização. A ACP já foi testada para a preservação de sêmen decaprinos (SALGUEIRO *et al.*, 2002), garanhão (ACP-105) (SAMPAIO NETO *et al.*, 2002) e cão (ACP-106) (CARDOSO *et al.*, 2005). No entanto até agora, não houve relato sobre a eficiência do uso de água de coco em pó como meio base para o cultivo *in vitro* de oócitos caprinos.

A espécie caprina pode ainda ser utilizada como modelo experimental para espécie humana, visto que, a mesma apresenta semelhanças morfofisiológicas no ovário, com o ovário humano em termos de tempo de duração da foliculogênese e consistência do ovário.

HIPÓTESE CIENTÍFICA

A água de coco (ACP®), usada como meio de cultivo de base é benéfica à sobrevivência e desenvolvimento de folículos pré-antrais caprinos inclusos em tecido ovariano após cultivo *in vitro*.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

- O objetivo do presente estudo é avaliar o efeito da ACP® como meio base de cultivo sobre a sobrevivência e desenvolvimento dos folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano caprino.

Objetivos Específicos

- Estudar o efeito da ACP® sobre a morfologia, ativação folicular, diâmetro folicular e oocitário, de folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano caprino cultivados *in vitro*;
- Comparar a eficiência ACP® e α -MEM com ou sem suplementação sobre a viabilidade, ativação e crescimento *in vitro* de folículos primordiais caprinos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, A.; APONTE-MELLADO, A.; PREMKUMAR, B. J.; SHAMAN, A.; GUPTA, S. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 10, p. 49-56, 2012.
- AIRES, F. P.; TONIOLLI, R. Congelação/descongelção e conservação de sêmen suíno. In: Reunião Anual da SBPC, 57, 2005, Fortaleza, CE. Anais... São Paulo: SBPC/UECE, 2005. Disponível em <http://www.spcnet.org.br/livro/57ra>.
- ALBERTI, K. Congelação do sêmen bovino: novos enfoques em meios diluentes. 2004. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade Estadual de São Paulo, FMVZ, Botucatu, SP, 2004.
- AMORIM, C. A.; LUCCI, C. M.; RODRIGUES, A. P. R.; CARVALHO, F. C. A.; FIGUEIREDO, J. R.; RONDINA, D.; CECCHI, R.; GIORGETTI, A.; MARTINI, A.; GONCALVES, P. D. B. Quantitative and qualitative analysis of the effectiveness of a mechanical method for the isolation of preantral follicles from ovine ovaries. *Theriogenology*, v. 53, p. 1251-1262, 2000.
- ARAGÃO, W. M.; ISBERNER, I. V.; CRUZ, E. M. O. Água-de-coco. Aracaju: Embrapa CPATC/ Tabuleiros Costeiros, 2001.
- ARAÚJO, L. L.; OLIVEIRA, K.; LIMA, J. S.; PANTOJA, P. S. P.; ARAÚJO, J. B.; DOMINGUES, S. F. S. Preservação de sêmen de *Cebusapella* (macaco-prego) em diluidor à base de água de coco a 37°C. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 17, 2007, Curitiba, PR. Anais... Belo Horizonte: CBRA, 2007. Disponível em: <http://www.cbra.org.br>
- ARUNAKUMARI, G.; SHANMUGASUNDARAM, N.; RAO, V. H. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. *Theriogenology*, v. 74, n. 5, p. 884–94, 2010.
- AZEVEDO, D. M. M. R.; TONIOLLI, R. Água de coco estabilizada suplementada com antibióticos e ácido 3-indol acético na conservação de sêmen de caprinos marota. *Ciência Animal*, v.9, p.37-42, 1999.
- BAKER, T. G.; FRANCHI, L. L. The fine structure of oogonia and oocytes in human ovaries. *Journal of Cell Science*, v. 2, p. 213-224, 1967.
- BARROS, T.B.; TONIOLLI, R. Uso potencial da água de coco na tecnologia de sêmen. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 35, p. 400-407, 2011.
- BEZERRA, M. B.; RONDINA, D.; LIMA, A. K. F.; OLIVEIRA, L. C.; CECCHI, R.; LUCCI, C. M.; GIORGETTI, A.; FIGUEIREDO, J. R. Aspectos quantitativos e qualitativos da foliculogênese pré-natal na espécie caprina. *Ciência Animal*, v. 8, p. 4756, 1998.
- BLUME, H.; MARQUES, A. P. Jr. Evaluation of coconut water on the culture and cryopreservation of mouse embryos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 18, p. 97–104, 1994.
- BLUME, H.; VALE FILHO, V. R.; MARQUES, A. P.; SATURNINO, H. M. Avaliação da água de coco na maturação de oócitos bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 21, p. 72–75, 1997a.

- BLUME, H.; VALE FILHO, V. R.; MARQUES, A. P.; SATURNINO, H. M. Uso da água de coco no cultivo de embriões bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 21, p. 78–81, 1997b.
- BRAS, M.; QUEENAN, B.; SUSIN, S. A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry*, v. 70, p. 231-239, 2005.
- BRAW-TAL, R.; YOSSEfi, S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 109, p. 165-171, 1997.
- BRAZ, V. B.; ARAÚJO, A. A.; NUNES, J. F.; MACHADO, V. P.; MOURA, A. A.; OLIVEIRA, K. P. L. Viabilidade do sêmen ovino diluído em água de coco em pó. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.27, p.99-107, 2003
- BRISTOL-GOULD, S.; WOODRUFF, T. K. Folliculogenesis in the domestic cat (*Feliscatus*). *Theriogenology*, v. 66, p. 5-13, 2006.
- BRITO, I. R.; SILVA, C. M. G.; DUARTE, A. B. G.; LIMA, I. M. T.; RODRIGUES, G. Q.; ROSSETTO, R.; SALES, A. D.; LOBO, C. H.; BERNUCI, M. P.; ROSA-E-SILVA, A. C. J. S.; CAMPELLO, C. C.; XU, M.; FIGUEIREDO, J. R. Alginate hydrogel matrix stiffness influences the in vitro development of caprine preantral follicles. *Molecular Reproduction and Development*, v. 81, n. 7, p. 636-645, 2014.
- CARDOSO, R. C. S.; SILVA, A. R.; SILVA, L. D. M. Use of the powdered coconut water (ACP-106) for cryopreservation of canine spermatozoa. *Animal Reproduction*, v.2, p.257-262, 2005.
- CASTRO, S. V.; CARVALHO, A. A.; SILVA, C. M. G.; SANTOS, F. W.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Fresh and vitrified bovine preantral follicles have different nutritional requirements during in vitro culture. *Cell Tissue Bank*, v. 15, p. 591-601, 2014.
- CORDEIRO, M. S.; SILVA, E. H. S.; MIRANDA, M. S.; BIONDI, F. C.; SANTOS, S. S. D.; OHASHI, O. M.; The use of coconut water solution (*Cocos nucifera*) as a holding medium for immature bovine oocytes for in vitro embryo production. *Animal Reproduction*, v. 3, p. 376-379,2006.
- CORTVRINDT, R.; SMITZ, J. E. J. In vitro follicle growth: achievements in mammalian species. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 36, p. 03-09, 2001.
- COSTA, S. H. F.; SANTOS, R. R.; FERREIRA, M. A. L.; MACHADO, V. P.; RODRIGUES, A. P. R.; OHASHI, O. M.; FIGUEIREDO, J. R. Conservação de folículos pré-antrais caprinos em solução salina ou à base de água de coco. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.39, p.324-330, 2002.
- 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.

- DRUMMOND, A. E. The role of steroids in follicular growth. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 4, p. 1-11, 2006.
- EDSON, M. A.; NAGARAJA, A. K.; MATZUK, M. M. The mammalian ovary from genesis to revelation. *Revelation. Endocrine Reviews*. v. 30, n. 6, p. 624-712, 2009
- ELMORE, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, v. 35, p. 495-516, 2007.
- ERICKSON, G. F. An analysis of follicle development and ovum maturation. *Seminars in Reproductive Endocrinology*, v. 4, p. 233-254, 1986.
- FAUSTINO, L. R.; SILVA, C. M. G.; ROSSETTO, R.; RODRIGUES, G. Q.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Estado atual e desafios da criopreservação de tecido ovariano em mamíferos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 35, p. 3-15, 2011. Disponível em www.cbpa.org.br
- FIGUEIREDO, J. R.; CELESTINO, J. J. H.; RODRIGUES, A. P. R.; SILVA, J. R. V. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção in vitro de embriões em larga escala. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 31, p. 143-152, 2007.
- FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; SILVA, J. R. V. Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais - MOIFOPA. In: P. B. D. Gonçalves, J. R. Figueiredo, V. J. F. Freitas. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008. p. 303-327.
- FIGUEIREDO, J. R.; CELESTINO, J. L. H.; FAUSTINO, L.R.; RODRIGUES, A. P. R. In vitro culture of caprine preantral follicles: advances, limitations and prospects. *Small Ruminant Research*, v. 98, p. 192-195, 2011.
- FORTUNE, J.E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science*. v. 78, p. 135-163, 2003.
- GORDON, I. *Laboratory production of cattle embryos*. Cambridge: CAB International, 640 p., 1994.
- GUPTA, P. S. P.; RAMESH, H. S.; MANJUNATHA, B. M.; NANDI, S.; RAVINDRA, J. P. Production of buffalo embryos using oocytes from in vitro grown preantral follicles. *Zygote*, v. 16, n. 1, p. 57-63, 2008.
- GUTIERREZ, C. G.; RALPH, J. R.; TELFER, E. E.; WILMUT, I.; WEBB, R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. *Biology Reproduction*, v. 62, p. 1322-1328, 2000
- HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. Anatomia da reprodução feminina. In: HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. *Reprodução Animal*, 7 ed., 513p. São Paulo: Manole, 2004, p. 13-29.
- HUSSEIN, M. R. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Human Reproduction Update*, v. 11, p. 162-178, 2005.

- HUSSEIN, T.S.; FROILAND, D.A.; AMATO, F.; THOMPSON, J.G.; GILCHRIST, R.B. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. *Journal of Cell Science*, v. 118, p. 5257-5268, 2005.
- JOZA, N.; KROEMER, G.; PENNINGER, J. M. Genetic analysis of the mammalian cell death machinery. *Trends in Genetics*, v. 18, p. 142-149, 2002.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO J. Aparelho reprodutor feminino. In: JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO J. *Histologia Básica*, 10 ed., 427p. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, p. 367-388.
- LAGUNA, L. E. Determinações Físico-químicas da Água de Coco Verde em Duas Variedades (Cocos nucifera L.) Coco da Praia e Anão. Monography (Especialização), Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 1996.
- LEITÃO, C. C. S.; BRITO, I. R.; FROTA, I. M. A.; SILVA, J.R.V. Importância dos fatores de crescimento locais na regulação da foliculogênese ovariana em mamíferos. *Acta scientiae veterinariae*, v. 37, n. 3, p. 215-224, 2009.
- LIMA, G. L.; COSTA, L. L. M.; CAVALCANTI, D. M. L. P.; RODRIGUES, C. M. F.; FREIRE, F. A. M.; FONTENELE-NETO, J. D.; SILVA, A.R. Short-term storage of canine preantral ovarian follicles using a powdered coconut water (ACP[®]) based medium. *Theriogenology*, v. 74, n. 1, p. 146-152, 2010
- LIU, H. C.; HE, Z.; ROSENWAKS, Z. In vitro culture and *in vitro* maturation of mouse preantral follicles with recombinant gonadotropins. *Fertil Steril*, v. 77, p. 373-383, 2002.
- LOKI, A. L.; RAJAMOHAN, T. Hepato protective and antioxidant effect of tender coconut water on carbon tetrachloride induced liver injury in rats. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*, v.40, n.5, p.354- 357, 2003
- LUCCI, C. M.; AMORIM, C. A.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P.; SILVA, J. R.; GONÇALVES, P. B. Effect of the interval of serial sections of ovarian tissue in the tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, v. 56, p. 39-49, 1999.
- MAGALHÃES, D. M.; ARAÚJO, V. R, LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T.; SILVA, R. C.; LUCCI, C. M.; BÁO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Different follicle-stimulating hormone (FSH) sources influence caprine preantral follicle viability and development in vitro. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 46, p. 378-86, 2009.
- MAGALHÃES, D. M.; FERNANDES, D. D.; MORORÓ, M. B.; SILVA, C. M.; RODRIGUES, G. Q.; BRUNO, J. B.; MATOS, M. H.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Effect of the medium replacement interval on the viability, growth and in vitro maturation of isolated caprine and ovine preantral follicles. *Reproduction of Domestic Animals*, v. 46, p. 134-40, 2011a
- MAGALHÃES, D.M.; DUARTE, A.B.; ARAUJO, V.R.; BRITO, I.R.; SOARES, T.G.; LIMA, I.M.T.; LOPES, C.A.P.; CAMPELLO, C.C.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. In vitro production of a caprine embryo from a

- preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. *Theriogenology*, v. 75, p. 182-188, 2011b.
- MANTENA, S. K.; JAGADISH; BADDURI, S. R.; SIRIPURAPU, K. B.; UNNIKRISSHANNAN, M. K. In vitro evaluation of antioxidant properties of *Cocos nucifera* Linn.water. *Nahrung*, Germany, v. 2, n. 47, p.126-131, 2003.
- MATOS, M. H. T.; SILVA, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Técnicas para avaliação da qualidade de folículos ovarianos pré-antrais cultivados in vitro. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 31, p.433-442, 2007.
- MCCAFFERY, F. H.; LEASK. R.; RILEY, S. C.; TELFER, E. E. 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
- MCLAUGHLIN, E. A.; MCIVER, S. C. Awakening the oocyte: controlling primordial follicle development. *Reproduction*, v. 137, p. 1-11, 2009.
- MCLAUGHLIN, M.; BROMFIELD, J. J.; ALBERTINI, D. F.; TELFER, E.E. Activin promotes follicular integrity and oogenesis in cultured pre-antral bovine follicles. *Human Reproduction*, v. 16, p. 644–653, 2010.
- NUNES, J. F.; SILVA, A. E. F. D. Tecnologia do sêmen resfriado em caprinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 8, n. 2, p. 121-127, 1984.
- NUNES, J. F. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de animais domésticos e do homem. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.22, p.109-112, 1998
- NUNES, J. F.; SALGUEIRO, C. C. M. Utilização da água de coco como diluidor de sêmen de caprinos e ovinos. *Revista Científica de Produção Animal*, v.1, p.17-26, 1999.
- NUNES, C. F.; PASQUAL, M.; SANTOS, D. N.; CUSTÓDIO, T. N.; ARAUJO, A. G. Diferentes suplementos no cultivo in vitro de embriões de pinhão-mansó. *Pesq Agropec Bras*, v.43, p.9-14, 2008.
- O'BRIEN, M. J.; PENDOLA, J. K.; EPPIG, J. J. A revised protocol for in vitro development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. *Biology of Reproduction*, v. 68, p. 1682–1686, 2003.
- PICTON, H.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R.The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 145, p. 27-37, 1998.
- PICTON, H. M.; HARRIS, S. E.; MURUVI, W.; CHAMBERS, E. L.The *in vitro* growth and maturation of follicles. *Reproduction*, v. 136, n. 6, p. 703-715, 2008
- RESENDE, J. M.; DE QUEIROZ, M. R.; SOARES, A. G.; BOTREL, N.; CABRAL, L. M. C.; JÚNIOR, J. S. Caracterização física, físico-química e química da água de coco “anão verde” revestida com diferentes biofilmes.

In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 20, 2008, Vitória, ES. Vitória, ES: Sociedade Brasileira de Fruticultura, 2008.

- ROSSETTO, R.; SARAIVA, M. V. A.; SANTOS, R. R.; SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; CHAVES, R. N.; BRITO, I. R.; RODRIGUES, G. Q.; LIMA, I. M. T.; DONATO, M. A. M.; PEIXOTO, C. A.; FIGUEIREDO, J. R. Effect of medium composition on the in vitro culture of bovine pre-antral follicles: morphology and viability do not guarantee functionality. *Zygote*, v. 21, n. 02, p. 125-128, 2012.
- SALGUEIRO, C. C. M.; NUNES, J. F.; OLIVEIRA, K. P. L. Utilização de diluentes à base de água de coco in natura e em pó na inseminação artificial programada de cabras. *Revista Brasileira de Reprodução Animal Supl*, n.5, p.175-182, 2002.
- SALGUEIRO, C. C. M.; NUNES, J. F. Água de coco em pó em biotécnicas da reprodução de caprinos. *Ciência Animal*, v. 22, p. 20-32, 2012.
- SAMPAIO NETO, J. C.; SALGUEIRO, C. C. M.; MATEOS-REX, E.; NUNES, J. F. Utilização do diluente ACP-105® na refrigeração do sêmen equino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 5, p. 137–139, 2002.
- SANTOS, R. R.; RODRIGUES, A. P.; COSTA, S. H.; SILVA, J. R.; MATOS, M. H.; LUCCI, C. M.; BÁO, S. N.; VAN DEN HURK, R.; FIGUEIREDO, J. R. Histological and ultrastructural analysis of cryopreserved sheep preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, v.91, p. 249-263, 2006.
- SARAIVA, M. V. A.; ROSSETTO, R.; BRITO, I. R.; CELESTINO, J.J. H.; SILVA, C.M. G.; FAUSTINO, L. R.; ALMEIDA, A. P.; BRUNO, J. B.; MAGALHÃES, M. S.; MATOS, M.H. T.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J.R. Dynamic medium produces caprine embryo from preantral follicles grown in vitro. *Reproduction Science*, v. 17, p. 1135–1143, 2010.
- SAWYER, H. T.; SMITH, P.; HEATH, D. A.; JUENGEL, J. L.; WAKEFIELD, S. J.; MCNATTY, K. P. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. *Biology of Reproduction*, v. 66, p. 1134-1150, 2002.
- SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; COSTA, S. H. F.; ANDRADE, E. R.; NUNES, A. P. A.; FERREIRA, F. V. A.; LÔBO, R. N. B.; FIGUEIREDO, J. R. Survival and growth of goat primordial follicles after in vitro culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. *Animal Reproduction Science*, v. 81, p. 273-286, 2004.
- SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; MATOS, M. H. T.; SANTOS, R. R.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; FIGUEIREDO, J. R. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during in vitro culture of caprine ovarian cortical tissue. *Theriogenology*, v. 61, p. 1691-1704, 2004b.
- SILVA, J. R. V. Growth factors in goat ovaries and the role of activina-A in the development of early-staged follicles. PhD thesis. Utrecht University, Faculty of veterinary medicine, p.142, 2005.
- SILVA, T. F. P.; ACKERMANN, C. L.; PINHEIRO, F. T. S.; SILVA, L. D. M. Uso da água de coco em pó (ACP-117) na criopreservação de sêmen de gato doméstico. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 17, 2007,

Curitiba, PR. Anais... Belo Horizonte: CBRA, 2007. Disponível em: <http://www.cbra.org.br>

- SILVA, A. E. F.; CAVALCANTE, L. F.; RODRIGUES, B. A.; RODRIGUES, J. L. The Influence of Powdered Coconut Water (ACP-318®) in *In Vitro* Maturation of Canine Oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 45, p. 1042–1046, 2010.
- SILVA-SANTOS, K. C.; SANTOS, G. M. G.; SILOTO, L. S.; HERTEL, M. F.; ANDRADE, E. R.; RUBIN, M. I. B.; STURION, L.; MELO-STERZA, F. A.; SENEDA, M. M. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. *Theriogenology*, v. 76, p.1051-1057, 2011.
- SMITZ, J. E. J.; CORTTVRINDT, R. G. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reproduction*. V. 123, p. 185-202, 2002.
- SMITZ, J.; DOLMANS, M. M.; DONNEZ, J.; FORTUNE, J. E.; HOVATTA, O.; JEWGENOW, K.; PICTON, H. M.; PLANCHA, C.; SHEA, L. D.; STOUFFER, R. L.; TELFER, E. E.; WOODRUFF, T. K.; ZELINSKI, M. B. Current achievements and future research directions in ovarian tissue culture, in vitro follicle development and transplantation: implications for fertility preservation. *Human Reproduction Update* v. 16, p. 395-414, 2010.
- TELFER, E. E.; McLAUGHLIN, M.; DING, C.; THONG, K. J. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. *Human reproduction*, v. 23, p. 1151-1158, 2008.
- THOMAS, F. H.; WALTERS, K. A.; TELFER, E. E. How to make a good oocyte: an update on in-vitro models to study follicle regulation. *Human reproduction update*, v. 9, p. 541-555, 2003.
- VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M. M.; BECKER, J. F. *In vivo* and *in vitro* development of preantral follicles. *Theriogenology*, v.47, p. 73-82, 1997.
- VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, v. 63, p. 1717-1751, 2005.
- WANDJI, S. A.; SRSEN, V.; VOSS, A. K.; EPPIG, E. E.; FORTUNE, J. E. Initiation in vitro of growth of bovine primordial follicles. *Biology of Reproduction*, v. 55, p. 942-948, 1996.
- WOOD, T. C.; MONTALI, R. J.; WILDT, D. E. Follicle-oocyte atresia and temporal taphonomy in cold-stored domestic cat ovaries. *Molecular Reproduction and Development*, v. 46, p. 190-200, 1997.
- WU, J.; EMERY, B. R.; CARRELL, D. T. In vitro growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. *Biology of Reproduction*, v. 64, n. 1, p. 375-81, 2001.
- XU, J.; LAWSON, M. S.; YEOMAN, R. R.; PAU, K. Y.; BARRETT, S. L.; ZELINSKI, M. B.; STOUFFER, R. L. Secondary follicle growth and oocyte maturation during encapsulated three-dimensional culture in rhesus

monkeys: effects of gonadotrophins, oxygen and fetu in. Human Reproduction, v. 26, p. 1061-1072, 2011.

ZORZETTO, M. F.; MARTIN, I.; SANCLER-SILVA, Y. F. R.; ZOCCA, S.; FREITAS-DELL'AQUA, C. P.; PAPA, F. O.; RAMOS, A. A.; NUNES, J. F.; SALGUEIRO, C. C. M.; OBA, E. Comparison of three different extenders on Murrah buffaloes (*Bubalus bubalis*) semen freezability. Andrologia, Botucatu, 2017;

Article

POWDERED COCONUT WATER (ACP 406®) AS A BASE CULTURE MEDIUM FOR *IN VITRO* CULTURE OF GOAT PRE-ANTRAL FOLLICLES ENCLOSED IN OVARIAN TISSUE.

Olga Juliana RoldanCastañeda^{a,b}, Francisco Léo Nascimento de Aguiar^a, Naiza Arcângela Ribeiro de Sá^a, Maria Luana Galdencio dos Santos Morais^a, Ciro Alexandre Alves Torres^b, José Ricardo de Figueiredo^{*a}

^a*Laboratory of Manipulation of Oocytes and Preantral Follicles (LAMOFOPA), State University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil*

^b*Laboratory of Animal Physiology and Reproduction, Federal University of Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, Brazil*

CONTENTS

This study evaluated the effect of ACP 406® as a base culture medium on the *in vitro* survival and development of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue. The ovarian fragments were either immediately fixed (non-cultured control) or individually *in vitro* cultured for 2 or 6 days at 39 °C with 5% CO₂ in air. The following culture media were evaluated: α-MEM (α-MEM alone, without additional supplementation); α-MEM+ (supplemented α-MEM); ACP (Powdered coconut water - ACP®406 alone); or ACP+ (supplemented ACP®406). After the tests, the following endpoints were recorded: (i) follicular survival, (ii) follicular growth, (iii) hormonal, and (iv) reactive oxygen species (ROS). At day 6 of culture when ACP and α-MEM were compared under the same condition, i.e., without or with supplementation, the percentage of healthy follicles were similar ($p>.05$) (Fig. 1) between the treatments. Overall, compared to non-cultured control treatment, despite of the culture time and base medium, it was observed a reduction ($p<.05$) in the percentage of primordial along with an increase

($p < .05$) in the rate of developing follicles indicating that primordial follicle activation had occurred. However, at day 6 of culture, the percentage of primordial follicle activation, the ROS production and follicular and oocyte diameters were similar ($p > .05$) among the treatments. In conclusion, ACP+ has the equivalent efficiency to MEM+ in maintaining the survival and development of goat preantral follicles *in vitro*. However, ACP has the advantage of being a natural product at a lower cost and may be an alternative medium for *in vitro* follicle culture.

Keywords: ACP, base medium, goat, *in vitro* culture, powdered coconut water, preantral follicles.

INTRODUCTION

The vast majority ($\approx 90\%$) of oocytes in the ovary are enclosed in preantral follicles (PAFs). Therefore, one of the chief emerging strategies to avoid follicular atresia is the use of assisted reproductive technique named *in vitro* follicle culture (IVFC). In short, the goals of this technique are to rescue PAFs from ovary before they become atretic and culture them up to maturation stages to prevent follicular atresia. One of the future applications of IVFC is the multiplication of superior genetic animals, endangered species, and infertility treatments in human (Silva, van den Hurk, & Figueiredo, 2016).

Even though several studies have been demonstrated the efficiency of IVFC to assure the survivability and development of PAFs, the results have been limited to the production of a few matured oocytes and embryos in some species, such as murine (Xu et al., 2006; Higuchi et al., 2015), pig (Wu et al.,

2001), buffalo (Gupta et al., 2008), sheep (Arunakumari, Shanmugasundaram, & Rao, 2010), goat (Saraiva et al., 2010; Magalhães et al., 2011), and non-human primate (Xu et al., 2011). Therefore, efforts must be done to optimize the efficiency of IVFC systems, including the search for new base culture media. Among the base culture media used for IVFC, the modified Minimal Essential Medium alpha (α -MEM) has been widely employed for the *in vitro* culture of PAFs enclosed in ovarian tissue in many species, such as caprine (Cadenas et al., 2017; Sá et al., 2017), ovine (Lunardi et al., 2015), bovine (Jimenez et al., 2016), canine (Serafim et al., 2010), and equine (Gomes et al., 2015; Aguiar et al., 2017a,b).

Plant-based culture media represent a low-cost alternative for IVFC, especially in tropical regions. One of this promising plant-based culture medium is the coconut water solution (CWS). Previous reports demonstrated that CWS maintained follicular morphology, and stimulated activation and development after *in vitro* culture of caprine PAFs (Silva et al., 2000; Martins et al., 2005), and ovine (Andrade et al., 2002; Costa et al., 2006), as well as increased *in vitro* maturation (IVM) of bovine oocytes (Blume, Vale Filho, Marques, & Saturnino, 1997; Cordeiro et al., 2006). Notably, the CWS is a sterile and slightly acid solution, which is rich in nutrients such as proteins, salts, carbohydrates, vitamins, growth factors (phytohormones) and different electrolytes (Yong, Ge, Ng, & Tan, 2009). However, the biochemical properties of CWS can vary among the different species of coconut. Hence, to reduce this variability, studies were conducted to evaluate the effects of dehydration on coconut water stability (Salgueiro, Nunes, & Oliveira, 2002). Then, a dehydrated presentation(sample) of CWS called powdered coconut water (ACP[®]) was

developed, which consists in a subtle and uniform dehydrated powder formulation obtained after fruit selection, the collection of the endospermic liquid and submission to a heat dehydration process. ACP has been successfully used for short-term preservation of canine preantral follicles (Lima et al., 2010) as well as IVM of canine oocytes (Silva, Cavalcante, Rodrigues, & Rodrigues, 2010). However, to the best of our knowledge, no reports are evaluating the effect of ACP406[®] on the IVC of caprine preantral follicles. This study aimed to assess the impact of ACP 406[®] as a base culture medium on the *in vitro* survival and development of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue. The endpoints evaluated were the following: (i) follicular survival, (ii) follicular growth, (iii) hormonal, and (iv) reactive oxygen species (ROS) production used in the culture media.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals

Unless otherwise specified, the culture media and other chemicals used in the present study were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., USA).

Ovaries

Ovaries (n = 8) from 4 adult mixed-breed goats were collected from a local slaughterhouse. Immediately post-mortem, the surrounding fat tissue, and ligaments were stripped off. Then, each ovarian pair were washed once in 70% alcohol for 10 seconds, followed by two washes in Minimum Essential Medium (MEM) supplemented with HEPES (MEM-HEPES), penicillin (100 µg/mL) and streptomycin (100 µg/mL). After that, the ovaries were placed in tubes with the

same medium and transported to the laboratory at 4°C within one hour (Chaves et al., 2008).

Experimental protocol

In the laboratory, the ovarian cortex of each ovarian pair was divided into 18 tissue samples (approximate size, 3 x 3 x 1 mm) under sterile conditions. From these obtained fragments, two randomly fragments were taken and immediately fixed for routine histology evaluation (non-cultured control). The remaining fragments (n= 16) were individually *in vitro* cultured in a well of a 24-well culture plate, each well containing one mL of culture medium (pH 7.2-7.4) for 2 or 6 days at 39 °C with 5% CO₂ in the air. The culture media tested were: 1. α-MEM (α-MEM alone, without additional supplementation); 2. α-MEM+ (supplemented α-MEM); (3) ACP (Powdered coconut water - ACP[®]406 alone, Biotechnology, Fortaleza, Ceará, Brazil); or 4. ACP+ (supplemented ACP[®]406). The medium supplementation was performed by the addition of 1.25 mg/mL bovine serum albumin (BSA), ITS (10 µg/mL insulin, 5.5 µg/mL transferrin, 5 ng/mL selenium), 2 mM glutamine, 2 mM hypoxanthine, and antibiotics (100 µg/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin). The whole culture medium was replaced every other day (Days 2, 4, and 6). Furthermore, one mL of the used medium was saved for hormonal and ROS analyses, and stored at -80 °C until evaluation. After medium collection at Day 2 and Day 6 the treatments ended and the fragments were processed for histological evaluation.

Follicle morphology and development

Follicular morphology and development of PAFs were assessed in each ovarian fragment before (non-cultured control) and after Day 2 or Day 6 of *in*

vitro culture. All samples were fixed in Carnoy solution at room temperature (around 25°C) for four hours and kept in 70% alcohol until routine histology. Afterward, the ovarian tissues were dehydrated by use of a graded series of ethanol, diaphanized with xylene, embedded in paraffin wax, and cut into serial sections of 7 µm. Every slice was mounted on glass slides, stained with periodic acid-Schiff-hematoxylin, and examined under light microscopy (Nikon, Tokyo, Japan) at 400 x magnification.

Preantral follicles were classified accordingly to its morphology as morphologically normal (follicle containing an intact oocyte and granulosa cells well-organized in layers without pyknotic nuclei) or degenerate (oocyte with pyknotic nuclei, retracted cytoplasm, or disorganized granulosa cells detached from the basement membrane). Only preantral follicles in which the oocyte nucleus could be observed in each section, was considered. To evaluate follicular activation (i.e., the transition from primordial to growing follicles, when surrounding squamous pregranulosa cells become cuboidal and begin to proliferate), the follicular developmental categories were determined only in morphologically normal follicles (MNF), as previously described (Silva et al., 2004). Either primordial (one layer of flat granulosa cells surrounding the oocyte) or developing follicles [transitional (one layer of flattened or cuboidal granulosa cells); primary (one layer of cuboidal granulosa cells); and secondary (two or more layers of cuboidal granulosa cells)] were calculated at Day 0 (non-cultured control) and after Day 2 and Day 6 of culture from each treatment.

Besides, the follicular and oocyte diameters per follicular category (primordial, transitional, and primary) were measured only in morphologically normal follicles, under an epifluorescence microscope (Zeiss, Cologne,

Germany) using software (Nis-Element AR 3.0). Follicle diameter was measured from one side to the other edge of the outermost layer of granulosa cells. Oocyte diameter was measured from one edge of the oocyte membrane to the other. Two perpendicular diameters were recorded for each measurement, and the average of those two values was calculated (Santos et al., 2007).

Reactive oxygen species (ROS) analysis

The levels of ROS were determined in the used culture media at Day 2 and Day 6 by a spectro fluorimetric method (Loetchutinat et al., 2005). Briefly, culture media for all treatments were incubated with 10 μ L of 2',7'- dihydro dichloro fluorescein diacetate (DCHF-DA;1mM). The oxidation of DCHF-DA to fluorescent dichloro fluorescein (DCF) was measured for detection of reactive species in the medium. The intensity of fluorescence emission (FI) was recorded at 520 nm (with 480 nm excitation) for two hours after addition of DCHF-DA to the medium.

Estradiol analysis

Concentrations of estradiol were measured from standard aliquots (200 μ L) in used culture media at Day 2, Day 4 and Day 6 of culture. The estradiol assay performed was the enzyme-linked fluorescent assay (ELFA) according to the manufacturer's instructions (VIDAS® Estradiol II, ref 30431 bioMérieux SA, 376 Chemin de L'Orme, 69280 Marcy-l'Etoile - France). In the end, the fluorescence intensity emission was recorded at 450 nm, and the values of the fluorescence signal were inversely proportional to the concentration of the antigen present in the samples (Anckaert, Mees, Schiettecatte, & Smits, 2002).

The analytical sensitivity of the estradiol assay was nine pg/mL (range, 9.49 to 1596.81 pg/ml), and the intra-assay coefficient of variation was 7.5%.

Statistical analyses

Data for continuous variables (morphologically normal, follicular development and follicular and oocyte diameters) were initially submitted to Shapiro-Wilk test to evaluate the normal distribution of the residues. Data for endpoints without a normal distribution were transformed to ranks when necessary. Statistical analyses were carried out using Sigma Plot version 11.2 (Systat Software, San Jose, CA, USA). Chi-square test was used to compare the percentage of morphologically normal and developing preantral follicles among and within treatments and the results expressed as percentages. Tukey test was used to compare follicle and oocyte diameters among treatments, follicular categories, and between days of culture. Estradiol analysis was compared among treatments within the same day of culture using the t-test, whereas, for ROS analysis, One Way Analysis of Variance was used to compare the effect of treatments between days of culture. Data are presented as the mean \pm SEM. In all cases, differences were considered to be significant when $p < .05$.

RESULTS

Number of follicles evaluated

A total of 177 (fresh non-cultured control), 145 and 138 (α -MEM, Day 2 and Day 6), 148 and 136 (α -MEM+, Day 2 and Day 6), 141 and 132 (ACP, Day 2 and Day 6), 162 and 151 (ACP+, Day 2 and Day 6) were assessed.

Altogether, 1,330 follicles were evaluated, with an average of 147.77 ± 4.72 follicles evaluated per treatment.

Follicular morphology

The percentage of morphologically normal follicles was reduced ($p < .05$) for all evaluated treatments after 2 and 6 days of culture when compared to the fresh non-cultured control group. Regardless the supplementation, at day 2 of culture α -MEM showed higher ($p < .05$) percentage of MNF than ACP. However, contrary to ACP and ACP+ treatments, α -MEM and α -MEM+ treatments reduced ($p < .05$) the percentage of healthy follicles from day 2 to day 6 of culture. Interestingly, at day 6 of culture when ACP and α -MEM were compared under the same condition, i.e., without or with supplementation, the percentage of normal follicles were similar ($p > .05$) (Figure 1) between the treatments.

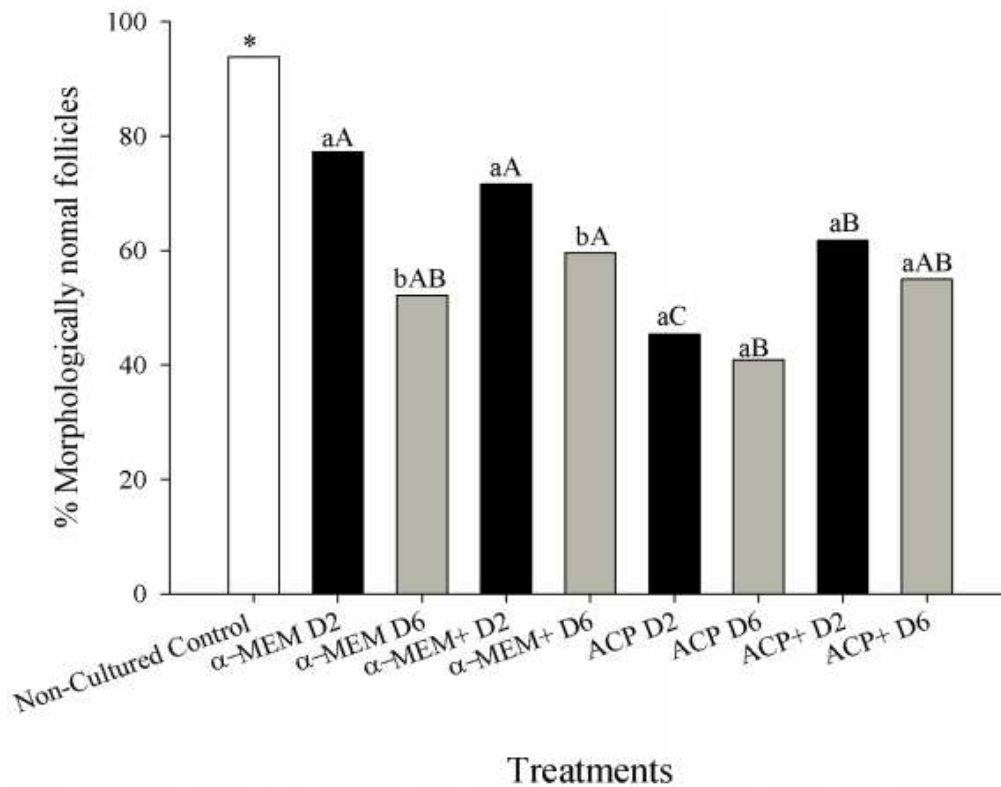


Figure 1. Percentage (%) of morphologically normal caprine preantral follicles (MNF) in a fresh non-cultured control group (Control) and after *in vitro* culture for two (D2) and six (D6) days in the absence (α -MEM or ACP) or presence of supplements (α -MEM+ or ACP+). *Indicates difference between non-cultured control and the other cultured treated groups.^{a,b} Within each treatment, values without a common letter differed ($p < .05$).^{A,B,C} Within days, values without a common letter differed ($p < .05$).

Follicular development

The percentage of primordial and developing follicles are shown (Figure 2A and B). Compared to non-cultured control treatment, in spite of the culture time and base medium, except for ACP at day 2 of culture, it was observed a reduction ($p < .05$) in the rate of primordial along with an increase ($p < .05$) in the percentage of developing follicles. Only for ACP treatment changes ($p < .05$) in the proportion of primordial and developing follicles were observed from day 2 to day 6 of culture. However, at day 6 of culture, similar ($p < .05$) proportion of follicular activation, i.e., the proportion of primordial and developing follicles were observed among the treatments.

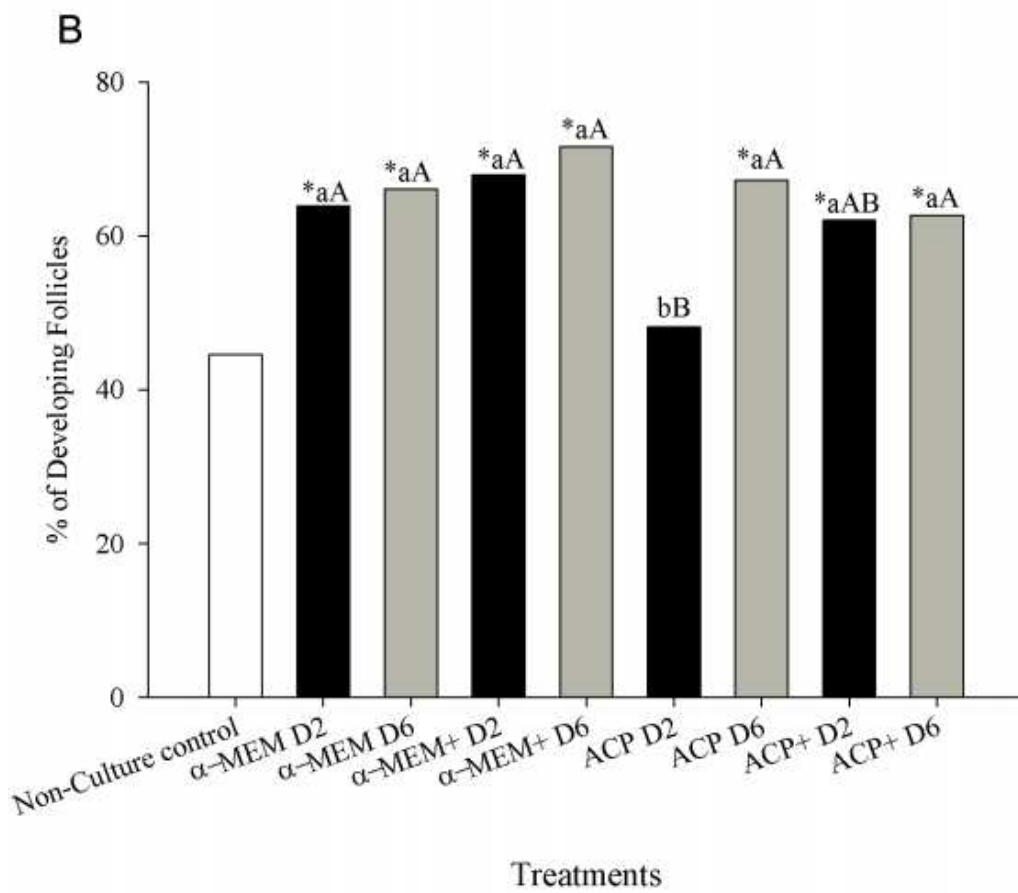
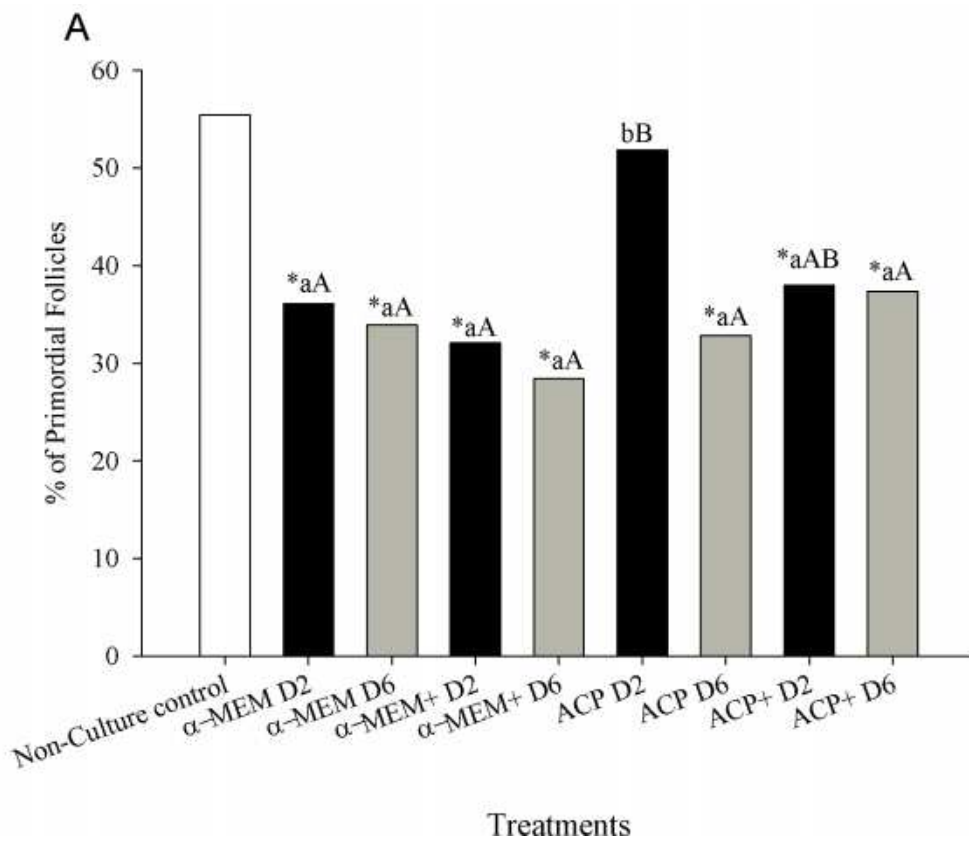


Figure 2.Percentage (%) of (A) primordial and (B) developing (transitional, primary and secondary) morphologically normal caprine preantral follicles in a fresh non-cultured control group (Control) and after *in vitro* culture for two (D2) and six (D6) days in the absence (α -MEM or ACP) or presence of supplements (α -MEM⁺ or ACP⁺). *Differed ($p < .05$) from fresh non-cultured control group.^{a,b} Within each treatment, values without a common letter differed ($p < .05$).^{A,B} Within days, values without a common letter differed ($p < .05$).

Follicular and oocyte diameter

The follicular and oocyte diameters of morphologically normal preantral follicles in primordial, intermediate and primary follicles, before (non-cultured – control) and after Day 2 and Day 6 of *in vitro* culture are shown (Table 1). When compared with Fresh non-cultured control group, all treatments had a decrease ($p < .05$) in the follicular and oocyte diameters despite the follicular category. All treatments had an increase ($p < .05$) in follicular and oocyte diameters from the primordial to primary stage. Only for the primary follicular class at Day 2 of culture, the α -MEM+D2 group had higher ($p < .05$) follicular and oocyte diameters than the ACP+D2 group.

Table 1. Mean (\pm SEM) diameters (μm) of caprine preantral follicle and oocytes (primordial, transitional, and primary) in a fresh non-cultured group and after two (D2) and six (D6) days of culture in α -MEM, or ACP in the absence or presence

	Follicle Diameter			Oocyte Diameter		
	Primordial	Transitional	Primary	Primordial	Transitional	Primary
Non-cultured control	31.0 \pm 1.0 ^a	37.5 \pm 0.8 ^b	45.7 \pm 2.0 ^c	25.4 \pm 0.8 ^a	29.2 \pm 1.0 ^a	34.4 \pm 1.3 ^b
α -MEM D2	19.7 \pm 0.4 ^{*aA}	23.2 \pm 0.4 ^{*aA}	32.9 \pm 1.2 ^{*bAB}	14.5 \pm 0.4 ^{*aA}	16.3 \pm 0.5 ^{*aA}	23.7 \pm 1.1 ^{*bBC}
α -MEM ⁺ D2	20.6 \pm 0.7 ^{*aA}	27.1 \pm 0.7 ^{*bA}	33.6 \pm 1.5 ^{*cB}	14.9 \pm 0.5 ^{*aA}	19.1 \pm 0.7 ^{*bA}	24.2 \pm 1.0 ^{*cC}
ACP D2	19.3 \pm 0.5 ^{*aA}	25.5 \pm 0.6 ^{*bA}	30.8 \pm 1.1 ^{*cAB}	15.1 \pm 0.7 ^{*aA}	17.9 \pm 0.5 ^{*abA}	22.4 \pm 0.9 ^{*bABC}
ACP ⁺ D2	20.2 \pm 0.5 ^{*aA}	24.0 \pm 0.8 ^{*aA}	29.3 \pm 1.4 ^{*bA}	15.0 \pm 0.5 ^{*aA}	17.2 \pm 0.5 ^{*abA}	19.6 \pm 0.8 ^{*bB}
α -MEM D6	19.3 \pm 0.9 ^{*aA}	26.0 \pm 0.7 ^{*bA}	32.0 \pm 1.2 ^{*cAB}	13.0 \pm 0.7 ^{*aA}	17.5 \pm 0.6 ^{*bA}	21.8 \pm 1.2 ^{*cABC}
α -MEM ⁺ D6	20.7 \pm 0.5 ^{*aA}	25.0 \pm 0.4 ^{*bA}	30.2 \pm 1.0 ^{*cAB}	14.8 \pm 0.6 ^{*aA}	16.9 \pm 0.5 ^{*abA}	19.7 \pm 0.9 ^{*bA}
ACP D6	22.0 \pm 0.6 ^{*aA}	24.6 \pm 0.7 ^{*aA}	30.0 \pm 0.7 ^{*bAB}	15.0 \pm 0.4 ^{*aA}	16.6 \pm 0.6 ^{*abA}	20.0 \pm 0.8 ^{*bAB}
ACP ⁺ D6	21.1 \pm 0.6 ^{*aA}	25.4 \pm 0.8 ^{*bA}	31.4 \pm 1.0 ^{*cAB}	15.9 \pm 0.8 ^{*aA}	17.7 \pm 0.7 ^{*aA}	22.1 \pm 1.1 ^{*bABC}

(⁺) of supplements.

* Values differed ($p < .05$) from fresh non-cultured control group at the same follicular stage.

A,B,C Within a column, uncommon uppercase letters differed ($p < .05$).

a,b,c Within a row, uncommon lowercase letters differed ($p < .05$).

Reactive oxygen species production

At Day 2 of culture, α -MEM and α -MEM⁺ treatments had a higher ($p < .05$) ROS production than the ACP and ACP⁺ (Figure 3). However, after days 4 and 6 of culture, no difference ($p > .05$) among treatments was observed. Finally, increasing ($p < .05$) in ROS production during culture was only observed in the treatment ACP without supplementation from Day 2 to Day 6 of culture.

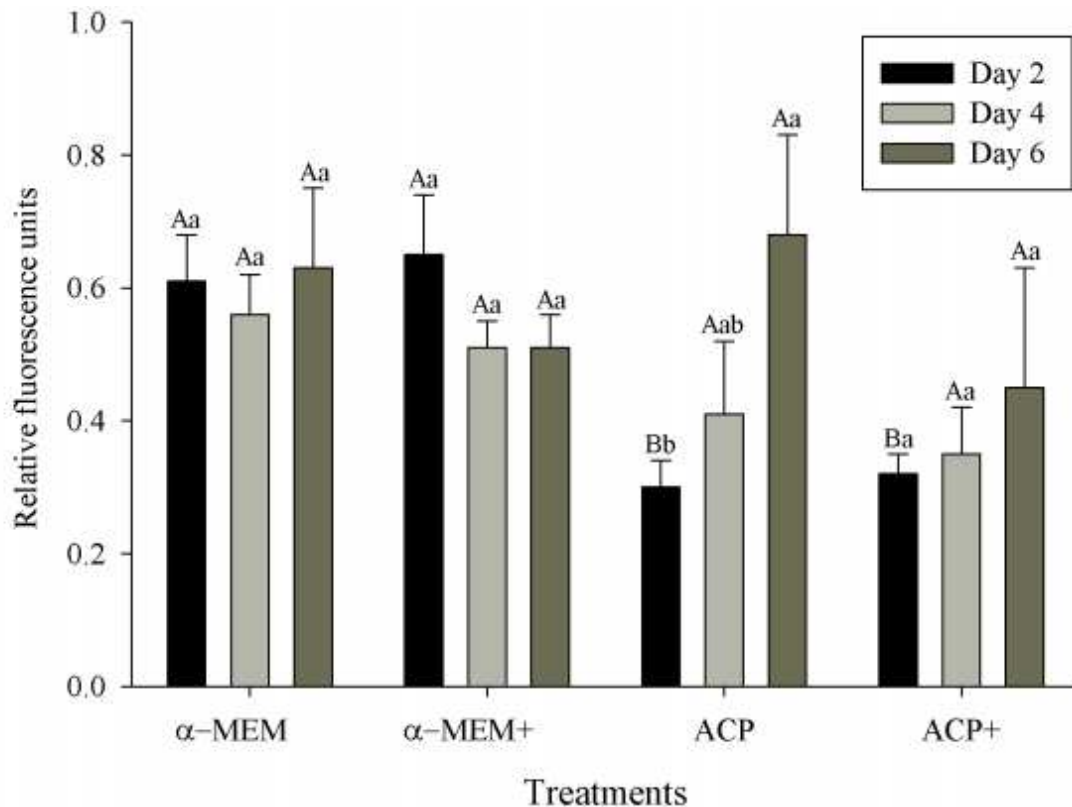


Figure 3. Mean (\pm SEM) reactive oxygen production (relative fluorescence units – microM of H_2O_2) produced in the used medium after two (D2), four (D4) and six (D6) days in the absence (α -MEM or ACP) or presence of supplements (α -MEM⁺ or ACP⁺). ^{a,b} Within each treatment, values without a common letter differed ($p < .05$). ^{A,B} Within days, values without a common letter differed ($p < .05$).

Estradiol production

On Day 2 of culture, the ACP treatment had higher ($p < .05$) estradiol production than α -MEM+ and ACP+ treatments, but it was similar ($p > .05$) to the α -MEM group. The levels of estradiol production at Day 4 of culture was detected only in a small number ($n=7$) of samples (data not shown). No estradiol production was observed in any treatment after six days of culture (Figure 4).

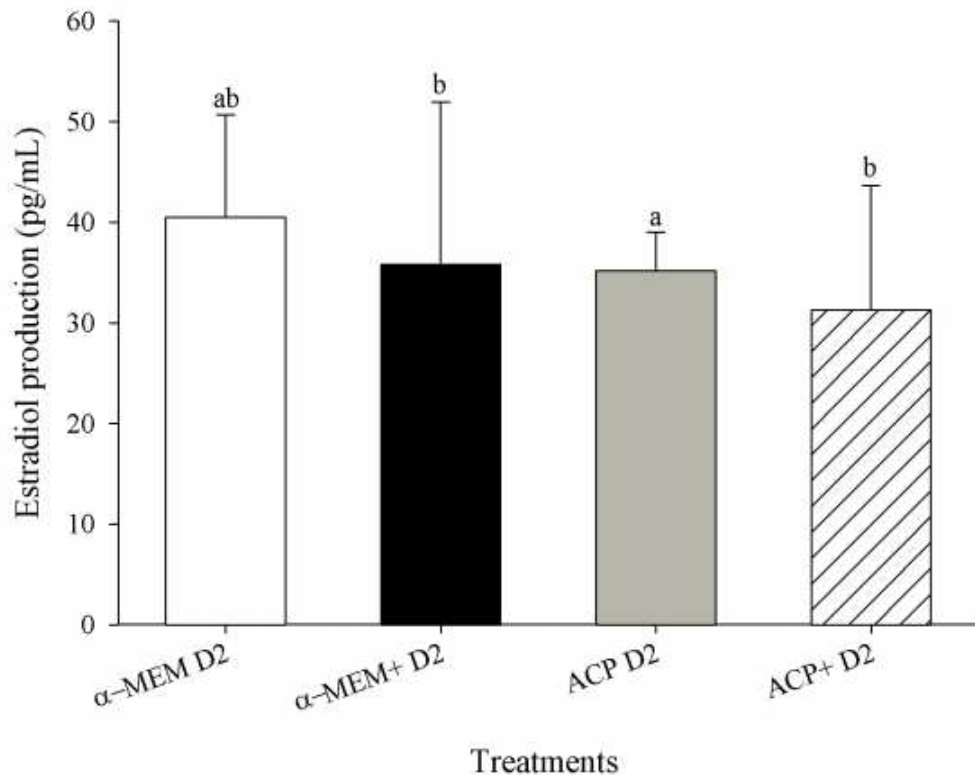


Figure 4. Mean (\pm SEM) estradiol production (pg/mL; n=24) produced by caprine preantral follicles after *in vitro* culture for two (D2) days in the absence (α -MEM or ACP) or presence of supplements (α -MEM⁺ or ACP⁺). ^{a,b} Values without a common letter differed ($p < .05$).

DISCUSSION

To the best of our knowledge, this is the first study comparing under the same experimental condition the efficiency of two base media, ACP and α -MEM, in the maintenance of *in vitro* follicular survival and development of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue. Our findings demonstrated similar efficiency between ACP⁺ and α -MEM⁺ taking into account the endpoints measured at day 6 of culture.

Overall, our findings showed a decrease in the percentage of MNF in all treatments when compared with the non-cultured control. This reduction has been commonly observed in many studies using preantral follicles from different

species: (Rossetto et al., 2013, Andrade et al., 2014, Gouveia et al., 2016). Even though the use of alpha modified MEM as a base culture medium showed higher survivability percentages when compared with ACP's treatments at Day 2 of culture, such difference was no longer observed at day 6 of culture suggesting similar efficiency between the two tested base media. Such finding is probably due to the fact that both MEM (Silva et al., 2004; Peng, Yang, Wang, Tong, & Guo, 2010) and ACP (Leong & Shui, 2002; Aroucha, Souza, Aroucha, & Vianni, 2005; Vigliar, Sdepanian, & Fagundes-Neto, 2006) base media were enriched formulations containing critical substances such as amino acids, vitamins, and inorganic salts.

Overall, at days 2 and 6 of culture in all treatments, it was observed a significant reduction in the percentage of primordial follicles with a concomitant increase in the rate of developing follicles when compared with the non-cultured control group. When the culture conditions are suitable, spontaneous activation of primordial follicles usually occurred which is in agreement with previous reports in several species including goats (Matos et al., 2007), mice (Eppig & O'Brien, 1996), horses (Haag et al., 2013), cattle (Tang et al., 2012), and primates (Wandji, Sřseň, Nathanielsz, Eppig, & Fortune, 1997). In the present study, when performed cultures in the presence of ACP without supplementation, primordial follicle activation was lower than the other treatments and did not differ from non-cultured control. However, this was not observed at day six showing that in the ACP treatment occurred a temporary delay in the primordial follicle activation, followed by a compensatory effect during culture. Similar findings were observed for the percentage of MNF endpoint in the present study.

Regarding follicular and oocyte diameter, all treatments reduced the follicular and oocyte diameters compared to the control group. Similar results were reported in goats (Silva et al., 2002) and mares (Aguiar et al., 2017a). Considering that follicular and oocyte diameters were only recorded using MNF, the diameter decreasing during culture is probably due to the atresia of more advance follicle stages (i.e., primary and secondary) that are more likely to undergo atresia than primordial follicles (Aguiar et al., 2016). The non-detectable levels of estradiol support this statement at the end of culture and this hormone is usually produced by late secondary follicles, as well as early antral follicles (Cecconi et al., 1999).

The assessment of ROS production is an imperative tool to determine the presence of free radicals that may lead to deleterious effects on cultured cells (Talebi et al., 2012). In fact, it was previously demonstrated that an IVFC environment with an inappropriate concentration of ROS might initiate apoptosis, provoking damages in all follicular stages (Aguiar et al., 2016, Sá et al., 2017). Our study demonstrated that after six days of culture, no difference among treatments in ROS production was observed. It is known that ACP is endowed with antioxidants such as ascorbic acid, a potent free radical scavenger, redox catalyst that can reduce and neutralize ROS, protecting cells against oxidative stress (Wang et al., 2002), as well to minimize the cost of IVC with the use of a.

In conclusion, ACP+ has equivalent efficiency to MEM+ in maintaining the survival and development of goat preantral follicles *in vitro*. However, ACP has the advantage of being a natural product at a lower-cost and may be an alternative medium for *in vitro* follicle culture.

REFERENCES

- Aguiar, F. L. N., Lunardi, F. O., Lima, L. F., Bruno, J. B., Alves, B. G., Magalhães-Padilha, D. M., ...Figueiredo, J. R. (2017a). Role of EGF on *in situ* culture of equine preantral follicles and metabolomics profile. *Research in Veterinary Science*, 115, 155–164. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.04.001>
- Aguiar, F. L. N., Gastal, G. D. A., Ishak, G. M., Gastal, M. O., Teixeira, D. I. A., Feugang, J. M., ... Gastal, E. L. (2017b). Effects of FSH addition to an enriched medium containing insulin and EGF after long-term culture on functionality of equine ovarian biopsy tissue. *Theriogenology*, 99, 124–133. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.04.045>
- Aguiar, F. L. N., Lunardi, F. O., Lima, L. F., Rocha, R. M. P., Bruno, J. B., Magalhães-Padilha, D. M., ...Figueiredo, J. R. (2016). FSH supplementation to culture medium is beneficial for activation and survival of preantral follicles enclosed in equine ovarian tissue. *Theriogenology*, 85(6), 1106–1112. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.11.022>
- Anckaert, E., Mees, M., Schiettecatte, J., & Smitz, J. (2002). Clinical Validation of a Fully Automated 17 β -Estradiol and Progesterone Assay (VIDAS®) for Use in Monitoring Assisted Reproduction Treatment. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 40(8), 824–831.
- Andrade, E. R., Amorim, C. A., Matos, M. H. T., Rodrigues, A. P. R., Silva, J. R. V., Dode, M. A. N., & Figueiredo, J. R. (2002). Evaluation of saline and coconut water solutions in the preservation of sheep preantral follicles *in situ*. *Small Ruminant Research*, 43(3), 235–243. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(02\)00018-4](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(02)00018-4)
- Andrade, P. M., Chaves, R. N., Alves, A. M. C. V, Rocha, R. M. P., Lima, L. F., Carvalho, A. A., ... Figueiredo, J. R. (2014). Effects of α -MEM and TCM-199 culture media and epidermal growth factor on survival and growth of goat and sheep preantral follicles cultured *in vitro*. *Animal Reproduction*, 11(4), 567–572. Retrieved from [http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v11n4/pag567-572\(AR685\).pdf](http://www.cbra.org.br/portal/downloads/publicacoes/animalreproduction/issues/download/v11n4/pag567-572(AR685).pdf)
- Aroucha, E. M. M., Souza, C. L. M., Aroucha, M. C. M., & Vianni R. (2005). CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E QUÍMICAS DA ÁGUA DE COCO ANÃO VERDE E ANÃO VERMELHO EM DIFERENTES ESTÁDIOS DE MATURAÇÃO. *Revista Caatinga*, 18(2), 82–87.
- Arunakumari, G., Shanmugasundaram, N., & Rao, V. H. (2010). Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles.

- Blume, H., Vale Filho, V. R., Marques, A. P. Jr., & Saturnino, H. M. 1997. Avaliação da água de coco na maturação de ovócitos bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 21, 72-75.
- Cadenas, J., Leiva-Revilla, J., Vieira, L. A., Apolloni, L. B., Aguiar, F. L. N., Alves, B. G., ... Maside, C. (2017). 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*, 87, 321–332. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.008>
- Cecconi, S., Barboni, B., Coccia, M., & Mattioli, M. (1999). *In Vitro* Development of Sheep Preantral Follicles. *Biology of Reproduction*, 60(3), 594–601.
- Chaves, R. N., Martins, F. S., Saraiva, M. V. A., Celestino, J. J. H., Lopes, C. A. P., Correia, J. C., ... Figueiredo, J. R. (2008). Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*, 20(5), 640–647. <https://doi.org/10.1071/RD07195>
- Cordeiro, M. S., Silva, E. H. S., Miranda M. S., Biondi, F. C., Santos, S. S. D., & Ohashi, O. M. (2006). The use of coconut water solution (*Cocos nucifera*) as a holding medium for immature bovine oocytes for in vitro embryo production. *Animal Reproduction*, 3(3), 376-379.
- Costa, S. H. F., Santos, R. R., Rodrigues, A. P. R., Silva, J. R. V, Celestino, J. J. H., Matos, M. H. T., ...Figueiredo, J. R. (2006). In vitro culture of ovine primordial follicles in media supplemented with coconut water. *Animal Reproduction*, 3(4), 403–409.
- Eppig, J. J., & O'Brien, M. J. (1996). Development *In Vitro* of Mouse Oocytes from Primordial Follicles. *Biology of Reproduction*, 54(1), 197–207.
- Gomes, R. G., Lisboa, L. A., Silva, C. B., Max, M. C., Marino, P. C., Oliveira, R. L., ...Seneda, M. M. (2015). Improvement of development of equine preantral follicles after 6 days of *in vitro* culture with ascorbic acid supplementation. *Theriogenology*, 84(5), 750–755. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.05.006>
- Gouveia, B. B., Macedo., T. J. S., Santos, J. M. S., Barberino, R. S., Menezes, V. G., Müller, M. C., ...Matos, M. H. T. (2016). Supplemented base medium containing *Amburana cearensis* associated with FSH improves in vitro development of isolated goat preantral follicles. *Theriogenology*, 86(5), 1275-1284. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.068>.
- Gupta, P. S. P., Ramesh, H. S., Manjunatha, B. M., Nandi, S., & Ravindra, J. P. (2008). Production of buffalo embryos using oocytes from in vitro grown

preantral follicles. *Zygote*, 16(1), 57–63.
<https://doi.org/10.1017/S096719940700442X>

- Haag, K. T., Magalhães-Padilha, D. M., Fonseca, G. R., Wischral, A., Gastal, M. O., King, S. S., ... Gastal, E. L. (2013). In vitro culture of equine preantral follicles obtained via the Biopsy Pick-Up method. *Theriogenology*, 79(6), 911–917. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.01.001>
- Higuchi, C. M., Maeda, Y., Horiuchi, T., & Yamazaki, Y. (2015). A simplified method for three-dimensional (3-D) Ovarian tissue culture yielding oocytes competent to produce full-term offspring in mice. *PLoS ONE*, 10(11), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143114>
- Jimenez, C. R., de Azevedo, J. L., Silveira, R. G., Penitente-Filho, J., Carrascal-Triana, E. L., Zolini, A. M., ...Torres, C.A.A. (2016). Effects of Growth Hormone on In Situ Culture of Bovine Preantral Follicles are Dose Dependent. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(4), 575–584. <https://doi.org/10.1111/rda.12722>
- Leong, L. P., & Shui, G. (2002). An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chemistry*, 76(1), 69–75. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(01\)00251-5](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00251-5)
- Lima, G. L., Costa, L. L. M., Cavalcanti, D. M. L. P., Rodrigues, C. M. F., Freire, F. A. M., Fontenele-Neto, J. D., & Silva, A. R. (2010). Short-term storage of canine preantral ovarian follicles using a powdered coconut water (ACP®)-based medium. *Theriogenology*, 74(1), 146–152. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.01.025>
- Loetchutinat, C., Kothan, S., Dechsupa, S., Meesungnoen, J., Jay-Gerin, J. P., & Mankhetkorn, S. (2005). Spectro fluorometric determination of intracellular levels of reactive oxygen species in drug-sensitive and drug-resistant cancer cells using the 2',7'- dichloro fluorescein diacetate assay. *Radiation Physics and Chemistry*, 72(2–3), 323–331. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2004.06.011>
- Lunardi, F. O., Chaves, R. N., Lima, L. F., Araújo, V. R., Brito, I. R., Souza, C. E. A., ... Rodrigues, A. P. R. (2015). Vitrified sheep isolated secondary follicles are able to grow and form antrum after a short period of in vitro culture. *Cell and Tissue Research*, 362(1), 241–251. <https://doi.org/10.1007/s00441-015-2181-0>
- Magalhães, D. M., Duarte, A. B. G., Araújo, V. R., Brito, I. R., Soares, T. G., Lima, I. M. T., ... Figueiredo, J. R. (2011). In vitro production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. *Theriogenology*, 75(1), 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.08.004>
- Martins, F. S., Van DenHurk, R., Santos, R. R., Silva, J. R. V, Matos, M. H. T., Celestino, J. J. H., ...Figueiredo, J. R. (2005). Development of goat

- primordial follicles after in vitro culture of ovarian tissue in Minimal Essential Medium supplemented with coconut water. *Animal Reproduction*, 2(2), 106–113.
- Matos, M. H. T., Lima-Verde, I. B., Luque, M. C. A., Maia, J. E., Silva, J. R. V., Celestino, J. J. H., ...Figueiredo, J. R. (2007). Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability in vitro. *Zygote*, 15(2), 173–182. <https://doi.org/10.1017/S0967199407004169>
- Peng, X., Yang, M., Wang, L., Tong, C., &Guo, Z. (2010). *In vitro* culture of sheep lamb ovarian cortical tissue in a sequential culture medium. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 27(5), 247–257. <https://doi.org/10.1007/s10815-010-9415-6>
- Rossetto, R., Saraiva, M. V. A., Dos Santos, R. R., Da Silva, C. M. G., Faustino, L. R., Chaves, R. N., ...De Figueiredo, J. R. (2013). Effect of medium composition on the *in vitro* culture of bovine pre-antral follicles: Morphology and viability do not guarantee functionality. *Zygote*, 21(2), 125–128. <https://doi.org/10.1017/S0967199412000044>
- Sá, N. A. R., Araújo, V. R., Correia, H. H. V., Ferreira, A. C. A., Guerreiro, D. D., Sampaio, A. M., ... Figueiredo, J. R. (2017). Anethole improves the *in vitro* development of isolated caprine secondary follicles. *Theriogenology*, 89, 226–234. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.12.014>
- Salgueiro, C.C.M., Nunes, J. F., Oliveira, K.P.L. (2002). Utilização de diluentes à base de água de coco *in natura* e em pó na inseminação artificial programada de cabras. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 5, 175–182.
- Santos, R. R., Tharasanit, T., Van Haeften, T., Figueiredo, J. R., Silva, J. R. V., & Van DenHurk, R. (2007). Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. *Cell and Tissue Research*, 327(1), 167–176. <https://doi.org/10.1007/s00441-006-0240-2>
- Saraiva, M. V. A., Rossetto, R., Brito, I. R., Celestino, J. J. H., Silva, C. M. G., Faustino, L. R., ... Figueiredo, J. R. (2010). Dynamic medium produces caprine embryo from preantral follicles grown in vitro. *Reproductive Sciences*, 17(12), 1135–1143. <https://doi.org/10.1177/1933719110379269>
- Serafim, M. K. B., Araújo, V. R., Silva, G. M., Duarte, A. B. G., Almeida, A. P., Chaves, R. N., ... da Silva, L. D. M. (2010). Canine preantral follicles cultured with various concentrations of follicle-stimulating hormone (FSH). *Theriogenology*, 74(5), 749–755. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.03.028>
- Silva, A. E. F., Cavalcante, L. F., Rodrigues, B. A., & Rodrigues, J. L. (2010). The influence of powdered coconut water (ACP-318®) in In Vitro

- Maturation of Canine Oocytes. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(6), 1042–1046. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2009.01487.x>
- Silva, J. R. V., Ferreira, M. A. L., Costa, S. H. F., Santos, R. R., Carvalho, F. C. A., Rodrigues, A. P. R., ... Figueiredo, J. R. (2002). Degeneration rate of preantral follicles in the ovaries of goats. *Small Ruminant Research*, 43(3), 203–209. [https://doi.org/10.1016/S0921-4488\(02\)00017-2](https://doi.org/10.1016/S0921-4488(02)00017-2)
- Silva, J. R. V., Lucci, C. M., Carvalho, F. C. A., Bão, S. N., Costa, S. H. F., Santos, R. R., & Figueiredo, J. R. (2000). Effect of coconut water and braun-collins solutions at different temperatures and incubation times on the morphology of goat preantral follicles preserved in vitro. *Theriogenology*, 54(5), 809–822. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(00\)00392-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(00)00392-7)
- Silva, J. R. V., van den Hurk, R., & Figueiredo, J. R. (2016). Ovarian follicle development *in vitro* and oocyte competence: Advances and challenges for farm animals. *Domestic Animal Endocrinology*, 55, 123–135. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2015.12.006>
- Silva, J. R. V., Van Den Hurk, R., Costa, S. H. F., Andrade, E. R., Nunes, A. P. A., Ferreira, F. V. A., ... Figueiredo, J. R. (2004). Survival and growth of goat primordial follicles after *in vitro* culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. *Animal Reproduction Science*, 81(3–4), 273–286. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2003.09.006>
- Talebi, A., Zavareh, S., Kashani, M. H., Lashgarbluki, T., & Karimi, I. (2012). The effect of alpha lipoic acid on the developmental competence of mouse isolated preantral follicles. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 29(2), 175–183. <https://doi.org/10.1007/s10815-011-9706-6>
- Tang, K., Yang, W. C., Li, X., Wu, C. J., Sang, L., & Yang, L. G. (2012). GDF-9 and bFGF enhance the effect of FSH on the survival, activation, and growth of cattle primordial follicles. *Animal Reproduction Science*, 131(3–4), 129–134. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.03.009>
- Vigliar, R., Sdepanian, V. L., & Fagundes-Neto, U. (2006). Biochemical profile of coconut water from coconut palms planted in an inland region. *Jornal de Pediatria*, 82(4), 308–312. <https://doi.org/10.2223/JPED.1508>
- Wandji, S. A., Sřseñ, V., Nathanielsz, P. W., Eppig, J. J., & Fortune, J. E. (1997). Initiation of growth of baboon primordial follicles *in vitro*. *Human Reproduction*, 12(9), 1993–2001. <https://doi.org/10.1093/humrep/12.9.1993>
- Wang, X., Falcone, T., Attaran, M., Goldberg, J. M., Agarwal, A., & Sharma, R. K. (2002). Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. *Fertility and Sterility*, 78(6), 12272–12277. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)04236-X](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)04236-X)

- Wu, J., Emery, B. R., & Carrell, D. T. (2001). *In vitro* growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. *Biology of Reproduction*, 64(1), 375-381. <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.1.375>
- Xu, M., Fazleabas, A. T., Shikanov, A., Jackson, E., Barrett, S. L., Hirshfeld-Cytron, J., ... Woodruff, T. K. (2011). *In Vitro* Oocyte Maturation and Preantral Follicle Culture from the Luteal-Phase Baboon Ovary Produce Mature Oocytes. *Biology of Reproduction*, 84(4), 689-697. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.088674>
- Xu, M., Kreeger, P. K., Shea, L. D., & Woodruff, T. K. (2006). Tissue-Engineered Follicles Produce Live, Fertile Offspring. *Tissue Engineering*, 12(10), 2739-2746. <https://doi.org/10.1089/ten.2006.12.2739>
- Yong, J. W. H., Ge, L., Ng, Y. F., & Tan, S. N. (2009). The Chemical Composition and Biological Properties of Coconut (*Cocos nucifera* L.) Water. *Molecules*, 14(12), 5144-5164. <https://doi.org/10.3390/molecules14125144>