



RENORBIO – REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA - UFRPE

**DIFERENTES OFERTAS DE ÁGUA E DE LEPTINA E SEUS EFEITOS NA FOLICULOGÊNESE DE OVELHAS NO SEMIÁRIDO PERNAMBUCANO**

VANÚZIA GONÇALVES MENEZES

Petrolina, 2020

VANÚZIA GONÇALVES MENEZES

**DIFERENTES OFERTAS DE ÁGUA E DE LEPTINA E SEUS EFEITOS NA  
FOLICULOGÊNESE DE OVELHAS NO SEMIÁRIDO PERNAMBUCANO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia, área de concentração Biotecnologia em Agropecuária.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Aurea Wischral

Coorientadores: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Helena Tavares de Matos

Prof. Dr. Mário Adriano Ávila Queiroz

Petrolina, 2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

M543d Menezes, Vanúzia Gonçalves  
Diferentes ofertas de água e de leptina e seus efeitos na foliculogênese no semiárido Pernambucano / Vanúzia  
Gonçalves Menezes. - 2020.  
113 f. : il.

Orientadora: Aurea Wischral.  
Coorientadora: Maria Helena Tavares de Matos.  
Inclui referências e anexo(s).

Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Doutorado em Biotecnologia – Rede  
Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Recife, 2020.

1. Oferta hídrica. 2. Folículos primordiais. 3. Hormônios sexuais. 4. Maturação oocitária in vitro. 5. Folículos pré  
antrais. I. Wischral, Aurea, orient. II. Matos, Maria Helena Tavares de, coorient. III. Título

CDD 620.8

---

RENORBIO – REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**DIFERENTES OFERTAS DE ÁGUA E DE LEPTINA E SEUS EFEITOS NA  
FOLICULOGÊNESE DE OVELHAS NO SEMIÁRIDO PERNAMBUCANO**

Tese de doutorado elaborada por  
VANÚZIA GONÇALVES MENEZES

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Dr. Gherman Garcia Leal de Araújo**  
**Embrapa Semiárido**

---

**Prof. Dr. André Mariano Batista**  
**Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE**

---

**Prof. Dr. José Roberto Viana Silva**  
**Universidade Federal do Ceará – UFC**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Gradela**  
**Colegiado de Medicina Veterinária da UNIVASF**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela vida, a saúde, a sabedoria e a determinação diária.

Ao meu pai Valmir Soares de Menezes, pelos conselhos, exemplos, otimismo, força e carinho.

Aos meus irmãos André Luíz Menezes, Edvaldo Menezes, Edinaldo Menezes e Valmira Menezes Alves pelo amor incondicional, estímulo, força e apoio.

Aos meus sobrinhos Luíz André Menezes, Marcos Vilson Alves, Maria Clara Menezes, Maria Helena Menezes, Paloma Alves, Pamela Alves e Pedro Henrique Menezes por serem minhas pedrinhas preciosas e minha fonte de felicidade.

Às minhas cunhadas Lívia Menezes, Carina Cardoso, Viviane Nascimento e meu cunhado Lourival Alves pelo carinho e estímulo.

Ao meu marido Darlei Alexandre de Souza pelo companheirismo e apoio.

Aos moradores da casa de estudante, especialmente a Milena Santos Coutinho, pelos momentos de conhecimento, sabedoria, alegrias e tristezas.

Aos colegas e professores de disciplinas do Doutorado da Renorbio, pelos conhecimentos e momentos compartilhados.

Aos companheiros do experimento *in vivo*: Claudenilde Pinheiro, Cleyton Araújo e Wellington Farias por todos os momentos e conhecimentos compartilhados.

Ao grupo de pesquisa Biotecnologia Aplicada ao Desenvolvimento de Folículos Ovarianos (BIOFOV): Alane Pains, Allan Nunes, Bruna Bortoloni, Daniela Campinho, Gizele Silva, Jamile Santos, Joãozito Oliveira Júnior, Joisyleide Pinto, Larisssa Marçal, Larissa Silva, Luana Araújo, Ricássio Barberino, Taís Jobard, Thae Lanne Lins, Valéria Guimarães e Vanessa Barros pelo companheirismo, ajuda e momentos compartilhados.

Ao pós-doutorando Felming Sena Campos e ao professor e pesquisador Doutor Gherman Araújo pela paciência e ensinamentos.

Ao professor André Mariano pela doação da leptina, bem como pela contribuição intelectual nos manuscritos.

Ao meu coorientador, professor Doutor Mário Queiroz, pelo apoio na execução do experimento *in vivo* e estatística e pelas palavras de estímulo e incentivo.

À minha orientadora professora doutora Aurea Wischral pela consideração, paciência, atenção, dedicação e orientação que contribuíram muito para minha formação acadêmica e pessoal.

À minha coorientadora professora doutora Maria Helena Tavares de Matos, pela atenção, dedicação, paciência e imensa contribuição para minha formação acadêmica e pessoal.

À Universidade Federal do Vale do São Francisco, pela disponibilidade de excelentes profissionais (professores e funcionários), especialmente pelos funcionários Antônio Carlos Gomes (vulgo vaqueiro), Augusto Henryque de Souza, Denni Capistana, Enoque Antônio de Souza, Francisco Peixoto, João Batista da Silva, José Arlindo de Oliveira e Paulo Avelar.

Ao pessoal que frequentava o Laboratório de Exigência e Metabolismo Animal (LEMA), especialmente, Adeilson Jamaica, Antônio Pontes, Arquinor Rodrigues, Breno Bonfim, Elves Oliveira, Jair Matos e Josiel Carvalho pela consideração e ajuda.

Ao pessoal do abatedouro Campo do Gado, especialmente aos funcionários Evanilde Gomes de Carvalho e Rogério pela disponibilidade e consideração.

À Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de PE – FACEPE, pelo fornecimento da bolsa de doutorado.

Ao órgão de fomento FACEPE pelo apoio financeiro ao projeto de doutorado.

Aos componentes da banca, pelo conhecimento e contribuição na elaboração do presente trabalho.

## RESUMO

O presente estudo avaliou o efeito de diferentes níveis de ofertas hídricas e de leptina sobre a foliculogênese de ovelhas mestiças da raça Santa Inês (Experimento I), e o efeito da leptina no cultivo *in vitro* de folículos antrais iniciais isolados de ovelhas Sem Padrão Racial Definido (SPRD; Experimento II). No primeiro experimento, 32 ovelhas (n = 08 ovelhas por tratamento) foram submetidas a diferentes níveis de ofertas hídricas: 100% de água (*ad libitum* – controle) e 80%; 60% e 40% de ofertas hídricas da ingestão de água do grupo controle, durante 63 dias. Sangue foi coletado para a determinação de estradiol e de progesterona. Ao final do experimento, as ovelhas foram pesadas, abatidas e seus ovários e úteros foram pesados. Os ovários foram destinados à análise histológica do córtex ovariano; à maturação *in vitro* (MIV) de oócitos de folículos antrais crescidos *in vivo*; ou ao cultivo *in vitro* de folículos secundários isolados na ausência ( $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>) ou na presença (10 e 25 ng/mL) de leptina, por 12 dias. No experimento II, 50 pares de ovários de ovelhas SPRD foram destinados ao cultivo *in vitro* de folículos antrais iniciais isolados em meio suplementado com concentrações de leptina (0; 2 e 10 ng/mL), por 12 dias. Ao final do cultivo, oócitos foram destinados a MIV e posteriormente, à análise de atividade mitocondrial e de espécies reativas de oxigênio (ERO). A oferta hídrica de 40% reduziu a sobrevivência de folículos pré-antrais, especialmente de folículos primordiais (P<0,05). A concentração de 25 ng/mL de leptina apresentou maior diâmetro folicular, taxa de crescimento total e diário de folículos de ovelhas que tiveram 60% de oferta hídrica (P<0,05) em comparação aos folículos cultivados em  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>. A concentração de 2 ng/mL de leptina resultou em maior porcentagem de folículos morfologicamente normais, oócitos totalmente crescidos, retomada da meiose e níveis de mitocôndrias ativas quando comparado ao meio controle (TCM 199<sup>+</sup>; P <0,05), mas não diferiu quando comparado à 10 ng/mL de leptina (P>0,05). Em conclusão, a oferta hídrica de 40% reduz a sobrevivência *in situ* de folículos pré-antrais, principalmente de folículos primordiais. A leptina (25 ng/mL) estimula o crescimento *in vitro* de folículos secundários isolados de ovelhas submetidas a 60% de oferta hídrica e, na dose de 2 ng/mL, melhora a sobrevivência de folículos antrais, o crescimento de oócitos, a atividade mitocondrial e a retomada da meiose após o cultivo *in vitro* de folículos antrais iniciais isolados de ovinos.

**Palavras-chaves:** Antrais. Folículos primordiais. MIV. Folículos pré-antrais. Restrição hídrica.

## ABSTRACT

The present study evaluated the effect of different levels of water supply and leptin on the folliculogenesis of crossbred Santa Inês sheep (Experiment I), and the effect of leptin on the *in vitro* culture of early antral follicles isolated from mixed-breed sheep (Experiment II). In the first experiment, 32 ewes (n = 8 ewes per treatment) were submitted to different levels of water supply: 100% water (*ad libitum* - control) and 80%; 60% and 40% of water supply from the control group's water intake for 63 days. Blood was collected for the determination of estradiol and progesterone. At the end of the experiment, the sheep were weighed, slaughtered and their ovaries and uteri were weighed. The ovaries were used for histological analysis of the ovarian cortex; *in vitro* maturation (IVM) of oocytes from antral follicles grown *in vivo*; or the *in vitro* culture of secondary follicles isolated in the absence ( $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>) or in the presence (10 and 25 ng/mL) of leptin, for 12 days. In experiment II, 50 pairs of mixed-breed sheep ovaries were destined for the *in vitro* culture of early antral follicles isolated in medium supplemented with leptin concentrations (0, 2 and 10 ng/mL), for 12 days. At the end of the culture, oocytes were destined for IVM and later for the analysis of mitochondrial activity and reactive oxygen species (ROS). The water supply of 40% reduced the survival of preantral follicles, especially of primordial follicles (P <0.05). The concentration of 25 ng/mL of leptin showed a larger follicular diameter, total and daily growth rate of sheep follicles that had a 40% reduction in water supply (P <0.05) compared to follicles grown on  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>. The concentration of 2 ng/mL leptin resulted in a higher percentage of morphologically normal follicles, fully grown oocytes, resumption of meiosis and active mitochondria levels when compared to the control medium (TCM 199<sup>+</sup>; P <0.05), but did not differ when compared to 10 ng/mL leptin (P > 0.05). In conclusion, the water supply of 40% reduces the survival *in situ* of preantral follicles, mainly of primordial follicles. Leptin (25 ng/mL) stimulates the *in vitro* growth of secondary follicles isolated from sheep subjected to 60% water supply and, at a dose of 2 ng/mL, improves the survival of antral follicles, oocyte growth, mitochondrial activity and the resumption of meiosis after the *in vitro* culture of isolated sheep early antral follicles.

Keywords: Antral. Primordial follicles. IVM. Preantral follicles. Water restriction.



## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1** - Ovelhas mestiças da raça Santa Inês. Fonte: Arquivo Pessoal..... 22
- Figura 2** - Desenho esquemático do ovário mamífero mostrando folículos em diferentes estádios de desenvolvimento, corpos lúteos e albicans e vasos sanguíneos (a); imagem de folículos ovarianos nos diferentes estádios de desenvolvimento: pré-antrais (primordial, transição, primário e secundário) e antrais (terciário e pré-ovulatório) (b). Fonte: LIMA, 2012..... 27
- Figura 3** - Tipos de mortes celulares: paraptose, necrose, autofagia e apoptose. Fonte: Adaptado de JHAYES21, 2014. Acesso em: <https://commons.wikimedia.org/>..... 30
- Figura 4** - A apoptose funciona através de duas principais vias alternativas: mediada pelo receptor de morte (ou extrínseca) e dependente das mitocôndrias (ou intrínseca). A primeira via é iniciada pela ligação de receptores de morte específicos por seus ligantes. Os principais receptores de morte - Fas e receptores DR4 e DR5 do ligante indutor da apoptose relacionada ao fator de necrose tumoral (TNF-) (TRAIL) - induzem a morte celular após a ligação com ligante Fas (FasL) ou TRAIL, respectivamente, seguido pelo recrutamento da procaspase 8. Esse processo dá origem à ativação da caspase 8. Este último induz apoptose ativando diretamente a caspase 3 ou clivando a bid (agonista da morte no domínio interativo BH3), resultando em disfunção mitocondrial e subsequente liberação do citocromo C e ativação das caspases 9 e 3. A caspase 3 promove as características típicas da apoptose, incluindo fragmentação do DNA e morte celular em vários tecidos. A via mitocondrial é parcialmente influenciada pelos membros da família bcl à membrana mitocondrial, incluindo bax e bcl-2, que são, respectivamente, proteínas reguladoras pró ou antiapoptóticas. As proteínas antiapoptóticas bcl-2 e bcl-XL inibem a liberação do citocromo c, enquanto a proteína X associada ao bcl-2 (bax), antagonista/assassino homólogo do bcl-2 (bak), e bid, todas proteínas pró-apoptóticas, promovem sua liberação das mitocôndrias. O citocromo C e o trifosfato de desoxiadenosina (dATP) se ligam ao fator de ativação da protease apoptótica (APAF-1) para formar um complexo multimérico que recruta e ativa a procaspase 9, um agente mediador da protease executora da apoptose que, por sua vez, ativa a caspase 3, resultando em apoptose celular. Fonte: Adaptado de LORETO et al., 2014..... 31

**Figura 5** – Cultivo de folículos ovarianos isolados de ovinos. Fonte: Arquivo pessoal..... 33

**Figura 6** - Receptores de leptina e vias de sinalização intracelular da leptina. A leptina se liga às isoformas de seu receptor (LEPR): a isoforma solúvel (não mostrada), a isoforma curta e a isoforma longa. A ligação da leptina à forma longa do LEPR resulta em sua dimerização e induz a autofosforilação da Janus quinase 2 (JAK2), que fosforila o domínio citoplasmático da LEPR em resíduos de tirosina (Tyr974, Tyr985, Tyr1077, Tyr1138), cada um funcionando como locais de ancoragem para adaptadores citoplasmáticos. O Tyr1138 fosforilado por LEPR medeia a interação com o transdutor de sinalização e o ativador da transcrição 3 (STAT3), que se dimerizam e translocam ao núcleo para ativar a transcrição gênica dos genes alvo, como o supressor da sinalização de citocina 3 (SOCS3), que atua como sinalização de feedback negativo. Além disso, a leptina induz a ativação do SHP2, que recruta a proteína adaptadora Grb2 para solicitar a ativação da cascata de sinalização Ras/Raf/MAPK. Leptina também mediou a ativação da fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K)/Akt via substrato receptor de insulina 1/2 (IRS1 / 2) e a proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B) atua como um regulador negativo da sinalização da leptina através da desfosforilação do JAK2. Fonte: Adaptado de FRANCISCO et al., 2018..... 36

## CAPÍTULO I

**Figure 1.** Histological sections of ovine ovarian fragments (A–D): Normal primordial follicles in the control group (100% - *ad libitum* water; A) and growing follicles: normal intermediate follicle from sheep that received 80% of water supply (B); atretic primary follicle (C) and atretic secondary follicle (D) from sheep that received 60 and 40% of water supply, respectively. O: oocyte; GC: granulosa cells; Asterisk: pyknotic nucleus; Arrow: retracted oocyte. Scale bar: 20  $\mu\text{m}$  (400 $\times$ )..... 54

**Figure 2.** Percentage of meiotic stages after IVM of *in vivo* grown oocytes recovered from sheep subjected to different levels of water supply. GV: germinal vesicle; GVBD: germinal vesicle breakdown; MI: metaphase I; MII: metaphase II (nuclear maturation). ( $P > 0.05$ )..... 56

**Figure 3.** Morphologically normal secondary follicle at day 0 (A), and antral (B), extruded (C),

and atretic (D) follicles after 12 days of *in vitro* culture of secondary follicles from sheep subjected to different levels of water supply. GC: granulosa cell; O: oocyte. Arrow: antral cavity. Scale bar: 150  $\mu\text{m}$  (100x magnification). Influence of leptin on the percentage of morphologically normal (E), antrum formation (F) and fully grown oocytes ( $\geq 110 \mu\text{m}$ ; G) After *in vitro* culture of secondary follicles from sheep subjected to different levels of water supply..... 57

**Figure 4.** Influence of leptin on the total growth rates (A) and daily growth (A) after 12 days of *in vitro* culture of secondary follicles from sheep subjected to different levels of water supply. <sup>A,B</sup> Different letters denote significant differences among the different levels of water supply in the same culture medium ( $P < 0.05$ ). <sup>a,b</sup> Different letters denote significant differences among different culture medium in the same level of water supply ( $P < 0.05$ )..... 59

## CAPÍTULO II

**Figure 1.** Morphologically normal early antral follicles in the day 0 (A) and after 12 days of culture in 2 ng/mL leptin (B). Atretic (C) and extruded (D) follicles after 6 days of culture in TCM 199<sup>+</sup> and in 10 ng/mL leptin, respectively. Percentages of morphologically normal follicles in TCM 199<sup>+</sup> or in medium containing 2 or 10 ng/mL leptin (E). GC: granulosa cell; O: oocyte. Arrow: antral cavity. Scale bar: 100  $\mu\text{m}$  (100x). <sup>A,B</sup> Different letters denote significant differences among treatments in the same period of culture ( $P < 0.05$ ); <sup>a,b,c</sup> Different letters denote significant differences among culture periods in the same treatment ( $P < 0.05$ )..... 77

**Figure 2.** Percentages of fully grown oocytes after *in vitro* culture of early antral follicles in TCM 199<sup>+</sup> or in medium containing 2 or 10 ng/mL leptin. <sup>A,B</sup> Different letters denote significant differences among treatments in the same period of culture ( $P < 0.05$ )..... 78

**Figure 3.** Epifluorescent photomicrographic images of sheep oocytes from *in vitro* grown isolated early antral follicles showing active mitochondria after IVM (A-C). Oocytes from follicles cultured in TCM 199<sup>+</sup> (A) or in medium containing 2 (B) or 10 ng/mL leptin (C). Scale bars: 50  $\mu\text{m}$  (100x). Intracellular levels of active mitochondria in oocytes after IVM (D). <sup>A,B</sup> Different letters denote significant differences among treatments ( $P < 0.05$ )..... 79

**Figure 4.** Epifluorescent photomicrographic images of sheep oocytes from *in vitro* grown isolated early antral follicles showing ROS after IVM (A-C). Oocytes from follicles cultured in TCM 199<sup>+</sup> (A) or in medium containing 2 (B) or 10 ng/mL leptin (C). Scale bars: 50 μm (100x). Intracellular levels of ROS in oocytes after IVM (D).....

**80**

**Figure 5.** Epifluorescent photomicrographic images of sheep oocytes from *in vitro* cultured early antral follicles stained with Hoeschst 33342 after IVM. Oocytes in GV (A) cultured in TCM 199<sup>+</sup>; oocytes in GVBD (B) and in MI (C) cultured in 2 ng/mL leptin; oocytes in MII (D) cultured in 10 ng/mL leptin. Scale bars: 50 μm (100x). Percentage of meiotic stages (E) and meiotic resumption (F) of sheep oocytes from *in vitro* grown early antral follicles after 12 days of culture in TCM 199<sup>+</sup> or in medium containing 2 or 10 ng/mL leptin. <sup>A,B</sup>Different letters denote significant differences among treatments (P < 0.05).....

**81**

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

<b>Table 1.</b> Proportion and chemical composition of the ingredients of the experimental diet.....	<b>48</b>
<b>Table 2.</b> Body weight at slaughter, average daily gain, weight of uterus and ovaries, serum levels (initial and final) of estradiol and progesterone, water and dry matter intake of Santa Inês crossbreed sheep subjected to different levels of water supply.....	<b>53</b>
<b>Table 3.</b> Preantral follicles survival (percentage of morphologically normal preantral follicles), percentage of normal preantral follicles in the different developmental stages, and follicular activation of Santa Inês crossbreed sheep subjected to different levels of water supply.....	<b>55</b>
<b>Table 4.</b> Correlation coefficients between the percentage of preantral follicles survival (percentage of morphologically normal preantral follicles) with the percentage of normal primordial follicles of Santa Inês crossbreed sheep subjected to different levels of water supply.....	<b>56</b>
<b>Table 5.</b> Linear regression equations to estimate the percentage of preantral follicle survival of Santa Inês crossbreed sheep subjected to different levels of water supply (y) in function of the percentage of normal primordial follicles (x).....	<b>56</b>
<b>Table 6.</b> Influence of the leptin on follicle diameter after <i>in vitro</i> culture of isolated secondary follicles of Santa Inês crossbreed sheep subjected to different levels of water supply.....	<b>58</b>

## CAPÍTULO II

**Table1.** Follicular diameter after *in vitro* culture of ovine early antral follicles in TCM 199<sup>+</sup> or in medium containing 2 or 10 ng/mL leptin. <sup>a,b</sup> Different letters denote significant differences among culture periods in the same treatment (P < 0.05)..... **78**

## LISTA DE ABREVIACES

AKT: Protein kinase B (Proteína quinase B)

APAF-1: Apoptotic protease activating factor 1 (Fator de ativação da protease apoptótica)

ATP: Adenosina tri-fosfato

2D: Bidimensional

3D: Tridimensional

CCO: Complexo cumulus-oócito

C/EBPs – CCAAT - enhancer-binding proteins (proteínas de ligação a CCAAT/potenciador)

CGPs: Células germinativas primordiais

CHOP: C/EBP homologous protein (Proteína homóloga de C/EBP)

CFIV: Cultivo folicular *in vitro*

CSIRO: Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (Organização de Ciência e Pesquisa Industrial da Commonwealth)

DNA: deoxyribonucleic acid (cido desoxirribonucleico)

EGF: Epidermal growth factor (Fator de crescimento epidermal)

ERO ou ROS: Reactive oxygen species (Espécie reativa de oxignio)

FasL – Fas ligand (ligante do receptor Faz)

FSH: Follicle-stimulating hormone (Hormônio fliculo estimulante)

GDF-9: Growth and differentiation factor-9 (Fator de crescimento e diferenciação-9)

GSH: Glutathione (Glutationa)

GV: Germinal vesicle (vesícula germinativa)

GVBD: Germinal vesicle breakdown (quebra da vesícula germinativa)

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IGF-I: Insulin-like growth factors-I (Fator de crescimento semelhante à insulina-I)

IMV ou MIV: In vitro maturation (Maturação *In vitro*)

JAK: Janus Kinase (Janus quinase)

KL: Kit Ligand (Kit ligante)

LEPRs ou Ob-Rs: Receptores da leptina

LH: Luteinizing hormone (Hormônio luteinizante)

MI: Metaphase-I (Metáfase I)

MII: Metaphase-II (Metáfase II)

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinases (Proteína quinase ativada por mitógeno)

$\alpha$ -MEM: Minimum Essential Medium Eagle - Alpha Modification (Meio essencial mínimo alfa-modificado)

MPF: Maturation promoting factor (Fator promotor de maturação)

PI3K: Phosphoinositide 3-kinase (Fosfatidilinositol 3 quinase)

SPRD: Sem Padrão Racial Definido

TCM-199: Tissue culture medium 199 (Meio de cultivo de tecido 199)

TNF- $\alpha$ : Tumor necrosis factor- Alpha (Fator de necrose tumoral alfa)

TRAIL: Tumour necrosis factor- (TNF-) related apoptosis inducing ligand (Ligante indutor da apoptose relacionada ao fator de necrose tumoral)

T<sub>4</sub>: Tiroxina

T<sub>3</sub>: Triiodotironina

VEGF: Vascular endothelial growth factor (Fator de crescimento endotelial vascular)



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>20</b>
2.1 Água e suas formas de ingestão por animais.....	20
2.2 Disponibilidade de água e pequenos ruminantes em regiões áridas e semiáridas.....	21
2.3 Ofertas hídricas e seus efeitos na produção de pequenos ruminantes.....	23
2.4 Ofertas hídricas e seus efeitos na reprodução de pequenos ruminantes.....	24
2.5 Ovário mamífero: Oogênese e foliculogênese .....	26
2.6 Atresia folicular.....	29
2.7 Cultivo <i>in vitro</i> de folículos ovarianos isolados.....	33
2.8 Leptina em Ruminantes: Caracterização.....	35
2.9 Uso da Leptina na Reprodução <i>in vivo</i> de Ruminantes .....	37
2.10 Uso da Leptina na Reprodução <i>in vitro</i> de Ruminantes .....	38
2.10.1 Leptina na Maturação oocitária <i>in vitro</i> (MIV).....	38
2.10.2 Leptina no cultivo <i>in vitro</i> de células foliculares ovarianas.....	39
<b>3.JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>40</b>
<b>4. HIPÓTESES.....</b>	<b>41</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>42</b>
5.1 Objetivo geral.....	42
5.2 Objetivos específicos.....	42
<b>6. CAPÍTULO I.....</b>	<b>43</b>

<b>7. CAPÍTULO II.....</b>	<b>69</b>
<b>8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>90</b>
<b>9. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>91</b>
<b>10.ANEXOS .....</b>	<b>110</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Pequenos ruminantes de regiões áridas e semiáridas podem sobreviver até uma semana com pouca ou sem nenhuma água. Porém, já foi demonstrado que o baixo consumo ou oferta de água, pode alterar a homeostase, causando diminuição da resistência a doenças (BARBOUR et al., 2005), redução na ingestão de alimentos, o que causa retardo do crescimento folicular ovariano (BLANC et al., 2004), diminuição no peso corporal (JABER et al., 2011; CHEDID et al., 2014), alteração no desempenho e no comportamento reprodutivo (BARBOUR et al., 2005; PACHECO et al., 2018; KHNISSI; REKIK; CASSOUED, 2019) e nos níveis séricos de estradiol, progesterona e de leptina (NAQVI et al., 2015; KUMA et al., 2016; PACHECO et al., 2018). Nota-se que poucos são os trabalhos destinados a verificar a importância da água e os efeitos de ofertas hídricas na reprodução de pequenos ruminantes criados em regiões áridas ou semiáridas do mundo. Nesse sentido, é de suma importância saber se diferentes níveis de ofertas hídricas (até 40%) afetam negativamente a reprodução de ovelhas mestiças da raça Santa Inês, especialmente, as diferentes fases da foliculogênese e os níveis séricos de hormônios reprodutivos nesses animais, como o hormônio leptina (WEBB; GARNSWORTHY; ARMSTRONG, 2004).

A leptina é um hormônio peptídico produzido pelo tecido adiposo e outros órgãos, que desempenha um importante papel no controle central do metabolismo energético e na regulação da oferta de alimentos e do peso corporal (KARMAZYN; GAN; RAJAPUROHITAM, 2013), bem como está relacionado com o controle da reprodução mamífera (BELLEFONTAINE et al., 2014; VÁZQUEZ; ROMERO-RUIZ; TENA-SEMPERE, 2015). As ações fisiológicas da leptina são mediadas através de receptores de membrana associados à leptina (LEPR) e, sua expressão da leptina e de seus receptores, já foi observada em oócitos e células da granulosa e/ou tecais de folículos pré-antrais e antrais caprinos (BATISTA et al., 2013) e ovinos (MACEDO et al., 2019). Além disso, estudos sugerem que a leptina influencia a foliculogênese *in vitro* por promover o aumento do diâmetro e da formação de antro, melhorar as taxas de maturação oocitária, os níveis intracelulares de glutatona e de mitocôndrias ativas de folículos secundários isolados (ovinos: KAMALAMMA et al., 2016; MACEDO et al., 2019), a produção de estradiol em folículos antrais avançados (suínos: GREGORASZCZUK et al., 2013; 2003) e as taxas de maturação e produção de embriões a partir de oócitos recuperados de folículos antrais (bovinos: PAULA-LOPES et al., 2007). No entanto, não há relatos dos efeitos da leptina sobre o desenvolvimento de folículos antrais iniciais ovinos.

O baixo consumo de água pode afetar o crescimento folicular, os níveis séricos de hormônios como estradiol, progesterona e leptina, além do que a leptina regula a homeostase energética e atua diretamente no ovário. Para se avaliar os efeitos de diferentes níveis de ofertas hídricas e da leptina sobre a foliculogênese ovina, pode-se utilizar tecnologias como Cultivo folicular *in vitro* (CFIV), que busca otimizar o potencial oocitário das fêmeas (FIGUEIREDO et al., 2011). Nesta técnica, também pode ser avaliado o efeito de modificações *in vivo* (como a oferta hídrica) e *in vitro* (adição da leptina) sobre o desenvolvimento de folículos em diferentes fases do crescimento. Neste sentido, é preciso considerar que os folículos pré-antrais representam a maior parcela (90%) das células germinativas femininas (FIGUEIREDO et al., 2011) e que folículos antrais iniciais possuem exigências metabólicas diferentes dos folículos pré-antrais (CADENAS et al., 2017; FERREIRA et al., 2018) e são encontrados, no ovário, em maior número do que os folículos antrais avançados, sendo uma importante reserva de oócitos imaturos com potencial para aumentar o número de oócitos meioticamente competentes (ALM et al., 2006; CORREIA et al., 2017).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Água e suas formas de ingestão por animais

A água é o componente químico encontrado em maior quantidade no corpo do animal, correspondendo a 50-80% do peso vivo a depender da idade e do grau de gordura corporal (CSIRO, 2007). Ao longo do envelhecimento, essa quantidade diminui, alcançando um mínimo de 50% e quanto maior a proporção de gordura que constitui o organismo, menor a quantidade de água. O animal pode perder 50% da proteína de seu corpo e sobreviver, porém a perda de 10% da água corporal pode levá-lo à morte (PALHARES, 2013).

A água é um solvente universal no qual as reações metabólicas ocorrem e é também um reagente em muitos processos bioquímicos, tais como hidrólise, condensação e reações de oxidação-redução (NELSON; COX, 2014). É considerada um nutriente essencial (KUMAR et al., 2016) que desempenha quatro funções principais: i) eliminação de produtos residuais da digestão e do metabolismo; ii) regulação da pressão osmótica do sangue; iii) componente importante nas secreções (leite, saliva e outros fluidos digestivos) e nos produtos da concepção e no crescimento corporal, e iv) participação na termorregulação. Para atender essa demanda hídrica corporal, os animais podem obter água de três maneiras: água da bebida (principal forma de um animal ter acesso à água; PALHARES, 2013), dos alimentos e do metabolismo (CSIRO, 2007).

O consumo de matéria seca e de energia, o estado fisiológico, o peso corporal, a raça, a espécie, a qualidade e a disponibilidade da água são fatores que influenciam o uso ou a oferta desse nutriente pelos animais (CSIRO, 2007). O consumo voluntário de água por ovinos em regiões semiáridas é de, aproximadamente, 3,5 L/dia (cordeiros sem padrão racial definido - SPRD: ALVES et al., 2007; ovelhas Malpuras adultas: KUMAR et al., 2016), sendo essa água, geralmente, proveniente de barragens, açudes, rios, barreiros, poços (ARAÚJO et al., 2011) e bebedouros (KUMAR et al., 2016). Segundo o CSIRO (2007), atender todo o requerimento de água para um animal, fornecendo quantidade suficiente para o consumo voluntário, é imprescindível para o sucesso do manejo nutricional.

Outra fonte importante de água é aquela que está presente nos alimentos e nas dietas. A oferta de alimentos suculentos com altas concentrações de água e baixo conteúdo de matéria seca, como palma forrageira, mandacaru, gramíneas e leguminosas frescas, melancia forrageira e silagem são boas alternativas para os ovinos e caprinos criados no semiárido brasileiro (ARAÚJO et al., 2010; CORDOVA-TORRES et al., 2017). Porém, ovinos que recebem dietas com maior quantidade

de concentrado (dieta rica em matéria seca e energia) apresentam maior consumo de água (NEIVA et al., 2004; SILVA et al., 2016).

A água do metabolismo é gerada pela oxidação dos nutrientes oriundos dos alimentos e do catabolismo dos tecidos corporais, sendo obtidos 1,1; 0,5 e 0,4 L de água após o catabolismo de 1 kg de gordura, carboidrato e proteína, respectivamente (CSIRO, 2007).

## **2.2 Disponibilidade de água e pequenos ruminantes em regiões áridas e semiáridas**

A produtividade e a saúde da pecuária são dependentes da quantidade e qualidade da água consumida, pois a água é um nutriente vital que contribui para a composição corporal de um animal, crescimento, reprodução, e processos biológicos (BEEDE, 2012). Entretanto, a qualidade e a disponibilidade de água é um fator limitante para os rebanhos em regiões áridas e semiáridas em todo o mundo (CHEDID et al., 2014; NAQVI et al., 2015; ALBUQUERQUE et al., 2020b).

A escassez de água em regiões semiáridas ocorre devido aos baixos níveis de umidade, escassez de chuvas anuais, irregularidade no ritmo das precipitações ao longo dos anos, prolongados períodos de carência hídrica, solos problemáticos tanto do ponto de vista físico quanto geoquímico, e ausência de rios perenes (AB'SABER, 1999).

O Semiárido do Nordeste brasileiro apresenta precipitações pluviométricas de até 800 mm anuais que são bastante irregulares dentro e ao longo dos anos em uma mesma localidade. Esta situação se agrava pela escassez de rios perenes que possam contribuir com o aumento da disponibilidade de água, como também, pelo baixo nível de captação e aproveitamento das águas das chuvas. Por outro lado, os reservatórios existentes são poucos e têm como base a tecnologia de captação e armazenamento da água em açudes, nos quais ocorrem perdas significativas por evaporação (ARAÚJO et al., 2011). Além disso, as mudanças climáticas podem diminuir a disponibilidade de água nessa região, fazendo com que pesquisadores, técnicos e produtores aumentem o interesse na busca de animais mais adaptados às condições ambientais, em que a elevação da temperatura e o estresse hídrico têm sido cada vez mais frequentes (ARAÚJO, 2015).

Segundo Chedid et al. (2014), raças de ovelhas nativas de regiões áridas e semiáridas possuem capacidade de adaptação a ambientes rústicos, às variações climáticas, bem como à escassez de recursos. Dentre esses animais, estão os ovinos mestiços da raça Santa Inês (Figura 1), que têm demonstrado alto grau de adaptabilidade às condições edafoclimáticas do semiárido nordestino (SANTOS et al., 2006; SILVA et al., 2016).

Ruminantes que habitam regiões áridas e semiáridas adquiriram vários mecanismos de adaptação que os beneficiam em tolerar a restrição hídrica (diminuição da oferta de água em % da ingestão de água *ad libitum*), conseguindo maior economia de água e sua utilização de forma mais eficiente, o que resulta na manutenção do consumo e da produção durante o período da escassez de água (SALEM, 2010). Dentre esses mecanismos, estão: retenção do alimento no rúmen por períodos mais longos, resultando em maior digestibilidade com melhor aproveitamento da ração e melhor conversão de alimentos (ABIOJA et al., 2010); diminuição no consumo de ração, resultando em redução de peso devido à perda de água e massa corporal (JABER; CHEDID; HAMADEH, 2013) ou mobilização de gordura para produção de energia para compensar menor consumo de ração (JABER et al., 2004); reserva de água no rúmen; modulação da produção e da osmolaridade da saliva (JABER; CHEDID; HAMADEH, 2013); aumento nos níveis séricos de cortisol e redução nos níveis plasmáticos de insulina, de triiodotironina (T3), tiroxina (T4) e de leptina (NAQVI et al., 2015). Esses hormônios podem ter efeito na foliculogênese ovariana (ARUNAKUMARI; SHANMUGASUNDARAM; RAO, 2010; KAMALAMMA et al., 2016; MACEDO et al., 2019).

**Figura 1** - Ovelhas mestiças da raça Santa Inês.



Fonte: Arquivo Pessoal.

A falta de água para dessedentação dos animais tem como consequências a redução do crescimento, do bem-estar e da saúde e o aumento do estresse, ou seja, resulta em consideráveis impactos negativos nos fatores zootécnicos e econômicos (PALHARES, 2013). Sendo assim, além do uso de animais mais adaptados às condições hostis de regiões áridas e semiáridas, busca-se a

utilização das diversas fontes de água para a dessedentação animal como rios, riachos, córregos, lagos, lagoas, nascentes, poços, captação de água da chuva, água ofertada pelas companhias de saneamento ou poços comunitários (PALHARES, 2013).

Além das diferentes fontes hídricas, têm-se como alternativa para a ingestão de água a utilização de alimentos suculentos como a palma forrageira in natura ou em forma de silagem para manter ou melhorar o desempenho produtivo desses animais (CORDOVA-TORRES et al., 2017; ALBUQUERQUE et al., 2020a). Outra estratégia para disponibilizar água, sem afetar o comportamento ingestivo, o desempenho produtivo e o estado nutricional de pequenos ruminantes seria o uso de água salina (MOURA et al., 2016; ALBUQUERQUE et al., 2020b). Porém, a ingestão de água salina pode afetar o potencial reprodutivo de ovinos ao diminuir, por exemplo, a qualidade espermática e causar anormalidades espermáticas nas células germinativas do túbulo seminífero (LINS et al., 2017a).

Estudos também vêm sendo realizados para verificar se a restrição ou privação hídrica (remoção de água para um determinado período; SALEM, 2010) podem ser alternativas no manejo hídrico para a produção e reprodução de pequenos ruminantes que vivem em regiões que, geralmente, sofrem com a baixa disponibilidade de água (MITTAL E GOSH, 1986; CASAMASSIMA et al., 2008; TIBIN et al., 2012; KHNISSI et al., 2014; KUMAR et al., 2016; SILVA et al., 2016; PACHECO et al., 2018; SANTOS et al., 2019).

### **2.3 Ofertas hídricas e Seus Efeitos na Produção de Pequenos Ruminantes**

Ovinos mestiços da raça Santa Inês submetidos à restrição hídrica de 50% (durante 73 dias de confinamento) apresentaram redução no consumo de matéria seca e de nutrientes, bem como, no ganho de peso total e diário, sem afetar a sua conversão ou eficiência alimentar (SILVA et al., 2016).

Estudo recente realizado por Santos et al. (2019) evidenciou que cordeiros mestiços de Santa Inês (confinados durante 67 dias) não devem ser submetidos a períodos de privação hídrica maior que 24 h (48 ou 72 h), pois há redução da ingestão de água e de matéria seca e, conseqüentemente, do peso corporal no abate e do rendimento de carcaça (quente e fria), porém sem afetar a deposição de gordura na carcaça. Além disso, foi observada diminuição do ácido graxo docosaheptaenoico (DHA – essencial para o bom funcionamento do cérebro e retina) e aumento do ácido graxo eicosapentaenoico (EPA – importante anti-inflamatório, antioxidante e antiarrítmico) e na força de cisalhamento da carne com os períodos crescentes de privação hídrica (SANTOS et al., 2019).



Ovinos do deserto submetidos à privação hídrica de 2-3 dias, também apresentaram redução do peso corporal no abate, da carcaça quente, meia carcaça e do peso corporal vazio quando comparados aos animais que tiveram acesso diário à água (*ad libitum*; TIBIN et al., 2012).

Ovelhas Comisana submetidas, durante 40 dias (período de inverno na Itália), a 40% de restrição hídrica reduziram o peso corporal e aumentaram concentrações séricas de triglicérides, proteínas totais e colesterol quando comparado ao grupo controle. Entretanto, não houve diferenças significativas no rendimento e na composição do leite e no consumo de ração entre os grupos de tratamento (*ad libitum*; 80 ou 60% de água; CASAMASSIMA et al., 2008).

Cabras da África Ocidental e cabras da raça Sokoto Vermelho não apresentaram alteração nos parâmetros sanguíneos (por exemplo, ureia, glicose) quando submetidas a 33 e 67% de restrição hídrica (ABIOJA et al., 2014). Entretanto, ovelhas Lacaune lactantes submetidas a 20% ou 40% de restrição hídrica apresentaram redução nas taxas respiratórias e aumento em parâmetros bioquímicos séricos, como o cortisol (CASAMASSIMA et al., 2016). Além disso, ovelhas Corriedale submetidas ao estresse térmico, recebendo água somente 3 h após alimentação, apresentaram maiores níveis de cortisol na lã do que as que receberam água *ad libitum* ou água apenas 2 horas após a alimentação. Nesse mesmo estudo, os autores concluíram que o cortisol da lã é melhor indicador de estresse do que o cortisol sanguíneo, em ovelhas expostas ao estresse por calor e por restrição hídrica (GHASSEMI NEJAD et al., 2014).

Estudo realizado por Jaber et al. (2011) demonstrou que ovelhas Awassi submetidas a três dias (72 h) de privação hídrica (duração de 21/23 dias) apresentaram redução na oferta de alimento e, conseqüentemente, redução do ganho de peso, sem, no entanto, alterar os níveis séricos de insulina, leptina, T3 e T4.

## **2.4 Ofertas Hídricas e Seus Efeitos na Reprodução de Pequenos Ruminantes**

Kumar et al. (2016) mostraram que a restrição hídrica de 40% ou a privação de água por 24 h pode reduzir o consumo do alimento, os níveis séricos de estradiol e aumenta os níveis séricos de progesterona, sem alterar a porcentagem de animais em estro e a duração do ciclo estral. Esses mesmos autores observaram que o ganho de peso corporal foi menor apenas nas ovelhas com privação de água.

Apesar de cabras criolas criadas no México, submetidas à aglomeração e à restrição hídrica, exibirem alteração nas variáveis sexuais comportamentais (corrimento vaginal, deslizamento da cauda, aproximação, etc.), não apresentaram ciclo estral alterado. No entanto, os níveis de estradiol

foram reduzidos durante a fase folicular, enquanto que os níveis de progesterona foram aumentados apenas na fase luteal. Houve correlação positiva entre os níveis de estradiol e o comportamento sexual, mas não com progesterona, e correlação negativa entre comportamento sexual e níveis de cortisol (PACHECO et al., 2018).

Estudos realizados por Mittal e Gosh (1986) e Khnissi et al. (2014) mostraram que a privação de água por três dias não afetou parâmetros reprodutivos em ovelhas (raças Barbarine, Magra e Marwari), como duração do ciclo estral, ovulação, concepção e taxas de reprodução. Já animais com estresse hídrico diminuem sua ingestão de alimento, o que pode causar retardo no crescimento folicular ovariano (BLANC et al., 2004) e diminuição no estado metabólico que inibe a secreção de leptina (HOUSEKNECHT e PORTOCARRERO, 1988; CHEDID, 2009; NAQVI et al., 2015).

A leptina, hormônio produzido principalmente pelo tecido adiposo, regula a ingestão de alimentos e o metabolismo energético (HOUSEKNECHT e PORTOCARRERO, 1998; KARMAZYN; GAN; RAJAPUROHITAM, 2013) e está relacionado com o controle da reprodução mamífera, agindo no eixo gonadotrófico e nos ovários (BELLEFONTAINE et al., 2014; VÁZQUEZ; ROMERO-RUIZ; TENA-SEMPERE, 2015). Nesse sentido, a restrição hídrica diminui a ingestão de alimento e nutrientes, que por sua vez reduz a produção de leptina. Os menores níveis séricos dessa adipocina podem afetar negativamente a foliculogênese ovariana. Entretanto, não há relatos sobre o efeito de diferentes níveis de ofertas hídricas sobre as diferentes fases da foliculogênese ovariana de ovelhas mestiças da raça Santa Inês e se a adição da leptina no meio de cultivo *in vitro* pode manter a viabilidade e promover o desenvolvimento de folículos secundários isolados desses animais.

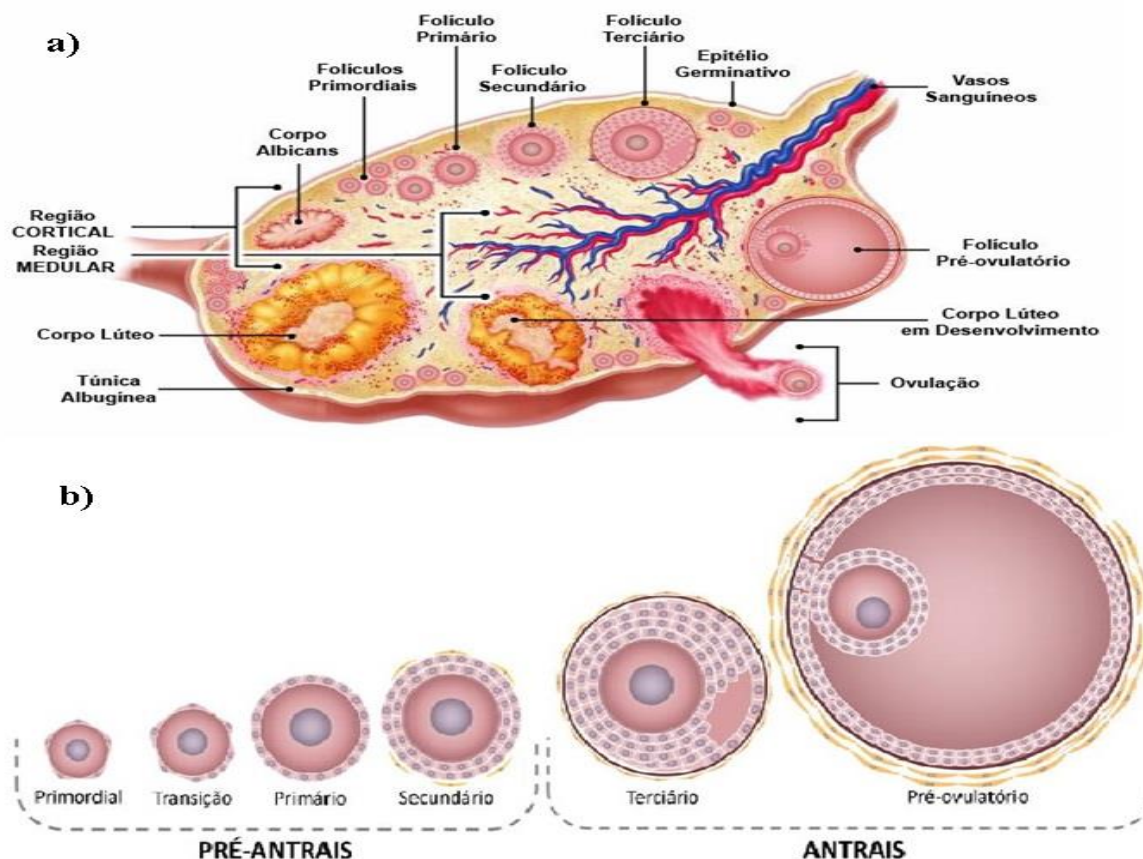
Sendo assim, sabendo-se que os ovinos, tais como os mestiços da raça Santa Inês, desempenham importante papel socioeconômico em regiões semiáridas, como a nordestina, faz-se necessário entender sua morfofisiologia ovariana para avaliar os possíveis efeitos de diferentes níveis de ofertas hídricas em sua reprodução.

## 2.5 Ovário mamífero: Oogênese e foliculogênese

O ovário mamífero é composto de duas regiões distintas: cortical e medular. A região medular, localizada mais internamente, é constituída de fibras nervosas, vasos linfáticos e de tecido conjuntivo frouxo altamente vascularizado. O córtex, parte periférica do ovário, é envolto por uma única camada de epitélio germinativo e é constituído de tecido conjuntivo (estroma) com folículos em diferentes estádios de desenvolvimento e corpos lúteos (AERTS; BOLS, 2010; MARTELLI et al., 2017; Figura 2a). Esse órgão tem como principais funções a gametogênese (produção de oócitos competentes para uma fertilização bem-sucedida e desenvolvimento embrionário inicial; ADONA et al., 2013; TORRES-RAMÍREZ et al., 2019) e a esteroidogênese (produção de hormônios esteroides), ambas reguladas por dois fenômenos que ocorrem no ovário: a oogênese e a foliculogênese (ADONA et al., 2013).

A oogênese é o processo de formação e de diferenciação das células germinativas primordiais (CGPs) até o estágio de oócito haploide fecundado (RÜSSE, 1983). Nos mamíferos, a oogênese começa durante o desenvolvimento fetal inicial, para no nascimento e continua durante a puberdade e durante toda a vida reprodutiva da fêmea (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Em ovelhas, as CGPs migram do saco vitelínico para a gônada em desenvolvimento, em torno de 17 a 21 dias após a fecundação (LEDDA, 2010), onde se tornam imóveis, mais esféricas, multiplicam-se por mitose (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005; PALMA et al., 2012) e sofrem redistribuição das organelas citoplasmáticas, transformando-se em oogônias (SADEU et al., 2006; PALMA et al., 2012). Após sucessivas divisões mitóticas, as oogônias duplicam seu DNA, iniciam a primeira divisão meiótica, parando no estágio diplóteno I da prófase meiótica (prófase I), originando o oócito primário imaturo (AERTS; BOLS, 2010; PALMA et al., 2012). Esse oócito poderá ser circundado por uma camada de células somáticas pavimentosas que, em ovelhas, são derivadas de células mesoteliais originadas do epitélio de superfície do ovário e do mesonéfron (MCNATTY et al., 2000; JUENGEL et al., 2002), denominadas de células da pré-granulosa ou da granulosa, dando origem ao folículo primordial (MARTELLI et al., 2017; TORRES-RAMÍREZ et al., 2019). Com a formação do folículo primordial se inicia, dentro do córtex ovariano, o processo de foliculogênese (MARTELLI et al., 2017).

**Figura 2** - Desenho esquemático do ovário mamífero mostrando folículos em diferentes estádios de desenvolvimento, corpos lúteos e albicans e vasos sanguíneos (a); imagem de folículos ovarianos nos diferentes estádios de desenvolvimento: pré-antrais (primordial, transição, primário e secundário) e antrais (terciário e pré-ovulatório) (b).



Fonte: LIMA, 2012.

O folículo ovariano é considerado a unidade morfofuncional do ovário, sendo composto por um oócito circundado por células somáticas (da granulosa e/ou tecais) (MATSUDA et al., 2012). De acordo com o estágio de desenvolvimento, os folículos ovarianos podem ser classificados em pré-antrais (primordiais, de transição, primários e secundários) e antrais (terciário e pré-ovulatório ou de Graaf) (Figura 2 b; SILVA et al., 2004; FIGUEIREDO et al., 2008). O predominante e menor folículo ovariano é o folículo primordial (MARTELLI et al., 2017). A maioria dos folículos primordiais é mantida quiescente como uma reserva para a vida reprodutiva. Apenas alguns deles são ativados e evoluem para um estágio folicular avançado (MATSUDA et al., 2012). A ativação ou início do crescimento folicular implica em mudança na morfologia das células da granulosa de pavimentosa para cuboide, em aumento no número de células da granulosa através da proliferação

celular e no crescimento do oócito (MONNIAUX, 2016). A comunicação bidirecional e a troca de moléculas de sinalização entre o oócito e as células da granulosa circundante são necessárias para o crescimento do oócito e o desenvolvimento do folículo (GRIVE; FREIMAN, 2015). Quando o folículo primordial começa a apresentar uma camada de células da granulosa com uma mistura de células com morfologia pavimentosa e cúbicas ao redor do oócito, é denominado de folículo de transição (SILVA et al., 2004). Quando o oócito é revestido por uma única camada de células da granulosa com morfologia cuboide, que se tornam proliferativas e separadas do estroma do ovário por uma lâmina basal, têm-se a formação do folículo primário (MARTELLI et al., 2017). Em ovinos, estudos *in vitro* têm demonstrado que a ativação folicular é estimulada por fatores de crescimento, tais como Kit ligand (KL; CAVALCANTE et al., 2016), fator de crescimento epidermal (EGF; SANTOS et al., 2017) e fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I; BEZERRA et al., 2018).

As células da granulosa do folículo primário continuam a proliferar, formando os folículos secundários com duas ou múltiplas camadas de células (MARTELLI et al., 2017; TORRES-RAMÍREZ et al., 2019). O desenvolvimento dos folículos secundários é caracterizado por três eventos: 1) o início da formação da zona pelúcida; 2) acúmulo de líquido entre as células da granulosa e 3) o aparecimento de células da teca, que separam o estroma ovariano das camadas de células da granulosa (MARTELLI et al., 2017).

Pequenos espaços entre as células da granulosa contendo o fluido folicular coalescem para formar um grande espaço, o antro, dando origem ao folículo terciário (folículo antral inicial; HENNET; COMBELLES, 2012). A formação de antro parece estar relacionada à presença das proteínas integrais de membrana, como aquaporinas 3 e 9 em folículos ovarianos (ovinos: SALES et al., 2015). O fluido folicular, composto por diferentes substâncias, tais como esteroides, proteínas, hormônios, anticoagulantes, enzimas e eletrólitos, circunda o oócito durante seu desenvolvimento e medeia a comunicação entre as células dentro dos folículos (HENNET; COMBELLES, 2012). No folículo terciário, as células da teca estão organizadas em duas camadas distintas: a teca interna e a teca externa (MARTELLI et al., 2017). Em ovinos, estudos *in vitro* têm demonstrado que o cultivo de folículos secundários isolados permite obter percentagens significativas de formação de antro (folículos terciários ou folículos antrais iniciais) quando cultivados na presença de hormônios, tais como FSH recombinante humano (BARROS et al., 2019a) e leptina (KAMALAMMA et al., 2016; MACEDO et al., 2019) e de fatores de crescimento:

IGF-I (MONTE et al., 2019a) e fator de crescimento de diferenciação-9 (GDF-9; MONTE et al., 2019b).

Com o crescimento do folículo antral inicial, as camadas de células da granulosa se subdividem em camadas de células da granulosa mural (camadas externas) e de células do cumulus (camadas internas - próximas ao oócito), formando o folículo antral avançado ou pré-ovulatório (MONNIAUX, 2016; CHIARATTI et al., 2018). As células da granulosa mural desempenham um papel central na síntese de hormônios e ligantes como ativinas e folistatina, expressando altos níveis de receptores de FSH, levando ao desenvolvimento folicular diretamente dependente da presença de FSH no antro. Já as células do cumulus interagem com o oócito para apoiar o desenvolvimento oocitário (CHIARATTI et al., 2018). Poucos são os trabalhos que realizaram o cultivo *in vitro* de folículos terciários (antrais iniciais) isolados de ruminantes. Recentemente, em ovinos, um estudo demonstrou que a melatonina promoveu o desenvolvimento folicular e a aquisição da competência meiótica de oócitos após o cultivo *in vitro* de folículos antrais iniciais isolados (BARROS et al., 2019b). Em caprinos, o cultivo *in vitro* dessa categoria folicular mostrou resultados promissores no crescimento folicular e nas percentagens de oócitos maturados após exposição ao hormônio de crescimento (GH; CADENAS et al., 2017; 2018) e ao FSH recombinante humano (FERREIRA et al., 2018).

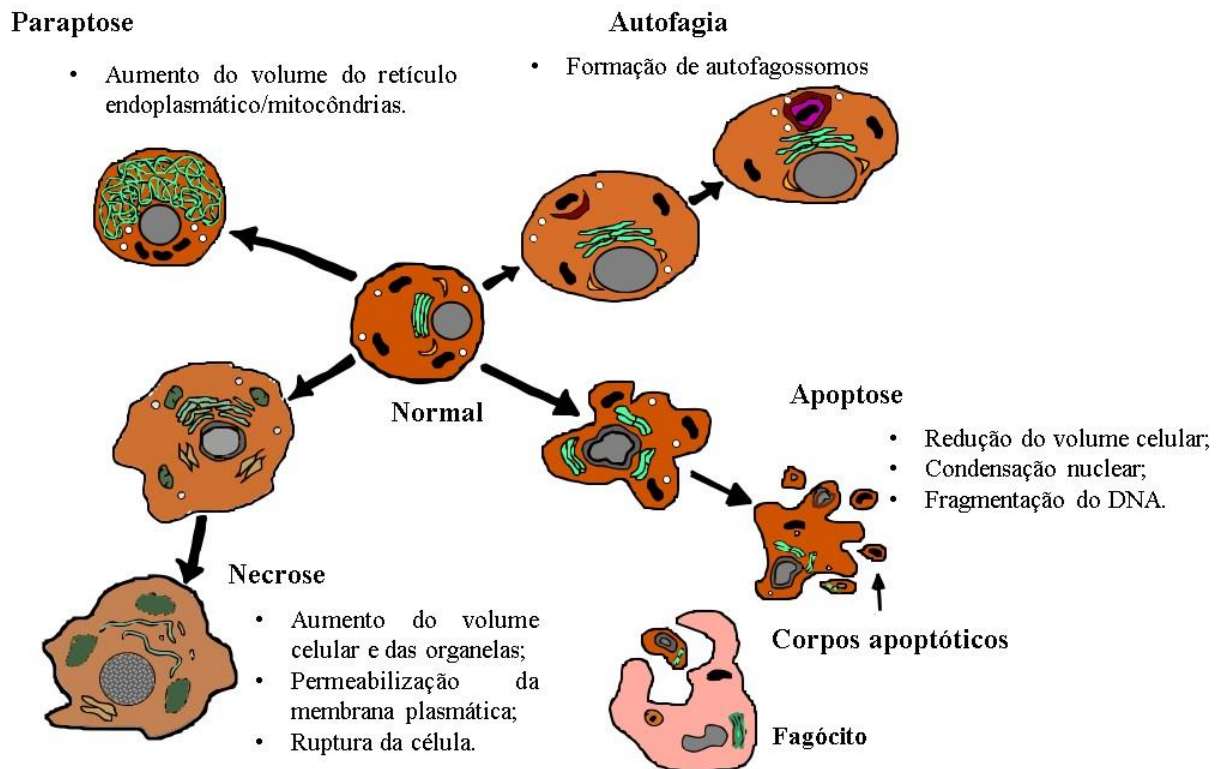
A partir da puberdade, após o pico pré-ovulatório do hormônio luteinizante (LH), o oócito do folículo pré-ovulatório retoma a meiose, interrompendo-a novamente na metáfase II (oócito secundário) e é liberado pelo ovário (AERTS; BOLS, 2010; COTICCHIO et al., 2015), finalizando a foliculogênese. Quando o oócito ovulado é fecundado pelo espermatozoide, retoma a meiose II, formando o oócito haploide fecundado (FIGUEIREDO et al., 2008), encerrando a oogênese.

## **2.6 Atresia folicular**

Ao nascimento, a ovelha possui cerca de 160.000 folículos ovarianos (DRIANCOURT et al., 1991), entretanto, poucos são os oócitos (aproximadamente 0,1%) que conseguem atingir a ovulação, pois a grande maioria morre por um processo natural denominado de atresia ou morte folicular (MATSUDA et al., 2012). A morte folicular resulta em depleção rápida de células germinativas no ovário mamífero (CHAUDHARY et al., 2018) e ocorre tanto na vida fetal quanto na vida reprodutiva, mantendo a homeostase intraovariana (TORRES-RAMÍREZ et al., 2019). A atresia folicular pode ocorrer pelas vias de necrose (ou necroptose), de autofagia, de apoptose

(MENG et al, 2018; CHAUDHARY et al., 2018) e/ou de paraptose (Figura 3; TORRES-RAMÍREZ et al., 2019).

**Figura 3** - Tipos de mortes celulares: paraptose, necrose, autofagia e apoptose.



Fonte: Adaptado de JHAYES21 (2014). Acesso em: <https://commons.wikimedia.org/>.

A necrose e a necroptose são tipos de morte celular induzidas por diferentes fatores, tais como estresse oxidativo, condições patológicas, citocinas, entre outros (CHAUDHARY et al., 2018). Ambas apresentam características morfológicas semelhantes, sendo caracterizadas por aumento de volume celular e das organelas, permeabilização da membrana e ruptura celular (FINK; COOKSON, 2005; ZHOU; HAN; HAN, 2012; CHAUDHARY et al., 2018). Porém a necroptose é iniciada pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e é operada através da proteína quinase que interage com o receptor, bem como da proteína semelhante ao domínio quinase da linhagem mista. A necrose da célula da granulosa induz direta ou indiretamente a susceptibilidade de oócitos à morte celular necroptótica ou apoptótica (CHAUDHARY et al., 2018).

A apoptose, tipo de morte celular programada, desempenha um importante papel durante a foliculogênese e a seleção do folículo dominante, bem como na regressão do corpo lúteo, permitindo um descarte seguro de células quando elas cumprirem suas funções biológicas. Morfologicamente, é caracterizada pela redução do volume celular, condensação nuclear e

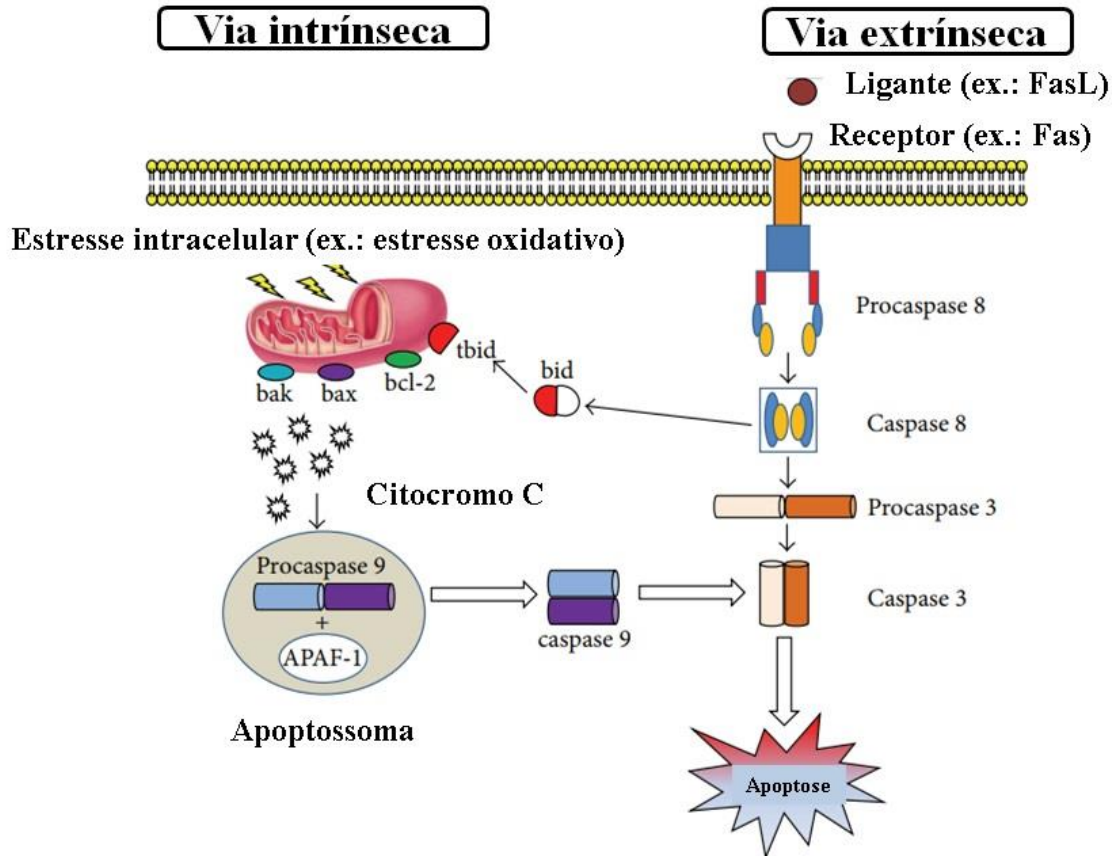
fragmentação do DNA, com a membrana citoplasmática permanecendo intacta durante o estágio inicial (SUKHOTNIK; ROFE, 2014), formação de corpos apoptóticos e exposição de moléculas de superfície visando corpos intactos de células para fagocitose (FINK; COOKSON, 2005). Na ausência de fagocitose, os corpos apoptóticos podem prosseguir para a lise e alterações secundárias ou necrose apoptótica (FINK; COOKSON, 2005). A apoptose diferencia-se da necrose, pois ao não liberar o conteúdo celular, não danifica os tecidos circundantes ou não provoca uma resposta inflamatória (SUKHOTNIK; ROFE, 2014). Na apoptose, proteínas denominadas caspases são ativadas e essa ativação pode ocorrer por duas vias: extrínseca e intrínseca (Figura 4: GHOBRIAL; WITZIG ; ADJEI, 2005; LORETO et al., 2014).

A via extrínseca é iniciada quando um sinal vindo do exterior da célula ativa os receptores localizados na membrana celular, denominados de receptores de morte (GHOBRIAL; WITZIG; ADJEI, 2005; LORETO et al., 2014; Figura 4). Já a via intrínseca (via mitocondrial) é desencadeada por lesão intracelular causada por estresses intrínsecos, tais como lesão no DNA ou o estresse oxidativo (RAMPAL et al., 2012), ocorrendo, principalmente, pela liberação do citocromo C da mitocôndria (GHOBRIAL; WITZIG; ADJEI, 2005; RAMPAL et al., 2012).

**Figura 4** - A apoptose funciona através de duas principais vias alternativas: mediada pelo receptor de morte (ou extrínseca) e dependente das mitocôndrias (ou intrínseca). A primeira via é iniciada pela ligação de receptores de morte específicos por seus ligantes. Os principais receptores de morte - Fas e receptores DR4 e DR5 do ligante indutor da apoptose relacionada ao fator de necrose tumoral (TNF-) (TRAIL) - induzem a morte celular após a ligação com ligante Fas (FasL) ou TRAIL, respectivamente, seguido pelo recrutamento da procaspase 8. Esse processo dá origem à ativação da caspase 8. Este último induz apoptose ativando diretamente a caspase 3 ou clivando a bid (agonista da morte no domínio interativo BH3), resultando em disfunção mitocondrial e subsequente liberação do citocromo C e ativação das caspases 9 e 3. A caspase 3 promove as características típicas da apoptose, incluindo fragmentação do DNA e morte celular em vários tecidos. A via mitocondrial é parcialmente influenciada pelos membros da família bcl à membrana mitocondrial, incluindo bax e bcl-2, que são, respectivamente, proteínas reguladoras pró ou antiapoptóticas. As proteínas antiapoptóticas bcl-2 e bcl-XL inibem a liberação do citocromo c, enquanto a proteína X associada ao bcl-2 (bax), antagonista/assassino homólogo do bcl-2 (bak), e bid, todas proteínas pró-apoptóticas, promovem sua liberação das mitocôndrias. O citocromo C e o trifosfato de desoxiadenosina (dATP) se ligam ao fator de ativação da protease apoptótica (APAF-



1) para formar um complexo multimérico que recruta e ativa a procaspase 9, um agente mediador da protease executora da apoptose que, por sua vez, ativa a caspase 3, resultando em apoptose celular.



Fonte: Adaptado de LORETO et al., 2014.

A autofagia é um tipo de morte celular programada adotada por algumas células germinativas para induzir atresia folicular no ovário (ESCOBAR; ECHEVERRÍA; VÁZQUEZ-NIN, 2012). Esse processo em folículos pré-antrais de mamíferos ocorre, principalmente, em oócitos, enquanto em folículos antrais ocorre, principalmente, nas células da granulosa e está intimamente relacionada com a apoptose celular (ZHOU; PENG; MEI, 2019). A autofagia acontece em nível basal em células normais sob certas condições adversas, como baixos níveis de oxigênio, privação de fator de crescimento, entre outros. Esse tipo de morte celular funciona como um programa citoprotetor que ajuda a manter a homeostase celular, reciclando o conteúdo citoplasmático, bem como eliminando as organelas danificadas através da exacerbada formação de autofagossomos (ESCOBAR; ECHEVERRÍA; VÁZQUEZ-NIN, 2012), que se fundem a lisossomos e seus conteúdos são degradados e reciclados (ZHOU; PENG, MEI, 2019).

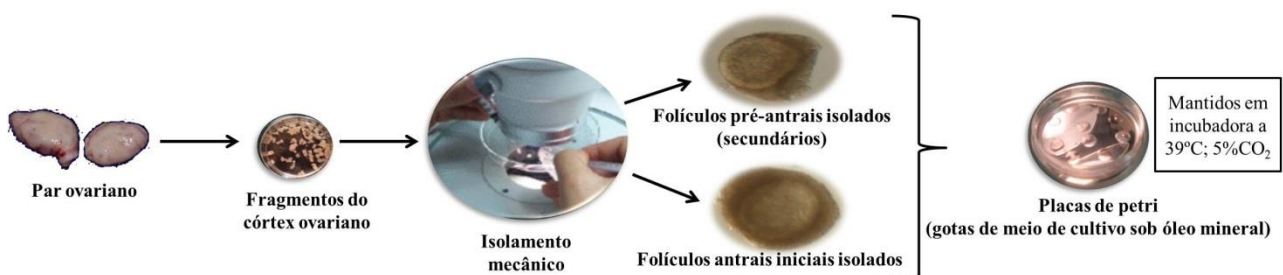
A paraptose é um tipo de morte celular programada que se caracteriza pelo aumento do volume do retículo endoplasmático e/ou mitocôndria (LEE et al., 2016), levando à necrose celular (HOA et al., 2009). Segundo Torres-Ramírez et al. (2019), o conhecimento do papel da paraptose durante a atresia folicular ainda é limitado. Em mamíferos, um estudo demonstrou a ocorrência de paraptose em células da granulosa de ratas ao evidenciar a turgidez do retículo endoplasmático e imunodeteção da proteína homóloga de CCAAT/enhancer-binding proteins (C/EBPs: CHOP; TORRES-RAMÍREZ et al., 2016).

Diante disso, na tentativa de prevenir a atresia, que ocorre naturalmente *in vivo*, e assim otimizar o potencial oocitário do ovário mamífero, especialmente, de ruminantes domésticos, o cultivo folicular *in vitro* tem sido aprimorado.

## 2.7 Cultivo *in vitro* de folículos ovarianos isolados

Os folículos ovarianos de ruminantes domésticos podem ser cultivados em tecido ovariano (*in situ*) ou isoladamente. Para o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos isolados, estes são submetidos à ação mecânica e/ou enzimática, sendo o método mecânico o de maior rendimento de folículos isolados normais (ARAÚJO et al., 2014). Geralmente, os folículos ovarianos de ovinos (pré-antrais ou antrais) são isolados mecanicamente com auxílio de agulhas de 21 G acopladas em seringas de 1 mL, sob estereomicroscópio, e cultivados em gotas de meio em placa de petri sob óleo mineral (Figura 5; KAMALAMMA et al., 2016; MACEDO et al., 2019; BARROS et al., 2019a; 2019b). Esse tipo de cultivo permite o monitoramento individual de cada folículo, bem como o desenvolvimento folicular com obtenção de embriões após o desenvolvimento *in vitro* de folículos ovinos (ARUNAKUMARI; SHANMUGASUNDARAM; RAO, 2010; LUZ et al., 2012).

**Figura 5** - Cultivo de folículos ovarianos isolados de ovinos.



Fonte: Arquivo pessoal.

O Meio Essencial Mínimo Alfa-modificado ( $\alpha$ -MEM) e o Meio de Cultivo de Tecidos 199 (TCM199) são meios ricos em nutrientes e comumente utilizados no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos ovinos. Esses meios suplementados com diferentes substâncias (antioxidantes, substratos energéticos e proteicos e/ou hormônios e fatores de crescimento) mantêm a sobrevivência, promovem o crescimento oocitário e a retomada meiótica de oócitos após cultivo de folículos secundários (pré-antrais) (TCM199: KAMALAMMA et al., 2016;  $\alpha$ -MEM: LUNARDI et al., 2017) ou de folículos antrais iniciais ( $\alpha$ -MEM: BARROS et al., 2019b), com posterior PIV de embriões (TCM199: ARUNAKUMARI; SHANMUGASUNDARAM; RAO, 2010;  $\alpha$ -MEM: LUZ et al., 2012).

Recentemente, estudos têm demonstrado que o cultivo *in vitro* de folículos secundários isolados de ovinos é uma importante ferramenta para verificar o desenvolvimento folicular e a qualidade oocitária após exposição a fatores de crescimento (IGF-I: MONTE et al., 2019a; GDF-9: MONTE et al., 2019b), a extrato de plantas medicinais (*Amburana cearensis*: BARBERINO et al., 2016; *Justicia insularis*: MBEMYA et al., 2018; *Morus nigra*: CAVALCANTE et al., 2018), a knockdown de aquaporina 3 por RNA interferência (PAZ et al., 2018), ao meio condicionado das células-tronco mesenquimais derivadas da geléia de Wharton de ovinos (BEZERRA et al., 2019) e a hormônios (leptina: KAMALAMMA et al., 2016; MACEDO et al., 2019; FSH recombinante humano: BARROS et al., 2019a; Melatonina: BARROS et al., 2019b). Além disso, este tipo de cultivo folicular tem demonstrado o efeito de: medicamentos homeopáticos utilizados contra infertilidade (FSH - 6cH: LIMA et al., 2017), estressores metabólicos (por exemplo, ureia: NANDI et al., 2017), substâncias antioxidantes (própolis vermelho: NASCIMENTO et al. 2019; rutina: LINS et al., 2017b; resveratrol: MACEDO et al., 2017; ácido protocatecuico: MENEZES et al., 2017) e criopreservação (LUNARDI et al., 2017) no metabolismo folicular e oocitário.

Em relação ao cultivo *in vitro* de folículos antrais iniciais isolados, já foi demonstrado que a melatonina promove o desenvolvimento, aumenta a atividade mitocondrial, diminui os níveis de ERO e promove a aquisição da competência meiótica de oócitos ovinos (BARROS et al., 2019b). Outros estudos demonstraram que oócitos de folículos antrais iniciais expostos ao hormônio do crescimento (GH), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (CADENAS et al., 2017) e FSH recombinante humano (FERREIRA et al., 2018) têm maior potencial para atingir a maturação quando comparados aos oócitos de folículos secundários, mostrando, assim, que essas duas categorias foliculares possuem diferentes exigências metabólicas. Além disso, no ovário, há mais folículos antrais iniciais do que folículos antrais avançados (ALM et al., 2006; ITAMI et al., 2015).

Nesse sentido, o cultivo *in vitro* de folículos antrais iniciais torna-se uma importante fonte de oócitos imaturos em potencial para aumentar o número de oócitos meioticamente competentes (ALM et al., 2006; CORREIA et al., 2017).

No entanto, a foliculogênese é um processo complexo e envolve inúmeras interações entre fatores intraovarianos, podendo ser influenciado pelo tipo de meio base de cultivo, modo de substituição de meio, tipo de sistema de cultivo (bidimensional [2D] vs tridimensional [3D]), duração do cultivo, fonte ovariana (pré-puberal vs adulto), componentes da matriz extracelular e categorias foliculares (pré-antral vs folículos antrais iniciais; FIGUEIREDO et al., 2019). Na tentativa de melhorar os resultados do cultivo *in vitro* de folículos de ruminantes, têm-se buscado entender os mecanismos de ação de substâncias envolvidas em seu metabolismo e em sua reprodução, tais como a leptina.

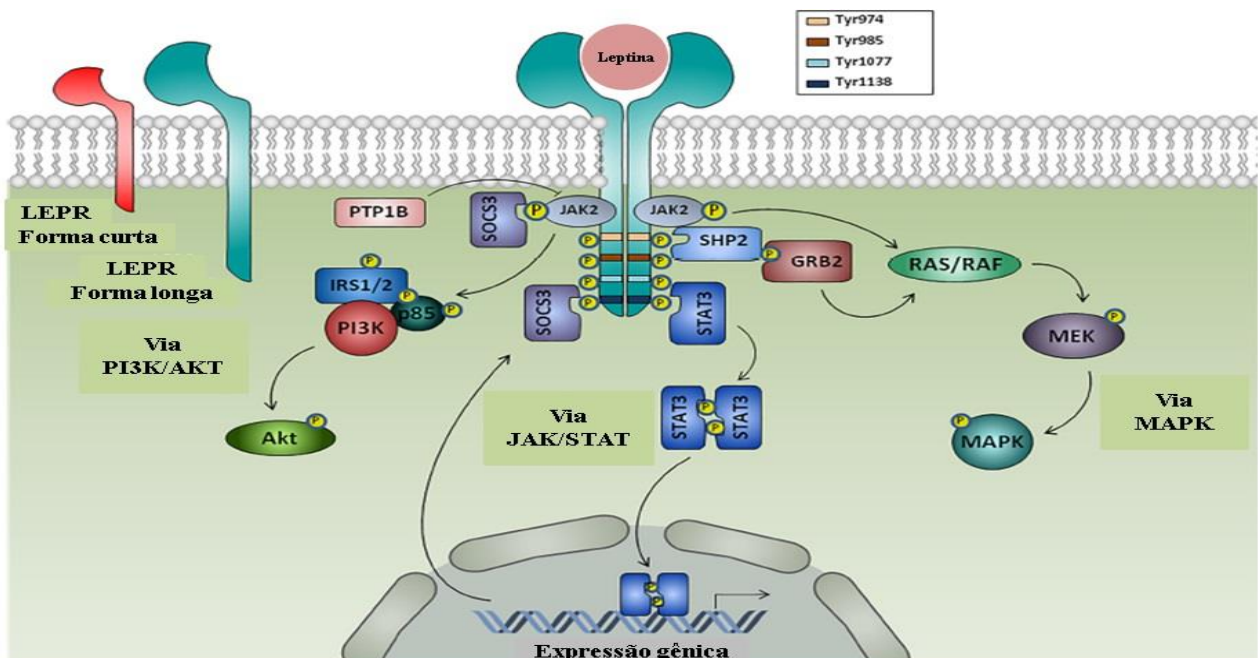
## **2.8 Leptina em ruminantes: Caracterização**

A leptina, proteína de 16 kDa, é um hormônio peptídico produzido, principalmente, pelo tecido adiposo e por outros órgãos, como músculo esquelético, intestino, cérebro, tecidos articulares, osso (SCOTECE et al., 2014) e placenta (MASUZAKI et al., 1997). Ela é conhecida por estar envolvida no controle do apetite, fornecendo um feedback para o animal em relação ao nível atual de deposição de gordura (SZCZESNA; ZIEBA, 2015), ao influenciar a via anorexigênica central (RAY, 2012). Assim como nas demais espécies de mamíferos, as concentrações plasmáticas dessa adipocina estão relacionadas à espessura do tecido adiposo (BLACHE et al., 2000). Em ovelhas, a concentração plasmática de leptina é de 0,5–2,0 ng/mL (DELAVAUD et al., 2000; KADOKAWA et al., 2003; CATUNDA et al., 2013).

A leptina exerce suas atividades biológicas através de receptores de membrana específicos (LEPRs ou OB-Rs). Os LEPRs pertencem à família de receptores de citocinas classe I do gene da diabetes (db) (MÜNZBERG; MORRISON, 2015). Existem pelo menos seis isoformas LEPR que diferem no comprimento do domínio citoplasmático: longo (LEPRb), curto com quatro isoformas (LEPRa, LEPRc, LEPRd e LEPRf) e solúvel (LEPRe) (VÁZQUEZ-VELA; TORRES; TOVAR, 2008). A isoforma longa (LEPRb), encontrada principalmente no hipotálamo (GORSKA et al., 2010), possui o domínio intracelular completo que permite a ativação da via de transdução de sinal JAK/STAT (Janus quinases/Transdutores de sinal e ativadores de transcrição), sendo considerado o receptor funcional da leptina (FRÜHBECK, 2006). Além disso, LEPRb pode ativar as vias da

Proteína Quinase Ativada por Mitógeno (MAPK) e da Fosfatidilinositol-3-quinase/proteína quinase B (PI3K/Akt; Figura 6; ZHOU; RUI, 2014; FRANCISCO et al., 2018).

**Figura 6** - Receptores de leptina e vias de sinalização intracelular da leptina. A leptina se liga às isoformas de seu receptor (LEPR): a isoforma solúvel (não mostrada), a isoforma curta e a isoforma longa. A ligação da leptina à forma longa do LEPR resulta em sua dimerização e induz a autofosforilação da Janus quinase 2 (JAK2), que fosforila o domínio citoplasmático da LEPR em resíduos de tirosina (Tyr974, Tyr985, Tyr1077, Tyr1138), cada um funcionando como locais de ancoragem para adaptadores citoplasmáticos. O Tyr1138 fosforilado por LEPR medeia a interação com o transdutor de sinalização e o ativador da transcrição 3 (STAT3), que se dimerizam e translocam ao núcleo para ativar a transcrição gênica dos genes alvo, como o supressor da sinalização de citocina 3 (SOCS3), que atua como sinalização de feedback negativo. Além disso, a leptina induz a ativação do SHP2, que recruta a proteína adaptadora Grb2 para solicitar a ativação da cascata de sinalização Ras/Raf/MAPK. Leptina também mediou a ativação da fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K)/Akt via substrato receptor de insulina 1/2 (IRS1/2) e a proteína tirosina fosfatase 1B (PTP1B) atua como um regulador negativo da sinalização da leptina através da desfosforilação do JAK2.



Fonte: Adaptado de FRANCISCO et al., 2018.

MUÑOZ-GUITIERREZ et al. (2005) demonstraram que após três dias de infusão de leptina em ovelhas cíclicas, houve redução das concentrações plasmáticas de estradiol e aumento das concentrações de FSH e de insulina, sem efeito nas concentrações de glicose. Em outro estudo, a administração de leptina durante a superovulação em cabras permitiu correlação positiva entre número de embriões transferíveis e os níveis de estradiol no dia do estro e os níveis de progesterona no dia da colheita de embriões (BATISTA et al., 2014). Além disso, em ovelhas Bannur observou-se que os níveis séricos de leptina, insulina e estradiol aumentaram com o avanço da idade, sendo proporcional ao ganho de peso corporal (VEENA et al., 2018).

## 2.9 Uso da Leptina na reprodução *in vivo* de ruminantes

Estudos têm demonstrado o papel da leptina na reprodução ao atuar no eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal (BELLEFONTAINE et al., 2014; DUPUIS et al., 2014) e diretamente no ovário (DUPUIS et al., 2014; VÁZQUEZ; ROMERO-RUIZ; TENA-SEMPERE, 2015). O excesso, a restrição ou a resistência de leptina podem estar associados à função reprodutiva anormal (PÉREZ-PÉREZ et al., 2015).

Autores sugerem que, em ovinos, a leptina é um importante sinal nutricional que modula a atividade reprodutiva através da regulação de secreção de LH (NAGATANI et al., 2000). Além disso, segundo Castaneda et al. (2013), existem relações entre nutrição, condição corporal, leptina circulante e conteúdo lipídico de oócitos de vacas.

Estudos já demonstraram a presença da leptina e/ou seu receptor (LEPRb) em diferentes compartimentos foliculares ovarianos de ruminantes (bovinos: MADEJA et al., 2009; PAULA-LOPES et al., 2007; SARKAR et al., 2010; caprinos: BATISTA et al., 2013; ovinos: MUÑOZ-GUTIÉRREZ et al., 2005; MACEDO et al., 2019) e em embriões (bovinos: MADEJA et al., 2009). Diante disso, percebe-se que a leptina pode regular a foliculogênese ovariana e o desenvolvimento embrionário em ruminantes.

No entanto, níveis plasmáticos de leptina em ovelhas Santa Inês e Morada Nova não interferiram nas taxas de fertilidade e prolificidade após dieta com ou sem suplementos, embora a suplementação alimentar tenha afetado positivamente a concentração de leptina, de insulina e de glicose no sangue de ambas as raças (CATUNDA et al., 2013). Em ovelhas, a imunização passiva contra a leptina aumenta a secreção de estradiol ovariano e, inversamente, a infusão de leptina diretamente na artéria ovariana reduz a secreção do estradiol ovariano (KENDALL et al., 2004). Em outro estudo, a infusão de leptina em curto prazo (72 h) estimulou a foliculogênese ovina ao

promover o desenvolvimento folicular e o aumento no número de folículos antrais avançados (MUÑOZ-GUITIERREZ et al., 2005). Além disso, a administração de leptina durante a superovulação em cabras favoreceu maior número de embriões transferíveis, menor número de embriões degenerados e de células TUNEL-positivas de blastocistos (BATISTA et al., 2014).

## **2.10 Uso da leptina na reprodução *in vitro* de ruminantes**

Para se avaliar os possíveis efeitos da leptina sobre a reprodução *in vitro* de ovelhas, especialmente, sobre a maturação oocitária e o desenvolvimento folicular, algumas tecnologias da reprodução podem ser utilizadas, tais como a Maturação *in vitro* (MIV; KESHRAWANI; ARUNA KUMARI; REDDY, 2016) e o Cultivo folicular *in vitro* (CADENAS et al., 2017; FERREIRA et al., 2018; MACEDO et al., 2019; FIGUEIREDO et al., 2019).

### **2.10.1 Leptina na maturação oocitária *in vitro* (MIV)**

A maturação do oócito ocorre em três etapas: a maturação nuclear, na qual é observada a separação dos cromossomos; a maturação citoplasmática em que ocorre a redistribuição das organelas celulares, as alterações nos filamentos do citoesqueleto celular; e a maturação molecular que se caracteriza pela transcrição de RNAm, síntese de proteínas e fatores de transcrição (fator promotor de maturação [MPF]) e suas ciclinas, e a MAPK (FERREIRA et al., 2008). Para o alcance de todas essas etapas na maturação *in vitro* de oócitos coletados a partir de folículos antrais crescidos *in vivo* e obter excelentes taxas de produção de embriões em estágio de blastocisto, substâncias envolvidas diretamente na reprodução, tais como a leptina, tem sido testadas na MIV.

Em ruminantes, estudos demonstraram que a adição de leptina no meio de MIV de complexos cumulus-oócitos (CCO) promove aumento nas taxas de maturação oocitária (bovinos: BOELHAUVE et al., 2005; PAULA-LOPES et al., 2007; VAN TOL et al., 2008; ARIA-ALVAREZ et al., 2011; JIA et al., 2012; bubalinos: KHAKI et al., 2014; SHEYKHANI; BATAVANI; NAJAFI, 2016; PANDA et al., 2017; ovinos: KESHRAWANI; ARUNA KUMARI; REDDY, 2016) e de produção de blastocistos (bovinos: PAULA-LOPES et al., 2007; JIA et al., 2012; bubalinos: PANDA et al., 2017) e reduz a apoptose de células dos cumulus (bovinos: PAULA-LOPES et al., 2007; PANDA et al., 2017) e de blastocistos (BOELHAUVE et al., 2005).

### 2.10.2 Leptina no cultivo *in vitro* de células foliculares ovarianas

A regulação da foliculogênese envolve uma interação complexa entre fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos (FIGUEIREDO et al., 2018). Nesse sentido, o cultivo *in vitro* de células foliculares representa uma excelente ferramenta para melhorar nossa compreensão do controle da foliculogênese e permitir o uso futuro de um grande número de oócitos imaturos inclusos em folículos pré-antrais ou antrais iniciais em técnicas de reprodução assistida em mamíferos (FIGUEIREDO et al., 2019).

No que diz respeito ao cultivo de folículos ovarianos pré-antrais (secundários) de ovinos, a adição de 10 ng/mL de leptina no meio de cultivo aumentou o crescimento, o antro e as taxas de maturação oocitária após 6 dias de cultivo folicular (KAMALAMMA et al., 2016). Quando o período de cultivo é aumentado para 18 dias, foi demonstrada a necessidade de adição de 25 ng/mL de leptina ao meio de cultivo para promover o desenvolvimento folicular, aumentar os níveis intracelular de glutatona (GSH) e a atividade mitocondrial, bem como melhorar as taxas de MIV (MACEDO et al., 2019). Por outro lado, a adição da leptina no cultivo *In vitro* de células da granulosa e da teca inibiu a esteroidogênese de folículos antrais bovinos (SPICER; FRANCISCO, 1998). Entretanto, não há relatos sobre a ação da leptina no desenvolvimento *In vitro* de folículos antrais iniciais ovinos.

Assim, sabendo-se que folículos pré-antrais e folículos antrais iniciais possuem exigências metabólicas diferentes após cultivo *in vitro* (CADENAS et al., 2017; FERREIRA et al., 2018), faz-se necessário avaliar os efeitos desse hormônio sobre o desenvolvimento *in vitro* destes folículos isolados de ovinos. Além disso, as ações da leptina durante o cultivo de folículos pré-antrais de ovelhas mestiças da raça Santa Inês submetidas a diferentes níveis de oferta de água não são conhecidos.



### 3. JUSTIFICATIVA

Diante da importância da água nas funções metabólicas e estruturais para o animal, a mesma deve estar disponível diariamente, na quantidade exigida pelo animal e com qualidade adequada, especialmente se esses animais forem criados em ambientes de elevada temperatura do ar, à semelhança do semiárido brasileiro, na maioria dos meses. Além disso, já foi demonstrado que a restrição ou a privação hídrica pode diminuir a ingestão de alimentos, o que pode levar ao retardo no crescimento de folículos ovarianos, bem como afetar negativamente o comportamento e o desempenho reprodutivo de pequenos ruminantes. Entretanto, ainda não há estudos que avaliem se diferentes níveis de ofertas hídricas podem afetar negativamente a viabilidade e o desenvolvimento de folículos ovarianos *in vivo*, a maturação oocitária *in vitro* e os níveis séricos de estradiol (E2) e progesterona (P4) em ovelhas mestiças da raça Santa Inês. Nesse sentido, faz-se necessário avaliar o efeito de diferentes níveis de ofertas hídricas sobre a sobrevivência de folículos pré-antrais (primordial, intermediário, primário e secundário), a ativação de folículos primordiais, a maturação *in vitro* de oócitos de folículos antrais crescidos *in vivo* e os níveis séricos de E2 e P4.

Sabe-se também que a restrição ou a privação hídrica pode reduzir o consumo de matéria seca, a ingestão de nutrientes, afetando o estado nutricional e o metabolismo energético, e consequentemente os níveis séricos do hormônio leptina que age diretamente nos ovários, podendo assim, diminuir a qualidade oocitária e o desenvolvimento folicular. Além disso, estudos *in vitro* mostraram que a leptina exógena promove o desenvolvimento de folículos secundários, aumenta as taxas de maturação oocitária e de produção de embriões em ruminantes domésticos. Considerando-se que a restrição hídrica pode diminuir os níveis séricos de leptina e que essa adipocina favorece a qualidade e o desenvolvimento oocitário, folicular e embrionário, a sua adição ao meio de cultivo *in vitro* pode manter a viabilidade e promover o desenvolvimento folicular e oocitário de folículos secundários de ovelhas mestiças da raça Santa Inês submetidas a diferentes níveis de ofertas hídricas, bem como manter a viabilidade, promover o desenvolvimento folicular e oocitário, reduzir os níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) e aumentar os níveis de mitocôndrias ativas e as taxas de maturação oocitária *in vitro* após o cultivo *in vitro* de folículos antrais iniciais de ovelhas SPRD.

#### 4. HIPÓTESES

- Diferentes níveis de ofertas hídricas em ovelhas mestiças da raça Santa Inês podem afetar negativamente a viabilidade e desenvolvimento folicular *in vivo*, a maturação oocitária *in vitro* e os níveis séricos de hormônios sexuais: estradiol e progesterona.

- A adição de leptina ao meio de cultivo *in vitro* de folículos secundários ovinos isolados pode promover a manutenção da viabilidade e o desenvolvimento folicular de ovelhas mestiças da raça Santa Inês submetidas a diferentes níveis de ofertas hídricas.

- A adição de leptina no meio de cultivo *in vitro* de folículos antrais iniciais isolados de ovelhas Sem Padrão Racial Definido (SPRD) mantém a viabilidade e promove o desenvolvimento folicular e produção de oócitos maduros.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos de diferentes níveis de ofertas hídricas sobre as diferentes fases da foliculogênese e nos níveis séricos de estradiol e progesterona e do uso da leptina sobre o cultivo *in vitro* de folículos secundários de ovelhas mestiças da raça Santa Inês criadas no Semiárido Pernambucano e da leptina no cultivo *in vitro* de folículos antrais iniciais isolados de ovelhas Sem Padrão Racial Definido (SPRD).

### 5.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito de diferentes níveis de ofertas hídricas (100% - *ad libitum*, controle; 80%; 60% e 40% de oferta hídrica da ingestão de água do grupo controle) sobre a foliculogênese de ovelhas mestiças da raça Santa Inês criadas no Semiárido Pernambucano, tendo como parâmetros: a sobrevivência de folículos pré-antrais (primordial, intermediário, primário e secundário), a ativação de folículos primordiais, os níveis séricos de estradiol (E2) e progesterona (P4) e a maturação *in vitro* de oócitos de folículos antrais crescidos *in vivo*.
- Verificar os efeitos da leptina no cultivo *in vitro* de folículos secundários isolados de ovários de ovelhas mestiças da raça Santa Inês criadas no Semiárido Pernambucano, submetidas à diferentes níveis de ofertas hídricas, tendo como parâmetros: sobrevivência, formação de antro, crescimento folicular e porcentagem de oócitos totalmente crescidos (oócitos  $\geq 110 \mu\text{m}$ ).
- Determinar os efeitos de duas concentrações de leptina (2 e 10 ng/mL) sobre o cultivo *in vitro* de folículos antrais iniciais isolados, coletados de ovários ovinos de abatedouros (ovelhas SPRD), tendo como parâmetros: sobrevivência, crescimento folicular, porcentagem de oócitos totalmente crescidos, taxas de maturação *in vitro*, níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de mitocôndrias ativas dos oócitos ovinos.

## 6. CAPÍTULO I

### **Decline of ovarian reserve and influence of leptin on in vitro growth of secondary follicles in sheep subjected to reduction of water supply**

V. G. Menezes<sup>a\*</sup>, A. P. O. Monte<sup>a</sup>, R. S. Barberino<sup>a</sup>, B. B. Gouveia<sup>a</sup>, T. L. B. G. Lins<sup>a</sup>,  
T. J. S. Macedo<sup>a</sup>, J. L. Oliveira Júnior<sup>a</sup>, C. A. Araújo<sup>b</sup>, F. S. Campos<sup>b</sup>, E. F. Oliveira Filho<sup>c</sup>, A. M.  
Batista<sup>d</sup>, M. A. A. Queiroz<sup>e</sup>, G. G. L. Araújo<sup>f</sup>, M. H. T. Matos<sup>a</sup>,  
A. Wischral<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Nucleus of Biotechnology Applied to Ovarian Follicle Development, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, PE, Brasil; <sup>b</sup> Postgraduate Program in Animal Science and Pastures, Universidade Federal do Agreste Pernambucano, Garanhuns, PE, Brazil; <sup>c</sup> Laboratory of Deficiency and Metabolic Diseases and Poisoning of Ruminants, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil; <sup>d</sup> Laboratory of Animal Reproduction, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil; <sup>e</sup> Laboratory of Bromatology and Animal Nutrition, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, PE, Brasil; <sup>f</sup> Embrapa Semi-Arid, Petrolina, PE, Brasil.

Manuscrito submetido no periódico: Theriogenology.

Qualis A1 para Biotecnologia; Fator de impacto: 2, 094

## 6. CAPÍTULO I

### **Decline of ovarian reserve and influence of leptin on in vitro growth of secondary follicles in sheep subjected to reduction of water supply**

V. G. Menezes<sup>a\*</sup>, A. P. O. Monte<sup>a</sup>, R. S. Barberino<sup>a</sup>, B. B. Gouveia<sup>a</sup>, T. L. B. G. Lins<sup>a</sup>,  
T. J. S. Macedo<sup>a</sup>, J. L. Oliveira Júnior<sup>a</sup>, C. A. Araújo<sup>b</sup>, F. S. Campos<sup>b</sup>, E. F. Oliveira Filho<sup>c</sup>, A. M.  
Batista<sup>d</sup>, M. A. A. Queiroz<sup>e</sup>, G. G. L. Araújo<sup>f</sup>, M. H. T. Matos<sup>a</sup>,  
A. Wischral<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Nucleus of Biotechnology Applied to Ovarian Follicle Development, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, PE, Brasil; <sup>b</sup> Postgraduate Program in Animal Science and Pastures, Universidade Federal do Agreste Pernambucano, Garanhuns, PE, Brazil; <sup>c</sup> Laboratory of Deficiency and Metabolic Diseases and Poisoning of Ruminants, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil; <sup>d</sup> Laboratory of Animal Reproduction, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brasil; <sup>e</sup> Laboratory of Bromatology and Animal Nutrition, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, PE, Brasil; <sup>f</sup> Embrapa Semi-Arid, Petrolina, PE, Brasil.

**Running head:** Water supply and leptin in ovine ovary

\*Correspondence should be addressed to:

Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF). Campus de Ciências Agrárias.  
Laboratório de Biologia Celular, Citologia e Histologia. Rodovia BR 407, Km 12, Lote 543 -  
Projeto de Irrigação Nilo Coelho - S/N, C1  
CEP: 56300-990 - Petrolina - PE – Brasil.

Corresponding author: vanuziagm@yahoo.com.br (V.G. Menezes)

## Abstract

This study aimed to evaluate the effect of reduced water supply on sheep preantral follicle survival, activation of primordial follicles, serum levels of estradiol (E2) and progesterone (P4), and *in vitro* maturation of oocytes derived from *in vivo* grown antral follicles, as well evaluate the effects of leptin on *in vitro* culture of secondary follicles isolated from ovaries these animals. Sheep (n = 32) were divided into four groups according to daily water supply: *ad libitum* water (Control – 100%); 80%; 60%, and 40% of water supply from the control group's water intake. Blood was collected to determine E2 and P4. After the slaughter of the animals, histological analysis of the ovarian cortex and *in vitro* maturation of oocytes were performed. Moreover, isolated secondary follicles were cultured *in vitro* for 12 days in control medium ( $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>) or  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> supplemented with 10 or 25 ng/mL leptin. The reduction of water supply caused a linear decreasing effect on the percentages of normal preantral follicles, especially of primordial ones (P < 0.05). The concentration of 25 ng/mL of leptin increased the follicle diameter, total and daily growth rates of secondary follicles isolated from the animals that received 60% of water supply (P < 0.05), compared to those follicles *in vitro* cultured in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>. In conclusion, 40% water supply reduces the number of normal sheep preantral follicles, especially the survival of primordial follicles. The concentration of 25 ng/mL leptin stimulated the *in vitro* growth of secondary follicles of sheep subjected to 60% water supply.

**Keywords:** Drinking water; Folliculogenesis; Primordial follicles; Oocyte; Sex hormones.

## 1. Introduction

Water is an essential nutrient that is involved in every metabolic function of the body, being of great importance for the productivity and reproduction of ruminants. However, water scarcity is a significant problem in arid and semiarid regions [1-3], particularly during the drought season of the year [4].

Several studies observed reduction in reproductive performance and behavior (ovine: [5, 6]; caprine: [7]), and in serum levels of estradiol and progesterone (ovine: [1]; caprine: [7]) in small ruminants submitted to water restriction or deprivation. Moreover, water-stressed animals often decrease their feed intake, which causes retardation of ovarian follicular growth [8]. Contrarily, other studies highlight that water deprivation does not affect reproductive parameters in sheep, such as length of the estrous cycle, ovulation, conception, and lambing rates [4,9].

Water restriction can also decrease serum leptin hormone levels in sheep because leptin secretion by the adipose tissue is inhibited when metabolic status is decreased [10-12]. The leptin is a 16-kDa protein produced mainly by adipose tissue that plays an essential role in regulating energy homeostasis and interacts with the reproductive axis and the ovary of mammals [13,14]. The presence of leptin and its receptors in oocytes, granulosa cells, and theca cells suggests a direct action of this hormone on folliculogenesis in ruminants (bovine: [15]; caprine: [16]; alpaca: [17]; ovine: [18]). Studies have demonstrated that leptin improves development and maturation of oocytes from *in vitro* grown secondary (ovine: [18, 19]) and early antral follicles (ovine: [20]), increases oocyte maturation and embryo production (bovine: [15]; bubaline: [21]) and reduces the apoptosis of cumulus cells (bubaline: [21]) and blastocysts (bovine: [22]; caprine: [23]).

A better understanding of the relationship between nutrition and ovarian function is fundamental to optimize reproductive performance in arid and tropical areas [24]). The sheep of these regions are known for their adaptive capacity to survive in adverse conditions [25, 26]. For these reasons, it is crucial to know whether animals may tolerate a partial water restriction without adverse effects on folliculogenesis in this species. Moreover, as water restriction could impair *in vivo* follicular growth, we propose that the addition of leptin to the *in vitro* culture medium of ovarian follicles may be a promising approach to improve follicle development in sheep subjected to water restriction. Thus, the present study aimed to evaluate whether the reduction in water supply by the animals affects preantral follicle survival, activation of primordial follicles, serum levels of estradiol and progesterone, and *in vitro* maturation of oocytes derived from *in vivo* grown antral

follicles. Besides, the study assessed the effects of leptin on *in vitro* culture of secondary follicles isolated from ovaries of animals subjected to different levels of water supply.

## 2. Materials and Methods

Unless noted otherwise, all chemicals used in this study were purchased from Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

### 2.1 Animals

The present experiment was approved and performed under the guidelines of the Ethics Committee on the Use of Animals at the Federal University of São Francisco Valley (UNIVASF), Petrolina, PE, Brazil (License number: 0002/241017). During the experimental period (January to April 2019), the temperature, humidity, and temperature-humidity index (THI) of pens environment were measured, using Data Logger Thermo-hygrometer (HOBO U12-013, MicroDaq, Contoocook, NH, USA), coupled to a black globe thermometer. The minimum and maximum average temperatures recorded were 24.56 °C and 33.83 °C, respectively, with relative air humidity of 63.90% and an average THI of 84.31.

Animal housing and experimental design were performed according to a previous study [1] with some modifications. Thirty two clinically healthy, multiparous, non-pregnant Santa Inês crossbreed sheep with an average age of  $2.3 \pm 0.9$  years and an average weight of  $32.2 \pm 7.4$  kg were used for this experiment. Before starting the experiment, the animals were identified, weighed, treated against endo- and ectoparasites, and randomly allocated in pens of 1.00 x 1.20 m (one sheep per pen). Individual feeders and drinkers were displayed in each pen. The experimental period was 77 days, with the first 14 days for adaptation of the animals to the facilities, diet, and routine management. Thus, the animals were subjected to 63 days of experimentation (water supply), covering 3.7 estrous cycles.

The diet was composed of 70% fresh elephant grass (*Pennisetum purpureum*) and 30% concentrate, consisting of ground corn, soybean meal, mineral mixture-sheep and urea, formulated according to the requirements of the National Research Council [27]) and calculated for a daily weight gain of 157 g. Table 1 describes the nutrient composition and percentage of dietary ingredients of the feed. During the experimental period, the diet was provided *ad libitum* twice a day.



**Table 1.** Proportion and chemical composition of the ingredients of the experimental diet.

Ingredients	% in dry matter			
Elephant grass	46.0			
Ground corn	38.1			
Mineral mixture-sheep*	2.0			
Urea	0.7			
Soybean meal	13.2			
Total	100			

Specification	Elephant grass	Ground corn	Soybean meal	Diet
DM (g/Kg MN)	261.9	889.3	886.1	576.26
MM (g/Kg DM)	105.2	12.9	64.8	61.86
CP (g/Kg DM)	105.5	89.9	487.4	149.13
EE (g/Kg DM)	28.7	45.1	19.0	32.89
NDF (g/Kg DM)	708.7	111.6	15.46	370.56
ADF (g/Kg DM)	419.5	33.7	8.85	206.97
TCHO (g/Kg DM)	830.5	859.9	42.8	715.30
NFC (g/Kg DM)	174.0	642.0	27.85	328.31
TDN (g/Kg DM)	570.1	850.0	80.48	596.71

DM – Dry Matter; NM – Natural Matter; MM – Mineral Matter; CP – Crude Protein; EE – Ether Extract; NDF – Neutral Detergent Fiber; ADF – Acid Detergent Fiber; TCHO – Total Carbohydrates; CNF – Non-Fiber Carbohydrates; TDN – Total Digestible Nutrients. \*Composition: P, 7.5%; Ca, 19%; Mg, 1%; S, 7%; Na, 14.3%; Cl, 21.8%; Fe, 500 ppm; Cu, 300 ppm; Zn, 4600 ppm; Mn, 1100 ppm; I, 80 ppm; Co, 405 ppm; Se, 30 ppm.

## 2.2 Water supply treatment

For the experimental conditions, sheep were randomly divided into four groups of eight animals each: *ad libitum* water (Control – 100%); 80%; 60%, and 40% of water supply from the control group's water intake. The water supply was carried out once a day in the morning.

## 2.3 Hormonal assay

Blood samples of each sheep were collected at the beginning and at the end of the experiment by jugular venipuncture using blood collection tubes with separator gel and clot activator (Cral Plast, São Paulo, Brazil). The serum was separated by centrifugation at 3500 rpm for 15 minutes, and then it was kept in 1.5 mL microtubes and stored at -20 °C. Plasma progesterone (P4) and oestradiol (E2) concentrations were determined through the electrochemiluminescence method (ECLIA) in automated analytical equipment, Access 2<sup>®</sup> (Beckman Counter- USA) using commercial kits specific for the equipment. The intra-assay CV was 1.87% and 2.3%, and the assay sensitivity was 0.016 ng/mL and 0.004 pg/mL, respectively, for P4 and E2.

## **2.4 Weight of animal body, uterus, and ovaries**

At the end of the experimental period, sheep were subjected to fasting, receiving only water for 18 h and weighed to obtain the bodyweight at slaughter. Next, the animals were stunned and slaughtered according to protocols established in Regulation of the Industrial and Sanitary Inspection of Products of Animal Origin [28]. The average daily weight gain (ADG) was calculated by the difference between the body weight at slaughter and the initial body weight dividing by the total number of experimental days. After slaughter, the uteri were removed and weighed. The ovarian pairs (n = 32) of all animals were also collected and weighed.

The ovaries were washed once in 70% alcohol (Dinâmica, São Paulo, Brazil) and twice in 0.9% saline solution supplemented with 100 µg/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. Next, the ovaries were transported within one hour to the laboratory in tubes containing 0.9% saline solution and antibiotics at 4 °C [29] for morphological analysis, *in vitro* maturation of *in vivo* grown oocytes collected from antral follicles, and *in vitro* culture of secondary follicles.

## **2.5 Morphological evaluation of preantral follicles enclosed in the ovarian tissue**

In the laboratory, the ovaries were fragmented into small pieces, and three ovarian cortical fragments (approximately 3 mm x 3 mm x 1 mm thick) were removed from each ovarian pair to evaluate the effect of water supply reduction on ovarian tissue, especially on the morphology of preantral follicles (primordial, intermediate, primary and secondary) and on primordial follicle activation. The fragments were immediately fixed in 10% buffered formalin (Dinâmica, São Paulo, Brazil), dehydrated using graded ethanol (Dinâmica), clarified in xylene (Dinâmica), and embedded in paraffin (Dinâmica). Five-µm thick serial sections were stained by Hematoxylin and eosin (Vetec, São Paulo, Brazil) and observed under a light microscope (Nikon, Tokyo, Japan; 400x magnification). Preantral follicles (n = 240 from each experimental group) were classified based on the morphological criteria of previous study [30] as primordial (one layer of flattened pregranulosa cells around the oocyte) or growing follicles (intermediate: one layer of flattened to cuboidal granulosa cells; primary: one layer of cuboidal granulosa cells, and secondary: two or more layers of cuboidal granulosa cells around the oocyte and no sign of antrum formation). In addition, to evaluate the survival, the follicles were classified as histologically normal when an intact oocyte was present and surrounded by granulosa cells that were well organized in one or more layers and had no condensed nuclear chromatin. Atretic follicles were those with a retracted or vacuolated

oocyte, condensed chromatin, disorganized granulosa cells detached from the basement membrane, or cell swelling [31].

The follicular activation (transition from primordial to growing follicle) was studied in morphologically normal follicles, assessing the proportion between primordial and growing follicles too [30].

### **2.6 *In vitro* maturation of ovine oocytes from *in vivo* grown antral follicles**

*In vitro* maturation (IVM) was performed in oocytes derived from *in vivo* grown antral follicles to verify whether they would have been affected by reduction of water supply. Cumulus-oocyte complexes (COCs) were mechanically separated from the antral follicles of the ovarian cortical fragments (1-2 mm thick) with sterile 26-G needles. The process was performed in tissue culture 199 medium supplemented with HEPES (TCM199-HEPES) and antibiotics. Only oocytes  $\geq 110$   $\mu\text{m}$  in diameter with a homogeneous cytoplasm and surrounded by at least one compact layer of cumulus cells were selected for IVM [32, 33]. The COCs from the animals submitted to the different water supply levels (100%: n = 46; 80%: n = 39; 60%: n = 39 and 40%: n = 21) were transferred to drops of 100  $\mu\text{L}$  of maturation medium composed of TCM 199 supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  follicle-stimulating hormone (human recombinant FSHr; Gonal-F; Serono Laboratórios, São Paulo, Brazil) and 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  luteinizing hormone (LH; ovine pituitary) under oil, and incubated for 24 h at 39 °C with 5% CO<sub>2</sub> in the air [32]. After that, the oocytes were incubated in drops of PBS containing ten mM Hoechst 33342 for 15 min at room temperature in the dark and visualized using an epifluorescence microscope (Nikon) with UV filter (483 nm) at a magnification of 100x. The chromatin configuration (blue fluorescence) was analyzed through observation of the intact germinal vesicle (GV), germinal vesicle breakdown (GVBD), metaphase I (MI) or metaphase II (MII; nuclear maturation).

### **2.7 *In vitro* culture of secondary follicles of sheep**

Next, a further experiment verified whether the addition of leptin to the *in vitro* culture medium would influence the survival and growth of secondary follicles isolated from ovaries of animals subjected or not to reduction of water supply. Isolation, culture, and follicle evaluation were performed according to previous study [34] with some modifications. At the same time of the recovery of oocytes described above, approximately 180-302  $\mu\text{m}$  in diameter secondary follicles were visualized under a stereomicroscope (SMZ 645 Nikon, Tokyo, Japan; 100x) and mechanically

isolated by microdissection from the strips of the ovarian cortex with 26-gauge (26 G) needles. After that, the follicles were transferred to 100  $\mu$ L droplets (one follicle per droplet) containing TCM199 for the quality evaluation. Follicles with a visible oocyte surrounded by two or more layers of granulosa cells, an intact basement membrane, and no antral cavity or cytoplasm darkness were selected for *in vitro* culture.

Secondary follicles isolated from animals of each experimental group were divided in three treatments (approximately 20-25 follicles per treatment, totaling 60-75 follicles for each experimental group). The follicles were individually cultured in 100  $\mu$ L droplets of culture medium under mineral oil in plastic Petri dishes (60 $\times$ 15 mm, Corning, Sarstedt, Newton, NC, USA) at 39  $^{\circ}$ C under 5% CO<sub>2</sub> for 12 days. The treatments were performed using a base control medium consisted of  $\alpha$ -MEM (pH 7.2–7.4) supplemented with 3.0 mg/mL bovine serum albumin (BSA), 10 ng/mL insulin, 5.5  $\mu$ g/mL transferrin, 5.0 ng/mL selenium, 2 mM glutamine, 2 mM hypoxanthine and 50  $\mu$ g/mL ascorbic acid, and then referred as  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> (control) or supplemented with 10 or 25 ng/mL human recombinant leptin (catalog number L4146). Every two days, 60  $\mu$ L of the culture media was replaced with fresh media in each droplet. The concentrations of leptin were chosen according to previous study [18].

Follicular morphology was assessed at day 12 of culture. Atretic follicles were those showing darkness of the oocytes and the surrounding granulosa cells, misshapen oocytes, rupture of the basement membrane, or oocyte extrusion. The following variables were analyzed in the normal follicles: antral cavity formation; follicle diameter (measured from the basement membrane using a pre-calibrated ocular micrometer attached to a stereomicroscope (Nikon, Tokyo, Japan) at 100x magnification); total growth, calculated as the final diameter of the normal follicle (day 12) subtracted from its initial diameter (day 0); and the daily growth rate, calculated as the diameter of normal follicles on day 12 subtracted from its diameter on day 0, divided by the days of culture (12 days). After 12 days of culture, all healthy follicles were carefully mechanically opened with 26 G needles under a stereomicroscope (Nikon) to recover the oocyte. The percentage of fully grown oocytes, i.e., oocyte  $\geq$ 110  $\mu$ m, was calculated as the number of  $\geq$ 110  $\mu$ m oocytes recovered out of the total number of cultured follicles (x 100).

## 2.8 Statistical analyses

All analyses were performed using the SAS package (SAS. INSTITUTE. SAS/STAT. Version 9.1, Cary, NC, 2004). Data were tested for normal distribution using the Shapiro-Wilk test

using PROC UNIVARIATE procedure and transformed when necessary ( $\log_{10}(x+1)$ ). The *in vivo* experiment was performed in a completely randomized experimental design due to the homogeneity obtained in the selection of animals' body size and age. The body weight at slaughter, diary weight gain, uterus and ovary weight, P4 and E2 concentrations (initial and final), in situ survival of preantral follicles, percentage of primordial, transition, primary and secondary normal follicles, and follicular activation were submitted to ANOVA using PROC GLM and orthogonal polynomials with linear and quadratic effect. Data with time effect were analyzed using PROC MIXED procedure. The model included the effect of water supply (100 – 80 – 60 and 40%) in 8 repetitions (32 animals). PROC CORR calculated the correlations, and PROC REG estimated the linear and quadratic regression when  $P < 0.05$ .

The *in vitro* experiment was also performed in a completely randomized experimental design, and PROC MIXED performed the ANOVA analysis. The model included the effect of water supply (100 – 80 – 60 and 40%), culture medium ( $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>; 10 and 25 ng/mL leptin), culture time (0 and 12 days), and their interactions. The results were displayed as the average and standard error of the mean. Total and diary follicular growth, and follicular diameter at day 12, were analyzed by PROC GLM. However, due to significant variance heterogeneity, the Kruskal-Wallis test was used by PROC NPAR1WAY.

Results were considered statistically significant when  $P < 0.05$ .

### **3. Results**

#### **3.1 Weight of animals' bodies, uteri, and ovaries**

According to Table 2, the animals' body weight at slaughter, daily weight gain, and weight of uterus and ovaries did not differ ( $P > 0.05$ ) between the control group and the groups subjected to reduction of water supply.

#### **3.2 Hormone levels**

Serum levels of estradiol and progesterone did not differ ( $P > 0.05$ ) among the groups neither at the beginning of the experiment nor at the end (Table 2). In addition, only animals that were subjected to 40% water supply had a significant increase in the serum level of progesterone at the end of the experiment when compared to the serum level of progesterone at the beginning of the experiment (Table 2).

**Table 2.** Body weight at slaughter, average daily gain, weight of uterus and ovaries, serum levels (initial and final) of estradiol and progesterone and water and dry matter intake of Santa Inês crossbred sheep subjected to different levels of water supply.

Variable	Experimental groups*				MSE	Probability Effect	
	100%	80%	60%	40%		Linear	Quadratic
Body weight at slaughter (Kg)	37.00 ± 0.70	38.43 ± 0.93	36.53 ± 0.73	38.56 ± 0.94	1.13	0.7919	0.8994
Average daily gain (kg)	0.078 ± 0.007	0.098 ± 0.007	0.065 ± 0.004	0.100 ± 0.003	0.01	0.7812	0.6114
Uterus (g)	65.60 ± 1.72	65.00 ± 1.86	60.00 ± 2.29	57.50 ± 1.80	2.66	0.2388	0.8648
Ovaries (g)	2.73 ± 0.10	2.55 ± 0.12	2.28 ± 0.08	2.21 ± 0.09	0.14	0.1647	0.8521
Initial estradiol (pg/mL)	29.62 <sup>A</sup> ± 2.82	25.50 <sup>A</sup> ± 0.79	30.25 <sup>A</sup> ± 1.59	24.87 <sup>A</sup> ± 0.96	2.37	0.6686	0.8996
Final estradiol (pg/mL)	22.25 <sup>A</sup> ± 1.60	25.00 <sup>A</sup> ± 2.01	28.87 <sup>A</sup> ± 1.63	28.00 <sup>A</sup> ± 2.89	2.77	0.4129	0.7555
Initial progesterone (ng/mL)	1.84 <sup>A</sup> ± 0.20	1.72 <sup>A</sup> ± 0.17	1.63 <sup>A</sup> ± 0.13	1.03 <sup>B</sup> ± 0.12	0.17	0.1063	0.4792
Final progesterone (ng/mL)	2.28 <sup>A</sup> ± 0.18	1.35 <sup>A</sup> ± 0.18	1.21 <sup>A</sup> ± 0.13	1.82 <sup>A</sup> ± 0.27	0.22	0.4372	0.0869
<sup>#</sup> Water intake (L/day)	1.622	1.311	1.233	0.910	0.07	<sup>1</sup> 0.0001	0.6231
<sup>#</sup> Dry matter intake (kg/day)	1.202	1.158	1.201	1.329	0.01	0.0912	<sup>2</sup> 0.0008

\* Water *ad libitum* (Control – 100%); 80%; 60%, and 40% of water supply from the control group's water intake.

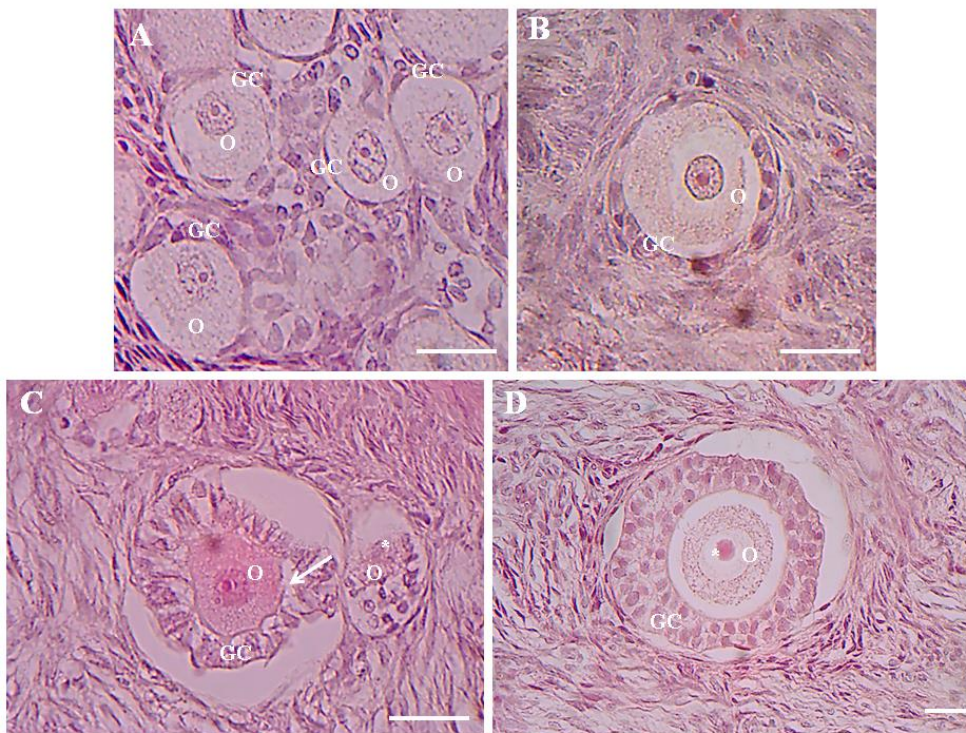
<sup>#</sup> Lima *et al.* unpublished data. <sup>1</sup>Water intake = 0.405 + 0.0128x R<sup>2</sup> = 0.583; <sup>2</sup>Dry matter intake = 1.846 – 0.017x + 0.00011x<sup>2</sup> R<sup>2</sup> = 0.61; Different letters in the column differ from each other (p < 0.05).

MSE: Mean Squared Error.

### 3.3 Follicle morphology (survival) and activation

The ovaries from sheep that received *ad libitum* water (control group; Fig. 1A) and those from the animals that received 80% of water supply (Fig. 1B) showed morphologically normal preantral follicles surrounded by normal granulosa cells. The ovaries from sheep that received 60% (Fig. 1C) or 40% (Fig. 1D) of water supply displayed atretic preantral follicles with swollen and disorganized granulosa cells, retracted, vacuolated oocyte or condensed nuclear chromatin. The reduction of the water supply levels caused a decreasing linear effect in the percentage of morphologically normal preantral follicles (follicle survival) ( $P = 0.0053$ ), and more specifically, in the percentage of normal primordial follicles ( $P = 0.0079$ ) (Table 3). However, the percentage of growing follicles (intermediate, primary, and secondary) did not differ ( $P > 0.05$ ) among treatment groups, indicating that there was no follicle activation (Table 3).

**Figure 1.** Histological sections of ovine ovarian fragments (A–D): Normal primordial follicles in the control group (100% - *ad libitum* water; A) and growing follicles: normal intermediate follicle from sheep that received 80% of water supply (B); atretic primary follicle (C) and atretic secondary follicle (D) from sheep that received 60 and 40% of water supply, respectively. O: oocyte; GC: granulosa cells; Asterisk: pyknotic nucleus; Arrow: retracted oocyte. Scale bar: 20  $\mu\text{m}$  (400 $\times$ ).



**Table 3.** Preantral follicles survival (percentage of morphologically normal preantral follicles), percentage of normal preantral follicles in the different developmental stages, and follicular activation of Santa Inês crossbreed sheep subjected to different levels of water supply.

Variable	Experimental groups*				MSE	Probability Effect	
	100%	80%	60%	40%		Linear	Quadratic
Preantral follicles survival (%)	56.25	49.17	45.00	32.08	3.03	<sup>1</sup> 0.0053	0.5644
<i>Normal follicles in each category (%)</i>							
Primordial follicles	44.17	40.42	35.42	25.42	2.75	<sup>2</sup> 0.0079	0.6579
Intermediate follicles	9.58	7.92	8.75	6.25	-	-	-
Primary follicles	0.83	0.42	0.42	0.00	-	-	-
Secondary follicles	1.67	0.42	0.42	0.42	-	-	-
<i>Follicular activation (%)</i>							
Primordial follicles	78.52	82.20	78.70	79.22	-	-	-
Intermediate follicles	17.04	16.10	19.44	19.48	-	-	-
Primary follicles	1.48	0.85	0.93	0.00	-	-	-
Secondary follicles	2.96	0.85	0.93	1.3	-	-	-
Growing follicles (intermediate, primary and secondary)	21.48	17.80	21.30	20.78	-	-	-

\* Water *ad libitum* (Control – 100%); 80%; 60%, and 40% of water supply from the control group's water intake.

N= 240 follicles per experimental group.

<sup>1</sup>Preantral follicles survival =  $18.81 + 0.384x$   $R^2 = 0.47$

<sup>2</sup>Normal primordial follicles =  $14.89 + 0.305x$   $R^2 = 0.35$

There was a high and significant correlation between the percentages of preantral follicles survival (percentage of morphologically normal preantral follicles) and normal primordial follicles in the control group and other groups subjected to reduction of water supply (Table 4). Besides, the data pointed out a correlation between the percentage of normal primordial follicles and the final levels of progesterone in sheep that received 60% of water supply ( $r = 0.74$ ;  $P = 0.0385$ ). Lastly, given that there was a significant correlation between the percentage of survival of preantral follicles and the percentage of primordial normal follicles in all experimental groups (Table 4), it was possible to estimate the survival of preantral follicles from the percentage of normal primordial follicles based on the linear regression equations presented in Table 5.



**Table 4.** Correlation coefficients between the percentage of preantral follicles survival (percentage of morphologically normal preantral follicles) with the percentage of normal primordial follicles of Santa Inês crossbreed sheep subjected to different levels of water intake.

	Experimental Groups			
	100%	80%	60%	40%
r value	0.91	0.90	0.90	0.97
P value	0.0014*	0.0026*	0.0019*	0.0001*

Water *ad libitum* (Control – 100%); 80%; 60%, and 40% of water supply from the control group's water intake. \* (P<0.05).

**Table 5.** Linear regression equations to estimate the percentage of preantral follicle survival of Santa Inês crossbreed sheep subjected to different levels of water intake (y) in function of the percentage of normal primordial follicles (x).

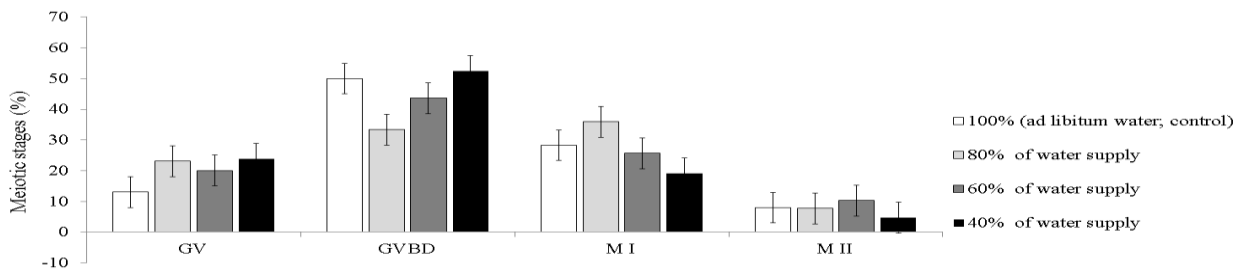
Groups <sup>a</sup>	Parameters					R <sup>2</sup>	Value of P		
	Y		Intercepta	Slope	X		Intercepta	Slope	
100%	PFS (%)	=	18.307	+	0.863	NP (%)	0.84	0.04*	0.0014*
80%	PFS (%)	=	5.326	+	1.091	NP (%)	0.81	0.57	0.0026*
60%	PFS (%)	=	10.201	+	0.987	NP (%)	0.82	0.19	0.0019*
40%	PFS (%)	=	3.965	+	1.110	NP (%)	0.94	0.26	0.0001*

<sup>a</sup> Water *ad libitum* (Control – 100%); 80%; 60%, and 40% of water supply from the control group's water intake. \* (P<0.05)..

### 3.4 *In vitro* maturation of oocytes from antral follicles

The reduction of water supply did not affect meiosis resumption of *in vivo* grown oocytes (P > 0.05; Fig. 2).

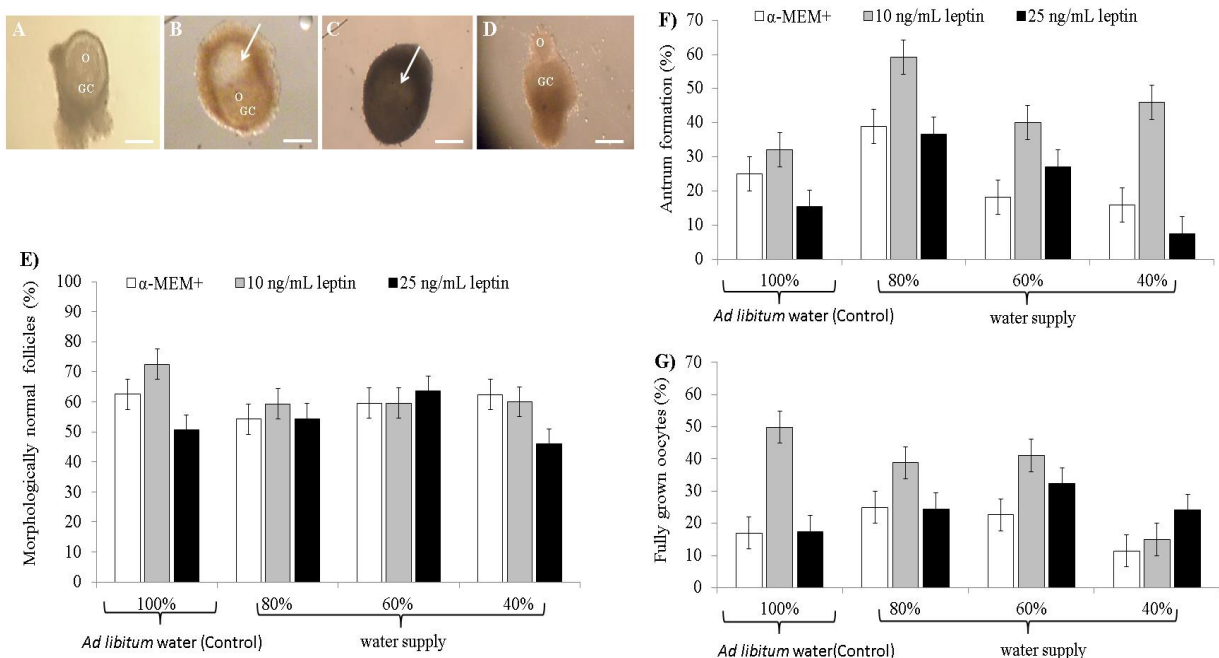
**Figure 2.** Percentage of meiotic stages after IVM of *in vivo* grown oocytes recovered from sheep subjected to different levels of water supply. GV: germinal vesicle; GVBD: germinal vesicle breakdown; MI: metaphase I; MII: metaphase II (nuclear maturation). (P > 0.05).



### 3.5 *In vitro* culture of secondary follicles

Morphologically normal secondary follicles (Fig. 3A) were isolated from ovaries of sheep subjected or not to reduction of water supply and cultured in  $\alpha$ -MEM+ (control medium) or  $\alpha$ -MEM+ containing 10 or 25 ng/mL leptin. After culture, all treatments displayed antral (Fig. 3B), atretic (Fig. 3C), and extruded (Fig. 3D) follicles. However, after 12 days of culture, supplementation of the culture medium with leptin did not influence ( $P > 0.05$ ) the percentage of normal follicles (Fig. 3E), antrum formation (Fig. 3F), fully grown oocytes (Fig. 3G) and oocyte extrusion (data not shown) among groups.

**Figure 3.** Morphologically normal secondary follicle at day 0 (A), and antral (B), extruded (C), and atretic (D) follicles after 12 days of *in vitro* culture of secondary follicles from sheep subjected to different levels of water supply. GC: granulosa cell; O: oocyte. Arrow: antral cavity. Scale bar: 150  $\mu$ m (100x magnification). Influence of leptin on the percentage of morphologically normal (E), antrum formation (F), and fully grown oocytes ( $\geq 110$   $\mu$ m; G) after *in vitro* culture of secondary follicles from sheep subjected to different levels of water supply. ( $P > 0.05$ )



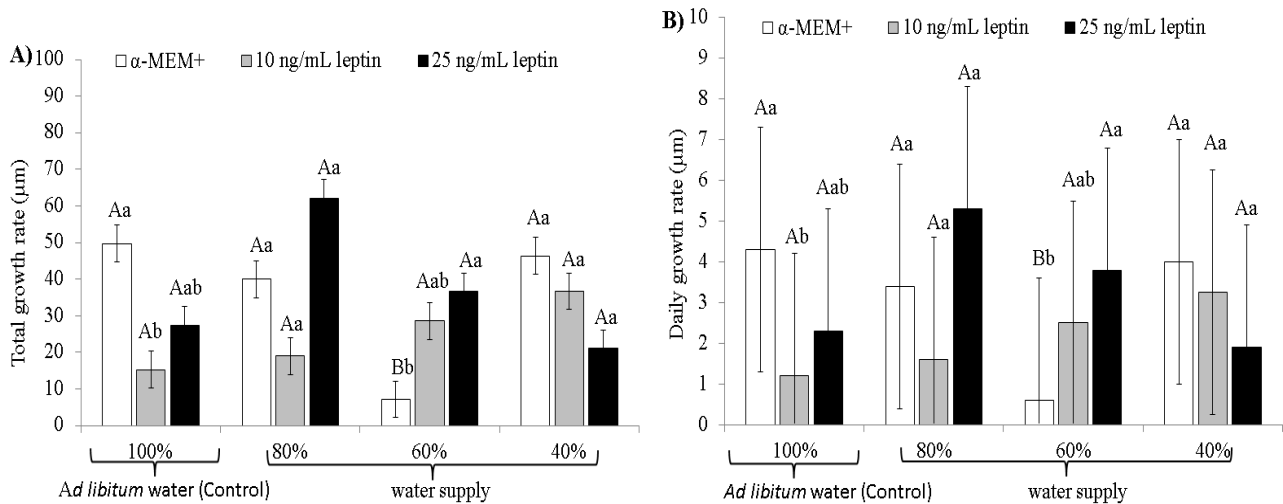
After 12 days of culture, follicles from sheep that received *ad libitum* water and were further cultured in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> had a higher diameter ( $P < 0.05$ ) than those cultured in 10 ng/mL leptin (Table 6). Nevertheless, follicles from animals that received 60% of water supply had a larger diameter ( $P < 0.05$ ) when cultured in 25 ng/mL leptin than those cultured in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> (control medium) and did not differ ( $P > 0.05$ ) from 10 ng/mL leptin. At the end of the culture, there was no difference ( $P > 0.05$ ) in total growth rate (Fig. 4A) and daily growth rate (Fig. 4B) among different water supply groups, except for the decreased diameter of follicles from sheep that received 60% of water supply and were cultured in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> ( $P < 0.05$ ). Besides, total growth (Fig. 4A) and daily growth rates (Fig. 4B) were significantly larger when follicles from animals that received *ad libitum* water (control group) were cultured in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> compared to those cultured in 10 ng/mL leptin but did not differ ( $P > 0.05$ ) from 25 ng/mL leptin. Nevertheless, the addition of 25 ng/mL leptin to the medium significantly increased total growth (Fig. 4A), and daily growth rates (Fig. 4B) compared to  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> (control medium) in those follicles from sheep that received 60% of water supply.

**Table 6.** Influence of the leptin on follicle diameter after *in vitro* culture of isolated secondary follicles of Santa Inês crossbreed sheep subjected to different levels of water supply.

Day of Culture	Treatments group of water intake*	Follicle diameter ( $\mu\text{m}$ )		
		$\alpha$ -MEM <sup>+</sup>	10 ng/mL leptin	25 ng/mL leptin
Day 0	100% (control)	238 $\pm$ 1.19 <sup>a</sup>	232 $\pm$ 1.49 <sup>a</sup>	246 $\pm$ 1.28 <sup>a</sup>
Day 12		294 $\pm$ 3.06 <sup>a</sup>	254 $\pm$ 3.38 <sup>b</sup>	281 $\pm$ 5.98 <sup>ab</sup>
Day 0	80%	261 $\pm$ 1.57 <sup>a</sup>	267 $\pm$ 1.75 <sup>a</sup>	251 $\pm$ 2.03 <sup>a</sup>
Day 12		304 $\pm$ 5.87 <sup>a</sup>	305 $\pm$ 6.72 <sup>a</sup>	317 $\pm$ 3.85 <sup>a</sup>
Day 0	60%	248 $\pm$ 1.38 <sup>a</sup>	241 $\pm$ 1.23 <sup>a</sup>	246 $\pm$ 1.58 <sup>a</sup>
Day 12		261 $\pm$ 2.43 <sup>b</sup>	274 $\pm$ 4.53 <sup>ab</sup>	295 $\pm$ 2.60 <sup>a</sup>
Day 0	40%	212 $\pm$ 1.65 <sup>b</sup>	250 $\pm$ 1.67 <sup>a</sup>	232 $\pm$ 1.64 <sup>ab</sup>
Day 12		259 $\pm$ 8.10 <sup>a</sup>	281 $\pm$ 5.70 <sup>a</sup>	256 $\pm$ 6.54 <sup>a</sup>

\* Water *ad libitum* (Control – 100%); 80%; 60%, and 40% of water supply from the control group's water intake. <sup>a,b</sup> Different letters denote significant differences among different culture media in the same level of water supply and same day of culture ( $P < 0.05$ ).

**Figure 4.** Influence of leptin on the total growth rates (A) and daily growth (B) after 12 days of *in vitro* culture of secondary follicles from sheep subjected to different levels of water supply. <sup>A, B</sup> Different letters denote significant differences among the different levels of water supply in the same culture medium ( $P < 0.05$ ); <sup>a,b</sup> Different letters denote significant differences among different culture medium in the same level of water supply ( $P < 0.05$ ).



There were no interactions between water supply levels, media and culture time.

#### 4. Discussion

The present study demonstrated for the first time the effects of the reduction of water supply on different phases of folliculogenesis in sheep, i.e., on the survival and activation of primordial follicles, *in vitro* maturation of oocytes derived from *in vivo* grown antral follicles, as well as the effects of the addition of leptin to the *in vitro* culture medium of secondary follicles isolated from ovaries of animals subjected to different levels of water supply.

Reproductive function tends to decrease when nutritional conditions are not adequate. Rondina et al. (2005), as an example, described that prolonged undernutrition in goat provokes the arrest of oestrus activity and reduced ovarian weight. The same does not seem to happen with water restriction since, in the present study, water restriction did not affect the weight of both ovaries and uterus. Studies also demonstrated that the water restriction or deprivation does not affect the duration of the estrous cycle, ovulation rate, conception rate, and lambing rate in ovine [4, 9]. Thus, sheep submitted to water restriction maintained the weight of both ovaries and uterus, showing that

Santa Inês sheep breed stand out, in northeast region of Brazil, for their adaptability to tropical climate conditions, presenting interesting traits as like prolificity, rusticity, maternal ability and parasite resistance [26].

Our results also demonstrated that the reduction of the water supply did not affect serum levels of estradiol and progesterone. However, animals that were subjected to 40% water supply had a significant increase in the serum level of progesterone at the end of the experiment when compared to the beginning. Previous study demonstrated that 50% of water restriction did not change the levels of these hormones in goats [35]. On the other hand, another study highlighted that water-restricted groups of Malpura ewes either submitted to 40% continuous water restriction or submitted to a total water restriction alternated to *ad libitum* availability showed decreased plasma estradiol and increased progesterone levels [1]. These authors also observed that these groups submitted to water restriction showed the highest loss of body weight at the end of the experiment, the highest reduction of the average daily weight gain, and the lowest dry matter intake, as compared to the other experimental groups. These results highlight that water-restricted ewes suffered nutritional insufficiency. The serum levels of estradiol and progesterone in ewes are related to the nutritional status [1, 36, 37]. Although, in present study, the reduction in water supply caused a decreasing linear effect on water intake (Lima et al., unpublished data), there was no significant difference in the body weight at slaughter and average daily weight between groups. Dry matter intake would have decreased (1.190 kg) only if the animals were submitted to a water availability of 77.27% of the *ad libitum* water intake according to equation “ $Y = 1.846 - 0.017x + 0.00011x^2$   $R^2 = 0.61$ ” (Lima et al., unpublished data). Possibly, in the present study, serum levels of estradiol and progesterone did not differ among the experimental groups due to the absence of a significant difference in body weight at slaughter, average daily weight and dry matter intake. Thus, animals submitted to water restriction maintained their levels of estradiol and progesterone and nutritional needs, confirming their adaptability to tropical climate conditions as maintenance of carcass traits and meat quality when submitted to water restriction of at 24 h [38] and their ingestive behavior when submitted to water saline levels (different levels of total dissolved solids; [39]).

Considering that the ovarian preantral follicles (primordial, intermediate, primary, and secondary follicles) are the major source of oocytes, which can be used in assisted reproductive programs, and that the primordial follicles are considered the pool of ovarian reserve [40], we investigated whether these follicles would be affected by a reduction of water intake. Interestingly, our results highlighted that the percentage of normal preantral and primordial follicles significantly

decreased according to the reduction of water intake. Small follicles do not have an independent capillary network and are dependent on their proximity to the stromal vessels for their survival and early growth [41]. Moreover, several studies claimed that a low flow of nutrients to the ovary for prolonged periods impairs the initial folliculogenesis [24, 42, 43]. Therefore, probably the reduction of water intake may alter the cortical vascularization, compromising the transport of nutrients to the preantral follicles, especially to the primordial follicles located in the outer part of the cortex. Since the activation of the primordial follicles was not observed in any treatment, we suggest that a reduction in water intake can affect the ovarian reserve due to the loss of primordial follicles by atresia. It is worth noting that this precocious depletion of the follicular pool may result in premature ovarian failure in the animals.

In the present study, we determined linear regression equations to estimate the percentage of preantral follicle survival in fresh ovarian cortex from sheep subjected or not to the reduction of water intake as a function of the percentage of normal primordial follicles. Sheep that received *ad libitum* water had about 44% of normal primordial follicles and an estimated preantral follicle survival of 56%. Sheep that received 80%, 60%, or 40% of water supply had 40%, 35%, and 25% normal primordial follicles and estimated follicle survival of 48.41%, 45.16%, and 32.18%, respectively. These findings agree with other studies with ovaries collected from sheep of unknown breed or nutritional status that, probability, received water *ad libitum*. These sheep presented about 73% and 87% [44] and 60% and 78% [45] normal primordial follicles and normal preantral follicles, respectively. When we using our equation “Preantral follicles survival (PFS) = 18.307+ 0.863 x normal primordial (NP; %)” the analysis estimated similar preantral follicle survival by these authors: 81.30% (87%; [44] and 70% (78%; [45]). Therefore, we suggest that our equations can be used as predictive equations for the survival of pre-antral follicles and thus, sheep subjected to water restriction do not need to be slaughtered to obtain ovaries, ovariectomized or subjected to ovarian biopsy to determine follicular survival in fresh ovarian tissue.

Considering the importance of IVM for improvement of the fertilization and developmental capacity of ovine oocytes [46], the study later assessed the effect of water restriction on IVM of oocytes from *in vivo* grown antral follicles. The water intake reduction did not affect meiotic resumption of *in vivo* grown oocytes. The similarity between the nutritional status of animals after water restriction might have contributed to the absence of significative difference in the meiotic stages because nutrition affects the number of oocytes that ovulate and their quality [47],

confirming once again that animals adapting to semi-arid conditions [26, 39) are resistant to water restriction [38].

The *in vitro* culture of isolated secondary follicles has been performed in sheep to evaluate follicle and oocyte development after the exposure to different substances (hormone, growth factors, or antioxidants), and to increase the production of meiotically competent oocytes [18, 48]. Water restriction can decrease feed intake, which is reported to cause retardation of ovarian follicular growth [8] and can decrease serum leptin hormone levels in sheep [12]. Leptin is related to the reproductive axis and the ovary of mammals [13, 14] and with the development *in vitro* of secondary follicles sheep (18, 19). Based on this information, we hypothesized that water restriction might impair the development of secondary follicles, and leptin could improve their growth *in vitro*. Our results highlighted a decrease in *in vitro* growth of secondary follicles cultured in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> from sheep that received 60% of water supply of the control c compared to the other experimental groups. After that, the addition of 25 ng/mL leptin to the culture medium stimulated the growth, compared to those follicles cultured in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>. Previous studies already pointed out that leptin increases the follicle diameter [19, 49], probably through stimulation of the granulosa cell proliferation [50]. Besides, considering that water deprivation for four days can decrease serum leptin hormone levels (ovines: [12]), we propose that sheep subjected to moderate water supply (60%) may have reduced levels of serum leptin, thus requiring a higher concentration of this hormone (25 ng/mL) to induce follicular growth *in vitro*. Moreover, our findings displayed that the *in vitro* growth of secondary follicles from sheep that received water *ad libitum* does not depend on the addition of leptin to the control medium ( $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>), possibly because there was no reduction in serum leptin levels in these animals [12].

Overall, our results indicate that the water supply of 40% of the control reduces the percentage of normal preantral follicles enclosed in ovarian tissue, mainly the survival of primordial follicles from crossbred Santa Inês sheep. Although water restriction did not influence serum levels of estradiol and progesterone, primordial follicle activation, as well as the IVM of oocytes from antral follicles, the concentration of 25 ng/mL leptin stimulated the *in vitro* growth of secondary follicles of sheep subjected to 60% water supply of the water intake of the control group.

### **Declaration of interest**

The authors declare no conflicts of interest.

## Acknowledgments

This work was supported by FACEPE (Process APQ-0895-5.05/14) and CAPES/PROAP. M.A.A. Queiroz, G.G.L. Araújo and M.H.T. Matos are supported by a grant from CNPq. We thank Dr. Alexandre Coutinho Antonelli and Alan Greison Costa Macêdo for the loan of the portable ultrasound device. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) Finance Code 001.

## References

- [1] Kumar D, De Kalyan, Singh AK, Kumar K, Sahoo A, Naqvi SMK. Effect of water supplies on physiological responses and certain reproductive traits of Malpura ewes in a semiarid tropical environment. *J Vet Behav* 2016;12:54-9. <https://doi.org/10.1016/j.jveb.2015.11.006>.
- [2] Akinmoladun OF, Muchenje V, Fon FN, Mpendulo CT. Small Ruminants: Farmers' Hope in a World Threatened by Water Scarcity. *Animals* 2019;9:1-20. <https://doi.org/10.3390/ani9070456>.
- [3] Albuquerque IRR, Araújo GGL, Voltolini TV, Moura JHA, Santos NMS, Queiroz MAA et al. Saline water intake effects performance, digestibility, nitrogen and water balance of feedlot lambs. *Anim Prod Sci* 2020;60:1-7. <https://doi.org/10.1071/AN19224>.
- [4] Khnissi S, Lassoued N, Rekik M, Salem HB. Effect of Pre-Mating Water Deprivation on Ovarian Activity and on Reproductive Traits of Mature Barbarine Ewes during Summer Season. *IJESD* 2014;5:332-5. <https://doi.org/10.7763/IJESD.2014.V5.503>.
- [5] Barbour E, Rawda N, Banat G, Jaber L, Sleiman FT, Hamadeh S. Comparison of immunosuppression in dry and lactating Awassi ewes due to water deprivation stress. *Vet Res Commun* 2005;29:47-60. <https://doi.org/10.1023/B:VERC.0000046742.12991.21>.
- [6] Khnissi S, Rekik M, Lassoued N. Duration of water deprivation in the warm summer months: Effect on reproductive performance of Barbarine rams. *JNS, Agri & Biotech* 2019;63:3951-5.
- [7] Pacheco MD, Romero JV, Rojasumaya S, Retanamárquez S. Effects of crowding and water supplies stress on creole goat reproduction in the Oaxacan Sierra Mixteca, Mexico. *Reprod Domest Anim* 2018;53:1-10. <https://doi.org/10.1111/rda.13267>.
- [8] Blanc F, Bocquier F, Debus N, Agabriel J, D'hour P, Chilliard Y. La pérennité et la durabilité des élevages de ruminants dépendent des capacités adaptives des femelles. *INRA Prod Anim* 2004;17:287-302. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2004.17.4.3604>.



- [9] Mittal JP, Ghosh PK. Effect of prolonged intermittent water supplies on the reproductive performance of ewes in the Indian desert. *Anim Prod* 1986;43:255-60. <https://doi.org/10.1017/S0003356100002439>.
- [10] Houseknecht KL, Portocarrero CP. Leptin and its receptors: regulators of whole body energy homeostasis. *Domest Anim Endocrinol* 1988;15:457-75. [https://doi.org/10.1016/s0739-7240\(98\)00035-6](https://doi.org/10.1016/s0739-7240(98)00035-6).
- [11] Chedid M. Physiological responses of feed and water restricted dry Awassi ewes to aspirin administration. Master thesis, American University of Beirut, Riad El-Solh/Beirut 1107 2020 Lebanon, 2009, 1-64
- [12] Naqvi SMK, Kumar D, De Kalyan, Sejalan V. Climate Change and Water Availability for Livestock: Impact on Both Quality and Quantity. In: **Sejian V, Gaughan J, Baumgard L, Prasad C**. Editors. *Climate Change Impact on Livestock: Adaptation and Mitigation*, 2015, p. 81-95. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-2265-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-81-322-2265-1_6).
- [13] Dar RR, Lone FA, Sheikh AA, Ahmad SF, Islam ST, Lakhani. Role of Leptin in Reproduction. *Theriogenology Insight* 2017;7:113-21. <https://doi.org/10.5958/2277-3371.2017.00027.4>.
- [14] Heryani LGSS, Laksmi DNDI, Lestari DLP, Laksana IGNBT, Sudimartini LM, Gunawan IWNF. Relationship between the appearance of first estrus (puberty) with leptin and body conditions score (bcs) levels in bali cattle. *Adv Anim Vet Sci* 2019;7:904-9. <http://dx.doi.org/10.17582/journal.aavs/2019/7.10.904.909>.
- [15] Paula-Lopes FF, Boelhauve M, Harbermann FA, Sinowatz F, Wolf E. Leptin promotes meiotic progression and developmental capacity of bovine oocytes via cumulus cell-independent and -dependent mechanisms. *Biol Reprod* 2007;76:532-41. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.054551>.
- [16] Batista AM, Silva DMF, Rêgo MJB, Silva FLM, Silva ECB, Beltrão EIC, et al. The expression and localization of leptin and its receptor in goat ovarian follicles. *Anim Reprod Sci* 2013;141:142-7. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.08.007>.
- [17] Gallelli MF, Bianchi C, Lombardo D, Rey F, Rodrigues FM, Castillo VA, et al. Leptin and IGF1 receptors in alpaca (*Vicugna pacos*) ovaries. *Anim Reprod Sci* 2019;200:96-104. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.12.001>.
- [18] Macedo TJS, Santos JMS, Bezerra MÉS, Menezes VG, Gouveia BB, Barbosa LMR, et al. Immunolocalization of leptin and its receptor in the sheep ovary and in vitro effect of leptin on

follicular development and oocyte maturation. *Mol Cell Endocrinol* 2019; 495:1-7. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110506>.

[19] Kamalamma P, Kona SSS, Chakravarthi VP, Kumar AVNS, PunyaKumari B & Rao VH 2016 Effect of leptin on in vitro development of ovine preantral ovarian follicles. *Theriogenology* 2016;85:224-9. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.045>.

[20] Menezes VG, Monte APO, Gouveia BB, Lins TLBG, Donfack NJ, Macedo TJS, et al. Effects of leptin on the follicular development and mitochondrial activity of ovine isolated early antral follicles cultured *in vitro*. *Theriogenology* 2019;138:77-83. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.07.005>.

[21] Panda BSK, Pandey S, Somai A, Parmar MS, Bhat IA, Baiju I, et al. Leptin supplementation in vitro improved developmental competence of buffalo oocytes and embryos. *Theriogenology* 2017;98:116-22. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.05.008>.

[22] Boelhaue M, Sinowatz F, Wolf E, Paula-Lopes FF. Maturation of bovine oocytes in the presence of leptin improves development and reduces apoptosis of in vitro-produced blastocysts. *Biol Reprod* 2005;73:737-44. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.041103>.

[23] Batista AM, Gomes WA, Carvalho CCD, Monteiro JRPLJ, Silva FLM, Almeida FC, et al. Effect of Leptin on In Vivo Goat Embryo Production. *Reprod Domest Anim* 2014;49:476-80. <https://doi.org/10.1111/rda.12314>.

[24] Rondina D, Freitas V, Spinaci M, Galeati G. Effect of Nutrition on Plasma Progesterone Levels, Metabolic Parameters and Small Follicles Development in Unstimulated Goats Reared Under Constant Photoperiod Regimen. *Reprod Domest Anim* 2005;40: 548–52. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2005.00631.x>.

[25] Chedid M, Jaber LS, Giger-Reverdin S, Duvaux-Ponter C, Hamadeh. Water stress in sheep raised under arid conditions. *Can J Anim Sci* 2014;94: 243–57. <https://doi.org/10.4141/cjas2013-188>

[26] Amorim ST, Klusk S, Berton MP, Lemos MVA, Perpolli E, Stafuzz NB, et al. Genomic study for maternal related traits in Santa Inês sheep breed. *Livestock Science* 2018;217:76–84. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2018.09.011>.

[27] NRC - National Research Council. Nutrient requirements of small ruminant: sheep, goats, cervids and new world camelids. Washington, 2007, 384 p.

- [28] Brasil. Ministério da Agricultura. Nº 12, de 11 de Maio de 2017. Regulamento técnico de métodos de insensibilização para o abate humanitário de animais de açougue, p.10 S.D.A./M.A.A. Diário Oficial da União, Brasília, 2017.
- [29] Soares MAA, Costa JJN, Vasconcelos GL, Ribeiro RP, Souza JC, Silva ALC, et al. Effects of frutalin on early follicle morphology, ultrastructure and gene expression in cultured goat ovarian cortical tissue *Histol Histopathol* 2018;33:41-53. <https://doi.org/10.14670/HH-11-882>.
- [30] Silva JRV, Van Den Hurk R., Costa SHF, Andrade ER, Nunes APA, Ferreira FVA, et al. Survival and growth of goat primordial follicles after in vitro culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. *Anim Reprod Sci* 2004;81:273–86. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2003.09.006>.
- [31] Santos JMS, Lins TLBG, Barberino RS, Menezes VG, Gouveia BB, Matos MHT. Kaempferol promotes primordial follicle activation through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B signaling pathway and reduces DNA fragmentation of sheep preantral follicles cultured in vitro. *Mol Reprod Dev* 2019;86:319-29. <https://doi.org/10.1002/mrd.23107>.
- [32] Cecconi S, Barboni B, Coccia M, Mattioli M. In vitro development of sheep preantral follicles. *Biol Reprod* 1999;60:594-601.
- [33] Luz VB, Araújo VR, Duarte AB, Celestino JJ, Silva TF, Magalhães-Padilha DM, et al. Eight-Cell Parthenotes Originated From In vitro Grown Sheep Preantral Follicles. *Reprod Sci* 2012;19:1219-25. <https://doi.org/10.1177/1933719112446072>.
- [34] Menezes VG, Santos JMS, Macedo TJS, Lins TLBG, Barberino RS, Gouveia BB, et al. Use of protocatechuic acid as the sole antioxidant in the base medium for in vitro culture of ovine isolated secondary follicles. *Reprod Domest Anim* 2017;52:890–8. <https://doi.org/10.1111/rda.12995>.
- [35] El Khashab MA, Masouda AIS, El-Ghany AA. Water supplies and Its Effect on Blood Hormones, Minerals, and Metabolite in Baladi Goats. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 2018;7:747-55. <https://doi.org/10.20546/ijemas.2018.703.087>.
- [36] Lamond RD, Gaddy GR, Kennedy WS. Influence of season and nutrition on luteal plasma progesterone in Rambouillet ewes. *J Anim Sci* 1972;34:626-9. <https://doi.org/10.2527/jas1972.344626x>.
- [37] Kiyama Z, Alexander BM, Van Kirk EA, Murdoch WJ, Hallford DM, Moss GE. Effect of feed restriction on reproductive and metabolic hormones in ewes. *J Anim Sci* 2004;82:2548-57. <https://doi.org/10.2527/2004.8292548x>.
- [38] Santos FM, Araújo GGL, Souza LL, Yamamoto SM, Queiroz MAÁ, Lanna DPD, et al. Impact

of water restriction periods on carcass traits and meat quality of feedlot lambs in the Brazilian semi-arid region. *Meat Sci* 2019;156:196–204. . <https://doi.org/110.1016/j.meatsci.2019.05.033>.

[39] Moura JHA, Araujo GGL, Saraiva EP, Albuquerque IRR, Turco SHN, Costa SAP, et al. Ingestive behavior of crossbred Santa Inês sheep fed water with different salinity levels. *Semin Cienc Agrar* 2016;37:1057-68. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2016v37n2p1057>.

[40] Guo R, Pankhurst MW. Accelerated ovarian reserve depletion in female anti-Müllerian hormone knockout mice has no effect on lifetime fertility. *Biol Reprod* 2020;102:915-22. <http://dx.doi.org/10.1093/biolre/ioz227>.

[41] Delgado-Rosas F, Gaytan M, Morales C, Gomez R, Gaytan F. Superficial ovarian cortex vascularization is inversely related to the follicle reserve in normal cycling ovaries and is increased in polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 2009;24:1142–51. <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/dep008>.

[42] Britt JH. Impact of early postpartum metabolism on follicular development and fertility. *Bov Pract* 1992;24:39–43.

[43] Nottle MB, Kleeman DO, Seamark RF. Effect of previous undernutrition on the ovulation rate of Merino ewes supplemented with lupin grain. *Anim Reprod Sci* 1997;49:29–36. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(97\)00066-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(97)00066-3).

[44] Sadeghnia S, Akhondi MM, Hossein G, Mobini S, Hosseini L, Naderi MM, et al. Development of sheep primordial follicles encapsulated in alginate or in ovarian tissue in fresh and vitrified samples. *Cryobiology* 2016;72:100–5. <https://doi.org/110.1016/j.cryobiol.2016.03.001>.

[45] Menezes VG, Barberino RS, Gouveia BB, Gonçalves RJS, Almeida JRGS, Matos MHT. Extract of *Amburana cearensis* maintains the survival of ovine preantral follicles during long-term ovarian tissue transport and promotes primordial follicle activation after in vitro culture. *Semin Cienc Agrar* 2018;39:2001-16. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2018v39n5p2001>.

[46] Karami Shabankareh H., Sarsaifi K, Mehrannia T. In vitro maturation of ovine oocytes using different maturation media: effect of human menopausal serum. *J Assist Reprod Genet* 2011;28:531–7. <http://dx.doi.org/10.1007/s10815-010-9523-3>.

[47] Ashworth CJ, Toma LM, Hunter MG. Nutritional effects on oocyte and embryo development in mammals: implications for reproductive efficiency and environmental sustainability. *Philos Trans R Soc B: Biol Sci*, 2009;364:3351–61. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2009.0184>.

- [48] ArunaKumari G, Shanmugasundaram N, Rao VH. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. *Theriogenology* 2010;74:884-94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.04.013>.
- [49] Bilbao MG, Di Yorio MP, Galarza RA, Varone CL, Faletti AG. Regulation of the ovarian oxidative status by leptin during the ovulatory process in rats. *Reproduction* 2015;149:357-66.
- [50] Wen R, Hu S, Xiao Q, Han C, Gan C, Gou H, et al. Leptin exerts proliferative and anti-apoptotic effects on goose granulosa cells through the PI3K/Akt/Mtor signaling pathway *J Steroid Biochem Mol Biol* 2015;149:70-9. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.01.001>.

## 7. CAPÍTULO II

### **Effects of leptin on the follicular development and mitochondrial activity of ovine isolated early antral follicles cultured *in vitro***

V. G. Menezes<sup>a\*</sup>, A. P. O. Monte<sup>a</sup>, B. B. Gouveia<sup>a</sup>, T. L. B. G. Lins<sup>a</sup>, N. J. Donfack<sup>a</sup>,  
T. J. S. Macedo<sup>a</sup>, R. S. Barberino<sup>a</sup>, J. M. Santos<sup>a</sup>, M. H. T. Matos<sup>a</sup>, A.M. Batista<sup>b</sup>, A. Wischral<sup>b</sup>

<sup>a\*</sup>Nucleus of Biotechnology Applied to Ovarian Follicle Development, Federal University of São Francisco Valley, Petrolina-PE, Brazil.

<sup>b</sup> Department of Veterinary Medicine, Federal Rural University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil.

Manuscrito publicado: *Theriogenology* 138 (2019) 77-83 - Qualis A1 em Biotecnologia; Fator de impacto: 2,330

## 7. CAPÍTULO II

### **Effects of leptin on the follicular development and mitochondrial activity of ovine isolated early antral follicles cultured *in vitro***

V. G. Menezes<sup>a\*</sup>, A. P. O. Monte<sup>a</sup>, B. B. Gouveia<sup>a</sup>, T. L. B. G. Lins<sup>a</sup>, N. J. Donfack<sup>a</sup>,  
T. J. S. Macedo<sup>a</sup>, R. S. Barberino<sup>a</sup>, J. M. Santos<sup>a</sup>, M. H. T. Matos<sup>a</sup>, A.M. Batista<sup>b</sup>, A. Wischral<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Nucleus of Biotechnology Applied to Ovarian Follicle Development, Federal University of São Francisco Valley, Petrolina-PE, Brazil.

<sup>b</sup> Department of Veterinary Medicine, Federal Rural University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil.

Running head: Leptin on sheep early antral follicle culture

\*Correspondence should be addressed to:

Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF)

Departamento de Medicina Veterinária - Campus de Ciências Agrárias. Laboratório de Biologia Celular, Citologia e Histologia.

Rodovia BR 407, Km 12, Lote 543 - Projeto de Irrigação Nilo Coelho - S/N, C1

CEP: 56300-990 - Petrolina - PE – Brasil. Tel.: +55.87.2101.4839

Corresponding author: vanuziagm@yahoo.com.br (V.G. Menezes)

## Abstract

This study evaluated the effect of leptin on the *in vitro* culture of isolated sheep early antral follicles. Early antral follicles (300-450  $\mu\text{m}$ ) were isolated and cultured for 12 days in tissue culture medium 199 (TCM 199) supplemented with glutamine, hypoxanthine, transferrin, insulin, selenium, ascorbic acid, bovine serum albumin (BSA) and recombinant follicle stimulating hormone (rFSH) (TCM 199<sup>+</sup>: control medium) or TCM 199<sup>+</sup> supplemented with 2 or 10 ng/mL leptin. After culture, oocytes were subjected to *in vitro* maturation (IVM). The parameters analyzed were morphology, extrusion rate, follicular diameter, growth and fully-grown oocytes (oocytes  $\geq 110$   $\mu\text{m}$ ) rates. After IVM, reactive oxygen species (ROS) levels, mitochondrial activity, meiotic stages and meiotic resumption rates were also analyzed. After 12 days of culture, the concentration of 2 ng/mL of leptin showed a higher percentage of morphologically normal follicles, fully-grown oocytes ( $\geq 110$   $\mu\text{m}$ ), active mitochondria and meiotic resumption compared to the control medium (TCM 199<sup>+</sup>;  $P < 0.05$ ) but did not differ when compared to leptin concentration of 10 ng/mL ( $P > 0.05$ ). After culturing, no significant differences existed among treatments in terms of the follicle diameter and ROS levels. In conclusion, the addition of 2 ng/mL leptin to the base culture medium is capable of improving follicular survival, oocyte growth, mitochondrial activity and meiotic resumption after the *in vitro* culture of isolated sheep early antral follicles.

**Additional keywords:** Fully-grown oocytes, *in vitro* maturation, ovary, ROS levels, sheep.



## 1. Introduction

The *in vitro* production of human and domestic animal embryos has been performed after *in vitro* maturation (IVM) and fertilization of immature oocytes derived from large antral follicles [1,2]. These oocytes appeared to acquire a greater developmental competence to become embryos in blastocyst stage [3, 4] and live births [3] than oocytes from small antral follicles. Considering that the ovary has more small than late antral follicles [5,6], *in vitro* culture (IVC) biotechnology may be used to grow small antral follicles, thus increasing the number of meiotically competent oocytes [5-8]. Metaphase II (MII) oocytes have been obtained after IVC of oocyte granulosa complexes collected from early antral follicles (bovine: [9, 10]; swine [6, 11, 12]) or after IVC of these follicles (caprine [7,8]) associated with embryo production (bovine: [10]; swine [6]). However, the efficiency of the developmental process is still low, and further improvement of the culture conditions is required [6]; for example, with the addition of hormones to the base medium such as leptin [13-15].

Leptin, a multifunctional hormone primarily expressed in the white adipose tissue [16], is considered a metabolic signal that regulates the effects of nutritional status on reproductive function [17, 18], playing a central role in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis [19, 20] and a direct action in the ovary [20]. In mammals, leptin is involved in the regulation of follicular growth, apoptosis, proliferation of granulosa cells, steroidogenesis, and oxidative status of the ovarian tissue during ovulation [21-25]. These effects occur probably through the interaction of leptin with its cellular membrane-associated receptors [26]. Studies have already demonstrated the presence of leptin and/or its receptors in the ovarian follicular compartments of different species (human:[27,28]; murine: [29]; bovine: [30]; caprine: [31]; ovine: [32,33]; swine [34,35]).

Previous studies have shown that the addition of leptin to the *in vitro* maturation (IVM) medium of cumulus-oocyte complexes (COCs) obtained from large antral follicles increases the rate of MII oocytes (bovine: [30,36]; bubaline: [15,37,38]; equine: [39]; ovine: [14]; swine [34]) and blastocysts (bovine: [30,36]; bubaline [15]), and reduces the apoptosis of cumulus cells (bovine: [30]; bubaline [15]). In addition, leptin at a concentration of 2 ng/mL acted synergistically with FSH on *in vitro* estradiol secretion in swine isolated pre-ovulatory follicles [40]. Moreover, the presence of 10 ng/mL leptin in the IVC medium of ovine isolated secondary follicles promoted follicular development and oocyte maturation [13]. It is known that ovarian follicles requirements differ between preantral and early antral stages after IVC [8, 41]. Therefore, it is still necessary to

evaluate the effects of leptin in a medium containing FSH, and on IVC of sheep isolated early antral follicles.

Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of different concentrations of leptin on the morphology and follicular development, active mitochondria, ROS levels and oocyte maturation of sheep early antral follicles, that provide an extra source of oocytes for biotechnological purposes, cultured *in vitro*.

## 2. Materials and methods

Unless stated otherwise, the supplements, hormones, and chemicals used in this study were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

### 2.1. Source of ovaries

Ovaries (n = 100) were collected at an abattoir from 50 adults (1-3 years old) mixed-breed sheep. The pairs of ovaries were washed once in 70% alcohol (Dinâmica, São Paulo, Brazil) and twice in 0.9% saline solution supplemented with 100 µg/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. Next, the ovaries were transported within 1 h to the laboratory in tubes containing 0.9% saline solution and antibiotics at 4 °C [42].

### 2.2. Isolation and selection of ovine early antral follicles

Isolation, culture and follicular evaluation were performed according to previous studies [7,8], but with some modifications. In the laboratory, the surrounding fatty tissues and ligaments were stripped from the ovaries. The ovarian cortical slices (1-2mm thick) were cut from the ovarian surface using a surgical blade under sterile conditions and subsequently placed in a fragmentation medium consisting of tissue culture medium 199 supplemented with HEPES (TCM199-HEPES) and antibiotics. Early antral follicles measuring approximately 300-450 µm in diameter were visualized under a stereomicroscope (SMZ 645 Nikon, Tokyo, Japan; 100x) and mechanically isolated by microdissection from the strips of the ovarian cortex using 26-gauge (26 G) needles. Thereafter, the follicles were transferred to 100 mL droplets (one follicle per droplet) containing base culture medium (TCM 199) for quality evaluation. Only early antral follicles that displayed the

following characteristics were selected for in vitro culture: an intact basement membrane, multiple layers of granulosa cells, a visible translucent cavity within the granulosa cell layers and healthy round oocyte without any dark cytoplasm [7, 8]. Isolated follicles were pooled and then randomly allocated to the three treatments with approximately 83 follicles per treatment (8 replicas for treatment; approximately, 10 follicles/replicate/treatment).

### *2.3. In vitro culture of early antral follicles*

After selection, the follicles were individually cultured (one follicle per droplet) in 100  $\mu$ L droplets of the culture medium under mineral oil in petri dishes (60x15 mm; Corning, Sarstedt, Newton, NC, USA) at 39 °C and 5% CO<sub>2</sub> in the air for 12 days. The base control medium (TCM-199<sup>+</sup>) consisted of TCM-199 (pH 7.2-7.4) supplemented with 3 mg/mL bovine serum albumin (BSA), 10 ng/mL insulin, 5.5  $\mu$ g/mL transferrin, 5 ng/mL selenium, 2mM glutamine, 2mM hypoxanthine, 50  $\mu$ g/mL ascorbic acid, and 100 ng/mL follicle stimulating hormone (human recombinant FSH; Gonal-F®; Serono Laboratórios, São Paulo, Brazil). To verify the effect of leptin, early antral follicles were randomly distributed into three treatments: TCM-199<sup>+</sup> alone (control medium) or TCM-199<sup>+</sup> supplemented with 2 or 10 ng/mL human recombinant leptin (L4146; Sigma). Every 2 days, 60  $\mu$ L of the culture media was replaced with fresh media in each droplet. The concentrations of FSH (swine: [40]; ovine [43]) and leptin (swine: [40]; ovine [13]) were chosen according to previous studies.

### *2.4. Morphological evaluation of follicular development*

The morphological aspects of all early antral follicles were assessed at the beginning, during and at the end of the culture (day 0, 6 and 12) using a pre-calibrated ocular micrometer in a stereomicroscope (SMZ 645 Nikon) at 100x magnification. Follicles were classified as morphologically normal follicles, atretic or extruded. Atretic follicles presented darkened oocyte and/or misshapen cytoplasm of the oocyte and surrounding granulosa cells, while extruded follicles were those that experienced a rupture of the basement membrane. The percentage of morphologically normal follicles was calculated from the total number of cultured follicles. The following characteristics were analyzed in the morphologically normal follicles: (i) visible oocyte, translucent cavity within the granulosa cell layers and an intact basement membrane; (ii) the

follicular diameter was measured from the basement membrane and included two perpendicular measures of each follicle; (iii) the total growth, calculated as the final diameter of morphologically normal follicle (day 12) subtracted from its initial diameter (day 0), and (iv) the daily growth rate, calculated as the diameter of morphologically normal follicles on day 12 subtracted from its diameter on day 0, divided by the number of culture days (12 days) [7, 8, 44].

After 12 days of culture, all morphologically normal follicles were carefully and mechanically opened with 26 G needles under a stereomicroscope (Nikon) for oocytes recovery. The percentage of fully grown oocytes was calculated by dividing the number of retrieved oocytes ( $\geq 110 \mu\text{m}$ ) by the total number of follicles at day 0 of culture ( $\times 100$ ) [7, 8].

### *2.5. In vitro maturation of ovine oocytes from in vitro cultured early antral follicles*

Only oocytes having  $\geq 110 \mu\text{m}$  diameter with a homogeneous cytoplasm and surrounded by at least one compact layer of cumulus cells were selected for IVM [43]. The COCs (TCM 199<sup>+</sup>: n = 19; 2 ng/mL leptin: n = 24; 10 ng/mL leptin: n = 21) were transferred to drops of 100  $\mu\text{L}$  maturation medium composed of TCM 199 supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 1  $\mu\text{g/mL}$  rFSH and 1  $\mu\text{g/mL}$  luteinizing hormone (LH; ovine pituitary) under oil [45], and incubated for 36-40 h under 5%  $\text{CO}_2$  [43].

### *2.6. Assessment of active mitochondria, reactive oxygen species levels and chromatin configuration after IVM*

After IVM, the oocytes were washed in phosphate buffered saline (PBS) after which mitochondrial activity and ROS intracellular levels were measured as previously described [46]. Briefly, oocytes (n = 19-24 per treatment) were incubated in the dark at 39 °C for 30 min in PBS supplemented with 100 nM MitoTracker® Red (CMXRos, Molecular Probes, Melbourne, Victoria, Australia) and 10 mM 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA; Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) to detect mitochondrial activity and ROS levels as red and green fluorescence, respectively. Thereafter, the oocytes were washed in PBS and observed under an epifluorescence microscope (Nikon) with UV filters (579 nm for active mitochondria and 460 nm

for ROS). The fluorescence intensities of the oocytes were analyzed using the Image J software (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

Thereafter, the oocytes were washed and incubated in drops of PBS containing 10 mM Hoechst 33342 for 15 min at room temperature in the dark and visualized under fluorescence microscopy (Nikon) with a UV filter (483 nm). The chromatin configuration (blue fluorescence) was analyzed by observation of the intact germinal vesicle (GV), meiotic resumption (including germinal vesicle breakdown [GVBD]), metaphase I [MI] or nuclear maturation (metaphase II [MII]).

### *2.7. Statistical analysis*

The data obtained from morphologically normal follicles, extruded follicles and fully-grown oocytes after culture were expressed as percentages and compared by the Chi-squared test. For verification of the normal distribution of residues and homogeneity of variances, data from follicular diameter, total growth rate, and daily growth rate were submitted to the D'Agostino test, and data from mitochondrial activity and ROS levels were submitted to the Shapiro-Wilk test. Thereafter, data from follicular diameter, total growth rate and mitochondrial activity were submitted to the analysis of variance (ANOVA) and when the main effects or interactions were significant, means were compared by Tukey test. Data from daily growth rate and ROS were submitted to the Kruskal-Wallis non-parametric test, and when the main effects or interactions were significant, means were compared by the Student Newman Keuls test. Data from IVM were submitted to the Fischer exact test. The results of follicular diameter, total growth rate, daily growth rate, mitochondrial activity and ROS levels were expressed as the means  $\pm$  standard error mean (SEM), and differences were considered significant when  $P < 0.05$ .

## **3. Results**

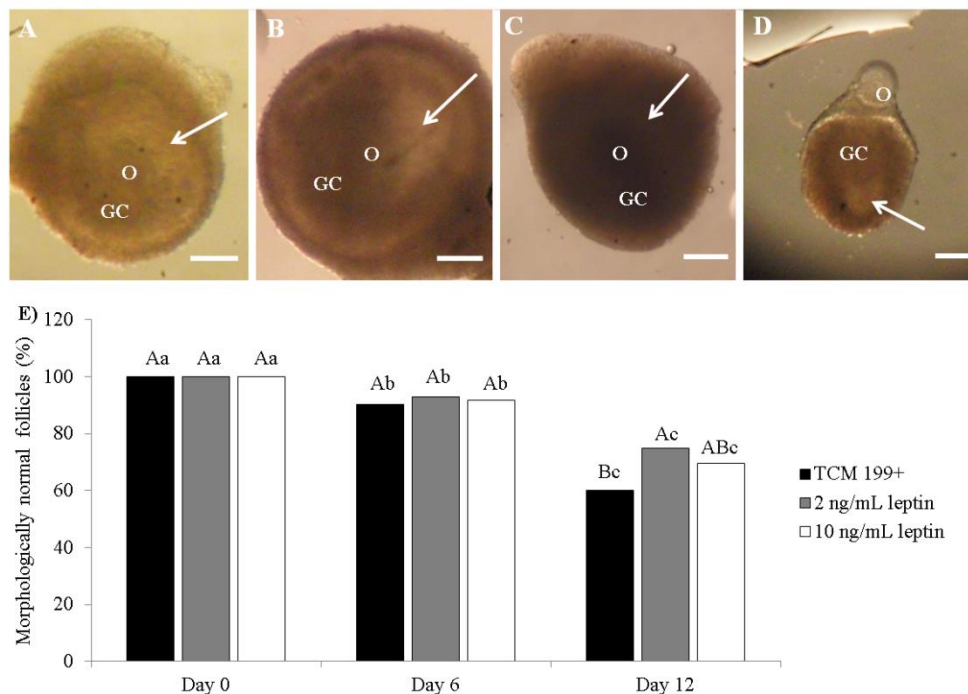
### *3.1. Follicular morphology and development after in vitro culture*

Fig. 1 shows morphologically normal antral follicles before (Fig.1A) and after (Fig.1B) day 12 of the culture with 2 ng/mL leptin, being possible to observe centrally located oocytes, normal

granulosa cells (without signs of darkening) and a visible translucent antrum cavity which were enclosed by an intact basement membrane. Moreover, atretic (Fig.1C) and extruded (Fig.1D) follicles can be observed after 6 days of culture in TCM 199<sup>+</sup> and 10 ng/mL leptin, respectively.

In all treatments, there was a significant decrease in the percentage of morphologically normal follicles throughout the culture period (Fig. 1E). After 12 days of culture, the group treated with 2 ng/mL showed a higher ( $P < 0.05$ ) percentage of morphologically normal follicles (75%) than the group cultured in TCM 199<sup>+</sup> (60.2%), but did not differ ( $P > 0.05$ ) from the 10 ng/mL leptin treatment (69.5%; Fig. 1E). There was no difference in the percentage of extruded follicles ( $P > 0.05$ ) among treatments (data not shown).

**Fig. 1.** Morphologically normal early antral follicles in the day 0 (A) and after 12 days of culture in 2 ng/mL leptin (B). Atretic (C) and extruded (D) follicles after 6 days of culture in TCM 199<sup>+</sup> and in 10 ng/mL leptin, respectively. Percentages of morphologically normal follicles in TCM 199<sup>+</sup> or in medium containing 2 or 10 ng/mL leptin (E). GC: granulosa cell; O: oocyte. Arrow: antral cavity. Scale bar: 100  $\mu$ m (100x). <sup>A,B</sup> Different letters denote significant differences among treatments in the same period of culture ( $P < 0.05$ ); <sup>a,b,c</sup> Different letters denote significant differences among culture periods in the same treatment ( $P < 0.05$ ).



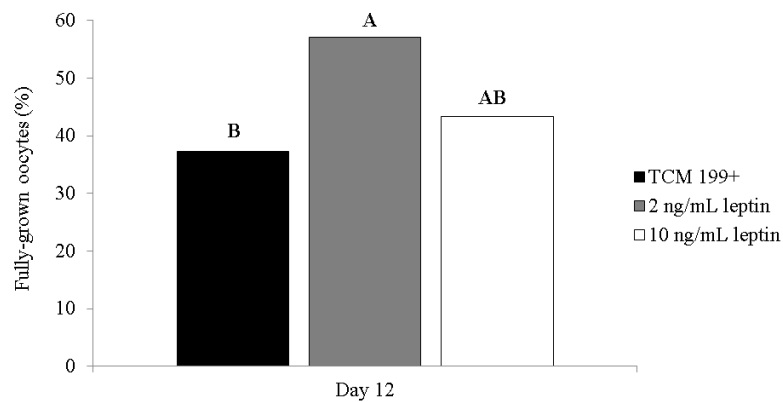
From day 0 to day 6, there was a significant increase in follicular diameter in both TCM 199<sup>+</sup> and 2 ng/mL leptin treatments (Table 1). However, at the end of the culture, no significant difference was observed among all treatments. Moreover, there was no difference in total growth rate (TCM 199<sup>+</sup>: 13.73  $\mu\text{m}$ ; 2 ng/mL leptin: 16.54  $\mu\text{m}$  and 10 ng/mL leptin: 9.3  $\mu\text{m}$ ) and daily growth rate (TCM 199<sup>+</sup>: 1.57  $\mu\text{m}$ ; 2 ng/mL leptin: 1.52  $\mu\text{m}$  and 10 ng/mL leptin: 0.6  $\mu\text{m}$ ) among treatments ( $P > 0.05$ ). After 12 days of culture, 2 ng/mL leptin treatment showed a higher ( $P < 0.05$ ) rate of fully-grown oocytes (57.14%) than TCM 199<sup>+</sup> (37.34%) and did not differ ( $P > 0.05$ ) from 10 ng/mL leptin (43.37%; Fig. 2).

**Table 1.** Follicular diameter after *in vitro* culture of ovine early antral follicles in TCM 199<sup>+</sup> or in medium containing 2 or 10 ng/mL leptin.

Treatments	Day 0 ( $\mu\text{m}$ )	Day 6 ( $\mu\text{m}$ )	Day 12 ( $\mu\text{m}$ )
TCM 199 <sup>+</sup>	375.66 <sup>b</sup>	394.26 <sup>a</sup>	411.2 <sup>a</sup>
2 ng/mL leptin	376.67 <sup>b</sup>	397.27 <sup>a</sup>	404.19 <sup>a</sup>
10 ng/mL leptin	367.3 <sup>b</sup>	374.00 <sup>ab</sup>	387.30 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> Different letters denote significant differences among culture periods in the same treatment ( $P < 0.05$ ).

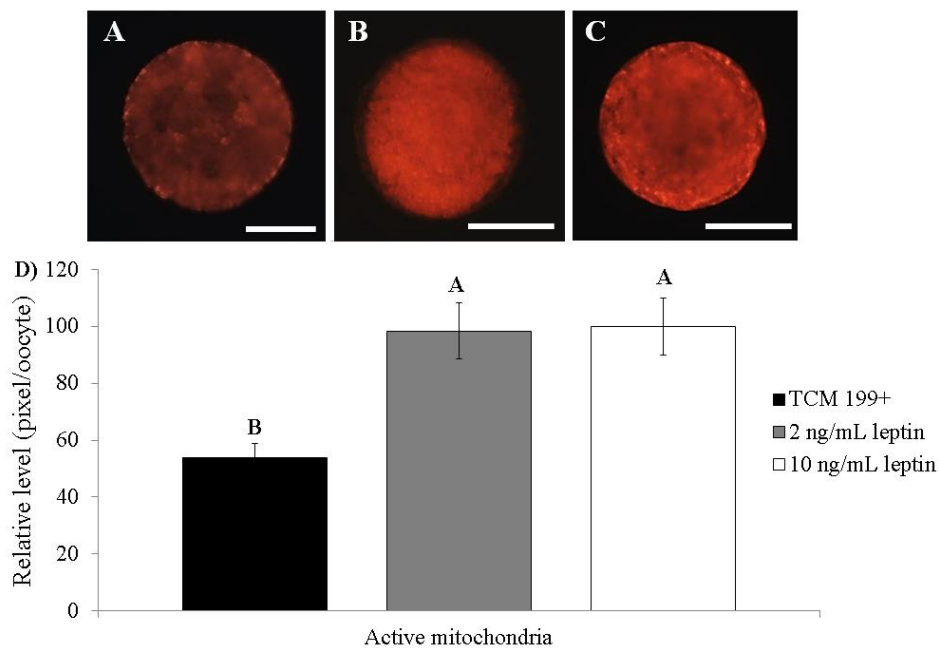
**Fig. 2.** Percentages of fully grown oocytes after *in vitro* culture of early antral follicles in TCM 199<sup>+</sup> or in medium containing 2 or 10 ng/mL leptin. <sup>A,B</sup> Different letters denote significant differences among treatments in the same period of culture ( $P < 0.05$ ).



### 3.2. Active mitochondria and ROS levels after IVM

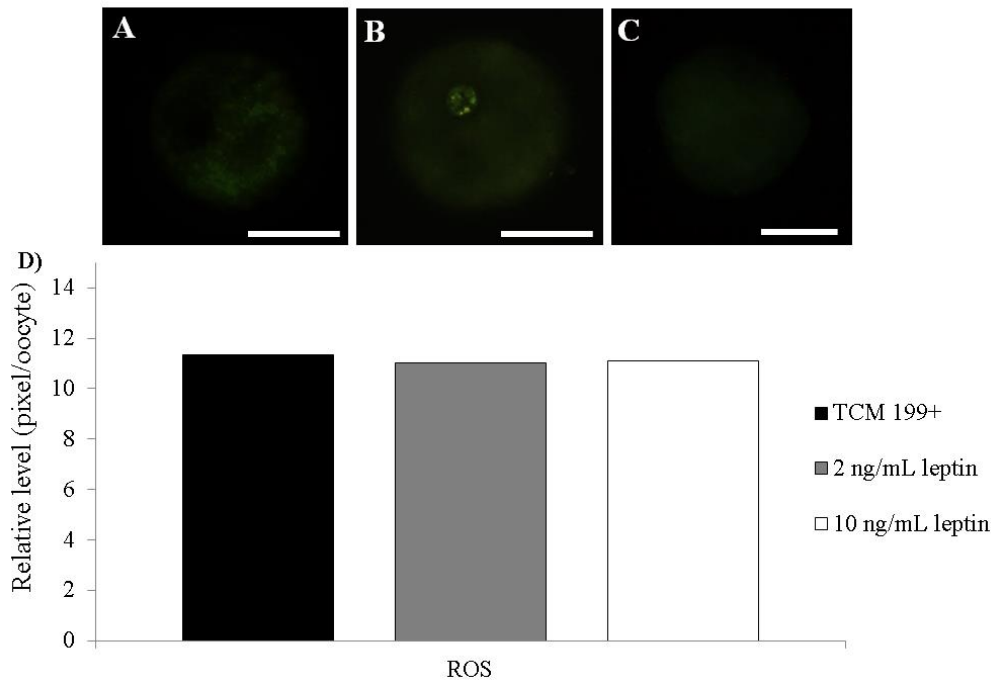
After IVM, both 2 and 10 ng/mL leptin treatments presented a similar ( $P > 0.05$ ) level of mitochondrial activity and were both significantly higher ( $P < 0.05$ ) compared to TCM 199<sup>+</sup> (Fig. 3). Moreover, the ROS levels did not differ ( $P > 0.05$ ) among treatments (Fig. 4).

**Fig. 3.** Epifluorescent photomicrographic images of sheep oocytes from *in vitro* grown isolated early antral follicles showing active mitochondria after IVM (A-C). Oocytes from follicles cultured in TCM 199<sup>+</sup> (A) or in medium containing 2 (B) or 10 ng/mL leptin (C). Scale bars: 50  $\mu$ m (100x). Intracellular levels of active mitochondria in oocytes after IVM (D). <sup>A,B</sup> Different letters denote significant differences among treatments ( $P < 0.05$ ).





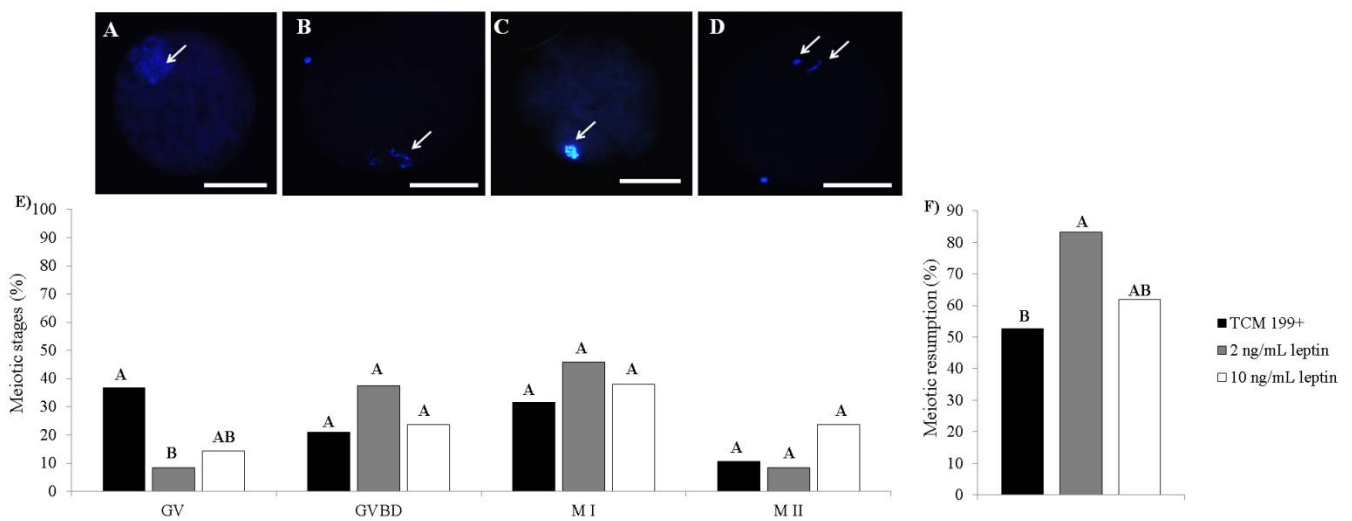
**Fig. 4.** Epifluorescent photomicrographic images of sheep oocytes from *in vitro* grown isolated early antral follicles showing ROS after IVM (A-C). Oocytes from follicles cultured in TCM 199<sup>+</sup> (A) or in medium containing 2 (B) or 10 ng/mL leptin (C). Scale bars: 50  $\mu$ m (100x). Intracellular levels of ROS in oocytes after IVM (D).



### 3.3. Chromatin configuration after IVM

The evaluation of chromatin configuration showed that oocytes were present in GV (Fig. 5A), GVBD (Fig. 5B), MI (Fig. 5C) and MII (Fig. 5D) in all treatments. Leptin at 2 ng/mL presented a lower percentage of oocytes in GV (8.33%, n = 02/24; Fig. 5E) than control (36.85%, n = 07/19;  $P < 0.05$ ) and did not differ from the 10 ng/mL leptin (14.29%, n = 03/21;  $P > 0.05$ ) treatment. Concurrently, leptin at 2 ng/mL showed a larger number of oocytes that resumed meiosis (GVBD + MI together: 83.34%, n = 20/24; Fig. 5F) compared to TCM 199<sup>+</sup> (52.63%, n = 10/19;  $P < 0.05$ ) and did not differ from the 10 ng/mL leptin treatment (61.9%, n = 13/21;  $P > 0.05$ ). Moreover, all treatments presented similar percentages of GVBD, MI and MII oocytes ( $P > 0.05$ ; Fig. 5E).

**Fig. 5.** Epifluorescent photomicrographic images of sheep oocytes from *in vitro* cultured early antral follicles stained with Hoeschst 33342 after IVM. Oocytes in GV (A) cultured in TCM 199<sup>+</sup>; oocytes in GVBD (B) and in MI (C) cultured in 2 ng/mL leptin; oocytes in MII (D) cultured in 10 ng/mL leptin. Scale bars: 50  $\mu$ m (100x). Percentage of meiotic stages (E) and meiotic resumption (F) of sheep oocytes from *in vitro* grown early antral follicles after 12 days of culture in TCM 199<sup>+</sup> or in medium containing 2 or 10 ng/mL leptin. <sup>A,B</sup> Different letters denote significant differences among treatments ( $P < 0.05$ ).



#### 4. Discussion

This study evaluated the effect of two different concentrations of leptin on the *in vitro* culture of isolated sheep early antral follicles. After 12 days of culture, the percentage of morphologically normal follicles was higher in 2 ng/mL leptin (74.5%) than TCM 199<sup>+</sup> (60.2%: control medium; Fig. 1E). Leptin administration attenuated apoptosis in rat oocytes and follicles [21] and increased the number of transferable embryos in super-ovulated goats [47]. Moreover, *in vitro* studies have shown that leptin supplementation during bovine oocyte maturation acted as a survival factor reducing the apoptosis of cumulus cells [30] and blastocyst cells during embryo development [48]. Thus, we believe that the highest follicular survival observed in 2 ng/mL leptin might be due to its antiapoptotic action. In addition, 2 ng/mL leptin is similar to the physiological

concentration found in sheep plasma (0.5e2 ng/mL) [49-51], and can be necessary to supply the metabolic demands of the *in vitro* follicles.

Additionally, leptin concentration of 2 ng/mL showed a higher percentage of oocytes  $\geq 110$   $\mu\text{m}$  (57.14%; Fig. 2) and meiotic resumption (83.34%; Fig. 5F) than the control medium (TCM 199<sup>+</sup>). Studies have shown that leptin enhanced oocyte nuclear maturation through phosphorylation of the mitogen activated protein kinase (MAPK) pathway or the regulation of oocyte gene expression (e.g.: STAT3), as well as cumulus cell-mediated gene expression (e.g.: antiapoptotic gene - BIRC4: [28]; mRNA of leptin receptor isoforms [52]). It is known that the oocytes of sheep antral follicles have leptin receptors and also produce leptin [33]. Therefore, our results suggest that leptin concentration of 2 ng/mL may be ideal and sufficient to support the *in vitro* development of the oocyte, and that higher concentrations (such as 10 ng/mL leptin) can be unnecessary and nonresponsive during culture. However, all treatments presented similar percentages of MII oocytes. Possibly, our results could be improved by adding antioxidants and other hormones, such as estradiol-17, to the IVM medium [13].

In our study, after IVM, the mitochondrial activity was higher in oocytes from follicles cultured in the presence of leptin in both concentrations (2 or 10 ng/mL; Fig. 3). It is known that during oocyte growth, the number of mitochondria increases and mitochondrial function profoundly affects oocyte maturation, fertilization and embryonic development [6, 53]. A recent study has shown that leptin can maintain mitochondrial integrity by increasing optic atrophy 1 (OPA1), a mitochondrial inner membrane protein that regulates fusion and cristae structure, and decrease OMA1, a mitochondrial protease that cleaves OPA1, of human mesenchymal stem cells [54]. Thus, our results demonstrate that the use of leptin during the *in vitro* culture of early antral follicles can provide better quality oocytes, possibly by maintaining the mitochondrial integrity of oocytes.

After IVM, the ROS levels did not differ among treatments. Contrary to our results, an *in vivo* study demonstrated that a daily stimulus with low doses of leptin decreased ROS levels in the ovarian tissue of rats [25]. The ROS are natural by-products of cellular respiration and metabolism, playing diverse roles in mammalian reproductive biology [55]. Therefore, based on our study, we have suggested that the ROS levels observed in the oocytes may be ideal for their metabolism. Some studies have shown that leptin increases the follicular diameter *in vivo* [25] and *in vitro* [13] probably through stimulation of the granulosa cell proliferation [22, 56]. Nevertheless, our results showed that leptin did not influence follicular diameter. These differences can be explained by the presence of FSH in the base culture medium, once it has been demonstrated that FSH can act

directly [57] or indirectly in the follicles [58, 59], increasing their diameter after *in vitro* culture of preantral (sheep [45]) and early antral follicles (caprine [41]).

In conclusion, the addition of 2 ng/mL leptin to the base culture medium can improve follicular survival, the percentages of fully grown oocytes, mitochondrial activity and meiotic resumption after the *in vitro* culture of isolated sheep early antral follicles. Further studies are needed to improve *in vitro* oocyte maturation rates from these follicles.

### Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interests.

### Acknowledgements

V. G. Menezes received a scholarship from the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE, Brazil). M. H. T. Matos was supported by a grant from CNPq.

### References

- [1] Chian RC, Wang L, Yang ZY. Strategies of infertility treatment with human immature oocytes. *Reprod Dev Med* 2018;2:237-48. <https://doi.org/10.4103/2096-2924.249885>.
- [2] Romaguera R, Moll X, Morato R, Roura M, Palomo MJ, Catala MG, Jimenez-Macedo AR, Hammami S, Izquierdo D, Mogas T, Paramio MT. Prepubertal goat oocytes from large follicles result in similar blastocyst production and embryo ploidy than those from adult goats. *Theriogenology* 2011;76:1-11. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.12.014>.
- [3] Moor RM, Trounson AO. Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes *in vitro* and their subsequent developmental capacity. *J Reprod Fertil* 1977;49:101-9.
- [4] Crozet N, Ahmed-Ali M, Dubos MP. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation, fertilization and culture *in vitro*. *Reproduction* 1995;103:293-8. <https://doi:10.1530/jrf.0.1030293>.
- [5] Alm H, Katska-Ksiazkiewicz L, Rynska B, Tuchscherer A. Survival and meiotic competence of bovine oocytes originating from early antral ovarian follicles. *Theriogenology* 2006;65:1422-34. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.08.014>.

- [6] Itami N, Shirasuna K, Kuwayama T, Iwata H. Resveratrol improves the quality of pig oocytes derived from early antral follicles through sirtuin 1 activation. *Theriogenology* 2015;83:1360-7. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.01.029>.
- [7] Cadenas J, Leiva-Revilla J, Vieira LA, Apolloni LB, Aguiar FLN, Alves BG, et al. Caprine ovarian follicle requirements differ between preantral and early antral stages after IVC in medium supplemented with GH and VEGF alone or in combination. *Theriogenology* 2017;87:321-32. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.008>.
- [8] Correia HHV, Vieira LA, Maside C, Paes VM, Silva RF, Alves BG, et al. Ovarian transport temperature (4 vs 33 °C) impacts differently the in vitro development of isolated goat preantral and antral follicles. *Small Rumin Res* 2017;155:16-23. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.09.001>.
- [9] Harada M, Miyano T, Matsumura K, Osaki S, Miyakel M, Kato S. Bovine oocytes from early antral follicles grow to meiotic competence in vitro: effect of fsh and hypoxanthine. *Theriogenology* 1997;48:743-55.
- [10] Nagai K, Yanagawai Y, Katagiri S, Nagano M. The relationship between antral follicle count in a bovine ovary and developmental competence of in vitro grown oocytes derived from early antral follicles. *Biomed Res* 2016;37(1):63-71. <https://doi.org/10.2220/biomedres.37.63>.
- [11] Miyano T, Moritake S, Hirata K, Miyake M, Kato S. In vitro culture of pig oocytes collected from early antral follicles. *J Mammalian Ova Res* 1998;15:161-6.
- [12] Kubo N, Cayo-Colca IS, Miyano T. Effect of estradiol-17b during in vitro growth culture on the growth, maturation, cumulus expansion and development of porcine oocytes from early antral follicles. *Anim Sci J* 2015;86:251-9. <https://doi.org/10.1111/asj.12283>.
- [13] Kamalamma P, Kona SSS, Chakravarthi VP, Kumar AVNS, Punyakumari B, Rao VH. Effect of leptin on in vitro development of ovine preantral ovarian follicles. *Theriogenology* 2016;85:224-9. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.09.045>.
- [14] Keshrawani S, ArunaKumari G, Reddy KRC. Supplementation of leptin on in vitro maturation of sheep oocytes. *Asian J Anim Vet Adv* 2016;11(10):629-36. <https://doi.org/10.3923/ajava.2016.629.636>.
- [15] Panda BSK, Pandey S, Somal A, Parmar MS, Bhat IA, Baiju I, et al. Leptin supplementation in vitro improved developmental competence of buffalo oocytes and embryos. *Theriogenology* 2017;98:116-22. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.05.008>.

- [16] Blüher B, Mantzoros CS. Leptin in reproduction. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2007;14:458-64. <https://doi.org/10.1097/MED.0b013e3282f1cfdc>.
- [17] Zieba DA, Amstalden M, Williams GL. Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism: a comparative review. *Domest Anim Endocrinol* 2005;29:166-85. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2005.02.019>.
- [18] Kumari P, Jaiswar SP, Shankhwar P, Deo S, Ahmad K, Iqbal B, et al. Leptin as a predictive marker in unexplained infertility in north Indian population. *J Clin Diagn Res* 2017;11:QC28-31. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/22444.9567>.
- [19] Bellefontaine N, Chachlaki K, Parkash J, Vanacker C, Colledge W, d'Anglemont de Tassigny X, et al. Leptin-dependent neuronal NO signaling in the preoptic hypothalamus facilitates reproduction. *J Clin Investig* 2014;124:2550-9. <https://doi.org/10.1172/JCI65928>.
- [20] Vazquez MJ, Romero-Ruiz A, Tena-Sempere M. Roles of leptin in reproduction, pregnancy and polycystic ovary syndrome: consensus knowledge and recent developments. *Metab Clin Exp* 2015;64:79-91. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2014.10.013>.
- [21] Almog B, Gold R, Tajima K, Dantes A, Salim K, Rubinstein M, et al. Leptin attenuates follicular apoptosis and accelerates the onset of puberty in immature rats. *Mol Cell Endocrinol* 2001;183:179-91.
- [22] Sirotkin A V, Mlynček M, Makarevich A V, Florkovičová I, Hetényi L. Leptin affects proliferation-, apoptosis- and protein kinase A-related peptides in human ovarian granulosa cells. *Physiol Res* 2008;57:437-42.
- [23] Gregoraszczyk EŁ, Rak-Mardyła A. Supraphysiological leptin levels shift the profile of steroidogenesis in porcine ovarian follicles toward progesterone and testosterone secretion through increased expressions of CYP11A1 and 17 $\beta$ -HSD: a tissue culture approach. *Reproduction* 2013;145:311-7.
- [24] Yorio MPD, Bilbao MG, Biagini-Majorel AM, Faletti AG. Ovarian signaling pathways regulated by leptin during the ovulatory process. *Reproduction* 2013;146:647-58. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0257>.
- [25] Bilbao MG, Di Yorio MP, Galarza RA, Varone CL, Faletti AG. Regulation of the ovarian oxidative status by leptin during the ovulatory process in rats. *Reproduction* 2015;149:357-66.
- [26] Cottrell EC, Mercer JG. Leptin receptors. *Handb Exp Pharmacol* 2012;3-21. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-24716-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-24716-3_1).

- [27] Cioffi JA, Van Blerkom J, Antczak M, Shafer A, Wittmer S, Snodgrass HR. The expression of leptin and its receptors in preovulatory human follicles. *Mol Hum Reprod* 1997;3:467-72.
- [28] Abir R, Ao A, Jin S, Barnett M, Raanani H, Ben-Haroush A, et al. Leptin and its receptors in human fetal and adult ovaries. *Fertil Steril* 2005;84:1779-82. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.05.067>.
- [29] Matsuoka T, Tahara M, Yokoi T, Masumoto N, Takeda T, Yamaguchi M, et al. Tyrosine phosphorylation of STAT3 by leptin through leptin receptor in mouse metaphase 2 stage oocyte. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;256:480-4. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0365>.
- [30] Paula-Lopes FF, Boehlauve M, Haubermann FA, Sinowatz F, Wolf E. Leptin promotes meiotic progression and developmental capacity of bovine oocytes via cumulus cell-independent and dependent mechanisms. *Biol Reprod* 2007;76:532-41. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.054551>.
- [31] Batista AM, Silva DMF, Rêgo MJBM, Silva FLM, Silva ECB, Beltrão EIC, et al. The expression and localization of leptin and its receptor in goat ovarian follicles. *Anim Reprod Sci* 2013;141:142-7. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.08.007>.
- [32] Muñoz-Gutierrez M, Findlay PA, Adam CL, Waxler G, Campbell BK, Kendall NR, et al. The ovarian expression of mRNAs for aromatase, IGF-I receptor, IGF-binding protein-2, -4 and -5, leptin and leptin receptor in cycling ewes after three days of leptin infusion. *Reproduction* 2005;130:869-81. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00557>.
- [33] Taheri SJ, Parham A. Sheep oocyte expresses leptin and functional leptin receptor mRNA. *Asia Pac J Reprod* 2016;5:395e9. <https://doi.org/10.1016/j.apjr.2016.07.002>.
- [34] Craig JA, Zhu H, Dyce PW, Petrik J, Li J. Leptin enhances oocyte nuclear and cytoplasmic maturation via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology* 2004;145(11):5355-63. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0783>.
- [35] Phoophitphong D, Srisuwatanasagul S, Tummaruk P. Leptin immunohistochemical staining in the porcine ovary. *Anat Histol Embryol* 2017;46:334-41. <https://doi.org/10.1210/en.2004-0783>.
- [36] Jia Z, Zhang J, Wu Z, Tian J. Leptin enhances maturation and development of calf oocytes in vitro. *Reprod Domest Anim* 2012;47:718-23. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01949.x>.
- [37] Khaki A, Batavani R, Najafi G, Tahmasbian H, Belbasi A, Mokarizadeh A. Effect of leptin on in vitro nuclear maturation and apoptosis of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocyte. *Int J Fertil Steril* 2014;8:43-50.

- [38] Sheykhani HRS, Batavani RA, Najafi GR. Protective effect of leptin on induced apoptosis with trichostatin A on buffalo oocytes. *Vet Res Forum* 2016;7:99-104.
- [39] Lange Consiglio A, Dell'Aquila ME, Fiandanese N, Ambruosi B, Cho YS, Bosi G, et al. Effects of leptin on in vitro maturation, fertilization and embryonic cleavage after ICSI and early developmental expression of leptin (Ob) and leptin receptor (ObR) proteins in the horse. *Reprod Biol Endocrinol* 2009;7:113.
- [40] Gregoraszczyk E Ł, Wójtowicz A K, Ptak A, Nowak K. In vitro effect of leptin on steroids secretion by FSH- and LH-treated porcine small, medium and large, preovulatory follicles. *Reprod Biol* 2003;3:227-39.
- [41] Ferreira ACA, Cadenas J, Sa NAR, Correia HHV, Guerreiro DD, Lobo CH, et al. In vitro culture of isolated preantral and antral follicles of goats using human recombinant FSH: concentration-dependent and stage-specific effect. *Anim Reprod Sci* 2018;196:120-9. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.07.004>.
- [42] Soares MAA, Costa JJN, Vasconcelos GL, Ribeiro RP, Souza JC, Silva ALC, et al. Effects of frutalin on early follicle morphology, ultrastructure and gene expression in cultured goat ovarian cortical tissue. *Histol Histopathol* 2018;33:41-53. <https://doi.org/10.14670/HH-11-882>.
- [43] Lunardi F O, Aguiar F L N, Apolloni L B, Duarte A B G, Sá N A R, Leal É S S et al. Sheep isolated secondary follicles are able to produce metaphase II oocytes after vitrification and long-term in vitro growth. *Biopreserv Biobanking* 2017;15:321-31. <https://doi.org/10.1089/bio.2016.0098>.
- [44] Gouveia BB, Macedo TJS, Santos JMS, Barberino RS, Menezes VG, Müller MC, et al. Supplemented base medium containing *Amburana cearensis* associated with FSH improves in vitro development of isolated goat preantral follicles. *Theriogenology* 2016;86:1275-84. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.04.068>.
- [45] Cecconi S, Barboni B, Coccia M, Mattioli M. In vitro development of sheep preantral follicles. *Biol Reprod* 1999;60:594-601.
- [46] Bezerra AMES, Monte APO, Barberino RS, Lins TLBG, Oliveira Junior JL, Santos JMS, et al. Conditioned medium of ovine Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells improves growth and reduces ROS generation of isolated secondary follicles after short-term in vitro culture. *Theriogenology* 2018;125:56-63. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.10.012>.



- [47] Batista AM, Gomes WA, Carvalho CCD, Monteiro Jr Jr, Silva FLM, Almeida FC, et al. Effect of leptin on in vivo goat embryo production. *Reprod Domest Anim* 2014;49:476-80. <https://doi.org/10.1111/rda.12314>.
- [48] Boelhauve M, Sinowatz F, Wolf E, Paula-Lopes FF. Maturation of bovine oocytes in the presence of leptin improves development and reduces apoptosis of in vitro-produced blastocysts. *Biol Reprod* 2005;73:737-44. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.041103>.
- [49] Delavaud C, Boucquier F, Chilliard Y, Keisler DH, Gertler A, Kann G. Plasma leptin determination in ruminants: effect of nutritional status and body fatness on plasma leptin concentration assessed by a specific RIA in sheep. *J Endocrinol* 2000;165:519-26.
- [50] Kadokawa H, Briegel JL, Blackberry MA, Blache D, Martin GB, Adams NR. Relationships between plasma concentrations of leptin and other metabolic hormones in GH-transgenic sheep infused with glucose. *Domest Anim Endocrinol* 2003;24:219-29.
- [51] Catunda AGV, Lima ICS, Bandeira GC, Gadelha CRF, Pereira ES, Salmito-Vanderley CSB, et al. Blood leptin, insulin and glucose concentrations in hair sheep raised in a tropical climate. *Small Rumin Res* 2013;114:272-9. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2013.07.008>.
- [52] Van Tol HTA, Van Eerdenburg HJCM, Colenbrander B, Roelen BAJ. Enhancement of bovine oocyte maturation by leptin is accompanied by an upregulation in mRNA expression of leptin receptor isoforms in cumulus cells. *Mol Reprod Dev* 2008;75:578-87. <https://doi.org/10.1002/mrd.20801>.
- [53] Babayev E, Seli E. Oocyte mitochondrial function and reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2015;27:175-81. <https://doi.org/10.1097/GCO.000000000000164>.
- [54] Yang F, Wu R, Jiang ZJ, Nan J, Su S, Zhang N, et al. Leptin increases mitochondrial OPA1 via GSK3-mediated OMA1 ubiquitination to enhance therapeutic effects of mesenchymal stem cell transplantation. *Cell Death Dis* 2018;9:1-17. <https://doi.org/10.1038/s41419-018-0579-9>.
- [55] Al-Gubory KH, Garrel C, Faure P, Sugino N. Roles of antioxidant enzymes in corpus luteum rescue from reactive oxygen species-induced oxidative stress. *Reprod Biomed Online* 2012;25(6):551-60. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.08.004>.
- [56] Wen R, Hu S, Xiao Q, Han C, Gan C, Gou H, et al. Leptin exerts proliferative and anti-apoptotic effects on goose granulosa cells through the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2015;149:70-9. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.01.001>.

[57] Patel H, Bhartiya D, Parte S, Gunjal P, Yedurkar S, Bhatt M. Follicle stimulating hormone modulates ovarian stem cells through alternately spliced receptor variant FSH-R3. *J Ovarian Res* 2013;6:1-15. <https://doi.org/10.1186/1757-2215-6-52>.

[58] Silva JRV, Van den Hurk R, Matos MHT, Santos RR, Pessoa C, Moraes MO, et al. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during in vitro culture of caprine ovarian cortical tissue. *Theriogenology* 2004;61:691-704. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2003.09.014>.

[59] Van den Hurk R, Zhao J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 2005;63:1717-51. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.08.005>.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A redução da oferta hídrica não afetou o peso do útero e dos ovários, os níveis séricos de estradiol e progesterona, a ativação de folículos primordiais, e os estágios meióticos após a MIV de oócitos de folículos antrais crescidos *in vivo*, entretanto a oferta hídrica de 80 a 40%, especialmente, a de 40% reduziu a sobrevivência *in situ* de folículos pré-antrais, principalmente de folículos primordiais. Através de equações de regressão linear conseguimos estimar a porcentagem de sobrevivência dos folículos pré-antrais ovinos em função da porcentagem de folículos primordiais normais no córtex ovariano fresco. A concentração de 25 ng/mL de leptina estimulou o crescimento *in vitro* de folículos secundários isolados de ovelhas mestiças da raça Santa Inês submetidas a 60% de oferta de água. Nesse sentido, recomenda-se que criadores de regiões áridas e semiáridas utilizando as mesmas condições de confinamento do presente estudo, não submetam matrizes ou fontes de matrizes de ovelhas mestiças da raça Santa Inês a qualquer redução da oferta hídrica para que não ocorra possível falha ovariana prematura e, conseqüentemente, menor número de descendentes no rebanho. Porém, caso seja necessário frente à escassez hídrica, submetê-las a 80% de oferta hídrica para evitar maiores perdas de folículos primordiais. Já fêmeas de descarte podem ser submetidas à oferta hídrica de 40% porque permanecem pouco tempo no rebanho e vimos que os oócitos de folículos antrais crescidos *in vivo* não são afetados pelo tempo e manejo do presente estudo.

Além disso, a adição de 2 ng/mL de leptina ao meio de cultivo de base pode ser uma alternativa para promover o desenvolvimento de folículos antrais iniciais isolados de ovinos após o cultivo *in vitro*, ao melhorar a sobrevivência folicular, o crescimento oocitário, a atividade mitocondrial e a retomada meiótica.

Têm-se como perspectivas de estudo, avaliar a sobrevivência de folículos antrais presentes no tecido ovariano, detectar a apoptose celular através da imunolocalização da caspase 3 ativada e mensurar a intensidade da imunomarcagem da leptina e seu receptor em folículos pré-antrais e antrais inclusos em tecido ovariano de animais submetidos a diferentes níveis de oferta de água. Além disso, determinar os níveis séricos de leptina, insulina e cortisol desses animais.

## 9. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DE LITERATURA

- ABIOJA, M.O.; OSINOWO, O.A.; ABIONA, J.A.; SODIPE, O.G. Water balance and some blood parameters in water-restricted goats during hot-dry season. *Slovak Journal of Animal Science*, v. 47, n. 3, p. 149-156, 2014.
- ABIOJA, M.O.; OSINOWO, O.A.; ADEBAMBO, O.A.; BELLO, N.J.; ABIONA, J.A. Water restriction in goats during hot-dry season in the humid tropics: feed intake and weight gain. *Archivos de Zootecnia*, v. 59, n. 226, p. 195-203, 2010.
- AB'SABER, A.N. Sertões e sertanejos: uma geografia humana sofrida. *Estudos Avançados*, v. 13, n. 36, p. 7-59, 1999.
- ADONA, P.R.; MONZANI, P.S.; MIRANDA, M.S.; OHASHI, O.T. Ovogênese e Foliculogênese em Mamíferos. *Journal of Health Sciences*, v. 15, n. 3, p. 245-250, 2013.
- AERTS, J.M.; BOLS, P.E. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 45, n. 1, p.171-179, 2010.
- ALBUQUERQUE, T.; ARAÚJO, G.; SANTOS, F.; CARVALHO, G.; SANTOS, E.; NOBRE, I.; BEZERRA, L.; SILVA-JÚNIOR, J.; SILVA-FILHO, E; OLIVEIRA, R. Performance, Body Water Balance, Ingestive Behavior and Blood Metabolites in Goats Fed with Cactus Pear (*Opuntia ficus-indica* L. Miller) Silage Subjected to An Intermittent Water Supply. *Sustainability*, v. 12, p. 1-15, 2020a.
- ALBUQUERQUE, I.R.R.; ARAUJO, G.G.L.; VOLTOLINI, T.V.; MOURA, J.H.A.; COSTA, R.G.; GOIS, G.C.; COSTA, S.A.P.; CAMPOS, F.S.; QUEIROZ, M.A.A.; SANTOS, N.M.S.S. Saline water intake effects performance, digestibility, nitrogen and water balance of feedlot lambs. *Animal Production Science*, v. 60, 1-7, 2020b.
- ALM, H.; KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L.; RYNSKA, B.; TUCHSCHERER A. Survival and meiotic competence of bovine oocytes originating from early antral ovarian follicles. *Theriogenology*, v. 65, p. 422-434, 2006.

- ALVES, J.M.; ARAÚJO, G.G.L.; PORTO, E.R.; CASTRO, J.M. da C.; SOUZA, L.C. de. Feno de erva-sal (*Atriplex nummularia Lindl.*) e palma-forrageira (*Opuntia ficus Mill.*) em dietas para caprinos e ovinos. *Revista Científica de Produção Animal, Fortaleza*, v. 9, n. 1, p. 43-52, 2007.
- ARAÚJO, G.G.L. Os impactos das mudanças climáticas sobre os recursos hídricos e a produção animal em regiões Semiáridas. *Revista Brasileira de Geografia Física*, v. 8, n. especial, p. 598-609, 2015.
- ARAÚJO, G.G.L.; VOLTOLINI, T.V.; TURCO, S.H.N.; PEREIRA, L.G.R. A água nos sistema de produção de caprinos e ovinos, cap. 3, p. 69-94. In: VOLTOLINI, T. V. (Ed.). *Produção de caprinos e ovinos no Semiárido*. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2011.
- ARAÚJO, G.G.L.; VOLTOLINI, T.V.; CHIZZOTTI, M.L.; TURCO, S.H.N.; CARVALHO, F.F.R. Water and small ruminant production. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.39, supl. especial, p. 326-336, 2010.
- ARAÚJO, V. R.; GASTAL, M.O.; FIGUEIREDO, J.R.; GASTAL, E. L. *In vitro* culture of bovine preantral follicles: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 12, p. 1-14, 2014.
- ARIA-ALVAREZ, M.; BERMEJO-ALVAREZ, P.; GUTIERREZ-ADAN, A.; RIZOS, D.; LORENZO, P.L.; LONERGAN, P. Effect of leptin supplementation during *In vitro* oocyte maturation and embryo culture on bovine embryo development and gene expression patterns. *Theriogenology*, v. 75, p. 887–896, 2011.
- ARUNAKUMARI, G.; SHANMUGASUNDARAM, N.; RAO, V.H. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. *Theriogenology*, v. 74, p. 884-94, 2010.
- BARBERINO, R.S.; BARROS, V.R.P.; MENEZES, V.G.; SANTOS, L.P.; ARAÚJO, V.R.; QUEIROZ, M.A.A.; ALMEIDA, J.R.G.S.; PALHETA-JUNIOR, R.C.; MATOS, M.H.T. *Amburana cearensis* leaf extract maintains survival and promotes *In vitro* development of ovine secondary follicles. *Zygote*, v. 24, p. 277-285, 2016.
- BARROS, V.R.P.; MONTE, A.P.O.; SANTOS, J.M.S.; LINS, T.L.B.; CAVALCANTE, A.Y.P.; GOUVEIA, B.B.; MÜLLER, M.C.; OLIVEIRA JUNIOR, J.L.; BARBERINO, R.S.; DONFACK, N.J.; ARAÚJO, V.R.; MATOS, M.H.T. Effects of melatonin on the *In vitro* growth of early antral follicles and maturation of ovine oocytes. *Domestic Animal Endocrinology*, 2019b.

- BARROS, V.R.P.; MONTE, A.P.O.; LINS, T.L.B.G.; SANTOS, J.M.; MENEZES, V.G.; CAVALCANTE, A.Y.P.; ARAÚJO, V.R.; GOUVEIA, B.B.; MATOS, M.H.T. In vitro survival, growth, and maturation of sheep oocytes from secondary follicles cultured in serum-free conditions: impact of a constant or a sequential medium containing recombinant human FSH. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 67, p. 71-79, 2019a.
- BATISTA, A M; GOMES, W.A.; CARVALHO, C.C.D.; MONTEIRO, J.R.P.LJ.; SILVA, F.L.M.; ALMEIDA, F.C.; SOARES, P.C.; CARNEIRO, G.F.; GUERRA, M.M. Effect of Leptin on In Vivo Goat Embryo Production. *Reproduction in Domestic Animal*, v. 49, p. 476-480, 2014.
- BATISTA, A.M.; SILVA, D.M.F.; RÊGO, M.J.B.M.; SILVA, F.L.M.; SILVA, E.C.B.; BELTRÃO, E.I.C.; GOMES FILHO, M.A.; WISCHRAL, A.; GUERRA, M.M. The expression and localization of leptin and its receptor in goat ovarian follicles. *Animal Reproduction in Science*, v. 141, N. 3-4, P. 142-147, 2013.
- BEEDE, D.K. What will our ruminants drink? *Animal Frontiers*, v. 2, n. 2, p. 36-43, 2012.
- BELLEFONTAINE, N.; CHACHLAKI, K.; PARKASH, J.; VANACKER, C.; COLLEDGE, W.; D'ANGLEMONT DE TASSIGNY X, GARTHWAITE, J.; BOURET, S.G.; PREVOT, V. Leptin-dependent neuronal NO signaling in the preoptic hypothalamus facilitates reproduction. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 124, n. 6, 2550-2559, 2014.
- BEZERRA, M.É.S.; BARBERINO, R.S.; MENEZES, V.G.; GOUVEIA, B.B.; MACEDO, T.J.S.; SANTOS, J.M.S.; MONTE, A.P.O.; BARROS, V.R.P.; MATOS, M.H.T. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) promotes primordial follicle growth and reduces DNA fragmentation through the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) signalling pathway. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 30, n. 11, p. 1503-1511, 2018.
- BEZERRA, M.É.S.; MONTE, A.P.O.; BARBERINO, R.S.; LINS, T.L.B.G.; OLIVEIRA JUNIOR, J.L.; SANTOS, J.M.S.; BEZERRA, D.O.; NEVES, C.A.; SILVA, G.C.; CARVALHO, M.A.M.; MATOS, M.H.T. Conditioned medium of ovine Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells improves growth and reduces ROS generation of isolated secondary follicles after short-term *In vitro* culture. *Theriogenology*, v. 125, p. 56-63, 2019.

- BLACHE, D.; TELLAM, R.L.; CHAGAS, L.M.; BLACKBERRY, M.A.; VERCOE, P.E.; MARTIN, G.B. Level of nutrition affects leptin concentrations in plasma and cerebrospinal fluid in sheep. *Journal of Endocrinology*, v.16, p. 625-637, 2000.
- BLANC, F.; BOCQUIER, F.; DEBUS, N.; AGABRIEL, J.; D'HOOR, P.; CHILLIARD, Y. La pérennité et la durabilité des élevages de ruminants dépendent des capacités adaptatives des femelles. *INRA Productions Animales*, v. 17, p. 287-302, 2004.
- BOELHAUVE, M.; SINOWATZ, F.; WOLF, E.; PAULA-LOPES, F.F. Maturation of bovine oocytes in the presence of leptin improves development and reduces apoptosis of *In vitro*-produced blastocysts. *Biology of Reproduction*, v. 73, p. 737-744, 2005.
- CADENAS, J.; MASIDE, C.; FERREIRA, A.C.A.; VIEIRA, L.A.; LEIVA-REVILLA, J.; PAES, VM.; ALVES, B.G.; BRANDÃO, F.Z.; RODRIGUES, A.P.R.; WHEELER, M.B.; FIGUEIREDO, J.R. Relationship between follicular dynamics and oocyte maturation during *In vitro* culture as a non-invasive sign of caprine oocyte meiotic competence. *Theriogenology*. v., 107, p. 95-103. 2018.
- CADENAS, J.; LEIVA-REVILLA, J.; VIEIRA, L.A.; APOLLONI, L.B.; AGUIAR, F.L.N.; ALVES, B.G., LOBO, C.H.; RODRIGUES, A.P.R.; APGAR, G.A.; SMITZ, J.; FIGUEIREDO, J.R.; MASIDE, C. 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*, v. 87, p. 321-332, 2017.
- CASAMASSIMA, D.; VIZZARRI F.; NARDOIA, M.; PALAZZO, M.. The effect of water-restriction on various physiological variables in intensively reared Lacaune ewes. *Veterinárni Medicina*, v. 61, n. 11, p. 623-634, 2016.
- CASAMASSIMA, D.; PIZZO, R.; PALAZZO, M.; D'ALESSANDRO, A. G.; MARTEMUCCI, G. Effect of water restriction on productive performance and blood parameters in comisana sheep reared under intensive condition. *Small Ruminant Research*, v. 78, n.1-3, p. 169-175, 2008.
- CASTANEDA, C.A.; KAYE, P.; PANTALEON, M.; PHILLIPS, N.; FRY, R.; D'OCCHIO, M.J. Circulating concentrations of leptin, ovarian follicle number, and oocyte lipid content and

active mitochondria, in Zebu crossbred cows maintained on standard or improved nutrition. *Animal Reproduction Science*, v.140, p.7-13, 2013.

CATUNDA, A.G.V.; LIMA, I.C.S.; BANDEIRA, G. C.; GADELHA, C.R.F.; PEREIRA, E.S.; SALMITO-VANDERLEY, C.S.B.; ARAÚJO, A.A.; MARTINS, G.A.; CAMPOS, A.C.N. Blood leptin, insulin and glucose concentrations in hair sheep raised in a tropical climate. *Small Ruminant Research*, v. 114, p. 272- 279, 2013.

CAVALCANTE, A.Y.P.; LINS, T.L.B.G.; SANTOS, J.M.S.; BARROS, V.R.P.; MONTE, A.P.O.; BARBERINO, R.S.; ALMEIDA, J.R.G.; MATOS, M.H.T. Supplemented *Morus nigra* extract-based medium associated with FSH enables the survival and growth of isolated ovine secondary ovarian follicles. *Reproduction in Domestic Animal*, v. 53, n. 2, p. 423-432, 2018.

CAVALCANTE, A.Y.P.; GOUVEIA, B.B.; BARBERINO, R.S.; LINS, T.L.B.G.; SANTOS, L.P.; GONÇALVES, R.J.S.; CELESTINO, J.J.H.; MATOS, M.H.T. Kit ligand promotes the transition from primordial to primary follicles after *In vitro* culture of ovine ovarian tissue. *Zygote*, v. 24, p. 578–582, 2016.

CHAUDHARY, G. R.; YADAV, P. K.; YADAV, A. K.; TIWARI, M.; GUPTA, A.; SHARMA, A.; SAHU, K.; PANDEY, A.N.; PANDEI, A.; CHAUBE, S. K. Necrosis and necroptosis in germ cell depletion from mammalian ovary. *Journal of Cellular Physiology*, 2018. doi:10.1002/jcp.27562.

CHEDID, M. Physiological responses of feed and water restricted dry Awassi ewes to aspirin administration. Master thesis, American University of Beirut, Riad El-Solh/Beirut 11072020 Lebanon, p 1–64, 2009.

CHEDID, M.; JABER, L.S.; GIGER-REVERDIN, S.; DUVAUX-PONTER, C.; HAMADEH, S.K. Review: Water stress in sheep raised under arid conditions. *Canadian Journal of Animal Science*, v. 94, p. 243-257, 2014.

CHIARATTI, M.R., GARCIA, B.M.; CARVALHO, K.F.; MACABELLI, C. H.; RIBEIRO, F. K. S.; ZANGIROLAMO, A. F.; SARAPIÃO, F. D.; SENEDA, M.M.; MEIRELLES, F. V.; GUIMARÃES, F.E.G.; MACHADO, T.S. Oocyte mitochondria: role on fertility and disease transmission. Proceedings of the 32nd Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE); Florianópolis, SC, Brazil, 2018.



- CSIRO - COMMONWEALTH SCIENTIFIC AND INDUSTRIAL RESEARCH ORGANISATION. Nutrient requirements of domesticated ruminants. Collingwood: CSIRO Publishing, 2007. 270 p.
- CORDOVA-TORRES A V; COSTA R G; MEDEIROS A N; ARAÚJO FILHO J T; RAMOS, A O; ALVES, N L. Performance of sheep fed forage cactus with total water restriction. *Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal*, v.18, n.2, p.369-377, 2017.
- CORREIA, H.H.V.; VIEIRA, L.A.; MASIDE, C.; PAES, V.M.; SILVA, R.F.; ALVES, B.G.; SANTOS, F.W.; APGAR, G.A.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Ovarian transport temperature (4 vs 33 °C) impacts differently the *In vitro* development of isolated goat preantral and antral follicles. *Small Ruminant Research*, v. 155, p. 16–23, 2017.
- COTICCHIO, G.; DAL CANTO, M.; RENZINI, M.M.; GUGLIELMO, M.C.; BRAMBILLASCA, F.; TURCHI, D.; NOVARA, P.; FADINI, R. Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization. *Human Reproduction Update*, v. 21, p. 427-454, 2015.
- DELAVAUD, C.; BOUCQUIER, F.; CHILLIARD, Y.; KEISLER, D.H.; GERTLER, A.; KANN, G. Plasma leptin determination in ruminants: effect of nutritional status and body fatness on plasma leptin concentration assessed by a specific RIA in sheep. *Journal of Endocrinology*, v. 165, 519–526, 2000.
- DRIANCOURT, M. A.; WEBB, R.; FRY, R. C. Does follicular dominance occur in ewe? *Journal of Reproduction and Fertility*, v.93, p.63-70, 1991.
- DUPUIS, L.; SCHUERMANN, Y.; COHEN, T.; SIDDAPPA, D.; KALAISELVANRAJA, A.; PANSERA, M.; BORDIGNON, V.; DUGGAVATHI, R. Role of leptin receptors in granulosa cells during ovulation. *Reproduction*, v. 147, p. 221–229, 2014..
- ESCOBAR, S.M.L.; ECHEVERRÍA, M.O.M.; VÁZQUEZ-NIN, G.H. Immunohistochemical and ultrastructural visualization of different routes of oocyte elimination in adult rats. *European Journal of Histochemistry*, v. 56, n. 2, p. 102-107, 2012.
- FERREIRA, A.C.A; CADENAS, J.; SÁ, N.A.R.; CORREIA, H.H.V.; GUERREIRO, D.D.; LOBO, C.H.; ALVES, B.G.; MASIDE, C.; GASTAL, E.L.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO,

- J.R. *In vitro* culture of isolated preantral and antral follicles of goats using human recombinant FSH: Concentration-dependent and stage-specific effect. *Animal Reproduction Science*, v. 191, p. 1201-129, 2018.
- FERREIRA, E.M.; ADONA, P.R. et al. Maturação citoplasmática de oócitos bovinos: aquisição de competência para o desenvolvimento. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.32, n.3, p.172-181, 2008.
- FIGUEIREDO, J.R.; CADENAS, J.; LIMA, L.F.; SANTOS, R.R. Advances in *In vitro* folliculogenesis in domestic ruminants. *Animal Reproduction*, v.16, n.1, p.52-65, 2019.
- FIGUEIREDO, J.R.; LIMA, L.F.; SILVA, J.R.V.; SANTOS, R.R. Control of growth and development of preantral follicle: insights from *In vitro* culture José Ricardo de *Animal Reproduction*, v.15, (Suppl.1), p.648-659, 2018.
- FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P; SILVA, J.R.; SANTOS, R.R. Cryopreservation and *In vitro* culture of caprine preantral follicles. *Reproduction, Fertility and Development*, v.23, n. 1, p.40-7, 2011.
- FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; SILVA, J.R.V. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. In: Gonçalves, P.B.D.; Figueiredo, J.R.; Freitas, V.J.F. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. 2ª ed. São Paulo, SP: Roca, 2008. p.303-327.
- FINK, S.L.; COOKSON, B.T. Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells. *Infection and Immunity*, v. 73, n. 4, p. 1907–1916, 2005.
- FRANCISCO, V.; PINO, J.; CAMPOS-CABALEIRO, V.; RUIZ-FERNÁNDEZ, C.; MERA, A.; GONZALEZ-GAY, M.A.; GÓMEZ R.; GUALILLO, O. Obesity, Fat Mass and Immune System: Role for Leptin. *Frontiers Physiology*, v. 9, p. 1-20, 2018.
- FRÜHBECK, G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *The Biochemical Journal*, v. 393, p. 7–20, 2006.
- GHASSEMI NEJAD, J.; LOHAKARE, J. D.; SON, J. K.; KWON, E. G.; WEST, J. W.; SUNG, K.I. Wool cortisol is a better indicator of stress than blood cortisol in ewes exposed to heat stress and water restriction. *Animal*, v. 8, n. 1, p. 128–132, 2014.

- GHOBRAL, I.M.; WITZIG, T.E.; ADJEI, A.A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 55, n. 3, p.178-94, 2005.
- GORSKA, E.; POPKO, K.; STELMASZCZYK-EMMEL, A.; CIEPIELA, O.; KUCHARSKA, A.; WASIK, M. Leptin receptors. *European Journal of Medical Research.*, v.15, Suppl 2, p. 50-54, 2010.
- GREGORASZCZUK, E.Ł.; WÓJTOWICZ, A.K.; PTAK, A.; NOWAK, K. *In vitro* effect of leptin on steroids secretion by FSH- and LH-treated porcine small, medium and large, preovulatory follicles. *Reproductive Biology*, v. 3, p. 227-239, 2003.
- GRIVE, K.J.; FREIMAN, R.N. The developmental origins of the mammalian ovarian reserve. *Development*, v. 142, n. 15, p. 2554–2563, 2015.
- HENNET, M.L.; COMBELLES, C.M. The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. *The International Journal of Development Biology*, v. 56, p. 819-31, 2012.
- HOA, N.; MYERS, M.P.; DOUGLASS, T.G.; ZHANG, J. G.; DELGADO, C.; DRIGGERS, L.; CALLAHAN L.L.; VANDEUSEN, G.; PHAM J.T.; BHAKTAN, N.; GE, L.; JADUS, M.R. Molecular Mechanisms of Paraptosis Induction: Implications for a Non-Genetically Modified Tumor Vaccine. *Plos One*, v. 4, n. 2, p. 1-19, 2009.
- HOUSEKNECHT, K.L.; PORTOCARRERO, C.P. Leptin and its receptors: regulators of whole body energy homeostasis. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 15, p. 457–475, 1998.
- IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Pesquisa Pecuária Municipal (PPM) 2017. Tabela 3939: efetivo dos rebanhos,por tipo de rebanho, 2008 a 2017. [Rio de Janeiro, 2017e]. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939>>. Acesso em: 08 de set. 2019.
- ITAMI, N.; SHIRASUNA, K.; KUWAYAMA, T.; IWATA, H. Resveratrol improves the quality of pig oocytes derived from early antral follicles through sirtuin 1 activation. *Theriogenology*, v. 83, p. 1360-1367, 2015.
- JABER, L.S.; CHEDID, M.; HAMADEH, S. Water stress in small ruminants. In: Responses of organisms to water stress. Ed. By Ş. Akinci, S, p. 115-149, 2013.

- JABER, L.S., HANNA, N., BARBOUR, E.K., ABI SAID, M., RAWDA, N., CHEDID, M.; HAMADEH, S.K. Fat mobilization in water restricted Awassi ewes supplemented with vitamin C. *Journal of Arid Enviroments*, v. 75, p. 625-628, 2011.
- JABER, L. S.; HABRE, A.; RAWDA, N.; BARBOUR, E.K.; HAMADEH, S. The effect of water restriction on certain physiological parameters in Awassi sheep. *Small Ruminant Research*, v. 54, p. 115–120, 2004.
- JIA, Z.; ZHANG, J.; WU, Z.; TIAN, J. Leptin enhances maturation and development of calf oocytes *In vitro*. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 47, p. 718-723, 2012.
- JHAYES21. Cell Pathways possibilities. File: Paraptosis.svg, v. 14; p. 55:25, 2014. Disponível em:<<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?title=Special:ElectronPdf&page=File%3AParaptosis.svg&action=show-download-screen>>. Acesso em: 28 set 2019.
- JUENGEL, J.L.; SAWYER, H.R.; SMITH, P.R.; QUIRKE, L.D.; HEATH, D.A.; LUN, S.; WAKEFIELD, S.J.; MCNATTY, K.P. Origins of follicular cells and ontogeny of steroidogenesis in ovine fetal ovaries. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 31, p. 1-10, 2002.
- KADOKAWA, H.; BRIEGEL, J. R.; BLACKBERRY, M.A.; BLACHE, D.; MARTIN, G.B.; ADAMS, N. R. Relationships between plasma concentrations of leptin and other metabolic hormones in GH-transgenic sheep infused with glucose. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 24, n. 3, 219–229, 2003.
- KAMALAMMA, P.; KONA, S.S.S.; CHAKRAVARTHI, V. P.; KUMAR, A.V.N.S.; PUNYAKUMARI, B.; RAO, V.H. Effect of leptin on *In vitro* development of ovine preantral ovarian follicles. *Theriogenology*, v. 85, p. 224–229, 2016.
- KARMAZYN, M.; GAN, X.T.; RAJAPUROHITAM, V. The potential contribution of circulating and locally produced leptin to cardiac hypertrophy and failure. *Canadian of Journal Physiology and Pharmacology*, v. 91, p. 883-888, 2013.
- KENDALL, N.R.; GUITIERREZ, C.G.; SCARAMUZZI, R.J.; BAIRD, D.T.; WEBB, R.; CAMPBELL, B.K. Direct in vivo effects of leptin on ovarian steroidogenesis in sheep. *Reproduction*, v.128, p. 757–765, 2004.

- KESHRAWANI, S.; ARUNAKUMARI, G.; REDDY, K.R.C. Supplementation of Leptin on *In vitro* Maturation of Sheep Oocytes. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, v. 11, n. 10, p. 629-636, 2016. .
- KHAKI, A.; BATAVANI, R.; NAJAFI, G.; TAHMASBIAN, H.; BELBASI, A.; MOKARIZADEH, A. Effect of leptin on *In vitro* nuclear maturation and apoptosis of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocyte. *International Journal of Fertility and Sterility*. v. 8, n. 1, p. 43-50, 2014.
- KHNISSI, S.; LASSOUED, N.; REKIK, M.; SALEM, H. B. Effect of Pre-Mating Water Deprivation on Ovarian Activity and on Reproductive Traits of Mature Barbarine Ewes during Summer Season. *International Journal of Environmental Science and Development*, v. 5, n. 3, p. 332-335, 2014.
- KUMAR, D.; DE KALYAN, SINGH, A.K.; KUMAR, K.; SAHOO, A.; NAQVI, S.M.K. Effect of water restriction on physiological responses and certain reproductive traits of Malpura ewes in a semiarid tropical environment. *Journal of Veterinary Behavior*, v. 12, p. 54-59, 2016.
- LEDDA, S. Characterization, isolation and culture of primordial germ cells in domestic animals: recent progress and insights from the ovine species. *Theriogenology*, v. 74, p. 534–543, 2010.
- LEE, D.; KIM, I. Y.; SAHA, S.; CHOI, K.S. Paraptosis in the anti-cancer arsenal of natural products. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 162, p. 120–133, 2016.
- LIMA, I.M.T. Desenvolvimento *In vitro* de folículos pré-antrais caprinos na presença de kit ligand (KL) e proteína morfogenética óssea 15 (BMP-15) 2012. 235 f. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Curso de Doutorado em Ciências Veterinárias, Fortaleza, 2012.
- LIMA, L.F.; ROCHA, R.M.P.; DUARTE, A.B.G.; BRITO, I.R.; SILVA, G.M.; RODRIGUES, G.Q., NUNES-PINHEIRO, D.C.; SALES, A.D.; MOURA, A.A.; WHEELER, M.B.; RODRIGUES, AP, CAMPELLO, C.C; FIGUEIREDO, J. R. Unexpected effect of the vehicle (grain ethanol) of homeopathic FSH on the *In vitro* survival and development of isolated ovine preantral follicles. *Microscopy Research and Technique*, v. 80, n. 4, p. 406-418, 2017.

- LINS, T.L.B.G.; MENEZES, V.G.; BARBERINO, R.S.; COSTA, S.A.P.; SANTOS, N.M.S.S.; NASCIMENTO, T.V.C.; QUEIROZ, M.A.A ; CORDEIRO, M.F.; RIBEIRO, L B.; ARAUJO, G.G.L.; MATOS, M.H.T. Sperm quality, and morphology and apoptosis of germinal epithelium cells of ram lambs receiving water of different salinities. *Animal Production Science*, v. online, p. 1-7, 2017a.
- LINS, T.L.B.G.; CAVALCANTE, A.Y.P.; SANTOS, J.M.S.; MENEZES, V.G.; BARROS, V.R.P.; BARBERINO, R.S.; BEZERRA, M.É.S.; MACEDO, T.J.S.; MATOS, M.H.T. Rutin can replace the use of three other antioxidants in the culture medium, maintaining the viability of sheep isolated secondary follicles. *Theriogenology*, v. 89, p. 263-270, 2017b.
- LORETO, C; GROCCA, G. L.; ANZALONE, R.; CALTABIANO, R.; VESPASIANI, G.; CASTORINA, S; RALPH, D. J.; CELLEK, S.; MUSUMECI, G.; GIUNTA, S.; DJINOVIC, R.; BASIC, D.; SANSALONE, S. The Role of Intrinsic Pathway in Apoptosis Activation and Progression in Peyronie's Disease. *BioMed Research International*, v. 2014, p. 1-11, 2014.
- LUNARDI, F.O.; AGUIAR, F.L.N.; APOLLONI, L.B.; DUARTE, A.B.G.; SÁ, N.A.R.; LEAL, É.S.S.; SALES, A.D.; LOBO, C.H.; CAMPELLO, C.C.; SMITZ, J.; APGAR, G.A.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Sheep Isolated Secondary Follicles Are Able to Produce Metaphase II Oocytes After Vitrification and Long-Term *In vitro* Growth. *Biopreservation and Biobanking*, v. 15, n. 4, p. 321-331, 2017.
- LUZ, V.B.; ARAÚJO, V.R.; DUARTE, A.B.; CELESTINO, J.J.; SILVA, T.F.; MAGALHÃES-PADILHA, D.M.; CHAVES, R.N.; BRITO, I.R.; ALMEIDA, A.P.; CAMPELLO, C.C., FELTRIN, C.; BERTOLINI, M.; SANTOS, R.R.; FIGUEIREDO, J.R. Eight-Cell Parthenotes Originated From *In vitro* Grown Sheep Preantral Follicles. *Reproductive Sciences*, v. 19, p.1219-225, 2012.
- MACEDO, T.J.S.; SANTOS, J.M.S.; BEZERRA, M.É.S.; MENEZES, V.G.; GOUVEIA, B.B.; BARBOSA, L.M.R.; LINS, T.L.B.; MONTE, A.P.O.; BARBERINO, R.S.; BATISTA, A.M.; BARROS, V.R.P.; WISCHRAL, A.; QUEIROZ, M.A.A.; ARAUJO, G.G.L. ; MATOS, M.H.T. Immunolocalization of leptin and its receptor in the sheep ovary and *In vitro* effect of leptin on follicular development and oocyte maturation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 495, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110506>.

- MACEDO, T.J.S.; BARROS, V.R.P.; MONTE, A.P.O.; GOUVEIA, B.B.; BEZERRA, M.É.S.; CAVALCANTE, A.Y.P.; BARBERINO, R.S.; MENEZES, V.G.; MATOS, M.H.T. Resveratrol has dose-dependent effects on DNA fragmentation and mitochondrial activity of ovine secondary follicles cultured *In vitro*. *Zygote*, v. 25, n. 4, p. 434-442, 2017.
- MADEJA, Z.E.; WARZYCH, E.; PEIPPO, J.; LECHNIAK, D.; SWITONSKI, M. Gene expression and protein distribution of leptin and its receptor in bovine oocytes and preattachment embryos produced *In vitro*. *Animal*, v.3, p.568–578, 2009.
- MAGALHÃES, K.A.; MARTINS, E.C.; HOLANDA FILHO, Z.F.; LUCENA, C.C. Boletim do Centro de Inteligência e Mercado de Caprinos e Ovinos. Pesquisa Pecuária Municipal 2017: efetivo dos rebanhos caprinos e ovinos, Nº 5, 13 p., Outubro, 2018.
- MARTELLI, A.; RUSSO, V.; MAURO, A.; DI GIACINTO, O.; NARDINOCCHI, D.; MATTIOLI, M.; BARBONI, B.; BERARDINELLI, P. Insights into Ovarian Follicle Angiogenesis: Morphological and Chronological Vascular Remodeling from Primordial to Ovulating Follicles. *SM Vascular Medicine*, v. 2, n.1, 2017.
- MASUZAKI, H.; OGAWA, Y.; SAGAWA, N.; HOSODA, K.; MATSUMOTO, T.; MISE, H.; NISHIMURA, H.; YOSHIMASA, Y.; TANAKA, I.; MORI, T.; NAKAO, K. Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nature Medicine*, n. 3, p. 1029-1333, 1997.
- MATSUDA F, INOUE N, MANABE N, OHKURA S. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. *Journal of Reproduction and Development*, v. 58, p. 44-50, 2012.
- MBEMYA, G. T.; CADENAS, J.; SÁ, N.A.R.; GUERREIRO, D.D.; DONFACK, N.J.; VIEIRA, L.A.; SOUSA, F.G.C.; ALVES, B.G.; LOBO, C.H.; SANTOS, F.V.; PINTO, F.C.L.; PESSOA, O.D.L.; SMITIZ, J.; COMIZZOLI, P.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Supplementation of *In vitro* culture medium with FSH to grow follicles and mature oocytes can be replaced by extracts of *Justicia insularis*. *Plos One*, v. 13, p. 1-21, 2018.
- MCNATTY, K.P.; FINDER, A.G.; JUNGEL, J.L.; QUARKE, L.D.; SMITH, P.R.; HEATH, D.A.; LUNDY, T.; O'CONNELL, A.; TISDALL, D.J. Growth and paracrine factors regulating

follicular formation and cellular function. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 163, p. 11-20, 2000.

MENEZES, V.G.; SANTOS, J.M.S; MACEDO, T.J.S.; LINS, T.L.B.G; BARBERINO, R.S.; GOUVEIA, B.B.; BEZERRA, M.É.S; CAVALCANTE, A.Y.P.; QUEIROZ, M.A.A.; PALHETA JUNIOR, R.C.; MATOS, M.H.T. Use of protocatechuic acid as the sole antioxidant in the base medium for *In vitro* culture of ovine isolated secondary follicles. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 52, n. 5, p. 890-898, 2017.

MENG, L.; JAN, S.Z.; HAMER, G.; VAN PELT, A.M.; VAN DER STELT, I.; KEIJER, J.; TEERDS, K.J. Preantral follicular atresia occurs mainly through autophagy, while antral follicles degenerate mostly through apoptosis. *Biology of Reproduction*, v. 99, n. 4, p. 853-863, 2018.

MITTAL, J.P. AND GHOSH, P.K. Effect of prolonged intermittent water supplies on the reproductive performance of ewes in the Indian desert. *Animal Production*, v. 43, p. 255-260, 1986.

MONNIAUX, D. Driving folliculogenesis by the oocyte-somatic cell dialog: Lessons from genetic models. *Theriogenology*, v. 86, p. 41-53, 2016.

MONTE, A.P.O.; BARROS, V.R.P.; SANTOS, J.M.; MENEZES, V.G.; CAVALCANTE, A.Y.P.; GOUVEIA, B.B.; BEZERRA, M.É.S.; MACEDO, T.J.S.; MATOS, M.H.T. Immunohistochemical localization of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in the sheep ovary and the synergistic effect of IGF-1 and FSH on follicular development *In vitro* and LH receptor immunostaining. *Theriogenology*, v. 129, p. 61-69, 2019a.

MONTE, A.P.O.; SANTOS, J.M.; MENEZES, V.G.; GOUVEIA, B.B.; LINS, T.L.B.G.; BARBERINO, R.S.; OLIVEIRA JÚNIOR, J.L.; DONFACK, N.J.; MATOS, M.H.T. Growth differentiation factor-9 improves development, mitochondrial activity and meiotic resumption of sheep oocytes after *In vitro* culture of secondary follicles. *Reproduction in Domestic Animals*, p. 1-8, 2019b. doi: 10.1111/rda.13485.

MOURA, J.H.A.; ARAUJO, G.G.L.; SARAIVA, E.P.; ALBUQUERQUE, I.R.R.; TURCO, S.H.N.; COSTA, S.A.P.; SANTOS, N.M. Ingestive behavior of crossbred Santa Inês sheep fed water with different salinity levels. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 37, n. 2, p. 1057-1068, 2016.



- MUÑOZ-GUTIÉRREZ, M.; FINDLAY, P.A.; ADAM, C.L.; WAX, G.; CAMPBELL, B.K.; KENDALL, N.R.; KHALID, M.; FORSBERG, M.; SCARAMUZZI, R.J. The ovarian expression of mRNAs for aromatase, IGF-I receptor, IGF-binding protein-2, -4 and -5, leptin and leptin receptor in cycling ewes after three days of leptin infusion. *Reproduction*, v.130, p.869–881, 2005.
- MÜNZBERG, H.; MORRISON, C.D. Structure, production and signaling of leptin. *Metabolism: Clinical and Experimental*, v. 64, n. 1, p. 13-23, 2015.
- NAGATANI, S.; ZENG, Y.; KEISLER, D.H.; FOSTER, D.L.; JAFFE, C.A. Leptin regulates pulsatile luteinizing hormone and growth hormone secretion in the sheep. *Endocrinology*, v.141, p.3965-3975, 2000.
- NANDI, S.; TRIPATHI, S.K.; GUPTA, P.S.P.; MONDAL, S. Effect of metabolic stressors on survival and growth of *In vitro* cultured ovine preantral follicles and enclosed oocytes. *Theriogenology*, v. 104, p. 80-86, 2017.
- NAQVI, S.M.K.; KUMAR, D.; DE KALYAN, SEJIAN, V. Climate Change and Water Availability for Livestock: Impact on Both Quality and Quantity. *Climate Change Impact on Livestock: Adaptation and Mitigation*, p. 81-95, 2015.
- NASCIMENTO, T.S.; SILVA, I.S.M.; ALVES, M.C.M.A.; GOUVEIA, B.B.; BARBOSA, L.M.R.; MACEDO, T.J.S.; SANTOS, J.M.S.; MONTE, A.P.O.; MATOS, M.H.T.; PADILHA, F.F.; LIMA-VERDE, I.B. Effect of red propolis extract isolated or encapsulated in nanoparticles on the *In vitro* culture of sheep preantral follicle: Impacts on antrum formation, mitochondrial activity and glutathione levels. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 54, n. 1, p. 31-38, 2019.
- NEIVA, J.N.M.; TEIXEIRA, M.; TURCO, S.H.N.; OLIVEIRA, S.N.P.; MOURA, A.A.A.N. Efeito do estresse climático sobre os parâmetros produtivos e fisiológicos de ovinos Santa Inês mantidos em confinamento na região Litorânea do Nordeste do Brasil. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 33, n. 3, p. 668-678, 2004.
- NELSON, D.L.; COX, M.M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. p. 75-104.

- PACHECO, M.D.; ROMERO, J.V.; ROJAS-MAYA, S.; RETANA-MÁRQUEZ, S. Effects of crowding and water restriction stress on creole goat reproduction in the Oaxacan Sierra Mixteca, Mexico. *Reproduction in Domestic Animals*, p. 1-10, 2018. Doi: 10.1111/rda.13267.
- PALHARES, J.C.P. Consumo de água na produção animal. Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos (Embrapa Pecuária Sudeste. Comunicado Técnico, 102), 2013.
- PALMA, G. A.; ARGAÑARAZ, M. E.; BARRERA, A. D.; RODLER, D.; MUTTO, A. Á.; SINOWATZ, F. Biology and Biotechnology of Follicle Development. *The Scientific World Journal*, v. 2012, p. 1–14, 2012.
- PANDA, B.S.K.; PANDEY, S.; SOMAL, A.; PARMAR, M.S.; BHAT, I.A.; BAIJU, I.; BHARTI, M.K.; SAI, K.G.; CHANDRA, V.; SHARMA, G.T. Leptin supplementation *In vitro* improved developmental competence of buffalo oocytes and embryos. *Theriogenology*, v. 98, p. 116-122, 2017.
- PAULA-LOPES, F.F.; BOEHLAUVE, M.; HAUBERMANN, F.A.; SINOWATZ, F.; WOLF, E. Leptin promotes meiotic progression and developmental capacity of bovine oocytes via cumulus cell-independent and dependent mechanisms. *Biology of Reproduction*, v. 76, n. 3, p.532-541, 2007.
- PAZ, M.P.; SOUSA, F.G.C.; ALVES, B.G.; LOBO, C.H.; SALES, A. D.; TAVARES, K.C.S.; SÁ, N.A.R.; GUERREIRO, D.D.; MASIDE, C.; ROCHA, R.M.P.; BERTOLINI, L.R.; BORDIGNON, V.; FIGUEIREDO, J.R.; Rodrigues, A.P.R. Effect of aquaporin 3 knockdown by RNA interference on antrum formation in sheep secondary follicles cultured *In vitro*. *Zygote*, p. 1-9, 2018. Doi: 10.1017/S096719941800031X.
- PÉREZ-PÉREZ, A.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F.; MAYMÓ, J.; DUEÑAS, J. L.; VARONE, C.; SÁNCHEZ-MARGALET, V. Role of leptin in female reproduction. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, v. 53, n 1, p. 15-28, 2015.
- RAMPAL, G.; KHANNA, N.; THIND, T. S.; ARORA, S.; VIGA, A. P. Role of isothiocyanates as anticancer agents and their contributing molecular and cellular mechanisms. *Medicinal Chemistry & Drug Discovery*, v. 3, n. 2, p. 79-93, 2012.

- RAY A. Adipokine leptin in obesity-related pathology of breast cancer. *Journal of Biosciences*, v. 37, p. 289-94, 2012.
- RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. *Bibliotheca Anatomica*, v. 24, p. 77-92, 1983.
- SADEU, J.C.; CORTVRINDT, R.; RON-EL, R.; KASTERTEIN, E.; SMITZ, J. Morphological and ultrastructural evaluation of cultured froze-thawed human fetal ovarian tissue. *Fertility and Sterility*, v.85, n. 1, p.1130-1141, 2006.
- SALEM, H. B. Nutritional management to improve sheep and goat performances in semiarid regions. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 39, p. 337–347, 2010.
- SALES, A.D.; DUARTE, A.B.; RODRIGUES, G.Q.; LIMA, L.F.; SILVA, G.M.; CARVALHO, A.A.; BRITO, I.R.; DA MARANGUAPE, R.M.; LOBO, C.H.; ARAGÃO, J.A.; MOURA, A.A.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Steady-state level of messenger RNA and immunolocalization of aquaporins 3, 7, and 9 during *In vitro* growth of ovine preantral follicles. *Theriogenology*, v. 84, p. 1–10, 2015.
- SANTOS, J.R.S.; SOUZA, B.B.; SOUZA, W.H.; CEZAR, M. F.; TAVARES, G.P. Respostas fisiológicas e gradientes térmicos de ovinos das raças Santa Inês, morada nova e de seus cruzamentos com a raça Dorper às condições do semiárido nordestino. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 30, n. 5, p. 995–1001, 2006.
- SANTOS, F.M.; ARAÚJO, G.G.L.; SOUZA, L.L.; YAMAMOTO, S.M.; QUEIROZ, M.A.Á.; LANNA, D.P.D.; MORAES, S.A. Impact of water restriction periods on carcass traits and meat quality of feedlot lambs in the Brazilian semi-arid region. *Meat Science*, v. 156, p. 196–204, 2019.
- SANTOS, L.P.; SANTOS, J.M.S.; MENEZES, V.G.; BARBERINO, R.S.; GOUVEIA, B.B.; CAVALCANTE, A.Y.P.; LINS, T.L.B.G.; GONÇALVES, R.J.S.; CELESTINO, J.J.H.; MATOS, M.H.T. Blocking the PI3K pathway or the presence of high concentrations of EGF inhibits the spontaneous activation of ovine primordial follicles *In vitro* *Animal Reproduction*, v. 14, p.1298-1306, 2017.

- SARKAR, M.; SCHILFFARTH, S.; SCHAMS, D.; MEYER, H.H.D.; BERISHA, B. The expression of leptin and its receptor during different physiological stages in the bovine ovary. *Molecular Reproduction and Development*, v. 77, P. 174–181, 2010.
- SCOTECE, M.; CONDE, J.; LÓPEZ, V.; LAGO, F.; PINO, J.; GÓMEZ-REINO, J. J.; GUALILLO, O. Adiponectin and leptin: new targets in inflammation. *Basic & Clinical Pharmacology Toxicology*, v. 114, p. 97-102, 2014.
- SHEYKHANI, H.R.S.; BATAVANI, R.A.; NAJAFI, G.R. Protective effect of leptin on induced apoptosis with trichostatin A on buffalo oocytes. *Veterinary Research Forum*, v. 7, p. 99-104, 2016.
- SILVA, C.M.; ARAÚJO, G.G.L.; OLIVEIRA, B.Y.S.; AZEVÊDO, J.A.G.; FURTADO, D.A. Performance and economic viability of feedlot sheep fed different levels of roughage, concentrate, and water. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 37, n. 3, p. 1595-1606, 2016.
- SILVA, J.R.V.; VAN DEN HURK, R.; MATOS, M.H.; 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, 2004.
- SPICER, L.J.; FRANCISCO, C.C. Adipose obese gene product, leptin, inhibits bovine ovarian thecal cell steroidogenesis. *Biology of Reproduction*, v.58, p.207– 212, 1998.
- SUKHOTNIK, I; ROFE, A. Germ Cell Apoptosis: Clinical Implications. *Andrology*, v. 3, p. 1-6, 2014.
- SZCZESNA, M.; ZIEBA, D.A. Phenomenon of leptin resistance in seasonal animals: the failure of leptin action in the brain. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 52, p. 60-70, 2015.
- TIBIN, M.A.M.; BUSHARA, I.; ELEMAM, M. B.; TIBIN, I. M.; JADALLA, J. B. Carcass characteristics of desert sheep under range conditions in North Kordofan state, Sudan. *Online Journal of Animal and Feed Research*, v. 2, p. 439–444, 2012.
- TORRES-RAMÍREZ, N.; ORTIZ-HERNÁNDEZ, R.; ESCOBAR-SÁNCHEZ, M.L.; ECHEVERRÍA, O.M.; VÁZQUEZ-NIN, G.H. Endoplasmic Reticulum Stress during Mammalian Follicular Atresia, *Endoplasmic Reticulum*, Angel Català, IntechOpen, 2019. DOI:

10.5772/intechopen.82687. Available from: <https://www.intechopen.com/books/endoplasmic-reticulum/endoplasmic-reticulum-stress-during-mammalian-follicular-atresia>.

TORRES-RAMÍREZ, N.; ESCOBAR, M.L.; VÁZQUEZ-NIN, G.H.; ORTIZ, R.; ECHEVERRÍA, O.M. Paraptosis-like cell death in Wistar rat granulosa cells. *Development, Growth & Differentiation*, v. 58, n. 8, p. 651-663, 2016.

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.

VAN TOL, H.T.A.; VAN EERDENBURG, F.J.C.M.; COLENBRANDA, B.; ROELEN, B.A.J. Enhancement of bovine oocyte maturation by leptin is accomplished by an upregulation in mRNA expression of leptin receptor isoforms in cumulus cells. *Molecular Reproduction and Development*. v.75, p.578–587, 2008.

VÁZQUEZ, M.J.; ROMERO-RUIZ, A.; TENA-SEMPERE, M. Roles of Leptin in Reproduction, Pregnancy and Polycystic Ovary Syndrome: Consensus Knowledge and Recent Developments. *Metabolism: Clinical and Experimental*, v. 64, p.79-91, 2015.

VÁZQUEZ-VELA, M.E.F.; TORRES, N.; TOVAR, AR. White Adipose Tissue as Endocrine Organ and Its Role in Obesity. *Archives of Medical Research*, v. 39, p.715-728, 2008.

VEENA, M.P.; NARYANA, S.M.; YATHIRAJ, S.; RAMESH, P.T.; RAO, S.; SHRIDHAR, N.B.; KALMATH, G.P.; SHWETHA, H.S. Leptin, Insulin and Estradiol Profile in Bannur Female Sheep. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v. 7, 10, p. 507-511, 2018.

WEBB, R.; GARNSWORTHY, J.G.; ARMSTRONG, D.G. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. *Journal of Animal Science*, v. 82, p.63–74, 2004.

ZHOU, J.; PENG, X.; MEI, S. Autophagy in Ovarian Follicular Development and Atresia. *International Journal of Biological Sciences*, v. 15, n 4, p. 726-737, 2019.

ZHOU, Y.; RUI, L. Leptin signaling and leptin resistance. *Frontiers in Medicine*, v. 7, p. 207–222, 2014.

ZHOU, Z.; HAN, V.; HAN, J. New components of the necroptotic pathway. *Protein Cell*, v. 3, n. 11, p. 811–817, 2012.

## 10. ANEXOS



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO MINISTÉRIO DE CIÊNCIA,  
TECNOLOGIA E INOVAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO VALE DO SÃO FRANCISCO COMISSÃO DE ÉTICA  
NO USO DE ANIMAIS



## Certificado de autorização

Certificamos que a proposta intitulada: "**Impacto de diferentes ofertas hídricas e energéticas sobre as respostas produtivas e o desenvolvimento de folículos ovarianos de ovelhas Santa Inês no Semiárido Pernambucano**", registrada com o nº **0002/241017**, sob a responsabilidade de **Maria Helena Tavares de Matos** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal do Vale do São Francisco - UNIVASF, em reunião de 24/10/2017.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino ( <input checked="" type="checkbox"/> ) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/12/2017 a 30/12/18
Espécie/linhagem/raça	<i>Ovis aries</i>
Nº de animais	120
Peso/Idade	25 a 30kg/ 20 meses
Sexo	F
Origem	Animais serão adquiridos de produtores (ovinocultores)

Em: 27/02/2018

**Marcelo Domingues de Faria**

**Coordenador Interino da Comissão de Ética no Uso de Animais – UNIVASF**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO  
REITORIA  
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA



FORMULARIO DE SOLICITAÇÃO DE ALTERAÇÃO DE METODOLOGIA E/OU TÉCNICAS DESCRITAS EM  
PROJETO VIGENTE E APROVADO PELO CEUA

Ilma. coordenadora Karine Vieira Antunes

Coordenadora do Comitê de Ética no Uso Animais da UNIVASF

Prezada,

Solicito ao CEUA-UNIVASF a seguinte alteração metodológica e/ou tecnológica no uso de animais do projeto sob protocolo nº 0002/241017, intitulado: "Impacto de diferentes ofertas hídricas e energéticas sobre as respostas produtivas e o desenvolvimento de folículos ovarianos de ovelhas Santa Inês no Semiárido Pernambucano", e aprovado em 24/10/2017 sob minha responsabilidade.

Descrever modificação/ alteração no protocolo do projeto:

Solicito alteração do período de autorização de vigência do referido projeto para dia 30 de dezembro de 2019. Realizaremos o experimento de oferta hídrica a partir de Janeiro de 2019, pois a liberação de parte do recurso financeiro do projeto ocorreu apenas recentemente, no mês de setembro de 2018.

Declaro que não realizei nenhum procedimento empregando a metodologia experimental ou técnica alterada no projeto vigente, previamente a esta solicitação.

Declaro que não haverá qualquer outra alteração no protocolo na referida licença.

Petrolina, 29/11/2018

M<sup>sc</sup> Helena T. Mouton

Pesquisador responsável

**PARA PREENCHIMENTO DA CEUA – UNIVASF**  
**PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE À SOLICITAÇÃO DE ALTERAÇÃO DO PROJETO**  
**PROTOCOLO Nº 02/241017**

Informamos que o Comitê de Ética no Uso de Animais/CEUA da Universidade Federal do Vale do São Francisco, após análise das adequações solicitadas, **deferiu** (X) / **indeferiu** ( ) as alterações solicitadas no projeto acima referido, sendo as mesmas consideradas em acordo com os princípios éticos vigentes.

Karine Vieira Antunes  
KARINE VIEIRA ANTUNES  
Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animais  
UNIVASF - Mat. SIAPE 1811171  
Coordenadora do CEUA/ UNIVASF





## Effects of leptin on the follicular development and mitochondrial activity of ovine isolated early antral follicles cultured *in vitro*



V.G. Menezes <sup>a,\*</sup>, A.P.O. Monte <sup>a</sup>, B.B. Gouveia <sup>a</sup>, T.L.B.G. Lins <sup>a</sup>, N.J. Donfack <sup>a</sup>, T.J.S. Macedo <sup>a</sup>, R.S. Barberino <sup>a</sup>, J.M. Santos <sup>a</sup>, M.H.T. Matos <sup>a</sup>, A.M. Batista <sup>b</sup>, A. Wischral <sup>b</sup>

<sup>a</sup> *Núcleo de Biotecnologia Aplicada em Ovarian Follicle Development, Federal University of São Francisco Valley, Petrolina, PE, Brazil*  
<sup>b</sup> *Departamento de Veterinária Médica, Federal Rural University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil*

### ARTICLE INFO

**Article history:**  
 Received 12 January 2019  
 Received in revised form 3 July 2019  
 Accepted 4 July 2019  
 Available online 9 July 2019

**Additional keywords:**  
 Fully-grown oocyte  
*in vitro* maturation  
 Oocyte  
 ROS levels  
 Sheep

### ABSTRACT

This study evaluated the effect of leptin on the *in vitro* culture of isolated sheep early antral follicles. Early antral follicles (300–450  $\mu$ m) were isolated and cultured for 12 days in tissue culture medium 199 (TCM 199) supplemented with glutamine, hypoxanthine, thymidine, insulin, selenium, ascorbic acid, bovine serum albumin (BSA) and recombinant follicle stimulating hormone (rFSH) (TCM 199 + control medium) or TCM 199 + supplemented with 2 or 10 ng/ml leptin. After culture, oocytes were subjected to *in vitro* maturation (IVM). The parameters analyzed were morphology, extrusion rate, follicular diameter, growth and fully-grown oocytes (oocyte  $\geq$ 110  $\mu$ m) rates. After IVM, reactive oxygen species (ROS) levels, mitochondrial activity, meiotic stages and meiotic resumption rates were also analyzed. After 12 days of culture, the concentration of 2 ng/ml of leptin showed a higher percentage of morphologically normal follicles, fully-grown oocytes ( $\geq$ 110  $\mu$ m), active mitochondria and meiotic resumption compared to the control medium (TCM 199);  $P < 0.05$  but did not differ when compared to leptin concentration of 10 ng/ml ( $P > 0.05$ ). After culturing, no significant differences related among treatments in terms of the follicle diameter and ROS levels. In conclusion, the addition of 2 ng/ml leptin to the basic culture medium is capable of improving follicular survival, oocyte growth, mitochondrial activity and meiotic resumption after the *in vitro* culture of isolated sheep early antral follicles.

© 2019 Published by Elsevier Inc.

### 1. Introduction

The *in vitro* production of human and domestic animal embryos has been performed after *in vitro* maturation (IVM) and fertilization of immature oocytes derived from large antral follicles [1,2]. These oocytes appeared to acquire a greater developmental competence to become embryos in blastocyst stage [3,4] and live births [3] than oocytes from small antral follicles. Considering that the ovary has more small than large antral follicles [5,6], *in vitro* culture (IVC) biotechnology may be used to grow small antral follicles, thus increasing the number of meiotically competent oocytes [5–8]. Metaphase II (MII) oocytes have been obtained after IVC of oocytes-

granulosa complexes collected from early antral follicles (bovine: [9,10]; swine [6,11,12]) or after IVC of these follicles (caprine [7,8]) associated with embryo production (bovine: [10]; swine [6]). However, the efficiency of the developmental process is still low, and further improvement of the culture conditions is required [6]; for example, with the addition of hormones to the basic medium such as leptin [13–15].


Leptin, a multifunctional hormone primarily expressed in the white adipose tissue [16], is considered a metabolic signal that regulates the effects of nutritional status on reproductive function [17,18], playing a central role in the hypothalamic-pituitary-gonadal axis [19,20] and a direct action in the ovary [20]. In mammals, leptin is involved in the regulation of follicular growth, apoptosis, proliferation of granulosa cells, oestrogenesis, and oxidative status of the ovarian tissue during ovulation [21–25]. These effects occur probably through the interaction of leptin with its cellular membrane-associated receptors [26]. Studies have already demonstrated the presence of leptin and/or its receptors in the ovarian follicular compartments of different species (human:

\* Corresponding author. Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Departamento de Medicina Veterinária, Campus de Ciências Agrárias, Laboratório de Biologia Celular, Citologia e Histologia, Rodovia BR 407, km 12, Lote 540, Projeto de Irrigação Nilo Coelho - S/N, CE: 56300-990, Petrolina, PE, Brazil.  
 E-mail address: vanuziagn@ufvsa.com.br (vanuziagn@gmail.com) (V.G. Menezes).

Elsevier Editorial SystemT x

Seguro | https://ees.elsevier.com/therio/default.asp

# THERIOGENOLOGY

Contact us Help ?  Impact of COVID-19 on peer review process; see [here](#).

home | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#) | Username: [vanuziagm@yahoo.com.br](#) | Switch To: [Author](#) | Go to: [My EES Hub](#) | Version: EES 2020.5

Submissions Being Processed for Author Vanúzia Gonçalves Menezes, M

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
<a href="#">View Submission</a>		Decline of ovarian reserve and influence of leptin on in vitro growth of secondary follicles in sheep subjected to reduction of water supply	28 Sep 2020	28 Sep 2020	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display 10 results per page.

<< Author Main Menu