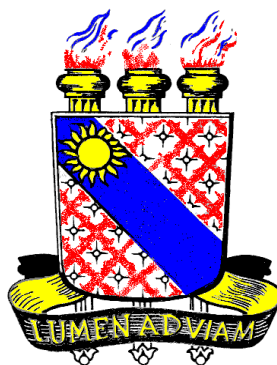


UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



FABRICIO SOUSA MARTINS

**EFEITO DA SOLUÇÃO À BASE DE ÁGUA DE COCO E DO MEIO
ESSENCIAL MÍNIMO SOBRE A ATIVAÇÃO E CRESCIMENTO *IN*
VITRO DE FOLÍCULOS PRIMORDIAIS CAPRINOS**

Fortaleza – Ceará
Dezembro, 2004

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

FABRICIO SOUSA MARTINS

**EFEITO DA SOLUÇÃO À BASE DE ÁGUA DE COCO E DO MEIO
ESSENCIAL MÍNIMO SOBRE A ATIVAÇÃO E CRESCIMENTO *IN*
VITRO DE FOLÍCULOS PRIMORDIAIS CAPRINOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências Veterinárias do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias – Faculdade de Veterinária, da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em Ciências Veterinárias

Área de concentração: Reprodução Animal
Orientador: Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo

Fortaleza – Ce
Dezembro, 2004

Universidade Estadual do Ceará

Curso de Mestrado em Ciências Veterinárias

Título do trabalho: Efeito da solução à base de água de coco e do meio essencial mínimo sobre a ativação e crescimento *in vitro* de folículos primordiais caprinos

Autor: Fabricio Sousa Martins

Defesa em: 16/12/04

Conceito obtido: Satisfatório

Banca Examinadora

José Ricardo de Figueiredo, Prof. Dr.
Orientador

Vicente José de Figueirêdo Freitas, Prof. Dr.
Co-orientador/Examinador

Marcelo Marcondes Seneda, Prof. Dr
Examinador

*Aos meus pais, Maria
Elizabeth de Souza Martins
e Milton Martins Júnior,*

Dedico

Agradecimentos

A Jesus Cristo, por ter me guiado espiritualmente nesta caminhada de crescimento pessoal e profissional.

Aos meus pais, Elizabeth e Milton Martins, pelo amor, incentivo, constante apoio e por chegarmos juntos nesta grande empreitada da vida. É difícil expressar em palavras meu amor e gratidão por vocês!

Às queridas irmãs, Fabrine Souza Martins e Fabiane Souza Martins, pelo incentivo, apoio e bons momentos de convivência.

À linda namorada, Lidiane Andrade Gomes, meus sinceros agradecimentos, pelo amor, carinho, compreensão e dedicação em todos os momentos e ainda pela inestimável ajuda na elaboração deste manuscrito.

Ao meu orientador Dr. José Ricardo de Figueiredo, pelo paradigma profissional e pessoal, conhecimento, incentivo, orientação, amizade e por ensinar que não existem tarefas difíceis. Existe apenas o que conhecemos e o que não conhecemos.

Aos colegas Regiane Rodrigues, Juliana Celestino, Helena Matos, Dra. Ana Paula e Dr. José Roberto que me receberam no laboratório com entusiasmo. Contribuíram, ensinaram e incentivaram de diferentes maneiras. A todos vocês o meu sincero “MUITO OBRIGADO” !

Aos colegas Cláudio Lopes, Juliana Ramos, Jamily e Gardel pela amizade, disponibilidade e prestatividade na conclusão deste trabalho.

Aos colegas, Daniel, Ney Rômulo, Walber, Cícero, Suzana, Tânia, Ana Karine, Sthênia, Maurício, Michele, Micheline e Alex pelos momentos de descontração e apoio em muitas adversidades durante o mestrado.

Aos membros da banca examinadora, pela predisposição em analisar este trabalho e pelas sugestões recebidas.

Aos colaboradores da UFC, Dr. Francisco Valdeci A. Ferreira, Dra. Cláudia Do Ó Pessoa, Dr. Manoel Odorico de Moraes e Francisco José Queirós (técnico), pelo respeito e acolhimento.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP, pelo apoio financeiro concedido na forma de bolsa de estudo.

Expresso meus agradecimentos, também, aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) pelo conhecimento e experiência compartilhados.

Ao Dr. Vicente José de Figueirêdo Freitas e grupo de pesquisa do Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução (LFCR), pela amizade e disponibilidade dos equipamentos.

À dedicação e competência das secretárias do PPGCV, Alzenira Andrade e Adriana Albuquerque, cujo auxílio e cooperação foram de grande valia para a realização deste trabalho, merecem o devido reconhecimento.

Ao, muito em breve, Dr. César Pinheiro, Dr. João Eduardo e Alana pela amizade, sugestões e profissionalismo.

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente ajudaram a seguir minha carreira acadêmica e pessoal, galgando mais esta etapa.

Resumo

O objetivo do presente estudo foi investigar o efeito de Meio Essencial Mínimo (MEM), Solução à Base de Água de Coco (SBAC) e MEM adicionado de SBAC sobre a viabilidade, ativação e crescimento de folículos primordiais caprinos após o cultivo *in vitro* de córtex ovariano. Fragmentos de córtex foram cultivados *in vitro* por 1 e 5 dias em MEM, SBAC ou MEM adicionado de 5, 10, 20, 50, 80, 90 ou 95% de SBAC na presença de BSA, ITS, penicilina, estreptomicina, anfotericina, glutamina, piruvato e hipoxantina. No dia 0 e após 1 e 5 dias de cultivo, os fragmentos foram fixados para análise histológica. Os folículos foram classificados em primordiais ou em desenvolvimento, bem como em normais ou atresícos de acordo com a sua morfologia. O diâmetro folicular foi avaliado antes e após o cultivo e a atividade mitótica das células da granulosa (CG) foi avaliada por imunolocalização do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA). Após 5 dias de cultivo, concomitante com o aumento do percentual dos folículos em desenvolvimento, o percentual de folículos primordiais foi reduzido ($P < 0,05$) em todos os meios. A redução de folículos primordiais ocorreu com o aumento do período de cultivo de 1 para 5 dias. Após 5 dias, as maiores taxas de ativação foram observadas após cultivo em MEM e MEM adicionado de 5 e 10% de SBAC. Contudo, a adição de SBAC nas proporções de 20%, ou superior, reduziu a ativação e a viabilidade folicular após 5 dias de cultivo. Independentemente do meio, houve aumento ($P < 0,05$) do diâmetro folicular no dia 5 em relação aos dias 0 e 1. A análise imunohistoquímica mostrou que o PCNA está geralmente ausente em folículos primordiais de córtex cultivado e não-cultivado. Contudo, após 5 dias de cultivo as células da granulosa dos folículos em desenvolvimento expressam PCNA. Em conclusão, folículos primordiais caprinos são ativados e mantêm-se viáveis após cultivo *in vitro* em MEM ou MEM adicionado com baixas proporções (10% ou menos) de SBAC. Entretanto, a adição de SBAC ao MEM não aumentou a viabilidade, a ativação e o crescimento de populações de folículos primordiais inclusos em fragmentos de córtex de ovários caprinos.

Abstract

In this study, we investigated the effect of Minimal Essential Medium (MEM), Coconut Water Solution (CWS) and MEM supplemented with CWS on the morphology and activation of goat primordial follicle after culturing ovarian cortical tissue. Cortical tissue pieces were cultured for 1 or 5 days in MEM, CWS or MEM supplemented with 5, 10, 20, 50, 80, 90, 95% of CWS. Both MEM and CWS were supplemented with BSA, ITS, glutamine, pyruvate and hypoxanthine. At day 0 and after 1 and 5 days of *in vitro* culture, the cortical pieces were fixed for histological evaluation. Based on their morphology, follicles were classified as primordial or developing and intact or atretic. Follicular diameter was evaluated before and after culture. Mitotic activity of granulosa cells was studied by immunolocalization of proliferation cell nuclear antigen (PCNA). The results showed that, after 5 days culture, concomitant with the increase of development follicles, the percentages of primordial follicles was reduced ($P<0.05$), in all media tested, when compared to days 0 and 1. After 5 days culture, the highest rate of primordial follicle activation was observed, when ovarian pieces were cultured in MEM or MEM supplemented with 5 or 10% CWS. However, culturing follicles for 5 days in a mixture of MEM and 20% or higher percentages of CWS reduced their activation and viability after 5 days culture. In all media tested, mean follicular diameters had significantly increased after 5 days culture when compared to those measured at days 0 and 1. Immunohistochemical analysis showed that both in non-cultured and cultured tissues, primordial follicles generally do not stain for PCNA, whereas after culture the granulosa cells of developing follicles do express PCNA. In conclusion, goat primordial follicle are activated and kept viable after *in vitro* culture in MEM or in a mixture of MEM with low proportions (10% or less) of CWS. However, addition of CWS to MEM, does not improve the survival, activation and further development of the primordial follicle population in culture goat ovarian cortical pieces.

Sumário

1. Introdução	13
2. Revisão de literatura	14
2.1 – Aspectos morfológicos e estruturais do ovário mamífero	14
2.2 – Oogênese	16
2.3 – Foliculogênese	17
2.4 – População folicular em ovários mamíferos	19
2.5 – Atresia folicular	20
2.6 – Ativação e crescimento dos folículos pré-antrais	22
2.7 – Métodos de avaliação da proliferação das células da granulosa	23
2.8 – Modelos de cultivo para o estudo do desenvolvimento folicular	23
2.9 – Estado atual do cultivo <i>in vitro</i> de folículos pré-antrais	24
2.10 – Regulação do crescimento folicular	25
2.11 – Importância da composição do meio sobre o desenvolvimento folicular ...	30
2.12 – A solução à base de água de coco	30
3. Justificativa	34
4. Hipótese científica	35
5. Objetivos	36
6. Artigo	37
7. Conclusão	60
8. Perspectivas	61
9. Referências Bibliográficas	62

Lista de abreviaturas e símbolos

AMH	:Hormônio anti-Mülleriano
ANOVA	:Análise de variância
ATP	:Adenosina trifosfato
BDNF	: Fator neurotrófico derivado do cérebro
BMP	: Proteína morfogenética óssea
BMP- 15	: Proteína morfogenética óssea - 15
BrdU	: Bromodesoxiuridina
BSA	: Albumina sérica bovina
°C	: Graus Celsius
Ca ⁺⁺	: Íon cálcio
CG	: Células da granulosa
CGP	: Células germinativas primordiais
c-Kit	: Receptor para <i>kit ligand</i>
CL	: Corpo lúteo
CO ₂	: Dióxido de carbono
CWS	: Solução à base de água de coco
DAB	: Diaminobenzidina
DNA	: Ácido desoxirribonucléico
EGF	: Fator de crescimento epidermal
Erb-A	: Receptor do tipo tirosina quinase para o fator de crescimento epidermal
FIV	: Fecundação <i>in vitro</i>
FGF	: Fator de crescimento fibroblástico
FGFb	: Fator de crescimento fibroblástico básico
FSH	: Hormônio folículo estimulante
FSH - R	: Receptor para o hormônio folículo estimulante
Fig.	: Figura
GDF-9	: Fator de crescimento de diferenciação – 9
h	: Horas
HB-EGF	: Ligante de heparina similar ao fator de crescimento epidermal
IA	: Inseminação artificial
IAA	: Ácido 3-indol acético

IGF	: Fator de crescimento semelhante à insulina
IGFBP	: Proteína de ligação do fator de crescimento semelhante à insulina
IGFR	: Receptor para o fator de crescimento semelhante à insulina
IgG	: Imunoglobulina
ITS	: Insulina, transferrina e selênio
K ⁺	: Íon potássio
KL	: <i>Kit ligand</i>
LH	: Hormônio luteinizante
MEM	: Meio essencial mínimo
MOIFOPA	: Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais
mg	: Miligrama
Mg ⁺⁺	: Íon magnésio
mm	: Milímetros
min.	: Minutos
mL	: Mililitro
mM	: Milimolar
mRNA	: Ácido ribonucleico mensageiro
Na ⁺	: Íon Sódio
Ng	: Nanogramas
NGF	: Fator de crescimento de nervos
PAS	: Ácido periódico de Schiff
PBS	: Tampão fosfato salino
PCNA	: Antígeno nuclear de proliferação celular
pH	: Potencial hidrogeniônico
P < 0.05	: Probabilidade de erro menor do que 5%
P > 0.05	: Probabilidade de erro maior do que 5%
RNA	: Ácido ribonucleico
RNA _m	: Ácido ribonucleico mensageiro
SBAC	: Solução à base de água de coco
SD	: Desvio padrão
TE	: Transferência de Embriões
TGF- α	: Fator de crescimento transformante alfa
TGF- β	: Fator de crescimento transformante beta
Trk	: Tirosina kinase

UI	: Unidade internacional
VIP	: Peptídeo intestinal vasoativo
X^2	: Qui-quadrado
ZP	: Zona pelúcida
μg	: Microgramas
μL	: Microlitro
μm	: Micrômetro
%	: Porcentagem
~	: Aproximadamente

1 - Introdução

A utilização e o desenvolvimento de biotécnicas relacionadas à reprodução animal são condições necessárias para o aumento da eficiência produtiva e reprodutiva de animais domésticos, principalmente para aqueles de interesse econômico, como os caprinos, com destacada atividade econômica e social, principalmente na região Nordeste do Brasil. Nos últimos 20 anos, várias biotécnicas tem sido desenvolvidas e aprimoradas com o intuito de aumentar o potencial reprodutivo de animais de alto valor genético, bem como, de preservar a fertilidade humana. Dentre as biotécnicas estudadas, podemos destacar a Inseminação Artificial (IA), a Transferência de Embriões (TE), a Fecundação *In vitro* (FIV), a transgênese, a clonagem e a Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais (MOIFOPA).

O ovário mamífero contém milhares de oócitos inclusos em folículos primordiais e poucos destes folículos desenvolvem-se até o estágio de folículo pré-ovulatório (EPPIG & O'BRIEN, 1996). Desta forma, o real desafio da biotécnica de MOIFOPA é estabelecer procedimentos ou sistemas para recuperar um grande número de oócitos inclusos nesses folículos e cultivá-los *in vitro* até sua completa maturação, prevenindo-os assim da atresia.

A ativação folicular consiste na passagem de folículos primordiais do *pool* de reserva ou quiescentes para o *pool* de folículos em crescimento. Neste contexto, o desenvolvimento de um sistema de cultivo eficiente é um ponto crucial para a ativação desses folículos *in vitro*, permitindo o desenvolvimento de um grande número de folículos pré-antrais que poderá contribuir para uma melhor compreensão dos diversos fatores implicados na foliculogênese e no processo de atresia (FIGUEIREDO, 1995). Além disso, poderá ser uma alternativa para o fornecimento de milhares de oócitos viáveis, inclusos em folículos pré-antrais em diversos estágios de desenvolvimento, para as biotécnicas de fecundação *in vitro* e clonagem (TELFER, 1996).

Na presente dissertação, serão abordados os aspectos morfológicos e estruturais do ovário mamífero, a oogênese, a foliculogênese, a população folicular, a atresia, a ativação e o crescimento dos folículos pré-antrais, os métodos de avaliação da proliferação das células da granulosa, os modelos de cultivo para o estudo do desenvolvimento folicular, o estado atual

do cultivo, fatores envolvidos na foliculogênese, bem como a importância da utilização de substâncias alternativas como a solução à base de água de coco no cultivo *in vitro* de folículos primordiais caprinos.

2 – Revisão de literatura

2.1 – Aspectos morfológicos e estruturais do ovário mamífero

O ovário é composto por uma região cortical e uma medular, sendo circundado por um epitélio superficial conhecido como epitélio germinativo que repousa sobre uma membrana basal. Logo abaixo, observa-se a túnica albugínea e o estroma ovariano. No córtex ovariano podem ser encontrados folículos ovarianos quiescentes, em desenvolvimento ou em atresia, corpos lúteos, corpos albicans e corpos hemorrágicos (MURDOCH, 1996). No córtex, também encontram-se colágenos dos tipos I e III, fibroblastos, vasos sanguíneos, linfáticos e terminações nervosas (HAFEZ, 1995). A região medular é responsável pela nutrição e sustentação do ovário. Ela consiste de tecido conjuntivo fibroblástico (fibroblasto, fibras de colágeno I e III e fibronectina), nervos e sistemas vasculares (SMITH *et al.*, 1994) que atingem o ovário pelo hilo (HAFEZ, 1995). A figura 1 mostra de forma esquemática a organização estrutural do ovário mamífero.

O ovário desempenha duas importantes funções, uma exócrina ou gametogênica (produção e liberação de óvulos) e uma endócrina ou esteroidogênica (produção e liberação de hormônios esteróides) (HAFEZ, 1995). Essa dupla função é um processo interdependente, complementar e necessário para o sucesso da reprodução (PINEDA, 1989). A produção de óvulos ou gametas femininos é resultante da interação de dois fenômenos que ocorrem no ovário, isto é, a oogênese e a foliculogênese (SAUMANDE, 1981).

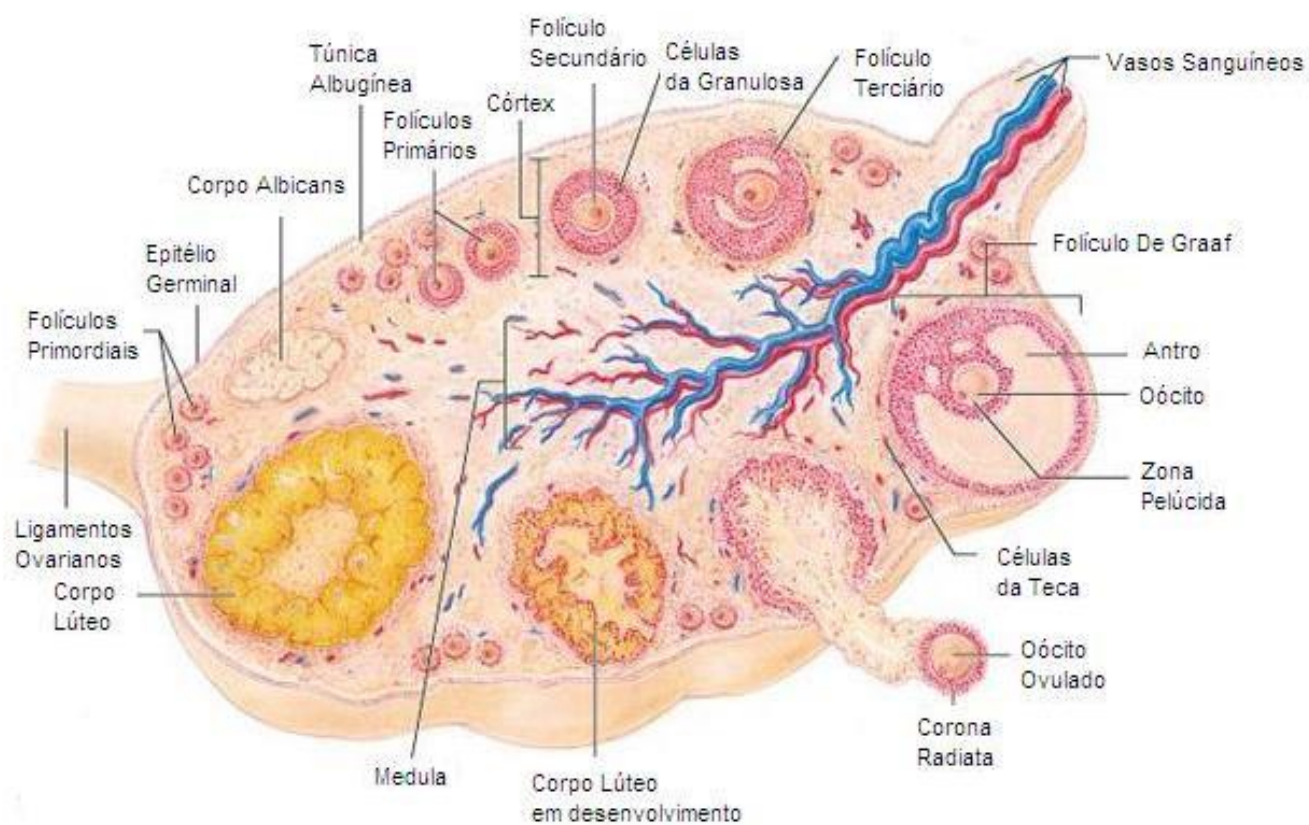


Figura 1. Organização estrutural do ovário mamífero. Adaptado de <http://vacadsi.org/jsr/ovary.jpg>

2.2 - Oogênese

A oogênese em mamíferos pode ser definida como uma seqüência de eventos pelo qual as células germinativas primordiais (CGP) desenvolvem-se e diferenciam-se até a formação do oócito haplóide fecundado (RÜSSE, 1983). A oogênese inicia-se na vida fetal, mas somente poderá ser completada meses ou anos mais tarde no animal adulto, após a fecundação (WASSARMAN, 1988).

A fase de multiplicação das CGP que culmina com a formação das oogônias, ocorre nos ovinos, bovinos e caprinos no 31º, 42º e 60º dias de gestação, respectivamente (BEZERRA *et al*, 1998; RÜSSE, 1983). A seguir, as oogônias iniciam a prófase da meiose e diferenciam-se em oócitos (HIRSHFIELD, 1991). A transformação de oogônia em oócito é marcada pela replicação final do DNA durante o estágio de pré-leptóteno (interfase que segue a última divisão mitótica da oogônia), preparando a célula para a divisão meiótica (GORDON, 1994).

A meiose é iniciada aos 55º e 82º dias de gestação, respectivamente em ovinos (RÜSSE, 1983) e bovinos (ERICKSON, 1966a; RÜSSE, 1983). Entretanto, no oócito primário, o processo meiótico é interrompido (1ª interrupção meiótica) e o núcleo permanece no estágio de diplóteno (ERICKSON, 1966a), conhecido como estágio de dictióteno ou de vesícula germinativa (GORDON, 1995). Os oócitos permanecem nesse estágio por vários anos, até que a maturidade sexual seja alcançada na puberdade e comecem os ciclos reprodutivos, ou seja, permanecem no estágio de prófase I até imediatamente antes da ovulação, quando então a meiose é retomada (MOORE & PERSAUD, 1994), passando do estágio de vesícula germinativa para diacinese (HIRSHFIELD, 1991). Nesse momento, inicia-se o processo de rompimento da vesícula germinativa que é seguida das fases de metáfase I, anáfase I e telófase I, quando então ocorrerá a expulsão do primeiro corpúsculo polar. Ocorre então a formação do oócito secundário, assim denominado pelo fato de seu núcleo encontrar-se na segunda divisão meiótica, que avança apenas até a metáfase II, quando então a segunda divisão meiótica é interrompida (GORDON, 1994). Esta somente será retomada caso um espermatozóide penetre no oócito (MOORE & PERSAUD, 1994).

2.3 - Foliculogênese

A foliculogênese, evento iniciado na vida pré-natal de várias espécies, caracteriza-se pela formação, crescimento e maturação folicular. Este evento inicia-se com a formação do folículo primordial e culmina com a formação do folículo maduro, pré-ovulatório ou de De Graaf (SAUMANDE, 1981; MOORE & PERSAUD, 1994).

O folículo primordial é formado quando uma camada de células somáticas pavimentosas conhecidas como células da pré-granulosa, originadas do tecido celômico, envolve o oócito (RÜSSE, 1983; WANDJI *et al.*, 1992). Ainda na fase pré-natal, alguns folículos primordiais são ativados, crescem e diferenciam-se em folículos primários (oócito circundado por uma camada de células da granulosa de forma cubóide); secundários (oócito circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa de forma cúbica (HULSHOF *et al.*, 1994) e terciários (oócito também circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa de forma cúbica, zona pelúcida mais espessa e uma cavidade antral) (FORTUNE, 1994; FIGUEIREDO, 1995). Na espécie ovina, os folículos primordiais, primários, secundários e terciários são formados aos 90°, 95°, 103° e 150° dias de gestação, respectivamente (RÜSSE, 1983; CLARCK *et al.*, 1996) e na espécie caprina aos 62°, 71°, 73° e 101° dias de gestação, respectivamente (BEZERRA *et al.*, 1998). Os folículos antrais nas espécies bovina e caprina são encontrados no 250° (ERICKSON, 1966b) e 101° (BEZERRA *et al.*, 1998) dias de gestação, respectivamente. Somente na vida pós-natal, sob efeito hormonal, os folículos podem atingir o estágio pré-ovulatório (FORTUNE, 1994).

A população folicular ovariana é bastante heterogênea (SAUMANDE, 1981). De acordo com seu grau de evolução, os folículos podem ser divididos em: a) folículos pré-antrais ou não cavitários, que abrangem os folículos primordiais, de transição, primários e secundários e b) folículos antrais ou cavitários, compreendendo os folículos terciários e folículos de De Graaf ou pré-ovulatórios (HULSHOF *et al.*, 1994).

2.3.1 - Folículos pré-antrais

Os folículos pré-antrais compreendem os folículos primordiais, de transição, primários e secundários (HULSHOF *et al.*, 1995). Estas classes foliculares podem ser diferenciadas

basicamente pelo número de camadas e morfologia das células da granulosa que circundam o oócito.

a) Folículos primordiais e de transição

Denominados ainda de folículos de reserva ou quiescentes, os folículos primordiais compreendem cerca de 90% a 95% de toda a população folicular presente no ovário (ERICKSON, 1986) e são constituídos por um oócito central circundado por uma camada de células da pré-granulosa de forma pavimentosa. O diâmetro médio dos folículos primordiais varia de acordo com a espécie animal, sendo 35,2, 18,0 e 21,5 μm em bovinos (BRAW-TAL & YOSSEFI, 1997), ovinos (AMORIM *et al.*, 2000) e caprinos (LUCCI *et al.*, 1999b), respectivamente. Quando algumas células da pré-granulosa se tornam cuboidais o folículo é classificado como “folículo de transição” ou “folículo intermediário” (SMITZ & CORTVRINDT, 2002).

b) Folículos primários

Estes folículos são constituídos por um oócito central circundado por uma única camada de células da granulosa de forma cúbica (HULSHOF *et al.*, 1994). As células da teca são recrutadas das células do estroma e podem ser reconhecidas como células individuais sobre a membrana basal numa parte do folículo primário (HIRSHFIELD, 1991; LUND *et al.*, 1999; PARROT & SKINNER, 2000). Neste estágio, as proteínas que irão formar a zona pelúcida começam a ser sintetizadas (LEE, 2000). Nas espécies bovina, ovina e caprina, o diâmetro médio dos folículos primários é de 55,06 (BRAW-TAL & YOSSEFI, 1997), 35,01 (AMORIM *et al.*, 1998) e 34,7 μm (LUCCI *et al.*, 1999b), respectivamente.

c) Folículos secundários

São caracterizados por um oócito central circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa de forma cúbica. Nos estágios mais avançados, os folículos secundários apresentam as fibras do tecido conjuntivo organizadas paralelamente à membrana basal para formar a camada de células tecais externa altamente vascularizada, fornecendo ao folículo fatores endócrinos que permitem sua expansão volumétrica exponencial (SMITZ & CORTVRINDT, 2002). Neste estágio, a zona pelúcida é claramente identificada ao redor do

oócito. Nas espécies bovina, ovina e caprina, os folículos secundários possuem diâmetro médio de 165,5 (BRAW-TAL & YOSSEFI, 1997), 66,03 (AMORIM *et al.*, 1998) e 58,94 μm (LUCCI *et al.*, 1999b), respectivamente.

2.3.2 - Folículos antrais

Os folículos são denominados de antrais quando uma cavidade preenchida por líquido (fluido folicular) é formada entre as células da granulosa que se diferenciam em células murais (na parede do folículo) e células do cúmulus (circundando o oócito) (PEDERSON & PETERS, 1968). O fluido folicular é um exsudato do plasma sanguíneo com diferentes fatores protéicos, glicoproteínas, glicosaminoglicanos, esteróides e muitos outros metabólitos sintetizados pelas células da parede folicular (GORDON, 1994). Folículos antrais podem ser classificados como folículos terciários e folículos de De Graaf, sendo estes últimos denominados ainda como maduros ou pré-ovulatórios.

a) Folículos terciários

Os folículos terciários são constituídos por um oócito circundado pela zona pelúcida, várias camadas de células da granulosa, uma pequena cavidade antral, uma membrana basal e duas camadas de células tecaais conhecidas como teca interna e teca externa (GORDON, 1994).

b) Folículos de De Graaf ou pré-ovulatórios

O folículo De Graaf ou pré-ovulatório, representa o estágio terminal do desenvolvimento folicular (HULSHOF *et al.*, 1994). A ovulação do oócito e células do cúmulus ocorre em resposta aos elevados níveis de LH durante a puberdade (LUCY *et al.*, 1992). O diâmetro dos folículos pré-ovulatórios pode variar de 1 mm em ratas a 20 mm na mulher (FORTUNE, 1994).

2.4 - População folicular em ovários mamíferos

Na espécie bovina, a população folicular foi estimada em 235.000 folículos por ovário (BETTERIDGE *et al.*, 1989). Nas espécies caprina, ovina e na mulher, este número foi

estimado em 37.646 (LUCCI *et al.*, 1999a), 160.000 (DRIANCOURT, 1991) e 2.000.000 (ERICKSON, 1986), respectivamente, mostrando que a população folicular varia com a espécie.

Além da variação individual, outros fatores como raça (CAHILL *et al.*, 1979), idade (RÜSSE, 1983), níveis hormonais (PETERS, 1976), genética (ERICKSON, 1966), estado reprodutivo – fêmeas impúberes, púberes ou prenhes (ERICKSON *et al.*, 1976) e nutricional (SCARAMUZZI *et al.*, 1993) podem exercer influência sobre a população folicular ovariana.

2.5 – Atresia folicular

Os folículos ovarianos pré-antrais representam cerca de 90% da população folicular (SAUMANDE, 1991) e são responsáveis pela constante renovação de folículos antrais no ovário (IRELAND, 1987). No entanto, cerca de 99,9% dos folículos de um ovário não ovulam, pois sofrem um processo fisiológico conhecido como atresia, que causa a morte do folículo, por via degenerativa (SAUMANDE, 1981) e/ou apoptótica (FIGUEIREDO, 1995).

A atresia acomete todas as espécies domésticas e pode ocorrer em qualquer estágio do desenvolvimento folicular (IRELAND, 1987). Segundo INGRAN (1962), vários fatores podem influenciar o processo de atresia, como idade, ciclo reprodutivo, gestação, lactação, hipofisectomia, ovariectomia unilateral, hormônios e nutrição. Independentemente da fase na qual ocorre e, apesar de ser um fenômeno natural, a atresia reduz de maneira significativa o número de oócitos que chegariam a ovular, diminuindo conseqüentemente, a produção de oócitos viáveis durante a vida reprodutiva de um animal.

Observações *in vitro* sugerem que a atresia não é um processo súbito, envolvendo a morte em conjunto de todas as células da granulosa. A viabilidade de algumas células da granulosa de folículos atrésicos e a ausência de sinais de degeneração dos oócitos, em início de atresia, sugerem que os folículos podem recuperar-se da atresia e retornar à ovulação (HIRSHFIELD, 1989).

A atresia folicular não é igualmente prevalente em todos os estágios de desenvolvimento folicular (FORTUNE, 1994). Em ratos, folículos pré-antrais atrésicos são raros, sendo a atresia predominante em folículos antrais (HIRSHFIELD, 1988).

Independentemente da fase na qual ocorre, e apesar de ser um fenômeno natural, a atresia reduz de maneira significativa o número de oócitos viáveis durante a vida útil de um animal, fazendo com que o potencial do ovário seja fracamente aproveitado.

Como citado anteriormente, a atresia pode ocorrer por via degenerativa (SAUMANDE, 1991) e/ou apoptótica (FIGUEIREDO, 1995). A isquemia é uma das principais causas do desencadeamento da morte celular por degeneração (FARBER, 1982). A redução da oxigenação celular durante a isquemia resulta em diminuição da produção de ATP afetando o funcionamento da bomba de Na^+/K^+ presente na membrana celular. As mudanças na permeabilidade membranária provocam alterações nos níveis intracelulares de Na^+ , K^+ e Ca^{++} . O aumento do influxo de Na^+ para o citoplasma, que ativa a Na^+/K^+ ATPase, associado com modificações na distribuição de Ca^{++} e com aumento de água intracelular podem levar ao aumento do volume celular, vacuolização citoplasmática e, conseqüentemente, degeneração (JENNINGS *et al.*, 1975, BARROS *et al.*, 2001). Com a evolução da degeneração, a morte celular é identificada histologicamente como necrose. No tocante à apoptose, esta é altamente dependente da expressão de genes. O balanço estabelecido entre o produto dos genes pró-apoptóticos e anti-apoptóticos pode determinar a morte celular por apoptose (HURWITZ & ADASHI, 1992). Quando a apoptose é desencadeada ocorre um desequilíbrio iônico celular e a ativação de endonucleases dependente de Ca^{++} e Mg^{++} . A ativação dessas endonucleases causa a fragmentação da molécula de DNA a cada 180 pares de bases nitrogenadas (HUGHES & GOROSPE, 1991; HURWITZ & ADASHI, 1992). A primeira característica da apoptose é a condensação periférica da cromatina nuclear (HURWITZ & ADASHI, 1992). Em seguida, ocorre compactação da célula e fragmentação citoplasmática e nuclear, resultante da formação de múltiplos corpos apoptóticos (HURWITZ & ADASHI, 1992), bem como, redução do conteúdo protéico (BLONDIN *et al.*, 1996).

Na análise histológica, as alterações indicativas de atresia em folículos pré-antrais ocorrem primariamente no oócito, sendo a picnose nuclear o primeiro sinal de atresia (JORIO *et al.*, 1991; WOOD *et al.*, 1997). Mais recentemente, SILVA *et al.* (2002) demonstraram que oócitos de folículos primordiais caprinos são mais sensíveis à degeneração do que as células da granulosa. Ultraestruturalmente, os oócitos inclusos em folículos primordiais degenerados apresentam um progressivo aumento dos vacúolos citoplasmáticos e retração oocitária, eventos que precedem o aparecimento de alterações nas células da granulosa. Também são observados sinais de danos às membranas e cristas mitocondriais presentes no ooplasma. As

células da granulosa tornam-se túrgidas e ocorre diminuição do número de organelas no seu citoplasma (TASSEL & KENNEDY, 1980). Já em folículos antrais, a picnose nuclear e a vacuolização citoplasmática ocorrem primariamente nas células da granulosa (HAY *et al.*, 1976). Em seguida, ocorre o aparecimento de alterações degenerativas nas células tecaais (O`SHEA *et al.*, 1978) e, finalmente, no oócito (HAY *et al.*, 1976).

2.6 - Ativação e crescimento dos folículos pré-antrais

Para que o crescimento dos folículos primordiais ocorra, é necessário, antes de mais nada, que eles sejam ativados. A ativação dos folículos primordiais é um processo que se dá pela passagem destes folículos do *pool* de reserva ou folículos quiescentes para o *pool* de folículos em crescimento (primário, secundário, terciário e/ou pré-ovulatório; RUSSE, 1983). O primeiro sinal de ativação dos folículos primordiais é a retomada da proliferação das células da granulosa, ou seja, o folículo primordial, o qual apresenta-se circundado por uma camada de células da granulosa de formato pavimentoso e cúbico (BRAW-TAL & YOSSEFI, 1997) transforma-se em folículo primário (VAN DEN HURK *et al.*, 1997), circundado por somente uma camada de células cubóides. Além da mudança da forma das células da granulosa, os volumes citoplasmático e nuclear do oócito aumentam consideravelmente (HIRSHFIELD, 1991). O conhecimento sobre os fatores e mecanismos envolvidos na regulação da ativação dos folículos primordiais são escassos, entretanto, existem hipóteses de que o número de folículos primordiais que deixa o *pool* de folículos quiescentes é predeterminado e, que o hormônio folículo estimulante (FSH) age sobre a ativação (BETTERIDGE *et al.*, 1989). O FSH parece estar envolvido na proliferação e diferenciação das células da granulosa *in vitro*. Aparentemente, níveis basais de FSH são necessários para o desenvolvimento de pequenos folículos (VAN DEN HURK *et al.*, 1997). HIRSHFIELD (1991) sugeriu que a ativação e o crescimento dos folículos primordiais devem ser controlados tanto por fatores endócrinos, como por fatores parácrinos. A ativação dos folículos primordiais continua assim que é iniciada, independentemente da fase do ciclo, idade e gestação (JEWGENOW & PITRA, 1993).

No tocante à ativação de folículos primordiais *in vitro*, EPPIG & O`BRIEN (1996) obtiveram sucesso após cultivo de ovários de camundonga recém-nascida, onde um grande número de folículos primordiais iniciaram seu crescimento e desenvolveram-se até o estágio de folículos secundários. Da mesma forma, a ativação de folículos primordiais bovinos

(WANDJI *et al.*, 1996b; BRAW-TAL & YOSSEFI, 1997) e babuínos (FORTUNE *et al.*, 1998) também foi alcançada com êxito após cultivo de pequenos fragmentos de córtex ovariano de fetos.

2.7 – Métodos de avaliação da proliferação das células da granulosa

Conforme foi citado anteriormente, após a ativação dos folículos primordiais ocorrem importantes mudanças no oócito e nas células da granulosa. No entanto, o estudo do crescimento de folículos primordiais depende da disponibilidade de marcadores sensíveis para detectar o início deste crescimento folicular (WANDJI *et al.*, 1996b). Inúmeros trabalhos relatam a aplicação de anticorpos monoclonais dirigidos contra o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), por ser este marcador, um indicador do comportamento biológico tumoral. A aplicação de marcadores de proliferação celular, destacando-se o uso do PCNA, assegura uma medida mais acurada da quantidade de células em proliferação, por estarem expressas nos vários estágios do ciclo celular, como a possibilidade de investigação das neoplasias de maneira simplificada, rápida e pouco dispendiosa (HALL & LEVINSON, 1990; RABENHORST *et al.*, 1993 e 1994).

Algumas técnicas consagradas utilizadas para uma análise acurada da cinética celular tais como: timidina triciada, citometria de fluxo e incorporação da bromodeoxiuridina (BrdU), além de difíceis e dispendiosas, consomem muito tempo e muitas vezes necessitam de equipamentos sofisticados, limitando seu uso rotineiro pelos patologistas (BROWN & GATTER, 1990).

2.8 - Modelos de cultivo para o estudo do desenvolvimento folicular

Espécies de roedores, como camundongos, ratos e hamsters, têm sido usadas extensivamente para estudar a ativação e o crescimento *in vitro* de folículos ovarianos. A vantagem do uso destes animais é que eles apresentam ovários de menor tamanho, permitindo o cultivo do órgão inteiro e, além disso, apresentam um curto período de foliculogênese, possibilitando a execução dos experimentos dentro de um menor período de tempo. Para animais domésticos de médio e grande porte, este modelo de cultivo não é utilizado devido às grandes dimensões do ovário. Neste caso, o cultivo de pequenos fragmentos de córtex ovariano de bovinos (WANDJI *et al.*, 1996b); BRAW-TAL & YOSSEFI, 1997), babuínos

(FORTUNE *et al.*, 1998) e humanos (HOVATTA *et al.*, 1997) tem sido realizado para estudar a ativação de folículos primordiais. Este modelo permite que nos pequenos fragmentos de córtex ovariano haja boa oxigenação, perfusão de nutrientes do meio para o tecido ovariano, manutenção do contato celular (TELFER, 1998) e prevenção de necroses (SMITZ & CORTVRINDT, 2002).

Para a obtenção de folículos pré-antrais isolados, de mamíferos de médio e grande porte, diferentes métodos têm sido aplicados, sendo a dissociação mecânica (EPPIG & SCHROEDER, 1989; HULSHOF, 1994), a digestão proteolítica pelo uso de enzimas (GREENWALD & MOOR, 1989) ou, o isolamento mecânico em combinação com dissociação enzimática parcial (FIGUEIREDO, 1993; OKTAY, 1997) as mais utilizadas. Devido à grande quantidade de matriz fibrosa existente no tecido ovariano e ao efeito prejudicial das enzimas sobre a qualidade do folículo isolado (TELFER, 1998), porções de tecido ovariano têm sido processadas através de instrumentos mecânicos como tesouras, pinças, agulhas e "Tissue Chopper" seguido de sucessivas pipetagens (FIGUEIREDO, 1995).

2.9 - Estado atual do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais

Notável progresso tem sido observado no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais em diferentes espécies animais. Em felinos (JEWGENOW & STOLTE, 1996) e marsupiais (BUTCHER & ULLMAN, 1996), já foi observado o crescimento de folículos ovarianos pré-antrais isolados após o cultivo *in vitro*, porém, sem a formação de antro. Nas espécies ovina (CECCONI *et al.*, 1999), bovina (GUTIERREZ *et al.*, 2000; McCAFFERY *et al.*, 2000) e caprina (HUANMIN & YONG, 2000) folículos pré-antrais isolados desenvolveram-se *in vitro* até o estágio antral. O desenvolvimento de folículos antrais a partir de folículos pré-antrais foi igualmente obtido para humanos (ROY & TREACY, 1993). Em suínos, folículos secundários crescidos *in vitro* chegaram até a ovulação e tiveram seus oócitos fecundados *in vitro* (HIRAO *et al.*, 1994) com desenvolvimento até o estágio de blastocisto (WU *et al.*, 2001). Apesar do grande avanço no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais obtido nas espécies supracitadas, os resultados mais satisfatórios têm sido observados em animais de laboratório. DANIEL *et al.* (1989) relataram a produção *in vitro* de embriões de ratos a partir da

fecundação de oócitos oriundos de folículos ovarianos pré-antrais cultivados *in vitro*. Em camundongos, o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais foi descrito por vários autores (EPPIG, 1997; QVIST *et al.*, 1990; CARROLL *et al.*, 1991; NAYÜDU & OSBORN, 1992; CECCONI & ROSSI, 2001). Entretanto, os melhores resultados foram observados por EPPIG & O'BRIEN (1996) que obtiveram o nascimento de camundongos a partir de folículos primordiais desenvolvidos, maturados e fecundados *in vitro*. Em outro estudo, CARROLL *et al.* (1990) obtiveram também o nascimento de camundongos, porém após o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais previamente congelados.

2.10 - Regulação do crescimento folicular

É sabido que o crescimento de folículos pré-antrais é pouco dependente de gonadotrofinas e é regulado principalmente por fatores intra-ovarianos. Inúmeros fatores de crescimento sintetizados pelas células foliculares atuam modulando o efeito das gonadotrofinas e regulando o desenvolvimento dos folículos ovarianos. A seguir serão descritos os efeitos de alguns fatores de crescimento implicados na foliculogênese.

2.10.1 – Fatores de Crescimento Transformante - β

Membro da superfamília dos fatores de crescimento transformante - β (TGF- β), exerce importante função em vários estágios do desenvolvimento folicular, como ativação de folículos primordiais, proliferação das células da granulosa e da teca, esteroidogênese e maturação oocitária (DRUMOND *et al.*, 2003; KNIGHT & GLISTER, 2003). A tabela 1 cita alguns dos principais membros pertencentes à família TGF- β e seu efeito biológico.

Tabela 1. Principais efeitos de alguns fatores pertencentes à família TGF- β

Fator	Efeito	Fonte
GDF-9	Promove o crescimento de folículos primários e a proliferação de células da teca de ratas; estimula a manutenção da viabilidade folicular e a proliferação de células da granulosa de humanos; exerce efeito sinérgico com o FSH sobre o crescimento e diferenciação de folículos pré-antrais murinos; na sua ausência não ocorre a formação de folículos secundários, levando conseqüentemente à degeneração dos oócitos inclusos em folículos primários.	NILSON & SKINNER, 2002; HREISSON <i>et al.</i> , 2002; HAYASHI <i>et al.</i> , 1999; DONG <i>et al.</i> , 1996
Ativina	Regula a esteroidogênese; reduz a produção de andrógenos pelas células da teca; induz o desenvolvimento de folículos não-cavitários.	FINDLAY, 1993
Inibina	Induz a síntese de andrógenos pelas células da teca e antagoniza o efeito da ativina.	FINDLAY, 1993
Folistatina	Inibe o crescimento de folículos primário e subseqüentemente dos demais estágios de desenvolvimento folicular.	FINDLAY, 1993
AMH	Inibe o recrutamento de folículos primordiais.	DURLINGER <i>et al.</i> , 1999
TGF- β	Estimula a proliferação de células da granulosa.	MCNATTY <i>et al.</i> , 1999
BMP-15	Estimula a expressão de KL e a proliferação de células da granulosa e inibe a expressão de receptores para o FSH.	OTSUKA <i>et al.</i> , 2000

2.10.2 – Fatores de Crescimento Epidermal

Outros fatores de crescimento envolvidos no controle de desenvolvimento folicular são aqueles pertencentes à família EGF (Fatores de crescimento epidermal): o EGF, o fator de crescimento transformante- α (TGF- α), o *heparin binding EGF-like growth factor* (HB-EGF),

a anfiregulina, a betacelulina e a epiregulina. Estudos *in vitro* têm demonstrado que o EGF promove o crescimento de folículos pré-antrais de suínos (MORBECK *et al.*, 1993), bovinos (GUTIERREZ *et al.*, 2000), hamster (ROY, 1993), camudongos (BOLAND & GOSDEN, 1994) e humanos (ROY & KOLE, 1998) e reduz os níveis de atresia em folículos pré-antrais bovinos (WANDJI *et al.*, 1996a). O TGF- α estimula o crescimento folicular pela proliferação das células da granulosa e da teca de bovinos (SKINNER & COFFEY, 1988) e inibe a ação estimulatória do FSH sobre a atividade da aromatase (ADASHI *et al.*, 1987). Estudos têm demonstrado que HB-EGF pode ser um fator mitogênico para as células da granulosa e a redução da sua expressão em folículos pré-ovulatórios pode ser essencial para a maturação folicular (PAN *et al.*, 2004). A anfiregulina, betacelulina e epiregulina estimulam a expansão das células do cúmulus e a maturação oocitária (PARK *et al.*, 2004).

2.10.3 – Oncogenes Erb-A, c-myc e WT-1

A hipótese de que oncogenes como o erb-A (MARUO, 1995), myc (LI *et al.*, 1994) e o gene do tumor de Wilms (WT-1) (HSU *et al.*, 1995; CHUN *et al.*, 1999) possam estar envolvidos com o início do crescimento folicular é baseada na sua localização em oócitos de folículos primordiais e células da granulosa de folículos em estágios iniciais de crescimento.

2.10.4 – Fatores de crescimento de nervos (NGF)

Existem fortes evidências de que neurotrofinas como fator de crescimento do nervo (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e neurotrofinas 3 e 4 exercem funções nos estágios iniciais do desenvolvimento folicular. Os RNAs que codificam esses fatores e seus receptores tirosina kinase (trk) estão presentes durante a formação e crescimento de folículos pré-antrais (OJEDA *et al.*, 2000). Uma deficiência de neurotrofinas 3 e 4 e BDNF promoveu redução significativa do número de folículos pré-antrais (OJEDA *et al.*, 1999). Entre as neurotrofinas, o polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP) é também um iniciador potencial do crescimento folicular e é expresso em nervos nas proximidades dos folículos pré-antrais de vacas (HULSHOF *et al.*, 1994) e macacas (SHULTEA *et al.*, 1992).

2.10.5 – Fatores de crescimento fibroblásticos (FGF)

Entre os fatores pertencentes ao grupo dos fatores de crescimentos de fibroblastos, podemos citar o fator de crescimento fibroblástico básico (FGFb), demonstrado em oócitos de folículos primordiais e primários e também em células da granulosa de folículos secundários e antrais de bovinos (VAN WEZEL *et al.*, 1995). Estudos demonstraram ainda que o FGFb promove o início do crescimento de folículos primordiais de ratas (NILSSON *et al.*, 2001), a proliferação das células da granulosa de galinhas (ROBERTS & ELLIS, 1999) e a produção de estradiol em folículos antrais de bovinos (VERNON & SPICER, 1994).

2.10.6 – Kit ligand

O *Kit ligand* (KL), também conhecido como Fator de Crescimento de Célula Germinativa (*Stem Cell Growth Factor*) ou Fator de Crescimento de Mastócitos, é um fator de crescimento importante na regulação do desenvolvimento folicular. YOSHIDA *et al.* (1997) mostraram que, bloqueando a interação do KL com o seu receptor (c-Kit) *in vivo*, o desenvolvimento folicular inicial foi interrompido.

Em ovários de roedores (HORIE *et al.*, 1991; MANOVA *et al.*, 1993; MOTRO & BERNSTEIN, 1993) e de ovinos (CLARCK *et al.*, 1996; TISDALL *et al.* 1997) foi detectada a expressão do c-kit em oócitos em todos os estágios de desenvolvimento folicular.

Recentes estudos demonstraram que o KL promove o crescimento oocitário, a diferenciação das células da teca (DRIANCOURT *et al.*, 2000), a proliferação das células da granulosa e a esteroidogênese (ratos: REYNAUD *et al.*, 2000; suínos: BRANKIN *et al.*, 2003).

2.10.7 – Fator de Crescimento Semelhante à Insulina (IGF)

O envolvimento dos fatores de crescimento semelhante à insulina (IGF-1 e IGF-2), seus receptores (IGFR-1 e IGFR-2) e as proteínas de ligação (IGFBP 1 a 6) na foliculogênese ovariana tem sido extensivamente estudado durante as últimas décadas. A ação do IGF

consiste em estimular a proliferação e diferenciação das células da granulosa e da teca (GIUDICE, 1995). A concentração de IGF-1 e IGF-2 não varia durante o crescimento de folículos. Em contraste, os níveis de IGFBP-2, 4 e 5 em ruminantes decresce durante o crescimento de pequenos folículos antrais para o estágio de folículos pré-ovulatórios e aumenta durante a atresia devido a uma redução no processo de degradação (BESNARD *et al.*, 1997). Desta forma, as IGFBPs atuam inibindo ou potencializando a ação dos dois tipos de IGF nas células alvo (MONGET *et al.*, 2002).

2.10.8 – Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e Hormônio Luteinizante (LH)

O hormônio gonadotrófico FSH é um crítico regulador da função ovariana. A ligação do FSH é restrita às células da granulosa e resulta em uma variedade de reações, tais como a estimulação da proliferação destas células, síntese de esteróides e expressão de receptores para o Fator de Crescimento Epidermal (EGF) e Hormônio Luteinizante (LH). Entretanto, ainda não está claro se o FSH afeta a proliferação de pequenos folículos pré-antrais. WANDJI *et al.*, (1996a) demonstraram que a proliferação das células da granulosa de folículos pré-antrais bovinos pode ser estimulada pelo FSH. Em porcas, folículos pré-antrais cresceram com sucesso *in vitro* em meio suplementado com estradiol e FSH. Em hamster, pequenos folículos pré-antrais mostraram ser dependentes de FSH, e o FSH reduziu significativamente a percentagem de folículos atrésicos (ROY & GREENWALD, 1989). QVIST *et al.*, (1990) mostraram que o crescimento de folículos no estágio primário é criticamente dependente, ou exige uma adequada concentração de FSH. Por outro lado, estudos realizados com camundongos mostraram que o FSH é indispensável somente para a formação do antro (NAYUDU & OSBORN, 1992). O modelo murino tem sido utilizado extensivamente para estudar os efeitos da estimulação gonadotrófica sobre o crescimento folicular, sobrevivência celular, formação do antro e produção de esteróides (MURRAY & SPEAR, 2000).

Em humanos, assim que a formação do folículo secundário inicia, as células da granulosa desenvolvem receptores para o FSH (OKTAY *et al.*, 1997) e as células da teca se diferenciam. Assim que as células da teca se formam, os receptores para o LH são expressos (SOKKA *et al.*, 1996; O'SHAUGHNESSY *et al.*, 1997). O LH estimula a diferenciação, a proliferação das células da granulosa e a produção de andrógenos em humanos (SMITZ & CORTVRINDT, 2002).

2.11 - Importância da composição do meio sobre o desenvolvimento folicular *in vitro*

A composição do meio é um importante fator para a obtenção de sucesso durante o cultivo de folículos pré-antrais *in vitro*. FIGUEIREDO *et al.*, (1994) descreveram que a sobrevivência dos folículos pré-antrais bovinos *in vitro* foi reduzida na ausência de hipoxantina e substratos energéticos, tais como piruvato e glutamina. Foi demonstrado também que, a adição de uma mistura de piruvato (0,23 mM), glutamina (2 mM) e hipoxantina ao meio de cultivo de base denominado controle (Meio Essencial Mínimo - MEM) suplementado com antibióticos: penicilina – 20 UI/mL, estreptomicina – 200 µg/mL, 10% de soro fetal bovino e ITS (insulina – 6,25 µg/mL, transferrina – 6,25 ng/mL e selênio – 6,25 ng/mL) aumentou significativamente a percentagem de folículos morfolologicamente normais de 29,4% (meio controle) para 78,0% (meio tratado). JEWGENOW (1998) também mostrou que a adição de piruvato, glutamina e hipoxantina ao meio de cultivo (MEM) é essencial para o crescimento de folículos pré-antrais felinos *in vitro*.

2.12 - A solução à base de água de coco

A solução à base de água de coco (SBAC) é um meio rico em nutrientes e de baixo custo que tem sido utilizada com sucesso para a maturação de oócitos (BLUME *et al.*, 1997a) e cultivo de embriões bovinos (BLUME *et al.*, 1997b) e murídeos (BLUME & MARQUES Jr., 1994). A SBAC é composta de duas partes de água de coco filtrada, uma parte de citrato de sódio a 5% e uma parte de água ultrapura (NUNES, 1998). Assim, a SBAC tem sido eficientemente utilizada para conservação de sêmen caprino (NUNES & SALGUEIRO, 1999), ovino (GUERRA & NUNES, 1999), suíno (TONIOLLI *et al.*, 1998), humano (NUNES, 1998) e canino (CARDOSO *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2001) bem como, para o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos (SILVA *et al.*, 2004).

A água de coco é uma solução ácida, natural e estéril, composta de sais, proteínas, açúcares, vitaminas, gorduras neutras (MARQUES, 1982), além de indutores da divisão celular e eletrólitos diversos, que lhes conferem densidade e pH compatíveis com o plasma sanguíneo (BLUME & MARQUES Jr., 1994). A composição química da água de coco maduro, variedade anão é mostrada na Tabela 2.

Tabela 2. Composição da água de coco anão maduro.

1. Aminoácidos	µg/ml
Alanina	177.1
Aminobutírico	168.8
Arginina	16.8
Asparagina	10.4
Aspártico	5.4
Fenilalanina	10.2
Glicina	13.9
Glutâmico	78.8
Glutamina	13.4
Histidina, Metionina e Hidroxipolina	Traços
Homoserina	5.2
Leucina	31.7
Lisina	22.5
Prolina	21.6
Serina	65.8
Tirosina	3.1
Treonina	26.3
Valina	15.1
2. Açúcares	
Frutose	8.9
Glicose	2.46
Sacarose	2.51
3. Vitaminas	
Ácido fólico	0.003
Ácido nicotínico	0.64
Ácido pantotéico	0.52
Biotina	0.02
Tiamina e Piridoxina	0.01
4. Minerais	
Cálcio	Traços
Cloro	183.0
Cobre	0.04
Enxofre	24.0
Ferro	0.10
Fósforo	37.0
Magnésio	30.0
Potássio	312.0
Sódio	105.0

Fonte: NUNES & COMBARNOUS, 1995.

Na Índia, foram isoladas e identificadas na água de coco, substâncias promotoras do crescimento, como citocininas endógenas e ainda traços de zeatina ribozídeo. A zeatina é a citocina natural mais ativa, sendo dez vezes mais potente que a cinetina. Têm sido demonstrados vários efeitos das citocinas sobre importantes processos fisiológicos como a floração, expressão sexual e formação de frutos (NUNES & SALLES, 1993).

Inúmeras são as utilidades da água de coco. Em virologia, a água de coco é utilizada para o desenvolvimento de meristemas vegetativos e florais, cujo cultivo é à base de um método de cura para as plantas infectadas com vírus. É ainda utilizada como fonte de fatores de crescimento para as culturas de tecido destinados ao estudo da biossíntese de vírus vegetais (PREVOT, 1968). GOMES (1977) descreveu que a água de coco possui atividade anti-helmíntica, tenicida e diurética. É ainda recomendada contra icterícias e irritações gastrintestinais.

A água de coco seja como meio líquido ou sólido (adicionada de 2% de Ágar), é um bom meio de cultura para fungos, leveduras industriais, bactérias formadoras de ácidos, larvas de mosca-das-frutas, para germinação de sementes de orquídeas e, quando alcalinizada, para bactérias intestinais (PICADO, 1942).

BRITO & DREISS (1943) relataram que a injeção endovenosa de água de coco causou diurese sem efeitos colaterais, assim como resposta diurética em casos de nefrite e cirrose atrófica com ascite. Para MAJUMDAR (1951), a água de coco pode ser usada com sucesso no edema nutricional.

Além de se constituir um excelente reidratante, a água de coco pode ser ainda um substituto de emergência para o plasma sangüíneo. Estudos revelaram semelhanças de densidade, acidez, aminoácidos essenciais, vitaminas e eletrólitos da água de coco com o sangue, podendo a mesma ser utilizada como soro improvisado em paciente com desidratação grave ou desnutrição protéica avançada (ÁGUA, 1984).

NOGUEIRA & VASCONCELOS (2000) utilizaram a água de coco como meio de cultura em conservante de córnea de coelhos. O conservante água de coco não apresentou qualquer alteração em olhos de coelhos após uso demorado, comprovada sua hígidez frente aos exames microscópico (“*in vivo*”) e histopatológico e, ainda, demonstrou “*in vitro*” ter

propriedades de manutenção da deturgência e na conservação do epitélio e endotélio. Os exames histopatológicos não evidenciaram alterações estruturais expressivas entre as córneas conservadas em conservante água de coco e as conservadas no conservante Optisol®.

COMBARNOUS & FERREIRA-NUNES *et al.* (1995) isolaram da água de coco, uma molécula pertencente ao grupo das auxinas, o Ácido 3-Indol-Acético (IAA), que tem ação benéfica sobre os espermatozóides. O IAA é um hormônio que atua no crescimento de vegetais (BARBIER-BRYGOO, 1995), ligando-se às proteínas solúveis da seiva, sendo transportado a receptores transmembranários, provocando, direta ou indiretamente, respostas celulares variadas (TONIOLLI *et al.*, 1996), tais como o aumento da plasticidade da parede celular, aumento da entrada de água na célula e alteração do metabolismo dos ácidos nucléicos e da respiração celular (GALSTON & PURVES, 1960), o que promove o crescimento da célula (BARBIER-BRYGOO, 1995). Atualmente, estão sendo realizados estudos utilizando o IAA na conservação de células animais. TONIOLLI *et al.* (1996) utilizaram o IAA para conservar sêmen suíno a 15°C, apresentando resultados satisfatórios. Recentemente FERREIRA *et al.*, (2001) demonstraram que o IAA pode ser utilizado com sucesso para conservação de folículos pré-antrais caprinos a 4°C por até 24 h.

3 - Justificativa

Estudos referentes aos fatores e mecanismos envolvidos na regulação e ativação dos folículos primordiais são escassos, especialmente em animais de produção, como caprinos. A quase totalidade (99,9%) dos folículos primordiais presentes nos ovários ao nascimento torna-se atresícos durante o seu desenvolvimento. Neste contexto, diversos autores têm investigado o efeito de vários componentes no cultivo de folículos pré-antrais, tanto de animais de laboratório, como animais domésticos como vaca, cabra e ovelha, visando melhores condições de cultivo *in vitro* para promover o desenvolvimento folicular e reduzir as perdas verificadas *in vivo*.

Os folículos primordiais constituem a maioria dos folículos, compreendendo cerca de 90 a 95% de toda população folicular presente no ovário mamífero. No entanto, para que estes folículos possam entrar em fase de crescimento (transição, primário, secundário, terciário e/ou pré-ovulatório), é preciso que sejam ativados, ou seja, retomem a proliferação das células da granulosa, bem como aumentem os volumes citoplasmático e nuclear do oócito. Assim, é de fundamental importância testar a eficiência de meios de cultivo comerciais (MEM) e alternativos, como a solução à base de água de coco, sobre o cultivo *in vitro* de folículos primordiais caprinos. Trabalhos recentes, elaborados por Silva et al. (2004), demonstraram que a adição de SBAC (25 %) ao MEM proporciona a manutenção da viabilidade e das percentagens da ativação de folículos caprinos similares ao MEM. Entretanto, não é conhecido se proporções inferiores a 25% de SBAC ao MEM podem incrementar a ativação e viabilidade folicular *in vitro*.

Neste contexto, sabendo-se da grande relevância econômica que a espécie caprina representa para várias regiões do mundo, como o Nordeste brasileiro, é de extrema importância o desenvolvimento de um sistema de cultivo *in vitro* capaz de ativar esses folículos e assegurar seu posterior crescimento *in vitro*, otimizando, no futuro, o aproveitamento do potencial oocitário desses animais e incrementando a eficiência da reprodução animal.

4 - Hipótese científica

Baseado na revisão descrita formulou-se a seguinte hipótese:

Folículos primordiais caprinos podem ser ativados e crescerem *in vitro* utilizando-se solução à base de água de coco em diferentes concentrações.

5 - Objetivos

Geral:

- Desenvolver um protocolo para ativação e crescimento *in vitro* de folículos primordiais caprinos

Específicos:

- Comparar a eficiência das soluções à base de água de coco (SBAC), MEM ou soluções mistas (SBAC + MEM) sobre a viabilidade, ativação e crescimento *in vitro* de folículos primordiais caprinos.
- Avaliar morfolologicamente os folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro* em SBAC, MEM ou soluções mistas (SBAC + MEM).

6. Artigo (Submetido)

DEVELOPMENT OF GOAT PRIMORDIAL FOLLICLES AFTER *IN VITRO*
CULTURE OF OVARIAN TISSUE IN MINIMAL ESSENTIAL MEDIUM
SUPPLEMENTED WITH COCONUT WATER

Periódico: Theriogenology

DEVELOPMENT OF GOAT PRIMORDIAL FOLLICLES AFTER *IN VITRO* CULTURE OF OVARIAN TISSUE IN MINIMAL ESSENTIAL MEDIUM SUPPLEMENTED WITH COCONUT WATER

F. S. Martins^a, R. Van den Hurk^b, R. R. Santos^a, J. R. V. Silva^a, M. H. T. Matos^a, J. J.H. Celestino^a, A. P. R. Rodrigues^a, C. Pessoa^c, F. V. A. Ferreira^d, J. R. Figueiredo^a

^a *Laboratory of Manipulation of Oocytes Enclosed in Preantral Follicles – LAMOFOPA, Faculty of Veterinary, State University of Ceará, Av. Paranjana, 1700, Campus do Itaperi, Fortaleza 60740-000, CE, Brazil*

^b *Department of Farm Animal Health, Section of Reproduction, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands*

^c *Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil*

^d *Department of Pathology, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil*

Abstract

The development of culture systems for primordial follicles is important to study their *in vitro* growth and differentiation. In this study, we investigated the effect of Minimal Essential Medium (MEM), Coconut Water Solution (CWS) and MEM supplemented with CWS on the morphology and activation of goat primordial follicle after culturing ovarian cortical tissue. Cortical tissue pieces were cultured for 1 and 5 days in MEM, CWS or MEM supplemented with 5, 10, 20, 50, 80, 90, 95% of CWS. Both MEM and CWS were supplemented with BSA, ITS, glutamine, pyruvate and hypoxanthine. At day 0 and after 1 and 5 days of *in vitro* culture, the cortical pieces were fixed for histological evaluation. Based on their morphology, follicles were classified as primordial or developing and intact or atretic. Follicular diameter was evaluated before and after culture. Mitotic activity of granulosa cells was studied by immunolocalization of proliferation cell nuclear antigen (PCNA). The results showed that, after 5 days culture, concomitant with the increase of development follicles, the percentages of primordial follicles was reduced ($P < 0.05$), in all media tested, when compared to days 0 and 1. After 5 days culture, the highest rate of primordial follicle activation was observed, when ovarian pieces were cultured in MEM or MEM supplemented with 5 or 10%

CWS. However, culturing follicles for 5 days in a mixture of MEM and 20% or higher percentages of CWS reduced their activation and viability after 5 days culture. In all media tested, mean follicular diameters had significantly increased after 5 days culture when compared to those measured at day 0 and day 1. Immunohistochemical analysis showed that both in non-cultured and cultured tissues, primordial follicles generally do not stain for PCNA, whereas after culture the granulosa cells of developing follicles do express PCNA. In conclusion, goat primordial follicle are activated and kept viable after *in vitro* culture in MEM or in a mixture of MEM with low proportions (10% or less) of CWS. Compared to MEM, however, addition of CWS to MEM, does not improve the survival, activation and further development of the primordial follicle population in culture goat ovarian cortical pieces.

Keywords: Goat; Ovary; Primordial Follicles; *In vitro*; Coconut Water

1. Introduction

The primordial follicles begin to develop in the early stage of fetal life and after birth the number of primordial follicles is established [1]. However, of the thousands of primordial follicles present at birth, the vast majority (99,9%) becomes atretic during growth and maturation and a small number of follicles achieve maturity and ovulate [2]. Thus, the study of early folliculogenesis as well as the development of *in vitro* conditions to promote primordial follicle development is very important to reduce the follicular demise that occurs *in vivo*. Better knowledge of the culture conditions is also very important for the study of factors involved in the activation and further growth of primordial follicles. Optimal *in vitro* culture conditions may lead to the generation of large numbers of healthy oocytes that can be

used for *in vitro* fertilization (IVF) procedures, intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and cloning.

Over the last two decades, many culture systems have been developed with the aim to promote activation and growth of primordial follicles *in vitro*, although the knowledge about the factors that control the earliest stages of folliculogenesis is still scarce. During the onset of follicle growth the enclosed oocyte begins to grow and the flattened pre-granulosa cell of primordial follicles become cuboidal and begin to proliferate [3]. The success of studies on the initiation of follicular development depends on the availability of sensitive markers, like the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) [4], to detect the onset of follicular growth. Several studies showed that expression of PCNA is correlated with the initiation of follicular growth in different species (humans: [5][6]; non-human primates: [7]; bovine: [8][9]; ovine: [10], murine: [11] and caprine: [12]).

When studying primordial follicle activation *in vitro*, the type of medium used has a significance influence on follicular survival and growth. MEM has been used for culturing ovarian tissue: (bovine: [13]; caprine: [12]) and isolated preantral follicles (bovine: [14]; murine: [15]). Coconut water solution (CWS) is a natural and sterile solution, which is cheap and rich in nutrients, like proteins, sugars, vitamins, salt and neutral lipids [16], and substances that can induce cellular division and different electrolytes that provide nutrients to keep the survival and viability of cryopreserved male and female gametes [17]. Nunes & Combarrous [18] isolated indole-3-acetic acid (IAA) an important molecule present in coconut water. Those authors showed that IAA, belong to a auxins group, has a beneficial effect on the metabolism of goat sperm, increasing motility and fertility rate and permitting its conservation by long times. In India, substances that promote growth in plants such as endogen cytokines and zeatine ribozide have been isolated from coconut water [19]. Silva *et al.* [12] suggested

that IAA can binds to certain animal growth factors present in the ovarian tissue, the complex modulating the action of the growth factors.

Coconut water solution has successfully been used for oocyte (murine: [20]) and embryo culture (murine: [21]), as well as for culture and preservation of goat preantral follicles *in vitro* [22][12][23]. Silva *et al.* [12] demonstrated that the activity and viability of early-staged follicles cultured in MEM plus 25% CWS was similar to those cultured in MEM alone, and that follicular viability was reduced when the proportion of CWS was increased. Thus far, however, the effect on primordial follicles of MEM and CWS mixtures, consisting of relatively low percentages of CWS, are unknown.

The aim of this work was to investigate the effects of MEM, CWS or mixtures of MEM with low or high proportions of CWS on viability, activation and further growth of goat primordial follicles cultured for 5 days. Additionally immunohistochemical localization of proliferating cell nuclear antigen was performed to evaluate granulosa cell proliferation.

2. Materials and methods

2.1. Ovaries

Ovaries (n=10) from five mixed breed goats were collected at a local slaughterhouse. Immediately after death of the animals, the ovaries were washed in alcohol 70% for 10 seconds following two times in saline solution 0.9% for 10 seconds. The pair of ovaries from each animal was transported in saline solution 0.9% to the laboratory at 37° C within 1 h. In the laboratory, from each animal, the ovaries were stripped of surrounded fat tissue and ligaments and then cut in half, where after the medulla, large antral follicles and corpora lutea were removed. Subsequently, the ovarian cortex was divided in 19 fragments of approximately 3mm x 3mm x 1mm.

2.2. *In vitro* culture of ovarian tissue

One fragment was taken randomly and immediately fixed for histological examination (control). The 18 fragments remaining were cultured individually in a culture dish with 24-wells, each containing 1 ml of culture media at 39°C with 5% CO₂ in air. The media tested were: (1) minimum essential medium (MEM – osmolarity: 300 mOsm/l, pH: 7.2 – Cultilab, Rio de Janeiro, Brazil), and (2) sterile coconut water solution composed of two parts of coconut water, one part of pure water and one part of sodium citrate 5% (final osmolarity: 300 mOsm/l and pH: 7.2). Coconut water was obtained from coconuts (6 months old) collected from the green beach variety of the coconut - palm (*Cocos nucifera*). Both media were supplemented with antibiotics (100 µg/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin and 0.25 µg/ml fungizone), ITS (insulin 6.25 µg/ml, transferrin 6.25 µg/ml, and selenium 6.25 ng/ml), 0.23 mM pyruvate; 2 mM glutamine; 2 mM hypoxanthine; and 1.25 mg/ml BSA.

The ovarian cortex fragments were cultured for 1 and 5 days in nine different culture media as described below.

- Minimum Essential Medium (MEM)
- MEM plus 5% CWS (MEM/5% CWS)
- MEM plus 10% CWS (MEM/10% CWS)
- MEM plus 20% CWS (MEM/20% CWS)
- MEM plus 50% CWS (MEM/50% CWS)
- MEM plus 80% CWS (MEM/80% CWS)
- MEM plus 90% CWS (MEM/90% CWS)
- MEM plus 95% CWS (MEM/95% CWS)
- Coconut water solution (CWS)

2.3. Histological evaluation and assessment of granulosa cells proliferation by PCNA

Immediately after fragmentation, representative pieces of ovarian cortex were immersion-fixed for 12 h in 10% neutral buffered formaldehyde (pH 6.8-7.2) to serve as non-cultured controls. After 1 or 5 days of culture in each medium, the pieces of ovarian cortex were fixed as described above, dehydrated in a graded series of ethanol, clarified with xylene and embedded in paraffin wax. For each piece of ovarian cortex, 7 µm thick tissue sections were mounted on coated slides and stained with Periodic Acid Schiff and hematoxylin. After 5 days culture, some slides were stained with antibodies for PCNA (DAKO, Carpinteria, CA, USA) as described previously [11]. Briefly, the sections were deparaffinized, rehydrated and treated for 8 min at 93 – 98 °C in citric buffer at pH 6, and then incubated for 30 min at room temperature (~20 °C) in 3% H₂O₂ for 30 min to block endogenous peroxidase activity. After washing, normal rabbit serum was added for 20 min at room temperature to inhibit non-specific binding. The first antibody was incubated at a dilution of 1:50 for 18h at 8°C followed by washing and incubation in rabbit anti-mouse IgG (DAKO, Carpinteria, CA, USA) at 1:200 dilution for 30 min. In control sections, the primary antibody was replaced by Tris-buffered saline. Finally, streptavidin–biotin complex (DAKO, Carpinteria, CA, USA) was added for 30 min at room temperature, followed by diaminobenzidine (DAB - DAKO, Carpinteria, CA, USA) for a further 7 min. After completing the reactions, the sections were counterstained with hematoxylin and evaluated for the presence or absence of PCNA. All the sections were evaluated with optical microscope (200 and 400x magnification). From each medium and after each culture period, approximately 150 follicles were randomly evaluated.

2.4. Follicle classification and measurement

The follicles were classified individually according to shape and number of granulosa cells layers around the oocyte as primordial (one layer of flattened granulosa cells) or developing follicles, i.e., intermediate (one layer of flattened to cuboidal granulosa cells), primary (a single layer of cuboidal granulosa cells), or secondary (two or more layers of cuboidal granulosa cells). The percentages of primordial and developing follicles were calculated on day 0 (control) and after 1 and 5 days of culture in each medium. In addition, follicular diameter was taken using only intact follicles from day 0 and after *in vitro* culture for 1 and 5 days. Only follicles with a visible oocyte nucleus were evaluated to avoid counting the same follicle twice. Follicular quality was evaluated based on morphological parameters such as: oocyte and granulosa cells morphology and basement membrane integrity [24]. The primordial and developing follicles were classified as morphologically normal (follicles containing an intact oocyte and granulosa cells well-organized in layers without pyknotic nucleus) and degenerated follicles (oocyte with pycnotic nucleus, retracted cytoplasm and disorganized granulosa cells detached from the basement membrane) [24].

2.5. Statistical analysis

The percentage of morphologically normal follicles, as well the percentage of primordial or developing follicles in non-cultured tissue or after 1 and 5 days culture in different media were evaluated by a Chi-squared test (Instat for Macintosh). Follicle diameters in non-cultured and cultured tissue were compared by ANOVA and Kruskal-Wallis test. Values were considered statistically significant when $P < 0.05$.

3 – Results

3.1. Goat primordial follicle activation *in vitro*

The percentage of primordial and developing follicles in non-cultured ovarian cortex was 69.2 e 30.8%, respectively (table 1). After 1 day of culture, the percentage of primordial and developing follicles did not differ significantly among the tested media or when compared to day 0 ($P > 0.05$). By contrast, after 5 days culture, in all media tested, the percentage of primordial follicles was reduced significantly ($P < 0.05$) concomitant with a increase in the percentage of developing follicles when compared to (control) values of non-cultured tissue. Cortical tissue cultured in MEM for 5 days had a higher percentage of developing follicles when compared to MEM plus 20, 50, 80, 90, 95% CWS and pure CWS, but no significant differences was observed among MEM and MEM plus 5 and 10% CWS. The percentage of developing follicles cultured in MEM plus 5, 10, 20, 50, 80, 90, 95% CWS and CWS did not differ from each other, except MEM plus 5% CWS that had higher percentage of developing follicles than MEM plus 80% CWS.

Table 1. Percentage of primordial and developing follicles in non-cultured tissue and in tissue after culture for 1 and 5 days in different media.

	Primordial follicles (%)		Developing follicles (%)	
Non-cultured	69.2 (74/107)		30.8 (33/107)	
Cultured	Day 1	Day 5	Day 1	Day 5
MEM	64.6 ^{A, a} (64/99)	17.0 * ^{B, a} (15/88)	35.4 ^{A, a} (35/99)	83.0 * ^{B, a} (73/88)
MEM/5% CWS	64.0 ^{A, a} (57/89)	23.0 * ^{B, ab} (20/87)	36.0 ^{A, a} (32/89)	77.0 * ^{B, ab} (67/87)
MEM/10% CWS	63.4 ^{A, a} (52/82)	27.5 * ^{B, abc} (22/80)	36.6 ^{A, a} (30/82)	72.5 * ^{B, abc} (58/80)
MEM/20% CWS	61.3 ^{A, a} (46/75)	34.3 * ^{B, bc} (24/70)	38.7 ^{A, a} (29/75)	65.7 * ^{B, bc} (46/70)
MEM/50% CWS	64.7 ^{A, a} (44/68)	36.2 * ^{B, bc} (17/47)	35.3 ^{A, a} (24/68)	63.8 * ^{B, bc} (30/47)
MEM/80% CWS	72.9 ^{A, a} (35/48)	42.9 * ^{B, c} (12/28)	27.1 ^{A, a} (13/48)	57.1 * ^{B, c} (16/28)
MEM/90% CWS	74.4 ^{A, a} (32/43)	39.1 * ^{B, bc} (9/23)	25.6 ^{A, a} (11/43)	60.9 * ^{B, bc} (14/23)
MEM/95% CWS	71.4 ^{A, a} (20/28)	35.0 * ^{B, bc} (7/20)	28.6 ^{A, a} (8/28)	65.0 * ^{B, bc} (13/20)
CWS	75.0 ^{A, a} (21/28)	36.4 * ^{B, bc} (8/22)	25.0 ^{A, a} (7/28)	63.6 * ^{B, bc} (14/22)

* Differs significantly from non-cultured tissue (control)

A, B - Values with different letters at the same row show significant differences ($P < 0.05$)

a, b, c - Values within columns with different letters show significant differences among media composition ($P < 0.05$)

3.2. Percentage of normal follicles in non-cultured (control) and cultured ovarian cortex

Histological analysis showed that normal (Fig. 1A) and degenerated (Fig. 1B) follicles were found in non-cultured and cultured ovarian cortical pieces. In degenerated follicles, a shrunken oocyte, a pyknotic nucleus and disorganized granulosa cells were observed.

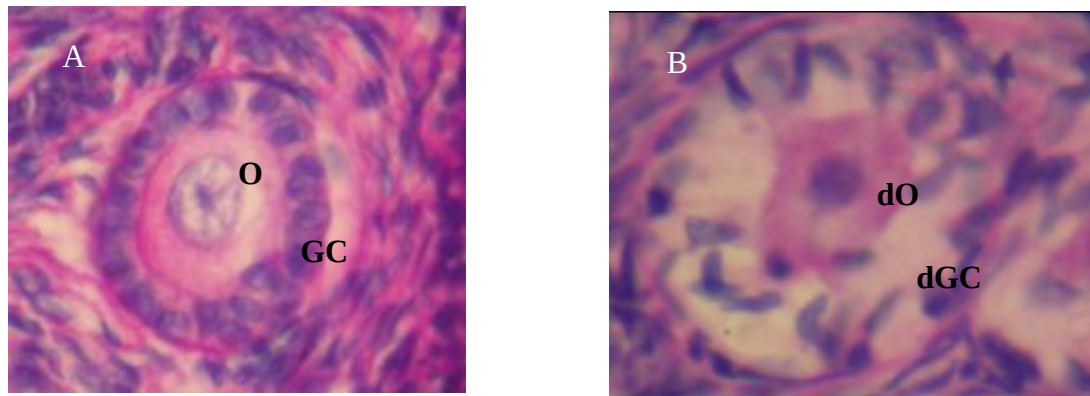


Figure 1 – Histological section of (A) normal and (B) degenerated developing follicle after staining with PAS-hematoxylin. O: oocyte, GC: granulosa cells, dO: degenerated oocyte, dGC: degenerated granulosa cells (400x magnification)

Table 2 shows the percentage of normal follicles in non-cultured (day 0: control) ovarian cortical pieces and after 1 and 5 day culture in different media. Culture of ovarian tissue for 1 and 5 days, in all media tested, significantly reduced the percentage of intact follicles when compared to non-cultured cortical pieces, except follicles cultured for 1 day in MEM. With the increase of culture period from 1 to 5 days, a significant reduction in the percentage of intact follicles was observed in tissue cultured in MEM plus 50, 80 and 90% CWS. After 1 day culture, a progressive and significant reduction ($P<0.05$) in the percentage of normal follicles was observed in MEM containing increasing proportions of CWS from 0 to 10, 50, 80 and 95%. No significant differences were observed with the increase of CWS from 0 to 5%, 5 to 10%, 10 to 20%, 20 to 50%, 80 to 90%, and from 95 to 100%. After 5 days culture, MEM, MEM plus 5 and 10% CWS showed significantly higher percentage of normal follicles when compared to the other media, except between MEM plus 5% CWS and MEM

plus 20% CWS that had similar percentage of normal follicles. The percentage of intact follicles in MEM/80, 90, 95% CWS and CWS were similar.

Table 2. Percentage of normal follicles in non-cultured tissue and in tissue after culture for 1 and 5 days in different media.

Non-cultured	83.6 % (107/128)	
Cultured	Day 1	Day 5
MEM	81.1% ^{A, a} (99/122)	68.2% * ^{B, a} (88/129)
MEM/5% CWS	74.2% * ^{A, ab} (89/120)	66.9% * ^{A, ab} (87/130)
MEM/10% CWS	68.3% * ^{A, bc} (82/120)	67.8% * ^{A, a} (80/118)
MEM/20% CWS	60.0% * ^{A, cd} (75/125)	56.9% * ^{A, b} (70/123)
MEM/50% CWS	54.8% * ^{A, d} (68/124)	38.4% * ^{B, c} (48/125)
MEM/80% CWS	41.7% * ^{A, e} (48/115)	24.1% * ^{B, d} (28/116)
MEM/90% CWS	38.4% * ^{A, e} (43/112)	20.2% * ^{B, d} (23/114)
MEM/95% CWS	23.5% * ^{A, f} (28/119)	15.7% * ^{A, d} (20/127)
CWS	22.3% * ^{A, f} (27/121)	17.7% * ^{A, d} (22/124)

* Differs significantly from non-cultured tissue (control)

A,B – Values with different letters at the same row show significant differences ($P<0.05$)

a,b,c,d,e,f – Values within columns with different letters show significant differences among media composition ($P<0.05$)

3.3. Follicles diameter in non-culture and cultured tissue.

Table 3 shows follicle diameter in non-cultured ovarian cortex and after *in vitro* culture for 1 and 5 days. After 5 days culture, in all media, a significant ($P<0,05$) increase in follicle diameter was seen when compared to follicles in non-cultured tissue or in tissue cultured for 1 day. Independent of culture period (1 and 5 days) no significant effect of media composition on follicular diameter was observed.

Table 3. Mean follicle diameter ($\mu\text{m} \pm \text{SD}$) in non-cultured ovarian cortex and after *in vitro* culture for 1 and 5 days.

Non-cultured	50.2 ± 7.2	
Cultured	Day 1	Day 5
MEM	49.4 ± 8.1^A	$59.0 \pm 8.5^*B$
MEM/5% CWS	49.4 ± 8.0^A	$58.4 \pm 8.8^*B$
MEM/10% CWS	49.0 ± 7.6^A	$54.6 \pm 8.7^*B$
MEM/20% CWS	48.0 ± 7.6^A	$54.8 \pm 6.0^*B$
MEM/50% CWS	50.9 ± 7.6^A	$60.5 \pm 9.0^*B$
MEM/80% CWS	52.7 ± 6.1^A	$58.2 \pm 9.4^*B$
MEM/90% CWS	53.7 ± 8.3^A	$60.0 \pm 10.0^*B$
MEM/95% CWS	53.0 ± 7.8^A	$60.5 \pm 7.6^*B$
CWS	53.9 ± 7.9^A	$61.8 \pm 9.4^*B$

* Differs significantly from non-cultured tissue (control)

A, B – Values with different letters at the same row show significant differences ($P < 0.05$)

3.4. Effect of *in vitro* culture on granulosa cell proliferation

In non-cultured ovarian cortex, PCNA staining was generally absent in granulosa cells of primordial follicles (Fig. 2A) and only a few developing follicles had PCNA positive granulosa cells. After 5 days culture, independent of the used culture medium, the majority of follicles were in developing and had intense PCNA immunostaining in granulosa cells (Fig. 2B and C). Occasionally, PCNA immunoreactivity was present in oocytes of both primordial and developing follicles (Fig. 2).

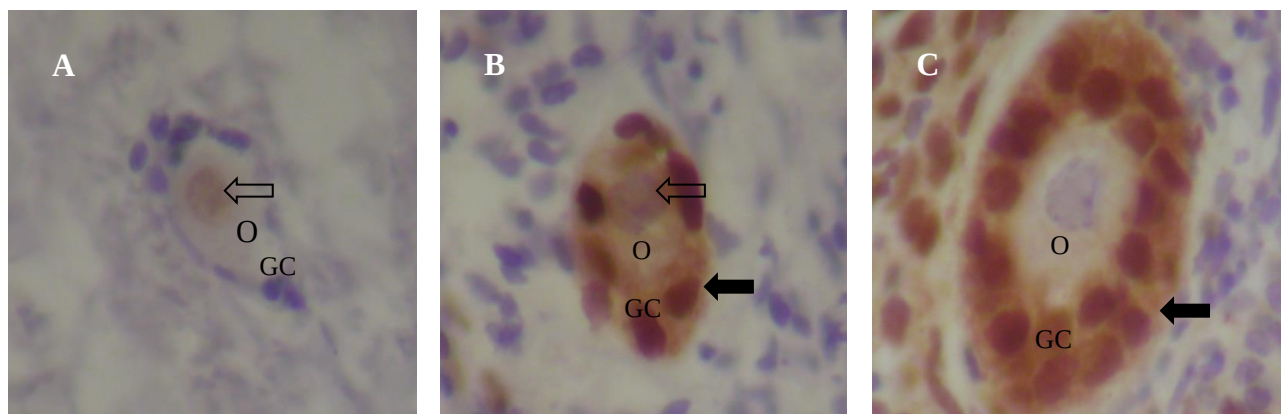


Figure 2 – Sections of ovarian tissue showing (A) primordial follicles on day 0 and (B and C) developing follicles after 5 days culture. PCNA staining in (↔) oocyte and (↗) granulosa cells. O: oocyte, GC: granulosa cells (400x magnification).

4 – Discussion

This study showed that goat primordial follicles can be activated after *in vitro* culture in MEM, CWS or in mixtures of MEM and CWS, and that, the rate of developing and viable follicles is decreased with the increase of the proportions of CWS in the mixture with MEM.

After 1 day of culture, the percentage of primordial and developing follicles was similar to control values. However, after 5 days, in all treatments, a significant reduction in the percentage of primordial follicles with concomitant increase in the percentage of developing follicles was observed. Similar results were obtained in studies with bovines [8][13] and baboon [25] in which the number of primordial follicles were dramatically reduced with concomitant increase in the number of developing follicle after 2 days culture. Possibly, the release of stimulatory factors or cessation of production of inhibitory factors by stromal, granulosa or pre-thecal cells within the culture of ovarian cortical tissue has triggered the *in vitro* activation of goat primordial follicles. In this respect, a recent study demonstrated that anti-Mullerian hormone (murine: [26]) and IGF-1 (bovine: [27]) can inhibit but not block the activation of primordial follicles *in vitro*, while the main source of this hormone are granulosa cells of more advanced follicles. Low concentration of such inhibitory factors in the cultured cortical pieces or the presence of possible stimulating ingredients, like insulin [28], in the culture media may explain primordial follicle activation *in vitro*. Locally produced growth factors that stimulate primordial follicle activation are BMP-7, Kit Ligand, GDF-9 and FGF-2 [29][30].

In this study, after 5 days culture, the supplementation of MEM with 5 and 10% of CWS kept the percentage of activated follicles similar to those cultured in MEM, whereas the use of 20% or higher proportions of CWS and pure CWS as a culture medium decreased the percentage of developing follicles. In a recent paper of our group [12], addition of more than

25% CWS to MEM appear to significantly lower the number of developing follicles, while the percentage of degenerated follicles was lower than in our studies and first appeared significantly increased by use of pure CWS. The disagreements between our results and those described by Silva *et al.* [12] could be due to differences in the quality of the follicles at the start, but also to the composition of the used coconut water, which is not commercially available as a standard solution, but was freshly prepared from different coconuts. The coconuts, however were derived from the same tree. Various authors concluded from their data that coconut water solution could be successfully used for *in vitro* culture of preantral follicle (goats: [12]; ovines: [23]) and semen preservation *in vitro* (dog: [31]). In others studies, coconut water was as efficient as TCM 199 during the bovine oocyte maturation [20] and murine embryo culture [21]. Satisfactory results using coconut water were ascribed to the many nutrients [32][33] and antioxidants in this fluid [34]. Leong and Shui [34] showed that acid ascorbic present in CWS contribute largely to antioxidant activity. Based on our findings, we however conclude that, dependent of the amount added, CWS negatively influences follicular development and therefore dissuade the use of CWS, either pure or in a mixture with MEM, as a culture medium for goat early-staged follicles.

The percentage of morphologically normal follicles in control, non-cultured tissue was similar to those described previously for goats [24] [35]. After 1 day culture, MEM was the only medium that kept the percentage of normal follicles at the level of that in control tissue. MEM is widely used to culture bovine preantral follicles *in vitro* [36][37][14][38]. Jewgenow [39] reported that MEM is more effective than TCM 199 to keep the viability *in vitro* of cat preantral follicles. The supplements added to MEM contributed *in vitro* early-staged follicle survival (goat: [12]; cat: [39]; cow: [14]). After 5 days culture, the results show that CWS reduced the follicular viability, when added in increasing proportions. Silva *et al.* [12] also demonstrated a reduction on the percentage of normal follicles after culture in medium

containing CWS. Despite being successfully used to culture oocytes [20] and to preserve semen [31], when compared to MEM, CWS did not improve the survival of *in vitro* cultured goat early-staged follicles and even had an atrophic effect on these follicles when added to MEM in higher proportions or as pure CWS.

The present data show that, independent of the tested medium composition, goat primordial follicle were able to grow during 5 days of *in vitro* culture. Our findings are in correspondence with those of Hreinsson *et al.* [40], who showed that the diameter of human early follicles increased significantly after 7 days culture. Studies of Wandji *et al.* [8] indicated that, in bovine ovarian cortical pieces, the diameter of normal primordial and developing follicles during *in vitro* culture had significantly increased after 2 days *in vitro* culture. Thomas *et al.* [41] showed that, after 6 day culture, there is a significant increase in the diameter of ovine follicle cultured *in vitro*. The increase in the diameter of baboon ovarian follicles may be due to oocyte growth and granulosa cells proliferation [42]. Indeed, the increase of follicular diameter after 5 days culture corresponded with the wide-spread PCNA immunoreactivity in granulosa cells and oocytes of developing follicles, the PCNA staining of granulosa cells being indicative of granulosa cell proliferation. PCNA staining in oocytes may be due to DNA repair [43] during the intense RNA transcription that occurs in growing oocytes [44]. In correspondence with our findings with goat follicles, the onset of bovine primordial follicle growth was also accompanied by PCNA expression in granulosa cells and oocytes [8].

In summary, this study showed that goat primordial follicles are activated *in vitro* in MEM, CWS or mixed solutions composed of MEM in different proportions of CWS. Culture in mixtures of 5 or 10% CWS and MEM kept these latter parameters in comparable levels when compared to those obtained by MEM. However, when compared to the effect of MEM alone, addition of CWS to MEM did not improve follicular viability, activation and growth. In

proportions of 20% or higher, CWS negatively influenced early follicular quality. It is concluded that, when used as culture media for goat ovarian primordial follicles, pure CWS or mixtures of CWS and MEM, compared to MEM alone, do not improve early-staged follicle survival, activation and further growth.

Acknowledgements

This study was supported by Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP). The author thanks Dr. Vicente José F. Freitas of the Faculty of Veterinary Medicine, State University of Ceará for the use of his histological equipment and Francisco José A. Queiroz of the Department of Pathology, Federal University of Ceara for his assistance in immunohistochemical work.

References

- [1] Cha KY, Han SY, Chung HM. Pregnancies and deliveries after *in vitro* maturation culture followed by *in vitro* fertilization and embryo transfer without stimulation in women with polycystic ovary syndrome. *Fert Steril* 2000;73:978-983.
- [2] Baker TG. A qualitative and cytogenetical study of germ cells in human ovaries. *Proc Reprod Soc London (Biology)* 1963;158:417-433.
- [3] Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 1991;124: 43-101.
- [4] Liu CY, Marracino RL, Keng PC, Bambara RA, Lord EM, Chou WG, Zain SB. Requirement for proliferating cell nuclear antigen expression during stages of the Chinese hamster ovary cell cycle. *Biochemistry* 1989;28:2967-2974.
- [5] Oktay K, Newton, H, Mullan J, Gosden RG. Development of human primordial follicles to antral stages in SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone. *Hum Reprod* 1998;13:1133-1138.
- [6] Oktay K, Newton H, Gosden RG. Transplantation of cryopreserved human ovarian tissue results in follicle growth initiation in SCID mice. *Fert Ster* 2000;73:599-603.
- [7] Gougeon A, Busso D. Morphologic and functional determinants of primordial and primary follicles in the monkey ovary. *Mol. Cell. Endoc.* 2000;163:33-41.

- [8] Wandji SA, Srsen V, Voss AK, Eppig JJ, Fortune JE. Initiation *in vitro* of growth of bovine primordial follicles. Biol Reprod 1996;55:942-948.
- [9] Fricke, PM, Al-Hassan MJ, Roberts AJ, Reynolds, LP, Redmer DA, Ford JJ. Effect of gonadotropin treatment on size, number, and cell proliferation of antral follicles in cows. Dom Anim Endoc 1997;14:171-180.
- [10] Lund SA, Murdoch J, Van Kirk EA, Murdoch WJ. Mitogenic and antioxidant mechanisms of estradiol action in preovulatory ovine follicles: relevance to luteal function. Biol Reprod 1999;61:388-392.
- [11] Oktay K, Schenken RS, Nelson JF. Proliferating cell nuclear antigen marks the initiation of follicular growth in the rat. Biol Reprod 1995;53:295–301.
- [12] Silva JRV, van den Hurk R, Costa SHF, Andrade ER, Nunes APA, Ferreira FVA, Lôbo RNB, Figueiredo JR. Survival and growth of goat primordial follicle after *in vitro* culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. Anim Reprod Sci 2004;81:273-286.
- [13] Braw-Tal R, Yossefi S. Studies *in vivo* and *in vitro* on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. J Reprod Fert 1997;109:165–171.

- [14] Figueiredo JR, Hulshof SCJ, van den Hurk R, Nusgens B, Bevers MM, Ectors FJ, Beckers JF. Preservation of oocyte and granulosa cell morphology in bovine preantral follicles cultured *in vitro*. *Theriogenology* 1994;41:1333–1346.
- [15] Zhao J, Taverne MAM, van der Weijden GC, Bevers MM and van der Hurk R. Effect of activin A on *in vitro* development of rat preantral follicles and localization of activin A and activin receptor II. *Biol Reprod* 2001;65:967-977.
- [16] Marques ALV. Água de coco. *Informativo Socego*. 1982;2:92.
- [17] Blume H, Marques Jr AP. Avaliação da água de coco no cultivo e criopreservação de embriões murídeos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 1994;18:97-104.
- [18] Nunes JF, Combarous Y. Utilização da água de coco e suas funções ativas como diluidor do sêmen de mamíferos domésticos. In: I Simpósio Nacional de Biotecnologia da Reprodução de Mamíferos Domésticos 1995;1:57-63.
- [19] Nunes JF, Salles FGM. El agua de coco (*Cocos nucifera* L.) “in natura”, integral y adicionada com citoquininas, como dilutor de semen caprino. *Revista Científica* 1993;3:273-281.
- [20] Blume H, Vale Filho VR, Marques AP, Saturnino HM. Avaliação da água de coco na maturação de oócitos bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 1997;21:72-75.

- [21] Blume H, Vale Filho VR, Marques AP, Saturnino HM. Uso da água de coco no cultivo de embriões bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 1997;1:78-81.
- [22] Silva JRV, Lucci CM, Carvalho FCA, Bão SN, Costa SHF, Santos RR, Figueiredo JR. Effect of coconut water and Braun-Collins solutions at different temperatures and incubation times on the morphology of goat preantral follicles preserved *in situ*. *Theriogenology* 2000;54:809-822.
- [23] Andrade ER, Amorim CA, Matos MHT, Rodrigues APR, Silva JRV, Dode MAN, Figueiredo JR. Evaluation of saline and coconut water solutions in the preservation of sheep preantral follicles *in situ*. *Small Rum Res* 2002;43:235-243.
- [24] Silva JRV, Bão SN, Lucci CM, Carvalho FCA, Andrade ER, Ferreira MAL, et al. Morphological and ultrastructural changes occurring during degeneration of goat preantral follicles preserved *in vitro*. *Anim Reprod Sci* 2001;66:209-23.
- [25] Fortune JE, Kito S, Wandji SA, Srsen V. Activation of bovine and baboon primordial follicles *in vitro*. *Theriogenology* 1998;49:441-449.
- [26] Durlinger ALL, Kramer P, Karels B, de Jong FH, Uilenbroek JTJ, Grootegoed JA, Themmen APN. Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology* 1999;140:5789-5796.

- [27] Fortune JE, GM, Rivera GM, Yang MY. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. Anim Reprod Sci 2004;82-83:109-26.
- [28] Kezele PR, Nilsson EE, Skinner MK. Insulin but not insulin-like growth factor-1 promotes the primordial to primary follicle transition. Mol Cell Endocrinol 2002;192 (1-2):37-43.
- [29] Fortune JE. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. Anim Reprod Sci 2003;78:135-63.
- [30] Van den Hurk R, Zhao J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. Theriogenology 2004 (in press).
- [31] Cardoso RCS, Silva AR, Uchoa DC, Silva LDM. Cryopreservation of canine semen using coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. Theriogenology 2002;59:743-751.
- [32] Laguna LE, Nunes JF. Avaliação físico-química da água de coco proveniente de frutos das variedades da praia e anão. Revista Brasileira de Reprodução Animal 1997;21:156.
- [33] Santoso U, Kubo K, Ota T, Tadokoro T, Maekawa A. Nutrient composition of kopyor coconuts (*Cocos nucifera* L.). Food Chem 1996;5:299-304.

- [34] Leong LP, Shui G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem.* 2002;76:69-75.
- [35] Carvalho FCA, Lucci CM, Silva JRV, Andrade ER, B  o SN, Figueiredo JR. Effect of Braun-collins and saline solutions at different temperatures and incubation times on the quality of goat preantral follicles preserved in situ. *Anim Reprod Sci* 2001;66:195-208.
- [36] Hulshof SCJ, Figueiredo JR, Beckers JF, Bevers MM, van der Donk JA, van den Hurk R. Effects of fetal bovine serum, FSH and 17 β -estradiol on the culture of bovine preantral follicles. *Theriogenology* 1995;44:217-226.
- [37] Katska L, Rinska B. The isolation and *in vitro* culture of bovine preantral follicles and early antral follicles of different size classes. *Theriogenology* 1998;50:213-222.
- [38] Saha S, Shimizu M, Geshi M, Izaike Y. *In vitro* culture of bovine preantral follicles. *Anim Reprod Sci* 2000;63:27-39.
- [39] Jewgenow K. Role of media, protein and energy supplements on maintenance of morphology and DNA-synthesis of small preantral domestic cat follicles during short-term culture. *Theriogenology* 1998;49(8):1567-1577.

- [40] Hreinsson JG, Scott JE, Rasmussen C, Swahn ML, Hsueh ALW, Hovatta O. Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. *J Clin Endoc Metab* 2002;87:316-321.
- [41] Thomas FH, Armstrong DG, Telfer EE. Activin promotes oocyte development in ovine preantral follicles *in vitro*. *Reprod Biol Endocrinol* 2003;6:1-7.
- [42] Wandji SA, Srsen V, Nathanielsz PW, Eppig JJ, Fortune JE. Initiation of growth of baboon primordial follicles *in vitro*. *Hum Reprod* 1997;12:1993-2001.
- [43] Downey KM, Tan CK, So AG. DNA polymerase delta: a second eucaryotic DNA replicase. *Bioessays* 1990;12:231-236.
- [44] Lintern-Moore S, Moore GPM. The initiation of follicle and oocyte growth in the mouse ovary. *Biol Reprod* 1979; 20:773-778

7 - Conclusão

Este estudo mostrou que folículos primordiais caprinos podem ser ativados *in vitro* em Meio Essencial Mínimo (MEM), Solução à Base de Água de Coco (SBAC) ou em soluções mistas compostas de MEM adicionado de SBAC em diferentes proporções. A adição de SBAC ao MEM não melhora a viabilidade, a ativação e o crescimento folicular, porém as proporções de 5 e 10% mantém estes parâmetros em níveis similares ao MEM.

8 - Perspectivas

As condições de cultivo *in vitro* testadas são de grande relevância para o conhecimento dos fatores envolvidos tanto na ativação de folículos primordiais, quanto no crescimento de folículos em desenvolvimento, proporcionando futuramente, oócitos viáveis que poderão ser destinados à biotecnologia da reprodução animal e humana. Este trabalho mostrou que a solução à base de água de coco é uma substância promitente no cultivo de folículos ovarianos, entretanto estudos devem ser aprimorados visando a sua utilização em âmbito comercial. Neste sentido, uma alternativa para o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais consiste na utilização da água de coco na forma de pó (ACP) enriquecida com suplementos nutricionais, o que facilitará a sua utilização, bem como a sua difusão para regiões que não disponham da matéria-prima (coco).

9 - Referências bibliográficas

- ADASHI, E.Y., RESNICK, C.E. & TWARDZIK, D.R. Transforming growth factor-alpha attenuates the acquisition of aromatase activity by cultured rat granulosa cells. *J. Cell Biochem.*, 33(1): 1-13, 1987.
- ÁGUA de coco, o elixir da longa vida, *Saúde*, 12:34-37, 1984.
- AMORIM, C.A., LUCCI, C.M., RODRIGUES, A.P.R., CARVALHO, F.C.A., FIGUEIREDO, J.R. & GONÇALVES, P.B.D. Efficiency of the specific mechanical method for the isolation of preantral follicles from ovine ovaries. *In: XIII Reunião anual da SBTE, Anais*, 26:211-211, 1998.
- AMORIM, C.A., LUCCI, C.M., RODRIGUES, A.P.R., CARVALHO, F.C.A., FIGUEIREDO, J.R., RONDINA, D., CECCHI, R., GIORGETTI, A., MARTINI, A. & GONÇALVES, P.B.D. Quantitative and qualitative analysis of the efficiency of the mechanical method for the isolation of preantral follicles from ovine ovaries. *Theriogenology*, 53:1251-1262, 2000.
- ANDRADE, E.R., AMORIM, C.A., MATOS, M.H.T., RODRIGUES, A.P.R., SILVA, J.R.V., DODE, M.A.N. & FIGUEIREDO, J.R. Evaluation of saline and coconut water solutions in the preservation of sheep preantral follicles in situ. *Small Rum. Res.*, 43:235-243, 2002.
- BAKER, T.G. A qualitative and cytogenetical study of germ cells in human ovaries. *Proc. Reprod. Soc. London (Biology)*, 158:417-433, 1963.
- BARBIER-BRYGOO, H. Tracking auxin receptors using functional approaches. *Crit. Rev. Plant.*, 14:1-25, 1995.
- BARROS, L.F., HERMOSILLA, T. & CASTRO, J. Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 130:401-409, 2001.

- BESNARD, N., PISSELET, C., MONNIAUX, D. & MONGET, P. Proteolytic activity degrading insulin-like growth factor-binding protein-2, -3, -4 and -5 in healthy growing and atretic follicles in the pig ovary. *Biol. Reprod.*, 56:1050-1058, 1997.
- BETTERIDGE, K.J., SMITH, C., STUBBINGS, R.B., XU, K.P. & KING, W.A. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, 38:87-98, 1989.
- BEZERRA, M.B., RONDINA, D., OLIVEIRA, L.C., LIMA, A.K.F., CECCHI, R., LUCCI, C.M., GIORGETTI, A. & FIGUEIREDO, J.R. Aspectos quantitativos e qualitativos da foliculogênese na fase pré-natal na espécie caprina. *Ciência Animal*, 8:30-41, 1998.
- BLUME, H. & MARQUES JR, A.P. Avaliação da água de coco no cultivo e criopreservação de embriões murídeos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 18:97-104, 1994.
- BLUME, H., VALE FILHO, V.R., MARQUES JR, A.P. & SATURNINO, H.M. Avaliação da água de coco na maturação de oócitos bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 21:72-75, 1997a.
- BLUME, H., VALE FILHO, V.R., MARQUES Jr, A. P. & SATURNINO, H.M. Uso da água de coco no cultivo de embriões bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 21:79-81, 1997b.
- BLODIN, P., DUFOUR, M. & SIRARD, M.A. Analysis of atresia in bovine follicles using different methods: flow citometry, enzyme-linked immunosorbent assay, and classic histology. *Biol. Reprod.*, 54:631-637, 1996.
- BOLAND, N.I. & GOSDEN, R.G. Effects of epidermal growth factor on the growth and differentiation of cultured mouse ovarian follicles. *Reproduction*, 101(2):369-74, 1994.
- BRANKIN, V., MITCHELL, M.R., WEBB, B. & HUNTER, M.G. Paracrine effects of oocyte secreted factors and stem cell factor on porcine granulosa and theca cells in vitro. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 1(1):55, 2003.

- BRAW-TAL, R. & YOSSEFI, S. Studies in vivo and *in vitro* on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *J. Reprod. Fert.*, 109:165-171, 1997.
- BRITO, J. C. & DREIS, G. El uso del agua de coco intravenosa como elemento terapéutico. *Arch. Hosp. Rosales*, 35(87):66-68, 1943.
- BROWN, D.C. & GATTER, K.C. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology*, 17:489-03, 1990.
- BUTCHER, L. & ULLMAN, S. Culture of preantral ovarian follicles in the grey, short-tailed opossum, *Monodelphis domestica*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 8:535-539, 1996.
- CAHILL, L.P., MARIANA, J.C. & MAULÉON. Total follicular populations in ewes of high and low ovulation rates. *J. reprod. Fert.*, 55:27-36, 1979.
- CARDOSO, R.C.S., SILVA, A.R., UCHOA, D.C., SILVA, L.D.M. Congelação do sêmen canino com um diluidor a base de água de coco acrescido de gema de ovo e glicerol. *Ciência Animal*, 10:29-36, 2000.
- CARDOSO, R.C.S., SILVA, A.R., UCHOA, D.C. & SILVA, L.D.M. Cryopreservation of canine semen using coconut water extender with egg yolk and three different glycerol concentrations. *Theriogenology*, 59:743-751, 2002.
- CARROLL, J., WHITTINGHAM, D.G. & WOOD, M.J. Effect of gonadotrophin environment on growth and development of isolated mouse primary ovarian follicles. *Journal of Reproduction and Fertility*, 93:71-79, 1991.
- CARROLL, J., WHITTINGHAM, D.G., WOOD, M.J., TELFER, E. & GOSDEN, R.G. Extraovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. *Journal of Reproduction and Fertility*, 90:321-327, 1990.

- CARVALHO, F.C.A, LUCCI, C.M., SILVA, J.R.V., ANDRADE, E.R., BÁO, S.N. & FIGUEIREDO, J.R. Effect of Braun-collins and saline solutions at different temperatures and incubation times on the quality of goat preantral follicles preserved in situ. *Anim. Reprod. Sci.*, 66:195-208, 2001.
- CECCONI, S., BARBONI, B., COCCIA, M. & MATTIOLI, M. In vitro development of sheep preantral follicles. *Biology of Reproduction*, 60:594-601, 1999.
- CECCONI, S & ROSSI G. Mouse antral oocytes regulate preantral granulosa cell ability to stimulate oocyte growth in vitro. *Journal of Developmental Biology*, 233(1):186-91, 2001.
- CHA, K.Y., HAN, S.Y. & CHUNG, H.M. Pregnancies and deliveries after *in vitro* maturation culture followed by *in vitro* fertilization and embryo transfer without stimulation in women with polycystic ovary syndrome. *Fert. Steril.*, 73:978-983, 2000.
- CHUN, S.Y., MCGEE, E.A., HSU, S.Y., MINAMI, S., LAPOLT, P.S., YAO, H.C., BAHR, J.M., GOUGEON, A., SCHOMBERG, D.W. & HSUEH, A.J.W. Restricted Expression of WT1 messenger ribonucleic acid in immature ovarian follicles: uniformity in mammalian and avian species and maintenance during reproductive senescence. *Biol. Reprod.*, 60:365-373, 1999.
- CLARCK, D.E., TISDALL, D.J., FIDLER, A.E. & MAULEON, P. Localization of mRNA e-kit during the initiation of folliculogenesis in ovine fetal ovaries. *Journal of Reproduction and Fertility*, 106:329-335, 1996.
- COMBARNOUS, Y. & FERREIRA-NUNES, J. Sperm extender including indole derivative. International patent no 2725342; PCT/FR95/01322 (FR 94-12122)
- DANIEL, S.A.J., ARMSTRONG, D.T. & GORE-LANGTON, R.E. Growth and development of rat oocytes in vitro. *Gamete Research*, 24:55-63, 1989.
- DONG, J., ALBERTINI, D.F., NISHIMORI, K, KUMAR, T.R., LU, N., & MATZUK, M.M. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*, 383:531-5, 1996.

- DOWNEY, K.M., TAN, C.K. & SO, A.G. DNA polymerase delta: a second eucaryotic DNA replicase. *Bioessays*, 12:231-236, 1990.
- DRIANCOURT, M.A. Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology*, 33:55-73, 1991.
- DRIANCOURT, M.A., REYNAUD, K., CORTVRINDT, R. & SMITZ, J. Roles of KIT and KIT LIGAND in ovarian function. *Rev. Reprod.*, 5:143-152, 2000.
- DRUMMOND, A.E., DYSON, M., LE, M.T., ETHIER, J.F. & FINDLAY, J.K. Ovarian follicle populations of the rat express TGF-beta signaling pathways. *Mol. Cel. Endoc.*, 202:53-57, 2003.
- DURLINGER, A.L., KRAMER, P., KARELS, B., DE JONG, F.H., UILENBROEK, J.T., GROOTEGOED, J.A. & THEMMEN, A.P. Control of primordial follicle recruitment by anti-Mullerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology*, 140:5789-5796, 1999.
- EPPIG, J.J. Mouse oocyte development in vitro with various culture systems. *Journal of Developmental Biology*, 60:371-378, 1997.
- EPPIG, J.J. & O'BRIEN, M.J. Development *in vitro* of mouse oocytes from primordial follicles. *Biology of Reproduction*, 54:197-207, 1996.
- EPPIG, J.J. & SCHROEDER, A.C. Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation and fertilization *in vitro*. *Biol Reprod.*, 41:268-276, 1989.
- ERICKSON, B.H. Development and radio-response of the prenatal bovine ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*, 10:97-105, 1966a.
- ERICKSON, B.H. Development and senescence of the postnatal bovine ovary. *Journal of Animal Science*, 25:800-805, 1966b.

- ERICKSON, B.H., REYNOLDS, R.A. & MURPHREE, R.L. Ovarian characteristics and reproductive performance of the aged cow. *Biology of Reproduction*, 15:555-560, 1976.
- ERICKSON, G.F. An analysis of follicle development and ovum maturation. *Seminars in Reproductive Endocrinology*, 4:233-254, 1986.
- FARBER, J.L. Membrane injury and calcium homeostasis in the pathogenesis of coagulative necrosis. *Lab. Invest.*, 47:114-123, 1982.
- FERREIRA, M.A.L., BRASIL, A.F., SILVA, J.R.V., ANDRADE, E.R., RODRIGUES, A.P.R. & FIGUEIREDO, J.R. Effects of storage time and temperature on atresia of goat ovarian preantral follicles held in M199 with or without indole-3-acetic acid supplementation. *Theriogenology*, 55:1607-1617, 2001.
- FIGUEIREDO, J.R. Isolement, caractérisation et culture et follicules préantraux chez les bovins. *Liege-Belgique: Université de Liège*, These PhD., p.113, 1995.
- FIGUEIREDO, J.R., HULSHOF, S.C.J., VAN DEN HURK, R., ECTORS, F.J., FONTES, R.S., NUSGENS, B., BEVERS, M.M. & BECKERS, J.F. Development of a combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. *Theriogenology*, 40:789-799, 1993.
- FIGUEIREDO, J.R., HULSHOF, S.C.J., VAN DEN HURK, R., NUSGENS, B., BEVERS, M.M., ECTORS, F.J. & BECKERS, J.F. Preservation of oocyte and granulosa cell morphology in bovine preantral follicles cultured *in vitro*. *Theriogenology*, 41:1333-1346, 1994.
- FINDLAY, J.K. An update on the roles of inhibin, activin and follistatin as local regulators of folliculogenesis. *Biol. Reprod.* 48:15-23, 1993.
- FORTUNE, J.E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim. Reprod. Sci.*, 78:135-63, 2003.
- FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biology of*

Reproduction, 50:225-232, 1994.

FORTUNE, J.E., KITO, S, WANDJI, S.A. & SRSEN, V. Activation of bovine and baboon primordial follicles *in vitro*. *Theriogenology*, 49:441-449, 1998.

FORTUNE, J.E., RIVERA, G.M. & YANG, M.Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Anim. Reprod. Sci.*, 82-83:109-126, 2004.

FRICKE, P.M., AL-HASSAN, M.J., ROBERTS, A.J., REYNOLDS, L.P., REDMER, D.A. & FORD, J.J. Effect of gonadotropin treatment on size, number, and cell proliferation of antral follicles in cows. *Dom. Anim. Endoc.*, 14:171-180, 1997.

GALSTON, A.W. & PURVES, W.K. The mechanism of action of auxin. *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 11:239-276, 1960.

GIUDICE, L.C., VAN DESSEL, H.J., CATALDO, N.A., CHANDRASEKHER, Y.A., YAP, O.W. & FAUSER, B.C. Circulating and ovarian IGF binding proteins: potential roles in normo- ovulatory cycles and in polycystic ovarian syndrome. *Prog. Growth Factor Res.*, 6(2-4): 397-408, 1995.

GOMES, R.P. *O coqueiro da Bahia*. 2.ed. São Paulo: Nobel, 111p., 1977.

GORDON, I. *Laboratory production of cattle embryos*. Cambridge: CAB International, 640 p., 1994.

GORDON, I. Prenatal Development of the Bovine Ovary. *In: GORDON, I., Laboratory Production of Cattle Embryos*. Cambridge: CAB Internacional: Raven Press, 43-49, 1995.

GOUD, P.T., GOUD, A.P., QIAN, C., LAVERGE, H., VAN DER ELST, J., DE SUTTER, P. & DHONT, M. In-vitro maturation of human germinal vesicle stage oocytes: role of cumuluscells and epidermal growth factor in the culture medium *Hum. Reprod.*, 13: 1638-1644, 1998.

- GOUGEON, A. & BUSSO, D. Morphologic and functional determinants of primordial and primary follicles in the monkey ovary. *Mol. Cell. Endoc.*, 163:33-41, 2000.
- GREENWALD, G.S., MOOR, R.M. Isolation and preliminary characterization of pig primordial follicles. *J. Reprod. Fert.*, 87:561-571, 1989.
- GUERRA F.F.A. & NUNES J.F. Fertilidade *in vivo* e avaliação *in vitro* do sêmen ovino resfriado e conservado em água de coco por 72 horas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 23:287-289, 1999.
- GUTIERREZ, C.G., RALPH, J.H., TELFER, E.E., WILMUT, I. & WEBB, R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. *Biology of Reproduction*, 62:1322-1328, 2000.
- HAFEZ, E.S.E. *Reproduction in farm animals*. 7.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 573p., 1995.
- HALL, P.A. & LEVINSON, D.A. Review: assessment of cell proliferation in histological material. *Journal of Clinical Pathology*, 43(2):184-192, 1990.
- HAY, M.F., CRAN, D.G. & MOOR, R.M. Structural changes occurring during atresia in sheep ovarian follicles. *Cell Tiss. Res.*, 169:515-529, 1976.
- HAYASHI, M., MCGEE, E.A., MIN, G., KLEIN, C., ROSE, U.M., VAN DUIN, M. & HSUEH, A.J.W. Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology*, 140:1236-1244, 1999.
- HIRAO, Y., NAGAI, T., KUBO, M., MIYANO, T., MIYAKE, M. & KATO, S. *In vitro* growth and maturation of pig oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, 100:333-339, 1994.
- HIRSHFIELD, A.N. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int. Rev. Cytol.*, 124:43-101, 1991.

- HIRSHFIELD, A.N. Rescue of atretic follicles *in vitro* and *in vivo*. *Biol. Reprod.*, 40:181-190, 1989.
- HIRSHFIELD, A.N. Size-frequency analysis of atresia in cycling rats. *Biol. Reprod.*, 38:1181-1188, 1988.
- HORIE, K., TAKAKURA, K. TAIL, S., NARIMOTO, K., NODA, Y., NISHIKAWA, S., NAKAYAMA, H., FUJITA, J. & MORI, T. The expression of c-kit protein during oogenesis and early embryonic development. *Biol. Reprod.*, 45:547-552, 1991.
- HOVATTA, O., SILEY, R., ABIR, R., KRAUSZ, T. & WINTSON, R.M.L. Extracellular matrix improves survival of both stored and fresh human primordial and primary ovarian follicles in long-term culture. *Hum. Reprod.*, 12:1032-1036, 1997.
- HREINSSON, J.G., SCOTT, J.E., RASMUSSEN, C., SWAHN, M.L., HSUEH, A.L.W. & HOVATTA, O. Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. *J. Clin. Endoc. Metab.*, 87:316-321, 2002.
- HSU, S.Y., KUBO, M., CHUN, S.Y., HALUSKA, F.G., HOUSMAN, D.E. & HSUEH, A.J.W. Wilms tumor protein WT1 as an ovarian transcription factor: decreases in expression during follicle development and repression of inhibin- α gene promoter. *Molec. Endocrinol.*, 9:1356-1366, 1995.
- HUANMIN, Z. & YONG, Z. *In vitro* development of caprine ovarian preantral follicles. *Theerigenology*, 54:641-650, 2000.
- HUGHES, F.M. & GOROSPE, W.C. Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia. *Endocrinology*, 129:2415-2422, 1991.
- HULSHOF, S.C.J., FIGUEIREDO, J.R., BECKERS, J.F., BEVERS, M.M., VAN DER DONT, J.A. & VAN DEN HURK, R. Effects of recombinant human FSH, 17 β estradiol,

- and thier combination on the bovine preantral follicles *in vitro*. *Theriogenology*, 44:217-226, 1995.
- HULSHOF, S.C.J., FIGUEIREDO, J.R., BECKERS, J.F., BEVERS, M.M. & VAN DEN HURK, R. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. *Veterinary Quarterly*, 18:78-80, 1994.
- HURWITZ, A. & ADASHI, E.Y. Ovarian follicular atresia as an apoptotic process: a paradigm for programmed cell death in endocrine tissues. *Mol. Cell Endoc.*, 84:19-23, 1992.
- INGRAN, D.L. Atresia. In: ZUCKERMAN, S. *The ovary*. New York: Academic Press, p. 247-273, 1962.
- IRELAND, J.J. Control of Follicular Growth and Development. *Journal of Reproduction and Fertility*, 34:39-54, 1987.
- JENNINGS, R.B., GANOTE, C.E. & REIMER, K.A. Ischemic tissue injury. *Amer. J. Pathol.*, 81:179-198, 1975.
- JEWGENOW, K. Role of media, protein and energy supplements on maintenance of morphology and DNA-synthesis of small preantral domestic cat follicles during short-term culture. *Theriogenology*, 49(8):1567-1577, 1998.
- JEWGENOW, K. & PITRA, C. Hormone-controlled culture of secondary follicles of domestic cats. *Theriogenology*, 39:527-535, 1993.
- JEWGENOW, K. & STOLTE, M. Isolation of preantral follicles from nondomestic cats – viability and ultrastructural investigations. *Reproduction Domestic Animal*, 44:183-193, 1996.
- JORIO, A., MARIANA, J.C. & LAHLOU-KASSI, A. Development of the population of ovarian follicles during the prepubertal period in D'mam and Timahdite sheep. *Anim. Reprod. Science*, 26:239-250, 1991.

- KATSKA, L. & RINSKA, B. The isolation and *in vitro* culture of bovine preantral follicles and early antral follicles of different size classes. *Theriogenology*, 50:213-222, 1998.
- KEZELE, P.R., NILSSON, E.E. & SKINNER, M.K. Insulin but not insulin-like growth factor-1 promotes the primordial to primary follicle transition. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 192 (1-2):37-43, 2002.
- KNIGHT, P.G. & GLISTER, C. Local roles of TGF-beta superfamily members in the control of ovarian follicle development. *Anim. Reprod. Sci.*, 78:165-183, 2003.
- LAGUNA, L.E. & NUNES, J.F. Avaliação físico-química da água de coco proveniente de frutos das variedades da praia e anão. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 21:156, 1997.
- LEE, V.H. Expression of rabbit zona pellucida-1 messenger ribonucleic acid during early follicular development. *Biol. Reprod.*, 63:401-408, 2000.
- LEONG, L.P. & SHUI, G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem.*, 76:69-75, 2002.
- LI, S., MARUO, T., LADINES-LLAVE, C.A., KONDO, H. & MOCHIZUKI, M. Stage-limited expresión of myc oncoprotein in the human ovary during follicular growth, regression and atresia. *Endocr. J.*, 41(1):83-92, 1994.
- LINTERN-MOORE, S. & MOORE, G.P.M. The initiation of follicle and oocyte growth in the mouse ovary. *Biol. Reprod.*, 20:773-778, 1979.
- LIU, C.Y., MARRACINO, R.L., KENG, P.C., BAMBARA, R.A., LORD, E.M., CHOU, W.G. & ZAIN, S.B. Requirement for proliferating cell nuclear antigen expression during stages of the Chinese hamster ovary cell cycle. *Biochemistry*, 28:2967-2974, 1989.
- LUCCI, C.M., AMORIM, C.A., BÁO, S.N., FIGUEIREDO, J.R., RODRIGUES, A.P.R., SILVA, J.R.V. & GONÇALVES, P.B.D. Effect of the interval of serial sections of

- ovarian tissue in the tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, 56:39-49, 1999a.
- LUCCI, C.M., AMORIM, C.A., RODRIGUES, A.P.R., FIGUEIREDO, J.R., BÁO, S.N., SILVA, J.R.V. & GONÇALVES, P.B.D. Study of preantral follicle population in situ and after mechanical isolation from caprine ovaries at different reproductive stages. *Animal Reproduction Science*, 56:223-236, 1999b.
- LUCCI, C.M., BADINGA, L., DE LA SOTA, R.L. & THATCHER, W.W. factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle. *J. anim. Sci.*, 70:3615-3626, 1992.
- LUND, S.A., MURDOCH, J., VAN KIRK, E.A. & MURDOCH, W.J. Mitogenic and antioxidant mechanisms of estradiol action in preovulatory ovine follicles: relevance to luteal function. *Biol. Reprod.*, 61:388-392, 1999.
- MAJUNDAR, N.G. Intravenous use of green coconut water in pedristic practice. *Jour. Indian Med. Assoc.*, 20:211-212, 1951.
- MANOVA, K., HUANG, E.J., ANGELES, M., DE LEON, V., SANCHEZ, S., PORNOVOST, S.M., BESMER, P. & BACHVAROVA, R.F. The expression pattern of the c-Kit ligand in gonads of mice supports a role for c-Kit receptor in oocyte growth and in proliferation of spermatogonia. *Dev. Biol.*, 157:85-99, 1993.
- MARQUES, A.L.V. Água de coco. *Informativo Socego*, 2:92, 1982.
- MARUO, T. Expression of oncoigenes, growth factors and their receptors in follicular growth, regression and atresia: their roles in granulosa cell proliferation and differentiation. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*, 47(8):738-750, 1995.
- MCCAFFERY, F.H., LEASK, R., RILEY, S.C. & TELFER, E.E. Culture of bovine preantral follicles in a serum-free system: markers for assessment of growth and development. *Biology of Reproduction*, 63:267-273, 2000.
- McNATTY, K.P., HEATH, D.A., LUNDY, T., FIDLER, A.E., QUIRKE, L., O'CONNELL,

- A., SMITH, P., GROOME, N. & TISDALL, D.J. Control of early ovarian follicular development. *J. Reprod. Fert. Supple.*, 54:3-16, 1999.
- MONGET, P., MONNIAUX, D. & DURAND, P. Localization, characterization and quantification of insulin-like growth factor-I-binding sites in the ewe ovary. *Endocrinology*, 125:2486-2493, 1989.
- MOORE, K.L., PERSAUD, T.V.N. Inicio do desenvolvimento humano. In: Moore, K.L. e Persaud, T.V.N. *Embriologia Clínica*. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p.13-38, 1994.
- MORBECK, D.E., FLOWERS, W.L. & BRITT, J.H. Response of porcine granulosa cells isolated from primary and secondary follicles to FSH, 8-bromo-cAMP and epidermal growth factor in vitro. *J. Reprod. Fertil.*, 99:577-584, 1993.
- MOTRO, B. & BERNSTEIN, A. Dynamic changes in ovarian c-kit and steel expression during the estrous reproductive cycle. *Dev. Dyn.*, 197:69-79, 1993.
- MURDOCH, W.J. Ovarian surface epithelium, ovulation and carcinogenesis. *Biol. Ver.*, 71: 529-543, 1996.
- MURRAY, A.A. & SPEAR, N. Follicular development in vitro. *Seminar in reproductive medicine*, 18(2):109-122, 2000.
- NAYUDU, P.L. & OSBORN, S.M. Factors influencing the rate of preantral and antral growth of mouse ovarian follicles *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 95:349-362, 1992.
- NILSSON, E.E., PARROTT, J.A. & SKINNER, M.K. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Mol. Cell Endocrinol.*, 175(1-2):123-130, 2001.

- NILSSON, E.E. & SKINNER, M.K. Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. *Biol. Reprod.*, 67:1018-1024, 2002.
- NOGUEIRA, R.D.M. & VASCONCELOS, P.R.L. Água de coco como meio de cultura em conservantes de córneas: estudo experimental em coelhos. *Rev. Bras. Oftalmologia*, 59(6):395-401, 2000.
- NUNES, J.F. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de animais domésticos e do homem. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 22:109-112, 1998.
- NUNES, J.F. & COMBARNOUS, Y. Utilização da água de coco e suas funções ativas como diluidor do sêmen de mamíferos domésticos. In: *I Simpósio Nacional de Biotecnologia da Reprodução de Mamíferos Domésticos*, 1:57-63, 1995.
- NUNES J.F. & SALGUEIRO C.C.M. Utilização da água de coco como diluidor do sêmen de caprinos e ovinos. *Revista Científica de Produção Animal*, 1:17-26, 1999.
- NUNES, J.F. & SALLES, F.G.M. El agua de coco (*Cocus nucifera* L.) “in natura”, integral y adicionada com citoquininas, como dilutor de semen caprino. *Revista Científica*, 3:273-281, 1993.
- OJEDA, S.R., DISSEN, G.A. & ROMERO, C. Role of neurotrophic factors in the control of ovarian development. *Frontiers in Endocrinology. Ovarian Function Research. Present and Future*, 21:171-179, 1999.
- OJEDA, S.R., ROMERO, C., TAPIA, V. & DISSEN, G.A. Neurotrophic and cell-cell dependent control of early follicular development. *Mol. Cell Endocrinol.*, 163(1-2):67-71, 2000.
- OKTAY, K., NEWTON, H. & GOSDEN, R.G. Transplantation of cryopreserved human ovarian tissue results in follicle growth initiation in SCID mice. *Fert. Ster.*, 73:599-603, 2000.

- OKTAY, K., NEWTON, H., MULLAN, J. & GOSDEN, R.G. Development of human primordial follicles to antral stages in SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone. *Hum. Reprod.*, 13:1133-1138, 1998.
- OKTAY, K., NUGETEN, D., NEWTON, H., SALHA, O., CHATTERJEE, P. & GOSDEN, R.G. Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue. *Fertility and Sterility*. 67:481-486, 1997.
- OKTAY, K., SCHENKEN, R.S. & NELSON, J.F. Proliferating cell nuclear antigen marks the initiation of follicular growth in the rat. *Biol. Reprod.*, 53:295-301, 1995.
- O'SHAUGHNESSY, P.J., McLELLAND, D. & McBRIDE, M.W. Regulation of luteinizing hormone-receptor and follicle-stimulating hormone-receptor messenger ribonucleic acid levels during development in the neonatal mouse ovary. *Biol. Reprod.*, 57:602-608, 1997.
- O'SHEA, J.D., HAY, M.F. & CRAN, D.G. Ultrastructural changes in the theca interna during follicular atresia in sheep. *J. Reprod. Fertil.*, 54:183-187, 1978.
- OTSUKA, F., YAO, Z. LEE, T., YAMAMOTO, S., ERICKSON, G.F. & SHIMASAKI. Bone morphogenetic protein-15. Identification of target cells and biological functions. *J. Biol. Chem.*, 275:39523-39528, 2000.
- PAN, B., SENGOKU, K., TAKUMA, N., GOISHI, K., HORIKAWA, M., TAMATE, K. & ISHIKAWA, M. Differential expression of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in the rat ovary. *Mol. Cel. Endoc.*, 214:1-8, 2004.
- PARK, J.Y., SU, Y.Q., ARIGA, M., LAW, E., JIN, S.L. & CONTI, M. EGF-like growth factors as mediators of lh action in the ovulatory follicle. *Science*, 303:682-684, 2004.
- PARROT, J.A. & SKINNER, M.K. Kit ligand actions on ovarian stromal cells: effect on theca cell recruitment and steroid production. *Mol. Reprod. and Dev.*, 55:55-64, 2000.
- PEDERSON, J. & PETERS, H. Proposal for a classification of oocytes and follicles in the mouse ovary. *J. Reprod. Fert.*, 17:555-557, 1968.

- PETERS, H. The development and maturation of the ovary. *Ann. Iol. Anim. Bioch. Byophys.*, 16:271-278, 1976.
- PICADO, C. El agua de coco como médio de cultivo. *Bol. Ofic. Sanit. Pan. Americ.*, 21:960-965, 1942.
- PINEDA, M.H. Female reproductive system. In: McDONALD, L.E. *Vet. Endocr. and Reprod.*, 12:303-354, 1989.
- PREVOT, P. L'utilisation du lait de coco comme accélérateur de croissance dès végétaux. *Oléagineux*, 23:177-178, 1968.
- QVIST, R., BLACKWELL, L.F., BOURNE & H. BROWN, J.B. Development of mouse ovarian follicles from primary to ovulatory stages *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 89:169-180, 1990.
- RABENHORST, S.H., BURRINI, R.C. & SCHIMITT, F.C.L. Marcadores de proliferação celular. *Revista Brasileira de Patologia Clínica*, 29(1):24-8, 1993.
- RABENHORST, S.H., BURINI, R.C., SCHIMITT, F.C.L. Ciclo celular, mecanismos reguladores e marcadores bioquímicos. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 40(3):141-47, 1994.
- REYNAUD, K., CORTVRINDT, R. SMITZ, J. & DRIANCOURT, M.A. Effects of Kit Ligand and anti-Kit antibody on growth of culture mouse preantral follicles. *Mol. Reprod. Dev.*, 56(4):483-94, 2000.
- ROBERTS, R.D. & ELLIS, R.C.L. Mitogenic effects of fibroblast growth factors on chicken granulosa and theca cells *in vitro*. *Biol. Reprod.*, 61:1387-1392, 1999.
- ROY, S.K. & GREENWALD, G.S. Hormonal requirements for the growth and differentiation of hamster preantral follicles in long-term culture. *Journal of Reproduction and Fertility*, 87:103-114, 1989.

- ROY, S.K. & KOLE, A.R. Ovarian transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptors: in vitro effects of follicle stimulating hormone, epidermal growth factor and TGF-beta on receptor expression in human preantral follicles. *Mol. Hum. Reprod.*, 4:207-214, 1998.
- ROY, S.K. & TREACY, B.J. Isolation and Long-Term Culture of Human Preantral Follicles. *Fertility and Sterility*, 59:783-790, 1993.
- RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. *Bibl. Anat.*, 24:77-92, 1983.
- SAHA, S., SHIMIZU, M., GESHI, M. & IZAIKE, Y. *In vitro* culture of bovine preantral follicles. *Anim. Reprod. Sci.*, 63:27-39, 2000.
- SANTOSO, U., KUBO, K., OTA, T., TADOKORO, T. & MAEKAWA, A. Nutrient composition of kopyor coconuts (*Cocos nucifera* L.). *Food Chem.*, 5:299-304, 1996.
- SAUMANDE, J. Ovogenèse et folliculogenèse. *Rec. Méd. Vét.*, 157:29-38, 1981.
- SAUMANDE, J. La Folliculogenèse Chez les Ruminats. *Rec. Vet.*, 167:205-218, 1991.
- SCARAMUZZI, R.J., ADAMS, N.R., BAIRD, D.T., CAMPBELL, B.K, DOWING, J.A., FINDLAY, J.K., HENDERSON, K.M, MARTIN, G.B., McNATTY, K.P. & McNEILLY, A.S. A model of follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. *Reprd. Fertil. Dev.*, 5(5):459-478, 1993.
- SCHULTEA, T.D., DESS, W.L. & OJEDA, S.R. Postnatal development of sympathetic and sensory innervation of the rhesus monkey ovary. *Biol. Reprod.*, 47:760-767, 1992.
- SILVA, A. R., CARDOSO, R.C.S. & SILVA, L.D.M. Criopreservação do sêmen canino: revisão. *Ciência Animal*, 11:119-129, 2001.
- SILVA, J.R.V., BÁO, S.N., LUCCI, C.M., CARVALHO, F.C.A., ANDRADE, E.R., FERREIRA, M.A.L. & FIGUEIREDO, J.R. Morphological and ultrastructural changes

occurring during degeneration of goat preantral follicles preserved *in vitro*. *Anim. Reprod. Sci.*, 66:209-23, 2001.

SILVA, J.R.V., FERREIRA, M.A.L., COSTA, S.H.F., SANTOS, R.R., CARVALHO, F.C.A., RODRIGUES, A.P.R., LUCCI, C.M., BÁO, S.N. & FIGUEIREDO, J.R. Degeneration rate of preantral follicles in the ovaries of goats. *Small Rumin. Res.*, 43: 203-209, 2002.

SILVA J.R.V., LUCCI, C.M., CARVALHO, F.C.A., BÁO, S.N., COSTA, S.H.F., SANTOS, R.R. & FIGUEIREDO, J.R. Effect of coconut water and Braun-Collins solutions at different temperatures and incubation times on the morphology of goat preantral follicles preserved *in situ*. *Theriogenology*, 54:809-822, 2000.

SILVA, J.R.V., VAN DEN HURK, R., COSTA, S.H.F., ANDRADE, E.R., NUNES, A.P.A., FERREIRA, F.V.A., LOBO, R.N.B. & FIGUEIREDO, J.R. Survival and growth of goat primordial follicle after *in vitro* culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. *Anim. Reprod. Sci.*, 81:273-286, 2004.

SKINNER, M.R. & COFFEY, J.R. Regulation of ovarian cell growth through the local production of transforming growth factor-alpha by theca cells. *Endocrinology*, 123: 2632-2638, 1988.

SMITH, P.W.S.O., BRAWN-TAL, R., CORRIGAN, K., HUDSON, N.L., HEATH, D.A. & McNATTY, K.P. Ontogeny of ovarian follicle development in Booroola sheep fetuse that are homozogous carriers or non-carriers of the Fec b gene. *J. reprod. fert.*, 98Ç41-54, 1994.

SMITZ, J.E.J. & CORTTVRINDT, R.G. The earliest stages of folliculogenesis *in vitro*. *Reproduction.*, 123:185-202, 2002.

SOKKA, T.A., HAMALAINEN, T.M., KAIPIA, A., WARREN, D.W. & HUHTANIEMI, I.T. Development of luteinizing hormone action in the perinatal rat ovary. *Biol. Reprod.*, 55:663-670, 1996.

- TASSEL, R. & KENNEDY, J.P. Early follicular development and atretic changes in ovary of the lamb – fine structure and histochemistry. *Aust. J. Biol. Sci.*, 33:675-687, 1980.
- TELFER, E.E. *In vitro* models for oocyte development. *Theriogenology*, 49:451-460, 1998.
- TELFER, E.E. The development of methods for isolation and culture of preantral follicles from bovine and porcine ovaries. *Theriogenology*, 45:101-110, 1996.
- THOMAS, F.H., ARMSTRONG, D.G. & TELFER, E.E. Activin promotes oocyte development in ovine preantral follicles *in vitro*. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 6:1-7, 2003.
- TISDALL, D.J., QUIRKE, L.D., SMITH, P. & MCNATTY, K.P. Expression of the ovine stem cell factor gene during folliculogenesis in late fetal and adult ovaries. *J. Mol. Endocrinol.*, 18:127-35, 1997.
- TONIOLLI, R., BUSSIÈRE, J., COUROT, M., MAGISTRINI, M. & COMBARNOUS, Y. Effect of indole-3-acetic-acid (plant auxin) on the preservation at 15°C of boar semen for artificial insemination, *Reproduction Nutritional Development*, 36:503-511, 1996.
- TONIOLLI, R., MESQUITA, D.S.M. & CAVALCANTE, S.G. Avaliação *in vitro* do Sêmen Suíno Diluído em PBS e na Água de Coco in Natura e Estabilizada. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 22:198-201, 1998.
- VAN DEN HURK, R., BEVERS, M.M. & BECKER, J. F. *In vivo* and *in vitro* development of preantral follicles. *Theriogenology*, 47:73-82, 1997.
- VAN DEN HURK, R. & ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* (in press), 2004 .
- VAN WEZEL, I.L., UMAPATHYSIVAM, K. TILLEY, W.D. & RODGERS, R.J. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor in bovine ovarian follicles. *Mol. Cell Endocrinol.*, 115(2):133-40, 1995.

- VERNON, R.K. & SPICER, L.J. Effects of basic fibroblast growth factor and heparin on follicle-stimulating hormone-induced steroidogenesis by bovine granulosa cells. *J. Anim. Sci.*, 72:2696-2702, 1994.
- WANDJI, S.A., EPPIG, J.J. & FORTUNE, J.E. FSH and growth factor affect the growth and endocrine function *in vitro* of granulosa cells of bovine preantral follicles. *Theriogenology*, 45:817-832, 1996a.
- WANDJI, S.A., FORTIER, M.A. & SIRARD, M. Differential response to gonadotrophins and prostaglandin E2 in ovarian tissue during prenatal and postnatal development in cattle. *Biology of Reproduction*, 46:1034-1041, 1992.
- WANDJI, S.A., SRSEN, V., NATHANIELSZ, P.W., EPPIG J.J. & FORTUNE, J.E. Initiation of growth of baboon primordial follicles *in vitro*. *Hum. Reprod.*, 12:1993-2001, 1997.
- WANDJI, S.A., SRSEN, V., VOSS, A.K., EPPIG, J.J. & FORTUNE, J.E. Initiation *in vitro* of growth of bovine primordial follicles. *Biol. Reprod.*, 55:942-948, 1996b.
- WASSARMAN, P.M. The mammalian ovum. In: KNOBIL, E. & NEILL, J. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, p. 69-101, 1988.
- WOOD, T.C., MONTALI, R.J. & WILDT, D.E. Follicle-oocyte atresia and temporal taphonomy in cold-stored domestic cat ovaries. *Mol. Reprod. Develop.*, 46:190-200, 1997.
- WU, J., EMERY, B.R. & CARRELL, D. T. *In vitro* growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. *Biology of Reproduction*, 64:375-381, 2001.
- YOSHIDA, H., TAKAKURA, N., KATAOBA, H., KUNISADA, T., OKAMURA, H., NISHIKAWA, S.I. Stepwise requirement of c-Kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. *Dev. Biol.*, 184:122-137, 1997.

ZHAO, J., TAVERNE, M.A.M., VAN DER WEIJDEN, G.C., BEVERS, M.M. & VAN DEN HURK, R. Effect of activin A on *in vitro* development of rat preantral follicles and localization of activin A and activin receptor II. *Biol. Reprod.*, 65:967-977, 2001.