



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ- UECE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
FACULDADE DE VETERINÁRIA- FAVET
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS-PPGCV**

ALLANA FERREIRA DA COSTA PESSOA

**INFLUÊNCIA DA INTEGRIDADE MORFOLÓGICA FOLICULAR,
DO SISTEMA E DA DURAÇÃO DO CULTIVO SOBRE O
DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS
CAPRINOS ISOLADOS**

FORTALEZA – CE

2013

ALLANA FERREIRA DA COSTA PESSOA

INFLUÊNCIA DA INTEGRIDADE MORFOLÓGICA FOLICULAR, DO
SISTEMA E DA DURAÇÃO DO CULTIVO SOBRE O
DESENVOLVIMENTO IN VITRO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS
CAPRINOS ISOLADOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Linha de Pesquisa: Reprodução e Sanidade de Pequenos Ruminantes.

Orientador: Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo.

FORTALEZA - CE

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação**Universidade Estadual do Ceará****Biblioteca Central Prof. Antônio Martins Filho****Bibliotecário(a) Responsável – Giordana Nascimento de Freitas CRB-3 / 1070****P472i** Pessoa, Allana Ferreira da Costa

Influência da integridade morfológica folicular do sistema e da duração do cultivo sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos isolados / Allana Ferreira da Costa Pessoa. — 2013.

CD-ROM. 62 f. : il. (algumas color); 4 ¾ pol.

“CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico, acondicionado em caixa de DVD Slin (19 x 14 cm x 7 mm)”.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias, Fortaleza, 2013.

Orientação: Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo.

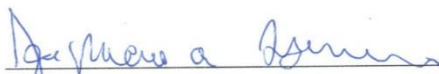
Área de concentração: Reprodução e Sanidade de pequenos ruminantes.

INFLUÊNCIA DA INTEGRIDADE MORFOLÓGICA FOLICULAR, DO
SISTEMA E DA DURAÇÃO DO CULTIVO SOBRE O
DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS
CAPRINOS ISOLADOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: 19/12/2013

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo
(Orientador)
Universidade Estadual do Ceará



Prof. Dra. Juliana Jales Holanda Celestino
(Examinadora)
Universidade da Integração Internacional da
Lusofonia Afro-Brasileira



Dra. Valdevane Rocha Araújo
(Examinadora)
Universidade Estadual do Ceará



Dra. Deborah de Melo Magalhães Padilha
(Examinadora)
Universidade Estadual do Ceará

DEDICATÓRIA

Dedico,
Ao meu Pai, Antônio José Sousa Pessoa (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Ceará (UECE) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) pela capacitação profissional que me proporcionaram. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo incentivo concedido na forma de bolsa de estudo, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Rede Nordeste de Biotecnologia (Renorbio), à Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo auxílio financeiro dessa pesquisa.

Ao meu Deus e ao meu Senhor Jesus Cristo por estarem presentes me guiando, dando força e protegendo durante todos os momentos desta caminhada.

Ao Hospital Geral de Fortaleza por ter disponibilizado estrutura física e pessoal para a realização da dosagem hormonal. Em especial a Prof.^a Dr. Diana Célia Souza Nunes Pinheiro por toda a ajuda e suporte técnico.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo por ter me recebido e orientado de forma competente e dedicada, sempre me fornecendo apoio acadêmico e incentivo profissional.

Ao Prof. Dr. Claudio Cabral Campello por toda a sua ajuda e contribuição neste trabalho, por ter se mostrado sempre disponível em me ajudar.

A Dr. Roberta Nogueira Chaves por ter me ensinado os primeiros passos metodológicos para a realização desse trabalho.

A minha equipe de trabalho Msc. Rebeca Magalhães Pedrosa Rocha, Msc. Ivina Rocha Brito, Msc. Gerlane Modesto Silva e Dr. Deborah de Melo Magalhães Padilha que me ensinaram e deram todo o suporte técnico para a realização desse trabalho.

A minha “mãe profissional”, Dr. Valdevane Rocha Araújo, a quem eu nem tenho palavras para agradecer o acolhimento e ajuda durante o período de estágio. Agradeço muito pela sua atenção e ensinamentos sempre de forma carinhosa e amiga.

Aos meus amigos IC's, Paula Correia, Aglaílson Pinheiro e Mirlla Baracho pelo acolhimento e amizade. Agradeço muito pelas experiências compartilhadas.

As minhas amigas Franciele Lunardi e Valesca Luz por me receberam em suas casas de forma tão generosa sem nem me conhecerem. Agradeço pela amizade e por toda ajuda durante o tempo que estiveram no laboratório.

A minha amiga de laboratório e de turma Francisca Tuelly Bandeira (Tutu), a quem eu nem tenho palavras para agradecer o companheirismo, a amizade e a paciência durante esses dois anos de convivência intensa. Agradeço imensamente pelo ombro amigo, pelas histórias compartilhadas, pelos risos e lágrimas divididos comigo.

Ao meu irmão e amigo em Cristo, Francisco Léo Nascimento Aguiar, a quem eu tenho imensa admiração e carinho. Agradeço por todas as vezes que se mostrou disposto a me ajudar sem nem fazer parte da minha equipe de trabalho. O enorme coração, bondade e humildade fazem dele um amigo inesquecível.

Ao Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-Antrais (LAMOFOPA) da UECE, por todo o suporte oferecido para realização deste trabalho. E a toda equipe LAMOFOPA que o compõe e já compôs: Profa. Dra. Ana Paula Ribeiro Rodrigues, Dr. Fabricio Sousa Martins, Dra. Ana Beatriz Graça Duarte, Dr. Carlos Henrique Lobo, Dra. Luciana Rocha Faustino, Dr. Cleidson Manoel Gomes da Silva, Dra. Isadora Machado Teixeira Lima, Dra. Giovanna Quintino Rodrigues, Adeline de Andrade Carvalho, Simone Vieira Castro, Débora Sales, Hudson Correia, Denise Guerreiro, Naiza Arcângela, Luana Gaudêncio, José Arnaldo Moreira de Sousa e Alzenira de Andrade Ferreira pela convivência amistosa durante todos esses anos, além de todos os conhecimentos transmitidos.

As amigas de turma Talita Câmara, Jéssica Santos, Aline Maia e Ludymila Furtado pelos momentos divertidos e conhecimentos compartilhados.

Aos meus amigos piauienses, Valdenise Carvalho, Ana Clara Brito, Íris Brito, Tiago Carvalho, Carinne Emanuelle, Danielle Smilay, Jorge Rocha, Paballo, Myckelly Agnes, pela fé e torcida a mim dispensadas.

Ao meu namorado Jethro Ribeiro Martins que me deu todo apoio e ombro amigo para que eu continuasse forte nesses dois anos de mestrado.

A minha família que foi a base mais sólida de sustentação que eu poderia ter. Agradeço pelo apoio, carinho e compreensão durante esses anos em que estive ausente. Obrigada em especial aos meus tios e padrinhos Eva Maria Ferreira da Costa e Adão Ferreira da Costa, as minhas tias Autair Ferreira da Costa Oliveira, Julieta Ferreira da Costa Barbosa, Honória Ferreira da Costa, a minha avó Anita Maria Ferreira da Costa que me ofereceram atenção, carinho e apoio. As minhas irmãs Alleana Ferreira da Costa Pessoa e Allyana Ferreira da Costa Pessoa que me alegravam e incentivavam durante todas nossas conversas. Ao meu sobrinho Luís Gustavo da Costa Pessoa Maciel a quem já amava antes mesmo de nacer. A minha mãe Ana Lúcia e ao meu Pai Antonio José Sousa Pessoa (*in memoriam*) que foram meus exemplos de vida, caráter e dedicação.

Finalmente, agradeço a todos que aqui não foram citados, mas ajudaram direta ou indiretamente para que essa dissertação fosse feita.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivos: 1) definir uma duração ideal para o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos isolados; 2) verificar a relação entre morfologia folicular (folículos íntegros, extrusos e degenerados) e a produção de estradiol e 3) avaliar o efeito dos sistemas bidimensional (2D) e tridimensional (3D) sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos. O trabalho foi dividido em três experimentos e, independentemente do experimento, o meio de cultivo utilizado foi α -MEM suplementado com GH (50ng/ml), Insulina (10ng/ml) e FSH sequencial (dia 0-6: 100ng/ml; dia 6-12: 500ng/ml; dia 12-30: 1000ng/ml). Nos experimentos I e II os folículos isolados foram cultivados por 18, 24 e 30 dias e por 30, 36 e 42, respectivamente. No experimento III, o melhor período de cultivo do experimento 2 foi repetido utilizando o sistema 2D e 3D. O desenvolvimento folicular foi avaliado com base na integridade morfológica, formação de cavidade antral, aumento do diâmetro folicular e presença de oócitos saudáveis, completamente crescidos ($\geq 110 \mu\text{m}$), taxa de retomada da meiose baseada na análise da configuração da cromatina do oócito. Ao final dos diferentes períodos de cultivo, os oócitos foram recuperados e submetidos à maturação *in vitro* (MIV). Para dosagem de estradiol, o meio de cultivo foi coletado a cada 6 dias e analisado por imunoensaio enzimático quimioluminescente. No experimento I, o percentual de retomada da meiose foi significativamente superior ($p < 0,05$) em oócitos cultivados por 30 dias (48,84%) quando comparado a oócitos cultivados por 18 (15%) e 24 dias (20,93%). No experimento II, os folículos cultivados por 30 e 36 dias apresentaram percentual de retomada da meiose significativamente superior (47,5% e 50%, respectivamente) quando comparado a 42 dias (20%). No tocante à secreção hormonal, a produção de estradiol a partir do dia 12 de cultivo foi similar entre folículos normais e extrusos, enquanto que no dia 36, ambas as categorias foram superiores ($p < 0,05$) aos folículos que degeneraram. Em conclusão, o cultivo de 36 dias é o mais aconselhável para o aumento das taxas de retomada da meiose. Além disso, a perda da integridade folicular afeta o padrão de produção de estradiol, sendo este um bom marcador para prever o destino do folículo, ou seja, se o folículo entrará em degeneração durante o cultivo.

Palavras Chave: tempo de cultivo, integridade morfológica, estradiol.

ABSTRACT

The aim of this study was to: 1) define an optimal time for the *in vitro* culture of isolated caprine preantral follicles, 2) verify the relationship between follicular morphology (intact, extruded and degenerate follicles) and hormone production, and 3) evaluate effect the two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) culture system on the *in vitro* development of goat preantral follicles. The work was divided into three experiments. Regardless of the experiment, the culture medium used was α -MEM supplemented with GH (50ng/ml) Insulin (10ng/ml) and sequential FSH (day 0-6: 100 ng / ml, day 6-12: 500 ng / mL, day 12-30: 1000 ng / mL). In the experiments I and II isolated follicles were cultured for 18, 24 and 30 days and by 30, 36 and 42, respectively. In experiment III the best culture time determined in experiment 2 (36 days) was repeated in 2D and 3D system. The follicular development was assessed based on morphological integrity, antral cavity formation, increased follicular diameter and presence of healthy cumulus-oocyte complexes with grown oocytes (> 110 mM) and an analysis of chromatin configuration of the oocyte (resumption of meiosis). After culture, the oocytes were recovered and submitted for *in vitro* maturation (IVM). For dosage of estradiol, the culture medium was collected every 6 days and analyzed by chemiluminescent enzyme immunoassay. In experiment I, there was a higher percentage of resumption of meiosis ($p < 0.05$) in oocytes cultured for 30 days (48.84%) when compared to oocytes cultured for 18 and 24 days (15% and 20.93%, respectively). In experiment II, the culture for 30 and 36 days showed significantly higher percentage of resumption of meiosis (47.5% and 50%, respectively) when compared to 42 days (20%). Regarding to hormone secretion, the production of estradiol from day 12 of culture was similar between normal and extruded follicles, been both superior ($p < 0.05$) from the follicles that degenerate only at the end of the culture (day 36). In conclusion, the culture for 36 days was the most advisable for the increased rates of meiosis resumption. In addition, the loss of follicular integrity affects the pattern of estradiol production, this being a good marker for predicting the destiny in other words, the degeneration of the follicle during the culture, since degenerate follicles produce low amounts of the hormone during the entire period of culture.

Keywords: culture time, morphological integrity, estradiol.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

Figura 1. Ovário mamífero: medula e córtex; presença de vasos, folículos e corpos lúteos em diferentes estágios de desenvolvimento.....19

Capítulo 1.

Figure 1. Production of estradiol on intact, extruded on Day 24 and degenerated on Day 36 follicles during the *in vitro* culture of goat preantral follicles. A, B, C indicate a significant difference between the types of follicles. a, b, c, d, e, f indicate a significant difference between days of culture.....47

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1.

Table 1. Culture period on the morphological integrity, antrum formation, follicular, oocyte diameters (Media $\pm$ SD), and meiotic resumption of goat preantral follicles.....	46
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	: Adenosina Trifosfato
AKR1C3	: Aldo keto reductase family 1 member c3 (enzima membro c3 da família aldo ceto redutase 1)
BMP	: Bone morphogenetic protein (Proteína morfogenética óssea)
BSA	: Bovine serum albumin (Albumina sérica bovina)
Bax	: Bcl-2 associated X protein (proteína X associada ao Bcl-2)
Bcl-2	: B-cell lymphoma protein 2 (Proteína 2 de infoma de célula B)
Bid	: BH3 interacting domain death agonist (Agonista de morte com domínio de interação BH3)
Bik	: Bcl-2 interacting killer (inibidor da Bcl-2)
Bcl-xL	: BCL-2 related protein, long isoform (Proteína relacionada ao Bcl-2 de longa isoforma)
°C	: Graus Celsius
CaCl ₂	: Cloreto de cálcio
Calceína - AM	: Calceína acetoximetil
CAPES	: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CGP	: Células Germinativas Primordiais
CNPq	: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO ₂	: Dióxido de Carbono
COCs	: Cumulus–oocyte complexes (Complexos cumulus-oócito)
DNA	: Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
Dr.	: Doutor
Dra.	: Doutora
EGF	: Epidermal growth factor (Fator de crescimento epidermal)
FSH	: Hormônio Folículo Estimulante
G	: Gauge

GFP	: Green Fluorescent protein (Proteína verde fluorescente)
GH	: Growth hormone (Hormônio do crescimento)
GV	: Germinal vesicle (Vesícula germinal)
h	: Horas
HC	: Histologia clássica
IAA	: Indole acetic acid (Ácido indol acético)
ITS	: Insulin, tranferrin and selenium (Insulina, transferrina e selênio)
IGF-I	: Insulin-like growth factor-I (Fator de crescimento semelhante à insulina – I)
IVC	: <i>In vitro</i> culture (cultivo <i>in vitro</i>)
IVM	: <i>In vitro</i> maturation (Maturação <i>in vitro</i>)
kg	: Quilograma
LH	: Hormônio Luteinizante (Luteinizing hormone)
LIF	: Leukemia inhibitor fator (fator inibidor de leucemia)
LAMOFOPA	: Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-Antrais
M	: Molar
MAPK	: Mitogen-activated protein kinase (Proteína quinase ativada por mitógenos)
MEM	: Minimal essential medium (Meio essencial mínimo)
MEM ⁺	: Supplemented minimal essential medium (Meio essencial mínimo suplementado)
MET	: Microscopia eletrônica de transmissão
mg	: Miligrama
MI	: Metaphase I (Metáfase I)
MII	: Metaphase II (Metáfase II)
min	: Minutos
mL	: Mililitro
mM	: Milimolar
MOIFOPA	: Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais

mRNA	: Messenger ribonucleic acid (Ácido ribonucléico mensageiro)
Na ⁺	: Íon sódio
ng	: Nanograma
O ₂	: Oxigênio
p < 0.05	: Probabilidade de erro menor do que 5%
p > 0.05	: Probabilidade de erro maior do que 5%
p.	: Página
PPGCV	: Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
p 450 aromatase	: Enzima p450 aromatase (Enzyme aromatase p450)
p 450 scc	: p 450 cholesterol side-chain cleavage enzyme (Enzima de clivagem de cadeia lateral de colesterol)
p 450c17	: p 450 steroide alpha-hydroxylase enzyme (Enzima p450 esteróide alfa-hydroxylase)
qPCR	: Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (Reação em cadeia de polimerase via transcrição reversa quantitativa)
RT-qPCR	: Reação em Cadeia de Polimerase-Transcriptase Reversa em Tempo Real
RENORBIO	: Rede Nordeste de Biotecnologia
SAS	: Statistical analysis system (Sistema de análise estatística)
sec	: Segundo (Second)
SD	: Standard deviation (Desvio padrão)
SEM	: Standard error of means (Erro padrão da média)
STAR	: Steroidogenic acute regulatory protein (Proteína de regulação aguda da esteroidogênese)
TE	: Transferência de embriões
TCM-199	: Tissue culture medium (Meio de cultivo tecidual- 199)
U	: Unidade
UECE	: Universidade Estadual do Ceará
UNIFOR	: Universidade de Fortaleza

VGBD	: Germinal vesicle breakdown (Quebra da vesícula germinal)
α -MEM	: Alpha minimal essential medium (Meio essencial mínimo alfa)
3 β HSD2	: Enzyme 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 (enzima 3 β hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2)
17 β HSD5	: Enzyme 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 5 (enzima 17 β hidroxiesteroide desidrogenase tipo 5)
μ g	: Microgramas
μ L	: Microlitro
μ m	: Micrômetro
%	: Porcentagem
~	: Aproximadamente
<	: Menor
=	: Igual
>	: Maior
$\pm$	: Mais ou Menos
$\geq$	: Maior ou igual

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Ovário Mamífero	19
2.2 Oogênese e Foliculogênese	20
2.3 Neofoliculogênese.....	21
2.4 População e atresia folicular	22
2.5 Fatores que afetam a eficiência do cultivo <i>in vitro</i> de folículos pré-antrais	24
2.5.1 Sistemas de cultivo <i>in vitro</i>	24
2.5.2 Composição dos meios de cultivo.....	25
2.5.3 Duração do cultivo	26
2.6 Estado atual do cultivo <i>in vitro</i> de folículos pré-antrais	27
2.7 Técnicas de análise da qualidade folicular	28
2.7.1 Histologia clássica (HC)	28
2.7.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	29
2.7.3 Microscopia de fluorescência.....	30
2.7.4 Dosagem de estradiol	30
2.7.5 Biologia molecular.....	31
2.7.6 Fertilização <i>in vitro</i> (FIV) e partenogênese	32
3 JUSTIFICATIVA	34
4 HIPÓTESE.....	35
5 OBJETIVOS	36
5.1 Objetivo Geral.....	36
5.2 Objetivos Específicos.....	36
6 CAPÍTULO 1 – Efeito da integridade morfológica, da duração e do sistema de cultivo sobre o desenvolvimento <i>in vitro</i> de folículos pré-antrais caprinos.....	37
7 CONCLUSÃO.....	53
8 PERSPECTIVAS.....	54
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1. INTRODUÇÃO

Em virtude das características adaptativas dos caprinos na região Nordeste do Brasil, esta espécie apresenta importante papel socioeconômico para esta região, pois representa fonte de renda e de alimento para a população (CAMPOS; CAMPOS, 2013). Por esta razão, diversas biotecnologias estão sendo utilizadas para melhoria e preservação da genética, bem como da eficiência reprodutiva desses animais (RAHMAN; ABDULLAH; WAN KHADIJAH, 2008). Nesse contexto, surge a importância da aplicabilidade da biotécnica de manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA), que tem como finalidade recuperar um grande número de folículos pré-antrais antes do processo de atresia e cultivá-los *in vitro* até a completa maturação dos seus oócitos. Estes oócitos crescidos *in vitro* poderão ser destinados à produção *in vitro* de embriões e clonagem, contribuindo para a propagação de animais de alto valor zootécnico e/ou em vias de extinção, bem como serem utilizados como modelos de pesquisa para tratamentos da infertilidade em humanos (TELFER et al., 2008; SMITZ et al., 2010).

Um importante fator que pode influenciar a eficácia do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais (FOPA) é a sua duração, uma vez que esta deve ser suficiente para assegurar a sobrevivência e o desenvolvimento folicular, bem como a posterior maturação oocitária. Diversos estudos vêm sendo realizados utilizando períodos variados de cultivo (ARUNAKUMARI et al., 2010; GUPTA et al., 2008, no entanto, em caprinos, a duração adequada do cultivo *in vitro* ainda não foi plenamente determinada (SILVA et al., 2010).

Outro fator que pode influenciar o cultivo folicular é o sistema no qual o folículo será desenvolvido que poderá ser *in situ* (inclusos no córtex ovariano) (SILVA et al., 2004) ou isolado (TELFER et al., 2008). No que diz respeito ao cultivo de folículos isolados, este pode ser realizado de forma bidimensional (2D) ou tridimensional (3D). Neste último, o folículo encontra-se no interior de um substrato, o qual mantém a arquitetura folicular. No sistema 2D, MAGALHÃES et al. (2011) produziram o primeiro embrião caprino após o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais na presença do hormônio do crescimento (GH).

Durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, uma importante ferramenta para verificar o desenvolvimento folicular é a produção hormonal (CHAVES et al., 2012). Resta saber se a produção hormonal poderia ser utilizada para prever o destino do folículo no cultivo.

Para uma melhor compreensão deste trabalho, a revisão de literatura a seguir abordará aspectos relacionados ao ovário mamífero, oogênese e foliculogênese, população

e atresia folicular, fatores que afetam a eficiência do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, estado atual do cultivo *in vitro* e métodos para análise da qualidade folicular após o cultivo *in vitro*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ovário mamífero

O ovário é o órgão mais importante do sistema reprodutivo das fêmeas mamíferas e pode ser dividido em duas regiões: uma medular que, na maioria das espécies, é localizada na porção interna do ovário sendo responsável pela sustentação e nutrição dessa estrutura; e uma região cortical, mais externa, que contém corpos lúteos, albicans e folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). A gônada feminina desempenha uma função endócrina (produção e liberação de hormônios esteroides e diversos peptídeos) e uma função exócrina ou gametogênica (produção e liberação de oócitos), as quais são exercida pela interação de dois fenômenos que ocorrem no ovário, isto é, a oogênese e a foliculogênese (SAUMANDE, 1981).

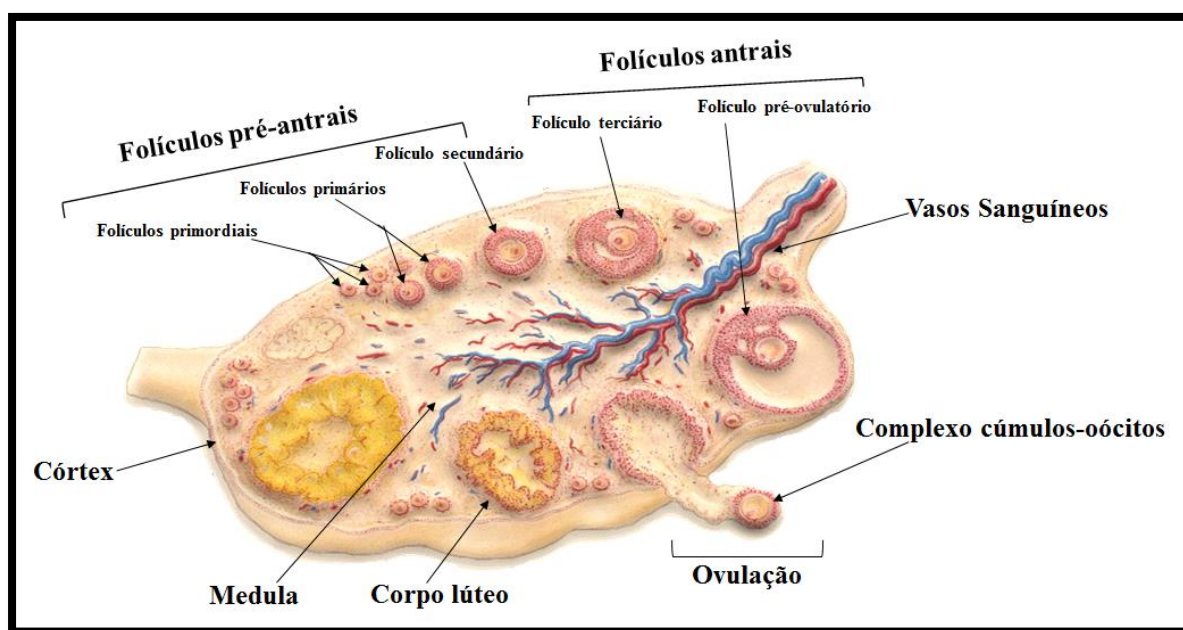


Figura 1: Ovário mamífero: medula e córtex; presença de vasos, folículos e corpos lúteos em diferentes estágios de desenvolvimento. Adaptado de <http://www.tarleton.edu/Departments/anatomy/ovary.html>.

2.2 Oogênese e foliculogênese

A oogênese consiste na formação e diferenciação das células germinativas primordiais (CGP) até a formação do oócito haplóide fecundado. Este processo caracteriza-se por ter início antes da foliculogênese e término após esse processo (VAN DEN HURK;

ZHAO, 2005). As CGP se originam do endoderma do saco vitelino primitivo, migram para a crista genital e colonizam a gônada ainda indiferenciada, onde recebem a denominação de oogônias e começam a multiplicar-se por divisões mitóticas (VAN DEN HURK et al., 1997). Posteriormente, as oogônias entram em primeira divisão meiótica e passam a ser chamadas de oócitos primários. Esses oócitos se caracterizam por apresentar um núcleo em fase de diplóteno da prófase I, também chamado de vesícula germinativa (FIGUEIREDO et al., 2008). Nessa fase, os oócitos são circundados por uma camada de células da pré-granulosa, oriundas do epitélio ovariano ou dos túbulos do mesonefron dando início a formação da unidade folicular (McNATTY et al., 2000) que neste momento é chamado folículo primordial. Os oócitos permanecerão nessa fase até atingir a puberdade, quando então, por ação hormonal, ocorrerá a quebra da vesícula germinativa e a progressão do núcleo do oócito até o estágio de metáfase II (FIGUEIREDO et al., 2008).

O evento da foliculogênese tem início com a formação do folículo primordial e termina com a formação do folículo pré-ovulatório (FIGUEIREDO et al., 2008). Esse processo é dividido em três etapas: ativação, crescimento e maturação folicular. Ao longo da foliculogênese, ocorre um aumento no diâmetro do oócito, bem como a multiplicação e diferenciação das células da granulosa (BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006). Além disso, a presença ou ausência da cavidade antral determina a classe dos folículos ovarianos podendo ser classificados em: 1) pré-antrais ou não cavitários (primordial, transição, primário e secundário) e 2) antrais ou cavitários (terciário e pré-ovulatório) (SILVA et al., 2005). Os folículos primordiais constituem 95% dos folículos pré-antrais, os quais são formados ainda no período fetal na maioria das espécies mamíferas e em diferentes períodos gestacionais (24º dia em humanos, 62º dia em caprinos, 130º dia em bovinos, poucos dias após o nascimento em ratos e camundongos (GOUGEON, 2004; JUENGEL et al., 2002; HIRSHFIELD, 1991). A formação dos folículos primordiais é marcada pelo recrutamento de células da pré-granulosa de morfologia pavimentosa para se localizarem ao redor do oócito. O início do crescimento folicular, também conhecido como ativação, é caracterizado pelo crescimento oocitário (McLAUGHLIN; McIVER, 2009), multiplicação das células da granulosa e transformação da morfologia dessas células de pavimentosa para cúbica (SKINNER, 2005). Durante a transição do estágio primordial para primário pode ser possível a visualização de folículos com células da granulosa de morfologia pavimentosa e cúbica, sendo assim classificados por alguns autores como folículos de transição (SILVA et al., 2004). Os folículos primários são caracterizados por conterem uma única camada de células da granulosa de formato cúbico circundando o oócito (SILVA et al., 2004). Com a

multiplicação mitótica das células da granulosa, o folículo primário se transforma em folículos com multicamadas de células da granulosa sem a presença de antro, também conhecidos como folículos secundários. No entanto, a passagem de folículo primário para secundário não é caracterizada apenas pela proliferação das células da granulosa, mas por uma série de outros eventos como: o aumento no tamanho e conteúdo proteico do oócito, formação da zona pelúcida e pela visualização da camada de células da teca (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Durante essa fase, o diâmetro do folículo aumenta de 40-60 μm no estágio inicial para 120-150 μm no estágio mais avançado. O núcleo do oócito assume uma posição excêntrica e as organelas começam a mover-se para a periferia (LUCCI et al., 2001).

A próxima fase da foliculogênese, em que os folículos passam a ser denominados terciários ou antrais, é caracterizada pela organização das células da granulosa em várias camadas com a formação de uma cavidade repleta de líquido folicular, entre as camadas de células da granulosa, denominada antro. O fluido folicular que preenche esta cavidade contém água, eletrólitos, proteínas séricas e alta concentração de hormônios esteroides secretados pelas células da granulosa e oócito (BARNETT et al., 2006).

2.3 Neofoliculogênese

Em 2004, uma grande mudança no paradigma da biologia reprodutiva foi proposta a partir de um estudo com camundongos que decidiu desafiar a crença de que ovários de fêmeas mamíferas perderiam a capacidade de gerar oócitos após o nascimento. Com base em seus resultados, JOHNSON et al. (2004) concluíram que na superfície do epitélio ovariano de camundongos fêmeas adultas existiam células-tronco germinativas que geravam oócitos de modo análogo as células-tronco espermatogoniais que suportam a produção de espermatozoides no testículo adulto. Após severas críticas, a mesma equipe sugeriu a hipótese de que o sangue periférico e a medula óssea poderiam ser fonte de células tronco germinativas para o ovário de ratas adultas (JOHNSON et al., 2005).

Anos mais tarde, outro estudo realizado por DYCE et al. (2006), descobriu que células tronco da epiderme de fetos suínos poderiam ser diferenciadas artificialmente durante o cultivo *in vitro* e dar origem a estruturas semelhantes a folículos em crescimento que respondiam aos estímulos do hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) e produziam estradiol e progesterona. Essa descoberta contribuiu indiretamente para a teoria da renovação folicular pós-natal. Corroborando com esse achado, ZOU et al. (2009) conseguiram isolar e cultivar *in vitro* as células-tronco germinativas do epitélio do ovário de

camundongos neonatais e adultos. No final do período de cultivo, essas células foram transfectadas com a proteína de fluorescência verde (GFP) e transplantadas para o ovário de camundongos submetidos à quimioterapia. Após 6 meses do transplante, os prováveis oócitos foram recuperados e fecundados *in vitro* dando origem a embriões e crias saudáveis positivas para GFP.

Recentemente, o estudo de PACCHIAROTTI et al. (2010) identificou a presença de células tronco no epitélio ovariano de ratas neonatais com capacidade de auto renovação e com características semelhantes à oócitos. Além desse estudo, WHITE et al. (2012) realizaram o isolamento de células mitoticamente ativas do tecido ovariano humano com perfil de expressão gênica idêntico ao das células germinativas primordiais de camundongos fêmeas. Após o isolamento, essas células foram modificadas para expressar GFP e injetadas no fragmento de tecido ovariano coletado por biopsia. Após o xenotransplante em camundongos imunodeficientes, foi observada a formação de folículos contendo oócitos GFP positivos.

Essas descobertas indicam um novo caminho a ser pesquisado na área da biologia reprodutiva de fêmeas mamíferas. No entanto, muitos trabalhos ainda são necessários para esclarecer se as células germinativas primordiais poderão ser capazes de se diferenciar espontaneamente em folículos *in vivo*, bem como também esclarecer quais mecanismos promoveriam a neofoliculogênese em pacientes inférteis. Desta forma, novas possibilidades de tratamentos de infertilidade poderiam ser desenvolvidas e aplicadas em humanos.

2.4 População e atresia folicular

Os folículos pré-antrais representam 90% da população folicular, sendo que 95% deste total é constituído por folículos primordiais (FIGUEIREDO et al., 2008), os quais compõem o estoque de gametas femininos (LIU et al., 2001). Independente da neofoliculogênese, a população folicular difere entre as espécies (KATSKA-KSIAZKIEWICZ, 2006), além de ser observada uma grande variação individual, sendo de, aproximadamente, 1.500 em camundongos (SHAW et al., 2000), 35.000 em cabras (LUCCI et al., 1999), 160.000 em ovelhas (DRIANCOURT et al., 1991), 235.000 em vacas (BETTERIDGE et al., 1989) e 2.000.000 em mulheres (BAKER et al., 1963). No entanto, ao longo da vida reprodutiva das fêmeas, ocorre uma diminuição natural da quantidade desses folículos devido a ovulação e a atresia ou morte folicular (SHAW et al., 2000).

A atresia atinge cerca de 99,9% da população folicular presente nos ovários, quando o ambiente parácrino ou endócrino não é apropriado para suportar o crescimento folicular e/ou a diferenciação das células da granulosa (SILVA et al., 2002). Este processo é comum em todas as espécies domésticas, podendo ocorrer em qualquer estágio do desenvolvimento folicular. Nos estágios iniciais da foliculogênese, a atresia é iniciada no oócito e em seguida, progride para as células da granulosa (MORITA; TILLY, 1999), verificando-se o processo inverso em folículos antrais (GLAMOCLIJIA et al., 2005).

A atresia pode ocorrer pelas vias degenerativa e/ou apoptótica de forma independente ou simultânea (HIRSCH et al., 1997; ZEISS, 2003). Em alguns casos, o tipo e/ou o grau do estímulo determina se a morte celular será por necrose ou apoptose. Em doses baixas, uma variedade de injúrias como toxinas, infecções virais, radicais livres, calor, radiação, hipóxia e quimioterápicos podem induzir a apoptose, mas os mesmos estímulos podem resultar em necrose em doses maiores (ELMORE, 2007).

A atresia por via degenerativa é causada, principalmente, por isquemia resultando em alterações na permeabilidade da membrana celular, aumento de água intracelular, vacuolização citoplasmática e, conseqüente, degeneração (MCULLY et al., 2004). No que diz respeito a apoptose, este é um processo fisiológico de morte celular programada que ocorre durante o desenvolvimento e envelhecimento das células, tendo um papel importante na homeostase de diferentes tecidos (NORBURY; HICKSON, 2001). Este processo é caracterizado pela fragmentação do DNA a cada 180-200 pares de base e formação de corpos apoptóticos, sendo altamente dependente da expressão gênica, em que o desbalanço entre os genes pró (Bax, Bid, Bik; HUSSEIN, 2005; GREENFELD et al., 2007) e anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-xL) determina a morte celular (RACHID; VASCONCELOS; NUNES, 2000). Além disso, pode ser desencadeada por estímulos externos por meio da ativação de receptores específicos presentes na superfície celular (via extrínseca ou via receptor de morte celular) ou pelo estresse intracelular (via intrínseca ou mitocondrial) (THORBUM, 2004).

Diante da grande perda folicular que ocorre naturalmente *in vivo*, diferentes sistemas de cultivo de folículos pré-antrais e antrais vêm sendo desenvolvidos, a fim de aproveitar o potencial de gametas femininos no futuro.

2.5 Fatores que afetam a eficiência do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais

O cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais vem sendo aprimorado no sentido de promover o crescimento e garantir a manutenção da viabilidade de folículos pré-antrais *in vitro*. Contudo, diversos fatores podem influenciar o sucesso do cultivo.

2.5.1 Sistemas de cultivo *in vitro*

Diferentes sistemas de cultivo têm sido testados visando o crescimento e a maturação dos oócitos inclusos em folículos pré-antrais. Nesses sistemas, os folículos pré-antrais podem ser cultivados inclusos no tecido ovariano (*in situ*) ou na forma isolada ou pode ainda ser realizado o cultivo em dois passos. No cultivo em dois passos, inicialmente é realizado o cultivo para que os folículos primordiais cresçam inseridos em fragmentos de tecido ovariano até a formação dos folículos secundários. Em seguida, esses folículos secundários são isolados do córtex ovariano e são cultivados *in vitro* até a formação dos folículos antrais (O'BRIEN et al., 2003; TELFER et al., 2008).

Em roedores, a pequena dimensão dos ovários possibilita o cultivo do órgão inteiro, o que tem sido bastante útil para o estudo da foliculogênese inicial em mamíferos (FORTUNE et al., 2003). Já em animais domésticos de médio e grande porte, devido às grandes dimensões dos ovários, não é possível a utilização deste modelo. Neste caso, pode ser realizado o cultivo de fragmentos do córtex ovariano, rico em folículos primordiais. Este modelo tem sido realizado para o estudo da ativação e crescimento de folículos primordiais em diferentes espécies tais como caprinos (SILVA et al., 2006), bovinos (BRAW-TAL; YOSSEFI, 1997) e humanos (TELFER et al., 2008). Embora o cultivo *in situ* apresente maior praticidade e preserve a estrutura tridimensional do folículo, a distribuição desigual de folículos nos fragmentos, a dificuldade de crescimento até estágio de folículos secundários e a dificuldade em avaliar quantitativamente e qualitativamente a população folicular no fragmento ovariano são obstáculos ao bom desempenho deste cultivo (QU et al., 2000; TROUNSON et al., 2001).

Uma alternativa para solucionar às dificuldades encontradas no cultivo *in situ* é o cultivo de folículos isolados. Este sistema permite o monitoramento individual do crescimento folicular, bem como a análise do efeito *in vitro* de hormônios e fatores de crescimento sobre uma determinada categoria folicular sem sofrer a interferência de outras estruturas, além de favorecer uma melhor perfusão do meio para o folículo (ABIR et al.,

2001). Além disso, este sistema pode ser realizado de forma bidimensional, na qual o folículo é cultivado diretamente em contato com o substrato, que pode ser o próprio plástico da placa de cultivo, recoberto ou não por uma matriz extracelular, ou mesmo por monocamadas de células somáticas (EPPIG; SCHROEDER, 1989; NATION; SELWOOD, 2009). Já na forma tridimensional, os folículos podem ser cultivados inclusos em gotas de substrato, como o colágeno ou o alginato (FIGUEIREDO et al., 2008).

2.5.2 Composição dos meios de cultivo

O estabelecimento de um meio de cultivo ideal é outro ponto crucial para o desenvolvimento de um eficiente sistema de cultivo (FIGUEIREDO et al., 2008). Uma variedade de meios de base tem sido utilizada para o crescimento folicular em diferentes espécies, tais como o meio essencial mínimo (MEM) (JEWGENOW et al., 1998), o meio Waymouth (MURUVI et al., 2005), o meio McCoy's (TELFER et al., 2008) e o meio TCM 199 (ANDRADE et al., dados não publicados). Esses meios são normalmente ricos em componentes importantes para manutenção e crescimento folicular *in vitro* como eletrólitos, antioxidantes, aminoácidos, substratos energéticos e vitaminas (PICTON et al., 2008). Estudos têm demonstrado que a adição de diferentes suplementos ao meio de cultivo, como piruvato, glutamina, hipoxantina e ITS (Insulina, Transferrina e Selênio), aumenta o percentual de folículos morfolologicamente normais e estimula o crescimento folicular (SILVA et al., 2004). Em caprinos, foi verificado que a adição de 50 µg/ml de ácido ascórbico no meio MEM aumentou as taxas de crescimento folicular, bem como manteve a sobrevivência e viabilidade de folículos pré-antrais (SILVA et al., 2011). Na mesma espécie, foi constatado que uma concentração mais baixa de insulina (10 ng/ml) associada a concentrações crescentes de FSH (100ng/ml do dia 0 ao dia 6, 500ng/ml do dia 6 ao dia 12, 1000ng/ml do dia 12 ao dia 18 de cultivo) resultou em melhores taxas de desenvolvimento folicular e retomada da meiose (CHAVES, et al., 2012).

Sabe-se que o desenvolvimento folicular é regulado por gonadotrofinas e por fatores intra-ovarianos. Assim, diferentes substâncias vêm sendo testadas, como FSH (MAGALHÃES et al., 2009), LH (SARAIVA et al., 2010), fator de crescimento epidérmico (EGF) (CELESTINO et al., 2009), fator inibidor de leucemia (LIF) (LUZ et al., 2012) e o hormônio do crescimento (GH) (MAGALHÃES et al., 2011). Na espécie caprina foi alcançada a produção de embriões, a partir de folículos pré-antrais crescidos *in vitro*, com

adição de GH (50 ng/ml) (MAGALHÃES et al., 2011) ou com a associação de LH (100 ng/ml) e EGF (100 ng/ml) ao meio de cultivo (SARAIVA et al., 2010).

Outros fatores também podem afetar a eficiência do sistema de cultivo, tais como a temperatura de transporte do ovário, pH do meio e tensão de oxigênio. CHAVES et al. (2008) analisaram o efeito de diferentes temperaturas (4°C, 20°C ou 35°C) e tempos (2h ou 4h) de transporte do ovário sobre a sobrevivência e o crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos. Neste trabalho foi demonstrado que o transporte de fragmentos ovarianos caprinos em MEM a 4°C por até 4h foi a condição mais adequada para manutenção da sobrevivência e do crescimento *in vitro* dos folículos. SILVA et al. (2010) verificaram que o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais na presença de 20% de O₂ produziu melhores taxas de crescimento quando comparado ao cultivo na concentração de 5% de O₂.

2.5.3 Duração do cultivo

Evidências indicam que o início do crescimento folicular pode ocorrer de forma consideravelmente lenta nas diferentes espécies de mamíferos (FORTUNE et al., 1994). Embora a foliculogênese dure aproximadamente 6 meses em caprinos, os sistemas de cultivo *in vitro* têm adotado meios otimizados com menores períodos de cultivo que variam de 5 a 28 dias para cultivo *in situ* e de 18 a 30 dias para o cultivo de folículos isolados. No cultivo *in situ*, SILVA et al. (2004) alcançaram maiores taxas de ativação e o crescimento de folículos pré-antrais até o estágio de folículo secundário após 5 dias de cultivo em meio MEM adicionado de FSH (100 ng/ml) e EGF (100 ng/ml). Em outro estudo, ROSSETO et al. (2009) verificaram que a associação de FSH (50 ng/ml) e Ácido ascórbico (50ng/ml) em meio MEM manteve a integridade ultraestrutural, além de permitir a ativação e o crescimento após 14 dias de cultivo. Em contraste, MATOS et al. (2011) observaram redução na integridade ultraestrutural após 28 dias de cultivo em meio MEM suplementado com 50 ng/ml de FSH, porém maiores taxas de crescimento folicular foram observadas no final do cultivo. No cultivo de folículos isolados, MAGALHÃES et al. (2010) alcançaram crescimento e formação de antro folicular, bem como viabilidade oocitária após 24 dias de cultivo de folículos pré-antrais caprinos com trocas de meio a cada 2 dias. SILVA et al. (2010) atingiram o crescimento de folículos pré-antrais caprinos após 30 dias de cultivo em meio α -MEM em atmosfera com 20% de O₂. Em estudo mais recente, MAGALHÃES et al. (2011) obtiveram embrião até a fase de mórula após 18 dias de cultivo de folículos pré-antrais caprinos em meio contendo 50ng/ml de GH e FSH sequencial.

A duração do cultivo no sistema *in situ* ou isolado também varia nas diferentes espécies mamíferas. No cultivo *in situ*, WANDJI et al. (1997) alcançaram ativação e crescimento de folículos pré-antrais de babuínos após 20 dias de cultivo em meio Waymouth suplementado com ITS. BRAW-TAL; YOSSEFI (1997) alcançaram ativação e crescimento de folículos pré-antrais bovinos após 4 dias de cultivo em meio MEM isento de soro e gonadotrofinas. No cultivo de folículos isolados, ARUNAKUMARI et al. (2010) atingiram crescimento, maturação oocitária e produção embrião até estágio de mórula após 6 dias de cultivo de folículos pré-antrais ovinos em meio TCM 199 suplementado com FSH, IGF-I e GH. GUPTA et al. (2008) alcançaram a produção embrião após 100 dias de cultivo de folículos pré-antrais de búfalos com células mesenquimais do ovário.

Segundo GOUGEON (2004) folículos primários de humanos necessitam de aproximadamente 70 dias para crescerem até folículos secundários, bem como folículos secundários necessitam de aproximadamente 15 dias para atingirem o estágio de folículo pré-ovulatório na mesma espécie. Portanto, pode ser necessário aumentar o tempo de cultivo *in vitro* para aumentar o diâmetro folicular e oocitário, bem como as taxas maturação dos oócitos caprinos oriundos de folículos pré-antrais.

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

Notável avanço tem sido alcançado no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais. Em babuínos (FORTUNE et al., 1998), felinos (JEWGENOW et al., 1998) e marsupiais (BUTCHER; ULLMAN, 1996) foi verificado significativo crescimento de folículos pré-antrais isolados após o cultivo *in vitro*, porém sem a formação de antro. Nas espécies humana (ROY; TREACY, 1993), bovina (GUTIERREZ et al., 2000) e canina (SERAFIM et al., 2010), folículos secundários isolados foram cultivados *in vitro* e se desenvolveram até a fase antral. Já em suínos (WU et al., 2001), bubalinos (GUPTA et al., 2008) e, mais recentemente, em caprinos (SARAIVA et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2011;) e ovinos (ARUNAKUMARI et al., 2010), folículos secundários crescidos *in vitro* tiveram seus oócitos fecundados *in vitro* com posterior desenvolvimento embrionário. Contudo, os resultados mais satisfatórios têm sido observados em animais de laboratório. CARROLL et al. (1990) obtiveram o nascimento de camundongos após o desenvolvimento *in vitro* de folículos primários, previamente submetidos à congelação e descongelação. Nesta mesma espécie, o cultivo de folículos primordiais também resultou no nascimento de um camundongo após crescimento, maturação e fecundação *in vitro* dos oócitos inclusos nos

folículos cultivados (EPPIG; O'BRIEN, 1996). O'BRIEN et al. (2003) utilizando um sistema de cultivo em dois passos (cultivo de ovário inteiro por 8 dias seguido de cultivo de folículos secundários isolados durante 14 dias) relataram a produção de embriões e o nascimento de 59 camundongos viáveis a partir de oócitos de folículos primordiais cultivados *in vitro*. O modelo murino demonstrado neste trabalho representa o maior avanço obtido até a atualidade utilizando um sistema de cultivo de folículos pré-antrais. Embora esses resultados tenham revelado que o sistema de cultivo de 22 dias é compatível com o nascimento de crias saudáveis, o rendimento da produção de oócitos maduros a partir de folículos pré-antrais ainda é baixo e variável devido a inadequação dos sistemas, meios e períodos de cultivo empregados.

Na sessão seguinte serão apresentadas as principais técnicas utilizadas na avaliação da eficiência dos sistemas de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais.

2.7 Técnicas para análise da qualidade folicular

O emprego de técnicas para a análise da qualidade folicular antes e após o cultivo *in vitro* permite o monitoramento das alterações ocorridas, sendo, portanto, de grande importância para a melhoria dos sistemas de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais. Dentre as diferentes técnicas disponíveis, podemos destacar aquelas que permitem avaliar alterações ocorridas na estrutura e na funcionalidade folicular, como por exemplo, a histologia clássica (HC), a microscopia eletrônica de transmissão (MET), a microscopia de fluorescência e a dosagem de estradiol. Além disso, existem ainda as técnicas de biologia molecular que permitem o estudo da expressão de genes que codificam ligantes e/ou receptores de diferentes substâncias importantes para a foliculogênese, bem como a fertilização *in vitro* e a partenogênese que avaliam diretamente o oócito de folículos pré-antrais cultivados *in vitro* contribuindo para uma melhor elucidação desse processo. A seguir, será abordada brevemente cada uma dessas técnicas.

2.7.1 Histologia clássica (HC)

A histologia clássica (HC) é importante para análise do cultivo *in vitro* de FOPA, pois permite a avaliação da morfologia citoplasmática e nuclear além de alteração no número e na morfologia das células da granulosa de pavimentosa para cúbica (MATOS et al., 2007). Tal técnica emprega normalmente a coloração com hematoxilina-eosina ou ácido periódico

de Schiff-hematoxilina que permite a classificação dos folículos quanto ao seu estágio de desenvolvimento (primordial, transição, primário ou secundário), e ainda quanto às suas características de integridade morfológica (normais ou atresicos). Entretanto, a HC não permite a avaliação da integridade de membranas e das organelas citoplasmáticas (GOSDEN, 2000). Vale ressaltar que esta técnica pode ser realizada tanto em folículos isolados, como naqueles inclusos em fragmentos de córtex ovariano (MATOS et al., 2007). Nesse último caso, para que não haja perda dos folículos isolados durante o processamento histológico, estes devem ser previamente encapsulados em uma matriz de colágeno ou alginato e corados com azul de alcian (PARSHAD et al., 2008).

Diversos estudos mostraram que a HC pode dar resultados similares aos de viabilidade folicular utilizando marcadores fluorescentes como a calceína e o corante azul de tripan (AMORIM et al., 2003; ROSSETTO et al., 2009). Além disso, outros trabalhos relataram ainda que a HC pode ser utilizada para avaliar as primeiras alterações indicativas de atresia em folículos pré-antrais por meio da visualização de picnose nuclear (JORIO et al., 1991; WOOD et al., 1997).

2.7.2 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é um método mais preciso e eficiente do que a HC por detectar alterações em organelas citoplasmáticas e mudanças ultraestruturais ocorridas devido ao processo de atresia (MARTINEZ-MADRID et al., 2007). Em folículos ovarianos a MET é capaz de verificar a qualidade do oócito e das células da granulosa (CHAVES et al., 2010). Após o cultivo *in vitro*, a MET confirma se realmente houve a manutenção da integridade morfológica após análise histológica. MATOS et al. (2006) embora tenham encontrado uma elevada percentagem de folículos histologicamente normais em meio MEM suplementado com ácido indol acético (IAA) (20 ng/mL) após 5 dias de cultivo, os estudos ultraestruturais não confirmaram a manutenção da integridade morfológica desses folículos, mesmo após 1 dia de cultivo. Já em outros estudos com o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, os resultados de integridade morfológica folicular da HC puderam ser confirmados por MET (MATOS et al., 2007; ROSSETTO et al., 2009).

2.7.3 Microscopia de fluorescência

Outra técnica empregada para avaliar a viabilidade folicular antes ou após o cultivo *in vitro* é a microscopia de fluorescência, a qual utiliza marcadores fluorescentes que, quando excitados com radiação de baixo comprimento de onda, absorvem energia e emitem luz de comprimento de onda maior (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999). A microscopia de fluorescência é considerada uma técnica confiável, prática e rápida para analisar a viabilidade folicular (LOPES et al., 2009), tendo sido, portanto, empregada para avaliação da viabilidade de folículos pré-antrais após o cultivo *in vitro* em diversos trabalhos (ROSSETTO et al., 2009; BRUNO et al., 2010; SILVA et al., 2010). Neste caso, os folículos são analisados baseado na detecção simultânea de células vivas e mortas marcadas por calceína-AM e etídio homodímero-1, respectivamente. A calceína-AM detecta atividade das esterases intracelulares, enzimas características de células viáveis, enquanto que o etídeo homodímero marca ácidos nucleicos em células não-viáveis com ruptura na membrana plasmática (LOPES et al., 2009). Dessa forma, essa técnica pode oferecer uma nova maneira para investigações metabólicas e aspectos do desenvolvimento folicular *in vitro* (BRUNO et al., 2009).

A microscopia de fluorescência é ainda empregada no intuito de avaliar a configuração da cromatina de oócitos oriundos de folículos pré-antrais, indicando assim o estágio meiótico alcançado após terem sido cultivados e maturados *in vitro* (DUARTE et al., 2010). Para tal finalidade, utiliza-se marcador Hoechst 33342, que penetra nas células e se intercala entre as bases nitrogenadas do DNA, permitindo a visualização do grau de organização da cromatina nuclear.

2.7.4 Dosagem de estradiol

A dosagem de estradiol é uma importante ferramenta utilizada para verificar a funcionalidade das células foliculares durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais de diferentes espécies (ovinos: CECCONI et al., 1999; bovinos: McLAUGHLIN et al., 2010; caprinos: SILVA et al., 2012). Nas células da teca, a produção de estradiol têm início com a conversão do colesterol oriundo do plasma sanguíneo em pregnenolona pela proteína STAR e pela enzima p450scc (TAMURA et al., 2007). Logo em seguida, as enzimas p450c17 e 3 β HSD2 convertem pregnenolona em androstenediona. Posteriormente, parte da androstenediona produzida é difundida nas células da granulosa para ser convertida em

testosterona pelas enzimas AKR1C3 e 17 β HSD5. Após esta etapa, a testosterona é convertida em estradiol pela enzima p450aromatase (MILLER et al., 2011). Em folículos pré-antrais a secreção de estradiol têm início imediatamente antes da formação de antro, momento em que ocorre a expressão das proteínas e enzimas que atuam na via de esteroidogênese e a expressão de receptores de LH (LOGAN et al., 2002).

Após a formação do antro, os folículos secretam grandes quantidade de estradiol sendo este evento essencial para a manutenção da sobrevivência folicular (DRIANCOURT, 2001). Além disso, o aumento do estradiol pode estar intimamente associado ao processo de maturação do oócito. Em diferentes espécies, foi demonstrado que as células do cúmulo produziram estradiol durante o cultivo em meio livre de hormônios esteroides (suínos: DODE; GRAVES, 2002; humanos: CHIAN et al., 1999; bovinos MINGOTI et al., 2002).

Segundo WALTERS et al. (2008), a resposta individual de folículos em diferentes fases dos desenvolvimento, bem como o destino folicular podem ser determinados por alterações nos níveis de esteroides intrafoliculares. Em bovinos, a atresia folicular tem sido comumente associada a baixos níveis de estradiol e elevados níveis de progesterona no fluido folicular (JOLLY et al., 1994). Em células foliculares cultivadas isoladamente também foi relatada produção de estradiol (GUTIÉRREZ et al., 1997). Neste estudo, a manutenção da morfologia e do contato entre a células da granulosa podem ter favorecido a atividade da enzima aromatase p450, bem como a responsividade das células ao FSH durante o cultivo (AMSTERDAM et al., 1987). Estes resultados sugerem que o estradiol está correlacionado com a maturação e o crescimento folicular, sendo, portanto, considerado uma importante técnica de avaliação do cultivo folicular.

2.7.5 Biologia molecular

No intuito de elucidar os mecanismos do desenvolvimento folicular, as técnicas de biologia molecular aplicadas isoladamente ou em associação podem fornecer dados essenciais para fundamentar a base do conhecimento sobre a expressão de RNAm, tanto de ligantes quanto de receptores associados a esse processo. Atualmente, a técnica mais utilizada para quantificar a expressão de RNAm é a RT-PCR em tempo real (RT-qPCR) (ALMEIDA et al., 2010). A qPCR uma variante da RT-PCR convencional, permite um diagnóstico preciso da quantificação da expressão gênica em determinada amostra biológica. Esse método utiliza um sistema fluorescente em plataforma, capaz de detectar a luz oriunda da reação de amplificação de um determinado gene no momento real da amplificação

(BUSTIN, 2002). Através da técnica de RT-qPCR e da RT-PCR convencional, já foi possível identificar a presença de diferentes substâncias, como hormônios e fatores de crescimento, presentes em folículos ovarianos caprinos (SILVA et al., 2004; SARAIVA et al., 2010).

2.7.6 Fertilização *in vitro* (FIV) e partenogênese

A técnica de fertilização *in vitro* (FIV) consiste basicamente em realizar a fecundação, ou seja, a união do gameta masculino (espermatozoide) e o gameta feminino (oócito), em um ambiente totalmente controlado, com o objetivo de produzir embriões em larga escala. No que concerne a animais de produção, somente no final da década de 70 foi relatada a primeira maturação *in vitro* (MIV) seguida de FIV de oócitos bovinos (IRITANI; NIWA, 1977). Contudo, somente em 1982, BRACKETT et al. relataram o nascimento do primeiro bezerro a partir de embriões produzidos *in vitro*.

A FIV avalia a competência oocitária e a capacidade de desenvolvimento embrionário, no entanto, problemas referentes a capacitação espermática e polispermia podem prejudicar a análise. No que se refere à oócitos oriundos de folículos pré-antrais cultivados *in vitro*, diversos estudos foram realizados utilizando esta biotécnica. GUPTA et al. (2008) alcançaram taxas de 12% de embriões no estágio de mórula a partir de oócitos de búfalos. Além deste, MAGALHÃES et al. (2011) obtiveram um embrião caprino no estágio de mórula utilizando a fertilização *in vitro*.

A ativação partenogenética é utilizada para avaliar a capacidade intrínseca do oócito de se desenvolver até o estágio embrionário, uma vez que não há participação do espermatozoide (KAUFMAN et al., 1981), descartando assim problemas referentes à capacitação espermática e polispermia. Essa ativação de oócitos mamíferos em metáfase II (MII) pode ser induzida por uma variedade de estímulos físicos e químicos (GRUPEN et al., 2002). Atualmente, estudos têm focado em protocolos de ativação química adicionando substâncias clássicas, tais como a ionomicina e a 6- dimetilaminopurina (6-DMAP). A ionomicina aumenta as concentrações de cálcio intracelular e promovendo a inativação do MPF (fator promotor de maturação). Já o 6-DMAP inibe a fosforilação da enzima MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) que desempenha importante função na progressão da meiose I para meiose II, bem como na manutenção dos oócitos em metáfase II até a fecundação (LOI et al., 1998; MOTILIK et al., 1998).

No que se refere à oócitos oriundos de folículos pré-antrais, poucos estudos foram descritos na literatura utilizando ativação partenogenética. Em 2009, KIM et al. realizaram ativação química de oócitos de camundongos fêmeas, permitindo a obtenção de 1 embrião no estágio de blastocisto. Em ovinos, LUZ et al. (2012) produziram 7 partenotos de 8 células a partir de folículos pré-antrais crescidos *in vitro* utilizando ionomicina e 6-DMAP, sendo este, o único trabalho utilizando partenogênese nesta espécie.

3. JUSTIFICATIVA

A espécie caprina é considerada uma ótima alternativa para a produção de carne, pele e leite, exercendo assim um importante papel sócio-econômico principalmente para o Nordeste do Brasil, região que concentra o maior rebanho. No entanto, a baixa eficiência reprodutiva dos rebanhos brasileiros é um obstáculo para uma maior rentabilidade da caprinocultura brasileira. Nesse contexto, diversas biotécnicas vem sendo empregadas com o intuito de aumentar a eficiência produtiva e reprodutiva dos rebanhos. Dentre essas biotécnicas destaca-se a manipulação de oócitos e folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA). A MOIFOPA permite a recuperação de milhares de folículos pré-antrais a partir de um único ovário, evitando a grande perda folicular que ocorre normalmente *in vivo*. Sendo assim, os oócitos oriundos de folículos pré-antrais crescidos *in vitro* poderão ser utilizados para maturação e fertilização *in vitro*, transferência de embriões e/ou criopreservação.

Sabendo-se da grande importância econômica que a espécie caprina representa para o Nordeste brasileiro e que diversos estudos têm utilizado variados protocolos com diferentes períodos de cultivo torna-se de grande relevância o desenvolvimento de um eficiente sistema de cultivo *in vitro* que aumente as taxas de maturação oocitária a partir de folículos pré-antrais crescidos *in vitro*. Para tanto, é indispensável determinar a duração ideal e o sistema de cultivo para o crescimento *in vitro*. Até o momento, estudos na espécie caprina têm utilizado 18 dias de cultivo folicular em sistema 2D. Contudo, as baixas taxas de maturação oocitária e produção embrionária alcançadas nesta espécie, levantam a hipótese de que este período e o sistema de cultivo podem não ser satisfatórios para a completa maturação do oócito.

Com o intuito de determinar a duração e o sistema do cultivo *in vitro* ideal para promover uma melhoria nas taxas de maturação oocitária, o presente trabalho avaliou os efeitos de diferentes períodos de cultivo (18, 24, 30, 36 e 42 dias), bem como o efeito de diferentes sistemas de cultivo (2D e 3D) sobre a maturação de oócitos oriundos de folículos pré-antrais caprinos, empregando as técnicas de MIV e fluorescência. Além disso, a dosagem hormonal foi realizada para verificar se a integridade folicular pode alterar o padrão de produção de estradiol ao longo do cultivo.

4. HIPÓTESE CIENTÍFICA

Diante do exposto, foram formuladas as seguintes hipóteses:

- 1) O aumento no período de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos isolados favorece o crescimento folicular e aumenta as taxas de maturação oocitária;
- 2) Existe uma correlação direta entre a integridade morfológica folicular e a produção de estradiol;
- 3) O sistema de cultivo empregado melhora o desenvolvimento folicular.

5. OBJETIVOS

5.1. Geral:

- Definir a duração e o sistema de cultivo *in vitro* ideal para melhorar as taxas de maturação de oócitos oriundos de folículos pré-antrais caprinos isolados.

3.2. Específicos:

- Avaliar o efeito da duração do cultivo *in vitro* (18, 24, 36 e 42 dias) sobre a integridade folicular, formação de antro e crescimento de folículos pré-antrais caprinos;
- Verificar se os níveis de estradiol são afetados pela duração do cultivo ou pela integridade morfológica dos folículos cultivados;
- Analisar a influência do tempo de cultivo *in vitro* sobre as taxas de recuperação de oócitos $\geq 110 \mu\text{m}$, de viabilidade oocitária, de retomada da meiose e de maturação de oócitos oriundos de folículos pré-antrais caprinos.
- Verificar o efeito do sistema de cultivo 2D e 3D sobre integridade folicular, formação de antro, crescimento folicular, recuperação de oócitos $\geq 110 \mu\text{m}$, viabilidade oocitária, de retomada da meiose e de maturação de oócitos oriundos de folículos pré-antrais caprinos.

6. CAPÍTULO 1

Efeito da integridade morfológica, da duração e do sistema de cultivo sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos isolados

(Effect of morphological integrity, time and system of culture on the *in vitro* development of caprine preantral follicles isolated)

Periódico: Theriogenology

(Submetido em novembro de 2013)

Effect of morphological integrity, period and type of culture system on the *in vitro* development of isolated caprine preantral follicles

A.F.C. Pessoa ^{a,*}, R.M.P. Rocha^a, I.R. Brito^a, G.M. Silva^a, R.N. Chaves^b, D.M. Magalhães-Padilha^a, C.C. Campelo^a, A.P.R. Rodrigues^a, D.C.S Nunes-Pinheiro^c, J.R. Figueiredo^a

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

^bHealth Center, University of Fortaleza (UNIFOR), Av. Washington Soares, 1321, Edson Queiroz, Fortaleza, 60811-905, CE, Brazil.

^cLaboratory of Animal Biochemistry and Immunology Veterinary Faculty, State University of Ceará, Av. Paranjana, 1700, Campus do Itaperi, Fortaleza, 60740-000, CE, Brazil.

***Corresponding author: Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV). State University of Ceará (UECE).**

Tel.: +55.85.3101.9852; Fax: +55.85.3101.9840

E-mail address: allanapessoa@hotmail.com (A.F.C. Pessoa)

ABSTRACT

The aim of this study was to: 1) define an optimal period for the *in vitro* culture of isolated caprine preantral follicles, 2) verify the relationship between follicular morphology (intact, extruded and degenerate follicles) and estradiol production, and 3) evaluate the effect of the 2D and 3D culture system on the *in vitro* development of caprine preantral follicles. The study was divided into three experiments. In the experiments I and II, isolated secondary follicles were cultured for 18, 24 and 30 days or 30, 36 and 42 days, respectively. In experiment III, the best culture period from experiment 2 was repeated using 2D and 3D culture system. After culture, the oocytes were submitted to *in vitro* maturation (IVM). The morphological integrity, antral cavity formation rates, increase follicular diameter, presence of healthy grown oocytes ($\geq 110 \mu\text{m}$), resumption of meiosis rates, and estradiol concentrations were evaluated. In experiment I, there was a higher percentage of resumption of meiosis in oocytes cultured for 30 d (48.84%) when compared to oocytes cultured for 18 and 24 d (15% and 20.93%, respectively). In experiment II, the culture for 30 and 36 d presented significantly higher percentage of resumption of meiosis (47.5% and 50%, respectively) when compared to 42 d (20%). The production of estradiol from Day 12 of culture were similar between normal and extruded follicles, but both superior when compared with follicles that degenerate at the end of the culture. In conclusion, the culture for 36 d was the most appropriate time to increase rates of meiosis resumption rates. In addition, the loss of follicular integrity affects the pattern of estradiol production, which means that this being a good marker for predicting follicle quality.

Keywords: Culture period; Morphological integrity; Preantral follicles; Estradiol.

1. Introduction

The *in vitro* culture (IVC) of preantral follicles is a promising reproductive biotechnology that can be used for the *in vitro* development of a large number of mature oocytes until its complete maturation. Oocytes from IVC could be used for the *in vitro* production of embryos from high value or endangered animals. Currently, encouraging results with IVC of preantral follicles in farm animals, as the production of embryos, have been reported by literature [1-3]. However, these results are limited to a low and variable number of embryos due to the low rates of oocyte maturation.

In an attempt to develop an efficient medium to allow the total follicular development, several authors have been tested the addition of hormones [4,5] and growth factors [6] on the IVC of goat isolated preantral follicles. In most of these studies, the period of the culture has been 18 d. However, there is no information whether 18 d would be the ideal time to the total follicular development. Gupta et al. [7] reported the production of buffalo embryos after a culture of secondary follicles of approximately 100 d. Thus, there are necessary studies testing longer term cultures of goat preantral follicles in order to increase the rates of maturation and subsequently embryo production.

An important factor for follicular culture is the system in which the follicles will be developed which may be *in situ* (included in the ovarian cortex) [8] or isolated [9]. Regarding to IVC of isolated follicles, it can be performed in a two-dimensional (2D) or three-dimensional (3D) system. In the 3D system the follicle is inside of a substrate, keeping its follicular architecture. In the 2D system, Magalhães et al. [3] observed the production of goat embryos after IVC of preantral follicles in the presence of Growth Hormone (GH). On the other hand, the 3D system has supported the oocyte and follicular development in mice and non-human primate [10,11]. However, there is no study in goats comparing the 2D and 3D system on IVC of preantral follicles.

Another point of controversy in the literature concerning to the necessity of maintaining or not the follicular integrity to ensure the follicular functionality. Enzymatically isolated follicles may be devoided of lose their basement membrane [12] and also, mechanically isolated follicles may even extrude their oocytes during the culture. Thus, regarding to necessity o maintain or not the follicular integrity to ensure the follicular functionality is a controversy point in the literature. Moreover, it is not known if the stradiol concentration [13] could predict follicular fate during culture, as well as, if this production is related to the maintenance of the follicular integrity.

Therefore, the aim of this study were to: 1) define an optimal period to *in vitro* culture of isolated caprine preantral follicles; 2) investigate the relationship between follicular morphology (intact, extruded and degenerated follicles) and estradiol concentrations and 3) evaluate the effect of the 2D and 3D culture systems on the *in vitro* development of caprine preantral follicles.

2. Material and methods

2.1. Collection of ovaries

A total of 20 pairs of ovaries from mixed-breed goats were collected at a local abattoir and used for each experiment. After the collection, the ovaries were washed in 70% ethanol followed by two rinses in HEPES-MEM medium supplemented with penicillin 100 µg/mL and streptomycin 100 µg/mL. The ovaries were transported to the laboratory in MEM-HEPES medium at 4 °C within approximately 1h [14].

2.2. Experimental protocol

This work was divided into three experiments: The experiment 1 aimed to analyze the effect of the increase in culture period (18, 24 and 30 d) on the parameters: morphological integrity, follicular diameter, antrum formation, oocyte diameter and resumption of meiosis; Experiment 2 aimed to verify if an increase in the culture period would be good for improve the rates of Then, the best treatment of the experiment 1 (30 d) was repeated and compared to longer periods of 36 and 42 d; and the Experiment 3 aimed to culture *in vitro* preantral follicles in 2D and 3D system using the best culture period obtained in the experiment 2. Irrespective of the experiment a total of 40 isolated follicles were cultured per treatment.

2.3. Follicular isolation

In the laboratory, fat and connective tissue surrounding the ovary was removed. Fragments of ovarian cortex (1 to 2 mm thick) were cut from the ovarian surface with surgical blade under sterile conditions. Subsequently, the ovarian cortex fragments were placed in fragmentation medium consisting of MEM-HEPES. Secondary follicles between 150 and 250 µm were identified under a stereomicroscope (SMZ 645 Nikon, Tokyo, Japan)

and isolated manually using 26 G needles coupled to 1 mL syringes. After isolation, only follicles with normal morphology were selected, ie, with a centrally located spherical oocyte surrounded by two or more compact layers of granulosa cells with no apparent damage in the basal membrane formation or antral cavity.

2.4. In vitro culture of goat preantral follicles

After selection, the follicles were cultured individually in 100 μ L droplets of medium under mineral oil using petri dishes (60 x 15 mm diameter) (2D culture system). The culture medium was α -MEM supplemented with 3 mg/mL bovine serum albumin (BSA), 2 mM glutamine, 2 mM hypoxanthine, 10 ng/mL insulin, 5.5 mg/mL transferrin, 5 ng/mL selenium, 50 μ g/mL ascorbic acid, 50 ng/mL of GH and sequential FSH (Day 0-6: 100 ng/mL; Day 6-12: 500 ng/mL, and Day 12 to 30: 1000 ng/mL). The culture was carried out for 18, 24 and 30 d (Experiment 1) or 30, 36 and 42 d (Experiment 2), and 36 d (Experiment 3) in an incubator at 39 °C and 5% CO₂.

2.5. 2D and 3D culture system

Considering that 36 d was the only treatment that showed higher oocyte recovery rates (oocytes $\geq 110\mu$ m), the same culture period was repeated in 2D and 3D systems. The goat ovaries were collected and transported to the laboratory as previously described. For 3D culture system, isolated follicles were transferred to drops of 7 μ L solution of sodium alginate at 0.25% (FMC Bio Polymers, Philadelphia, PA, USA). Subsequently, the beads were polymerized in a solution of 50mM CaCl₂ and 140 mM of NaCl for 1 min. Each follicle encapsulated in alginate was transferred to an individual well of a 48 well plate containing 300 μ L of culture medium previously mentioned. Half medium was changed every 2 d (150 μ L) and total medium was exchanged every 6 d of culture.

2.6. Morphological evaluation of follicular development

In all three experiments, every 6 d of culture, follicles were evaluated morphologically, and the antrum formation and follicular diameter were recorded. It was considered two types of morphologically normal follicles: the intact, characterized as translucent with intact basal membrane, surrounding with homogeneous and bright

granulosa cells; and the extruded characterized by ruptured basal membrane, homogeneous, bright and without signs of degeneration in granulosa cells (irregular contour, darkness of the oocyte and/or granulosa cells and reduction of the diameter). Follicular growth was assessed according to the appearance of antral cavity, defined as a visible translucent cavity between the layers of granulosa cells, and follicular diameter increase, which was verified by measuring horizontal and vertical morphologically of normal follicles using an ocular micrometer attached to a stereomicroscope.

2.7. *In vitro* maturation (IVM)

At the end of the three experiments, follicles were manually opened with 26G needles attached to 1mL syringes under a stereomicroscope. Oocytes $\geq 110 \mu\text{m}$ [15] with homogeneous cytoplasm and surrounded by at least one layer of compact cumulus cells were selected for IVM procedures. The oocyte recovery rate was calculated by dividing the number of oocytes $\geq 110\mu\text{m}$ by the number of cultured follicles. The recovered cumulus-oocyte complexes (COCs) were cultured in TCM199 medium supplemented with 1 mg/mL BSA, 1 mM/mL pyruvate, 0.5 ug/mL rFSH , 5 ug/mL LH, 1 ug/mL of 17β -estradiol, 10 ng/mL epidermal growth factor (EGF), 50 ng/mL insulin-like growth factor-I (IGF-I) and 100 uM/mL cysteamine. The culture of COCs was performed in droplets of 50 uL medium on culture plates (35 x 15 mm) under mineral oil, using a proportion of 10 COCs per drop. The incubation was performed in incubators with 5% CO₂ in air at 39 °C for a period of 32 h. After this period, the oocytes were incubated at 39° C for 15 min in Hoechst 33342 (10 μM) to assess viability and to verify the configuration of nuclear chromatin. After this process, the oocytes were evaluated under a fluorescence microscope equipped with an image processor (293 NIS Elements, Nikon, Tokyo, Japan).

2.8. *Hormonal Assay*

To evaluate the relationship between follicle development and hormone production, the culture medium of intact follicles, follicles that had extruded on Day 24 and follicles that had degenerated on Day 36 were collected every 6 d of culture (Days 6, 12, 18, 24, 30, 36 and 42) to measure estradiol levels. For this evaluation, it was used the commercial kit in chemiluminescent enzyme immunoassay IMMULITE 2000 automated analyzer systems – Siemens.

2.9. Statistical Analysis

Discrete variables, obtained by counting the number of units identified in relation to the total available follicles (morphological integrity, antrum formation, occurrence of extrusion, allocation to IVM, oocyte viability and resumption of meiosis) and continuous variables (follicular and oocyte diameters) were analyzed. The data corresponding to discrete variables was analyzed by frequency spread by Chi-square test and the results were expressed in percentage (in cases of follicular antrum formation, in which the number of observations was less than five, we used the Fisher test). Data regarding continuous variables was analyzed following the PROC MIXED procedure from SAS program (2002) with the inclusion of the repeated command, considering the existence of autocorrelation between sequenced measurements, and the mean comparisons were made by Tukey test. Differences were considered significant when $p < 0.05$ and the results were expressed as mean $\pm$ standard deviation, unless otherwise mentioned in the Table.

3. Results

3.1. Effect of culture period and system (2D and 3D) on the in vitro development of goat preantral follicles (Experiments 1, 2 and 3)

The results of antrum formation, morphological integrity, follicular and oocyte diameters as well as the rates of meiosis resumption and MII from experiments 1, 2 and 3 have been shown in Table 1.

For the Experiment 1, it was observed a progressive decrease ($p < 0.05$) in the morphological integrity from Day 0 to Day 24 of the culture. However, this reduction was not observed ($p > 0.05$) from Day 24 to Day 30. The rate of antrum formation did not differ ($p > 0.05$) between Days 18, 24 and 30 of culture. The follicular diameter increased ($p < 0.05$) progressively from Day 0 to Day 24, but there was no difference ($p > 0.05$) from Day 24 to Day 30. The oocyte diameter increased ($p < 0.05$) from Day 18 to Day 24 of culture, but with no difference ($p > 0.05$) from Day 24 to Day 30. Analysis of chromatin configuration showed a higher percentage ($p < 0.05$) of resumption of meiosis in oocytes from 30 d of culture compared to oocytes cultivated for 18 and 24 d. It is important to note that 4.6% of oocytes cultured for 30 d reached the MII stage.

In experiment 2, it was observed a reduction ($p < 0.05$) in the morphological integrity from Day 0 to Day 30. However, there was no difference ($p > 0.05$) between Day 30 and Day 42 of culture. The follicular diameter increased ($p < 0.05$) progressively from Day 0 to Day 36, but there was no difference ($p > 0.05$) from Day 36 to Day 42. Regarding the oocyte diameter, there was no difference ($p > 0.05$) between culture periods. The oocyte meiosis resumption did not differ between Days 30 and 36 of culture. However, the resumption of meiosis rate was lower ($p < 0.05$) on Day 42 of culture when compared to Day 36. The percentage of MII oocytes did not differ ($p > 0.05$) between the Days 30, 36 and 42 of culture.

In experiment 3, at the end of culture period, the rate of antrum formation did not differ between the 2D and 3D systems. Concerning the morphological integrity and follicular diameter, the 3D system was superior ($p < 0.05$) when compared to 2D system. However, the opposite was observed for oocyte diameter ($p < 0.05$).

Table 1. Culture period on the morphological integrity, antrum formation, follicular, oocyte diameters (Media $\pm$ SD), and meiotic resumption of goat preantral follicles.

Culture period		Parameters				
Experiment 1	(%) Morphological integrity	(%) antrum formation	(μ m) Follicular diameter	(μ m) Oocyte diameter	(%) Resumption of meiosis	(%) MII
Day 0	100.00 (126/126) a	0.00 (0/120)	229.82 $\pm$ 48.00 c	-----	-----	-----
Day 18	79.37 (100/126) b	76.19 (96/126) a	411.54 $\pm$ 149.02 b	118.73 $\pm$ 20.01 b	15.00 (6/40) b	0.00 (0/40)
Day 24	55.81 (48/86) c	83.72 (72/86) a	524.14 $\pm$ 195.92 a	128.94 $\pm$ 18.95 a	20.93 (9/43) b	0.00 (0/43)
Day 30	46.51 (20/43) c	81.39 (35/43) a	481.95 $\pm$ 156.86 a	136.54 $\pm$ 16.77 a	48.84 (21/43) a	4.65 (2/43)
Experiment 2						
Day 0	100 (120/120) a	0.00 (0/120)	231.89 $\pm$ 30.94 c	-----	-----	-----
Day 30	46.66 (56/120) ab	85.8 (103/120) a	619.64 $\pm$ 167.33 b	141.39 $\pm$ 9.85 a	47.5% (19/40) ab	10% (4/40) a
Day 36	41.25 (33/80) b	83.8 (67/80) a	681.01 $\pm$ 138.22 a	143.22 $\pm$ 10.75 a	50% (20/40) a	10% (4/40) a
Day 42	37.50 (15/40) b	82.5 (33/40) a	732.97 $\pm$ 112.38 a	144.64 $\pm$ 13.89 a	20% (8/40) b	2.5% (1/40) a
Experiment 3						
2D	45.5 (18/40) b	95.00 (38/40) a	512.04 $\pm$ 115.13 b	144.82 $\pm$ 14.16 a	15% (6/40) a	5% (2/40)
3D	67.5 (27/40) a	97.00 (39/40) a	617.04 $\pm$ 112.16 a	130.14 $\pm$ 15.93 b	5% (2/40) a	0% (0/40)

^{a,b,c} Within a column, groups without a common superscript differed ($P < 0.05$) between treatments within the same experiment.

3.2. Effect of follicular morphology on estradiol production of goat preantral follicles.

The Figure 1 illustrates estradiol levels evaluated on Days 6, 12, 18, 24, 30 and 36 in the 2D system. It were evaluated the hormone level of intact follicles, extruded (extrusion occurred only on Day 24 of culture) and those who had shown degeneration signs only on Day 36 of culture. Regarding the intact follicles, it was observed a progressive increase ($p < 0.05$) in the estradiol production from Day 0 until the end of culture. Concerning the follicles that extruded only on Day 24, there was an increase in the production of estradiol from Day 18 to Day 24 of culture (before extrusion). However, no subsequent increase ($p > 0.05$) from Day 24 until the end of culture was observed. Follicles that showed morphological signs of degeneration on Day 36 did not differ ($p > 0.05$) on estradiol level from Day 12 until the end of culture. When the comparison was made between treatments, it was observed that, on Day

6, the follicles that had been extruded showed higher ($p < 0.05$) estradiol production when compared to the other treatments. From Day 12 onwards, there was no significant difference in estradiol levels between intact and extruded follicles. However, the follicles that would degenerate on Day 36 showed a significantly lower production of estradiol when compared to the other treatments.

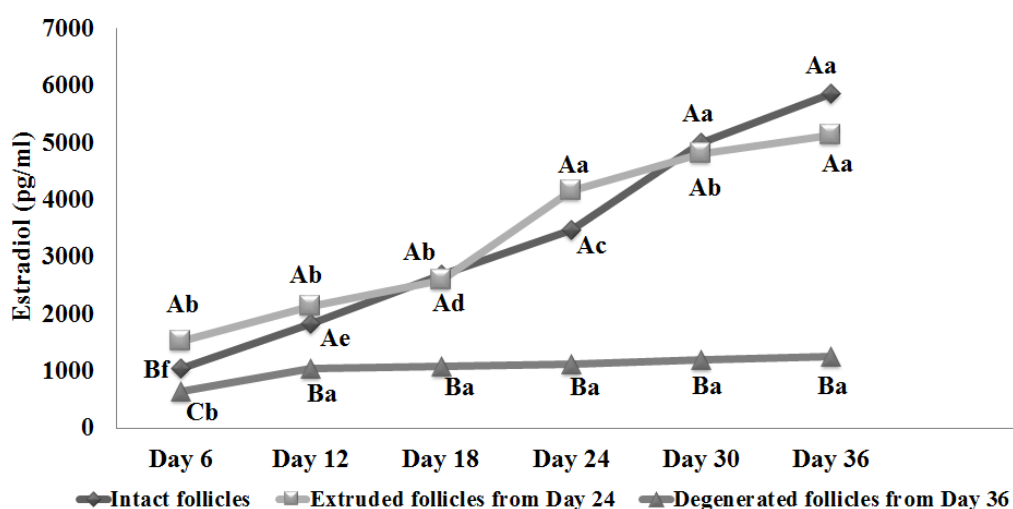


Figure 1: Production of estradiol on intact, extruded on Day 24 and degenerated on Day 36 follicles during the *in vitro* culture of goat preantral follicles. A, B, C indicate a significant difference between the types of follicles. a, b, c, d, e, f indicate a significant difference between days of culture.

4. Discussion

The present study demonstrated, for the first time, the influence of the follicular integrity on the hormone production of isolated goat preantral follicles cultured *in vitro*. Furthermore, it was evaluated the effect of culture period on the survival, growth and antrum formation of isolated goat preantral follicles, as well as on the ability to resume oocyte meiosis.

Studies have used different periods for the culture of preantral follicles in different species [1,7]. In goats, studies have advocated the culture for 18 d as the most suitable for follicular development [3]. In the current study, it was observed that an increase in culture

period, reduced the percentage of follicular morphological integrity, but increased the percentage of resumption of meiosis. The long term culture, although it was necessary to better oocyte development, may have increased the production of toxic metabolites and reactive oxygen species (ROS) such as H_2O_2 and O_2^- which in excess can oxidize important molecules that release nucleases, proteases and lipases from mitochondria [16], resulting in disruption of the basal membrane.

This study showed a progressive follicular growth until the Day 36 of culture. This result may have been caused by the use of an enriched culture medium (α -MEM) supplemented with FSH and GH. The GH has been described as an important factor of survival and follicular growth in goats, sheep and mice [1,3,17]. Also, GH associated to gonadotropins has shown an important role on the growth, proliferation of granulosa cells and estradiol production in mice and canines [18].

In the current study, it was demonstrated an oocyte increase in a culture of 30 d when compared to 18 d of culture. In addition, the culture of 36 d significantly increased the recovery rates of oocytes for IVM and resumption of meiosis. These results suggest that oocytes from goat preantral follicles require more culture time to grow and resume meiosis *in vitro*. Wassarman & Schultz [19] suggest that the increase on growth period can increase the protein content and accumulate essential substances for oocyte maturation. Some authors achieved the production of the first buffalo embryo derived from *in vitro* culture of preantral follicles, after 100 d of culture [7].

As regards to hormone production, follicles remained a progressive increase in estradiol production for 36 d of culture. A recent study showed that the combination of insulin and FSH, hormones present in the medium of the current study, increase the expression of mRNA levels of the aromatase P450 enzyme, which is associated with an increased production of estradiol [5]. In the ovary, P450 has the function of converting androgens into estrogens [20]. In ruminants, FSH is the primary stimulator of the expression and enzymatic activity of aromatase P450 [21]. The association of insulin with FSH promotes also the steroidogenesis by the granulosa and theca cells in primates [22].

On extruded follicles, it was observed that the production of estradiol was not significantly increased after extrusion. This result suggests that extrusion, although it has not caused a decrease in production of the hormone, did not ensure significant increases in its production, which suggests a loss of follicular efficiency. Unlike observed in the present work, some authors found that bovine granulosa cells cultured alone in a medium supplemented with FSH and insulin secreted increasing amounts of estradiol after 2 d of

culture [21]. In the same study, the authors found that the amount of estradiol produced by the isolated cells did not differ from the amount of estradiol produced by the follicles.

Since the beginning of culture, the follicles that degenerate at the end of culture (Day 36) showed lower estradiol production when compared to intact and extruded follicles. This result shows that the production of estradiol may be used as a marker of follicular degeneration during the *in vitro* culture of goat preantral follicles. Furthermore, the low estradiol production suggests that these follicles may be unable to respond to hormonal stimuli to produce estradiol, as well as to survive during culture [23].

In conclusion, for an increase in rates of resumption of meiosis in oocytes from goat preantral follicles it is advisable a culture of 36 d. In addition, the loss of follicular integrity affects the pattern of estradiol production, this being a good marker for predicting the follicular fate, in other words, the degeneration of follicles during culture, since degenerated follicles produce low amounts of this hormone during the entire culture period.

Acknowledgments

Allana Ferreira da Costa Pessoa is the recipient of a grant from CNPq (Brazil).

Referências Bibliográficas

- [1] Arunakumari G, Vagdevi R, Rao BS, Naik BR, Naidu KS, Suresh Kumar RV, Rao VH. Effect of hormones and growth factors on *in vitro* development of sheep preantral follicles. *Small Rum Res* 2007;70:93-100.
- [2] Saraiva MVA, Rossetto R, Brito IR, Celestino JJH, Silva CMG, Faustino LR, Almeida AP, Bruno JB, Magalhães DM, Matos MHT, Campello CC, Figueiredo JR. Dynamic medium produces caprine embryo from preantral follicles grown *in vitro*. *Reprod Sci* 2010;12:1135-1143.
- [3] Magalhães DM, Duarte ABG, Araújo VR, Brito IR, Soares TG, Lima IMT, Lopes CAP, Campello CC, Rodrigues APR, Figueiredo JR. *In vitro* production of a caprine embryo

from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. *Theriogenology* 2011a;75:182-188.

- [4] Magalhães DM, Araújo VR, Lima-Verde IB, Matos MHT, Silva RC, Lucci CM, Bão SN, Campello CC, Figueiredo JR. Different Follicle-Stimulating Hormone (FSH) sources influence caprine preantral follicle viability and development *in vitro*. *Brazilian J of Vet Res and Anim Sci* 2009;46:378-386.
- [5] Chaves RN, Duarte ABG, Rodrigues GQ, Celestino JJH, Silva GM, Lopes CAP, Almeida AP, Donato M, Moura AAA, Lobo CH, Locatelli Y, Mermillod P, Campello CC, Figueiredo JR. The effects of insulin and FSH during *in vitro* development of ovarian goat preantral follicles, and the relative mRNA expression for insulin and FSH receptors and cytochrome P450 aromatase in cultured follicles. *Biol of Reprod* 2012;87:1-11.
- [6] Araújo VR, Lima-Verde IB, Name KPO, Bão SN, Campello CC, Silva JRV, Rodrigues, A.P.R.; Figueiredo, J.R. Bone Morphogenetic Protein-6 (Bmp-6) Induced atresia in goat primordial follicles cultured *in vitro*. *Pesq Vet Bras* 2010;9:770-776.
- [7] Gupta PSP, Ramesh HS, Manjunatha BM, Nand S, Ravindra JP. Production of buffalo embryos using oocytes from *in vitro* grown preantral follicles. *Zygote* 2008;16:57-63.
- [8] Silva JRV, Van Den Hurk R, Costa SHF, Andrade ER, Nunes APA, Ferreira FVA, Lôbo RNB, Figueiredo JR. Survival and growth of goat primordial follicles after *in vitro* culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. *Animal Reproduction Science* 2004;81:273-286.
- [9] Telfer EE, McLaughlin M, Ding C, Thong KJ. A two step serum free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. *Hum Reprod* 2008;23:1151-1158.

- [10] Tagler D, Tu T, Smith RM, Anderson NR, Tingen CM, Woodruff TK, Shea LD. Embryonic fibroblasts enable the culture of primary ovarian follicles within alginate hydrogels. *Tiss Engin* 2012;18:11-12.
- [11] Xu M, Banc A, Woodruff TK, Shea LD. Secondary follicle growth and oocyte maturation by culture in alginate hydrogel following cryopreservation of the ovary or individual follicles. *Biotech Bioeng* 2009;103:378–386.
- [12] Demeestere I, Delbaere A, Gervy C. Effect of pre-antral follicle isolation technique on follicular growth, oocyte maturation and fertilization *in vitro* in the mouse. *Hum Reprod* 2000;15:89-90.
- [13] Mclaughlin M, Bromfield JJ, Albertini DF, Telfer EE. Activin Promotes Follicular Integrity and Oogenesis in Cultured Preantral Bovine Follicles. *Mol Hum Reprod* 2010;16:644-653.
- [14] Chaves RN, Martins FS, Saraiva MVA, Celestino JJH, Lopes CAP, Correia JC, Lima-Verde IB, Matos MHT, Bão SN, Name KPO, Campello CC, Silva JRV, Figueiredo JR. Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured *in vitro*. *Reprod Fert Develop* 2008;20:640-7.
- [15] Crozet N, Dahirel M, Gall L. Meiotic competence of *in vitro* grown goat oocytes. *J Reprod Fertil* 2000;118:367-373.
- [16] Fiers W, Beyaert R, Declercq W, Vandenabeele P. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* 1999;18:7719-7730.
- [17] Liu X, Andoh K, Yokota H, Kobayashi J, Abe Y, Yamada K, Mizunuma H, Ibuki Y. Effects of growth hormone, activin, and follistatin on the development of preantral follicle from immature female mice. *Endocrinology* 1998;139:2342-2347.
- [18] Kobayashi J, Mizunuma H, Kikuchi N, Liu X, Andoh K, Abe Y, Yokota H, Yamada K, Ibuki Y, Hagiwara H. Morphological assessment of the effect of growth hormone on

- preantral follicles from 11-day-old mice in an *in vitro* culture system. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;268:36–41.
- [19] Schultz RM, Wassarman PM. Biochemical studies of mammalian oogenesis: protein synthesis during oocyte growth and meiotic maturation in the mouse. *J Cell Sci* 1977;24:167-194
- [20] Kandiel MM, Watanabe G, Taya K. Ovarian expression of inhibin-subunits, 3 β -hydroxy steroid dehydrogenase, and cytochrome P450 aromatase during the estrous cycle and pregnancy of shiba goats (*Capra hircus*). *Exper Anim* 2010;59:605-614.
- [21] Gutiérrez CG, Campbell BK, Webb R. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle stimulating hormone, and morphological characteristics. *Biol of Reprod* 1997;56:608-616.
- [22] Xu J, Bernuci PB, Lawson MS, Yeoman RR, Fisher TE, Zelinski MB, Stouffer RL. Survival, growth, and maturation of secondary follicles from prepubertal, young, and older adult rhesus monkeys during encapsulated three-dimensional culture: effects of gonadotropins and insulin. *Reproduction* 2010;140:685–697.
- [23] Howard HJ, Ford JJ. Differential Steroidogenic Response of Subpopulations of Porcine Granulosa Cells to Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF-1) or IGF-1 Analogs *Biol of Reprod* 1994;51:108-115.

7. CONCLUSÃO

A duração do cultivo influenciou positivamente as taxas de recuperação de óocitos crescidos in vitro e de retomada da meiose de oócitos oriundos de folículos pré-antrais caprinos sendo recomendado o período de 36 dias. Além disso, foi observada pela primeira vez que folículos extrusos produzem níveis de estradiol semelhantes aos folículos íntegros ao longo do cultivo, porém folículos degenerados produzem baixos níveis de estradiol quando comparados a folículos íntegros e extrusos durante o cultivo.

8. PERSPECTIVAS

Os bons resultados obtidos nesse trabalho utilizando 36 dias de cultivo podem ser de grande valia para o entendimento do tempo ideal para a aquisição da competência de oócitos oriundos de folículos pré-antrais crescidos in vitro. Entretanto, estudos adicionais são necessários para testar novos meios de cultivo suplementado com diferentes fatores de crescimento e hormônios utilizando cultivos de longa duração a fim aumentar as taxas de maturação oocitária e produção in vitro de embriões a partir de folículos pré-antrais caprinos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIR, R.; FISCH, B.; NITKE, S.; OKON, E.; RAZ, A.; BEN, R. Z. Morphological study of fully and partially isolated early human follicles. *Fertility and Sterility*, v. 75, p. 141-146, 2001.

ALMEIDA, A. P.; CELESTINO, J. J. H.; SARAIVA, M. V. A; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Aplicabilidade das técnicas de biologia molecular para a compreensão da foliculogênese inicial em mamíferos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 34, p.133-148, 2010.

AMORIM, C. A.; RODRIGUES, A. P. R.; RONDINA, D.; GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; GIORGETTI, A. Cryopreservation of ovine primordial follicles using dimethyl sulfoxide. *Fertility and Sterility*, v. 79, Suppl., p. 682-682, 2003.

AMSTERDAM A, ROTMENSCH S. Structure-function relationships during granulosa cell differentiation. *Endocrine reviews*, v.8, p. 309-337.

ARUNAKUMARI, G.; SHANMUGASUNDARAM, N.; RAO, V. H. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. *Theriogenology*, v. 74, p. 884-894, 2010.

BAKER, T. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, v.158, p. 417–433, 1963.

BETTERIDGE, K. J.; SMITH, C. STUBBINGS, R. B., XU, K. P.; KING, W. A. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal in vitro. *Journal of Reproduction & Fertility*, v. 38, p.87-98, 1989.

BRACKETT, B. G.; BOUSQUET, D.; BOICE. X. L.; DONAWICK, V. J.; VANS, J. F.; DRESSEL, W. A. Normal development & following in vitro fertilization in the cow. *Biology of Reproduction*. v. 27, p.147-158, 1982.

BRAW-TAL, R.; YOSSEFI, S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth on the bovine ovary. *Journal Reproduction Fertility*, v. 109, p. 165–171, 1997.

BRISTOL-GOULD, S.; WOODRUFF, T. K. Folliculogenesis in the domestic cat (*Feliscatus*). *Theriogenology*, v. 66, p. 5-13, 2006.

BUSTIN, S. A. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, v. 29, p. 23-39, 2002.

BUTCHER, L.; ULLMANN, S. L. Culture of Preantral Ovarian Follicles in the Grey, Short-tailed Opossum, *Monodelphis domestica*. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 8, p. 535-539, 1996.

CAMPOS, R. T.; CAMPOS, K. C. Diagnóstico técnico-Econômico da ovinocaprinocultura no estado do Ceará. *Teoria e Evidência Econômica*, v.19, p. 126-152, 2013.

CARROLL, J.; WHITTINGHAM, D. J.; WOOD, M. J.; TELFER, E.; GOSDEN, R. G. Extra-ovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 90, p. 321-327, 1990.

CECCONI, S.; BARBONI, B.; COCCIA, M.; MATTIOLI, M. *In vitro* development of sheep preantral follicles. *Biology of Reproduction*, v. 60, p. 594-601, 1999.

CELESTINO, J. J. H.; BRUNO, J. B.; LIMA-VERDE I. B.; MATOS, M. H. T.; SARAIVA, M. V. A.; CHAVES, R. N.; MARTINS, F. S.; LIMA, L. F.; NAME, K. P. O.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; BÃO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Recombinant epidermal growth factor maintains follicular ultrastructure and promotes the transition to primary follicles in caprine ovarian tissue cultured *in vitro*. *Reproductive Sciences*, v. 16, p. 239-246, 2009.

CHAVES, R. N.; MARTINS, F. S.; SARAIVA, M. V. A.; CELESTINO, J. J. H.; LOPES, C. A. P.; CORREIA, J. C.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T.; BÃO, S. N.; NAME, K. P. O.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured *in vitro*. *Reproduction Fertility and Development*, v. 20, p. 640-647, 2008.

CHAVES, R. N.; ALVES, A. M. C. V.; DUARTE, A. B. G.; ARAÚJO, V. R.; CELESTINO, J. J. H.; MATOS, M. H. T.; LOPES, C. A. P.; CAMPELLO, C. C.; NAME, K. P. O.; BÃO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Nerve Growth Factor Promotes the Survival of Goat Preantral Follicles Cultured *in vitro*. *Cells Tissues Organs*, v. 192, p. 272-282, 2010.

CHAVES, R. N.; DUARTE A. B. G., RODRIGUES G. Q., CELESTINO J. J. H.; SILVA, G. M. M.; LOPES, C. A. P.; ALMEIDA, A. P.; DONATO, M.; MOURA, A. A. A.; LOBO, C.H.; LOCATELLI, Y.; MERMILLOD, P.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R. The Effects of Insulin and FSH During In Vitro Development of Ovarian Goat Preantral Follicles, and the Relative mRNA Expression for Insulin and FSH Receptors and Cytochrome P450 Aromatase in Cultured Follicles. *Biology of Reproduction*, v. 69, p.559, 2012.

CHIAN, R.C.; ASANGLA, A.; CLARKE, H.J.; TULANDI, T.; TAN, S.L. Production of steroids from human cumulus cells treated with different concentrations of gonadotropins during *in vitro* culture *in vitro*. *Fertility and Sterility*, v. 71, p. 61-66, 1999.

BRUNO, J. B.; CELESTINO, J. J. H.; LIMA-VERDE, I. B.; LIMA, L. F.; MATOS, M. H. T.; ARAÚJO, V. R.; SARAIVA, M. V. A.; MARTINS, F. S.; NAME, K. P. O.; CAMPELLO, C. C.; BÃO, S. N.; SILVA, J. R.; FIGUEIREDO, J. R. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor in goat ovaries and improvement of *in vitro* caprine preantral follicle survival and growth with VEGF. *Reproduction Fertility and Development*, v. 21, p. 679-687, 2009.

BRUNO, J. B.; CELESTINO, J. J. H.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T.; LIMA, L. F.; NAME, K. P. O.; ARAÚJO, V. R.; SARAIVA, M. V. A.; MARTINS, F. S.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; BÃO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Vasoactive Intestinal Peptide improves the survival and development of caprine preantral follicles after *in vitro* tissue culture. *Cells Tissues Organs*, v. 191, p. 414-421, 2010.

DYCE, P.W.; LIHUA, W.; LI, J. *In vitro* germline potential of stem cells derived from fetal porcine skin. *Nature Cell Biology*, v. 8, p. 384-390, 2006.

DODE, M.A.N.; GRAVES, C.N. Involvement of steroid hormones on *in vitro* maturation of pig oocytes. *Theriogenology*, v. 57, p. 811-821, 2002.

DRIANCOURT, M. A. Follicular dynamics in sheep and cattle. *Theriogenology*, v. 35, p. 55-63, 1991.

DRIANCOURT, M.A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals: Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*, v. 55, p. 1211-1239, 2001.

DUARTE, A. B. G.; CHAVES, R. N.; ARAÚJO, V. R.; CELESTINO, J. J. H.; SILVA, G. M.; LOPES, C. A. P.; TAVARES, L. M. T.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Follicular interactions affect the *in vitro* development of isolated goat preantral follicles. *Zygote*, v. 19, p. 215-227, 2010.

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*. *Biology of Reproduction*, v. 41, p. 268-276, 1989.

EPPIG, J. J.; O'BRIEN, M. J. Development *in vitro* of Mouse Oocytes from Primordial Follicles. *Biology of Reproduction*, v. 54, p. 197-207, 1996.

ERICKSON, G. F. An analysis of follicle development and ovum maturation. *Seminars in Reproductive Endocrinology*, v. 4, p. 233-254, 1986.

FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; SILVA, J. R. V. Manipulação de oócitos incluídos em folículos ovarianos pré-antrais – MOIFOPA. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V. J. F. (Ed.), *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*, São Paulo: Livraria Roca, p. 303-327, 2008.

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

FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, v. 78, p.135-163, 2003.

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

GLAMOCLIIJA, V.; VILOVIC, K.; SARAGA-BABIC, M.; BARANOVIC, A.; SAPUNAR, D. Apoptosis and active caspase-3 expression in human granulosa cells. *Fertility and Sterility*, v. 83, p. 426-431, 2005

GOSDEN, R. G. Low temperature storage and grafting of human ovarian tissue. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 163, p. 125-129, 2000.

GOUGEON, A.; BUSSO, D. Morphologic and functional determinants of primordial and primary follicles in the monkey ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 163, p. 33-41, 2000.

GOUGEON, A. Dynamics for human follicular growth: morphologic, dynamic, and functional aspects. In: Leung, P. C. K., Adashi, E. Y. (eds). *The ovary*. 2nd ed. San Diego: Elsevier Academic Press; pp. 25–43, 2004.

GREENFELD, C.R.; PEPLING, M.E.; BABUS, J.K.; FURTH, P.A.; FLAWS, J.A. BAX regulates follicular endowment in mice. *Reproduction*, v. 133, p. 865-876, 2007.

GRUPEN, C. G.; NOTTLE, M. B.; NAGASHIMA, H. Calcium release at fertilization : artificially mimicking the oocyte's response to sperm. *Journal Reproduction and Development*. v. 48, p. 313-333, 2002.

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

GUTIÉRREZ, C. G.; CAMPBELL, B. K.; WEBB, R. Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. *Biology of reproduction*, v. 56, n. 3, p. 608–616, 1997.

GUTIERREZ, C. C.; 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*, v. 62, p. 1322-1328, 2000

HIRSCH, T.; MARCHETTI, P.; SUSIN, S. A.; DALLAPORTA, B.; ZAMZAMI, N.; MARZO, I.; GEUSKENS, M.; KROEMER, G. The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene*, v. 15, p. 1573-1581, 1997.

HIRSHFIELD, A. N. Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review of Cytology*, v. 124, p. 43-101, 1991.

HUSSEIN, M. R. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Human Reproduction Update*, v. 11, p. 162-178, 2005.

IRITANI A.; NIWA K. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture. *Journal Reproduction Fertility*, v. 50, p.119-121, 1977.

JEWGENOW, K. Role of Media, Protein and Energy Supplements on Maintenance of Morphology and DNA-Syntesis of Small Preantral Domestic Cat Follicles During Short-Term Culture. *Theriogenology*, v. 49, p.1567-1577, 1998.

JOHNSON, J.; BAGLEY, J.; SKAZNIK-WIKIEL, M.; LEE, H.J.; ADAMS, G.B.; NIIKURA, Y.; TSCHUDY, K.S.; TILLY, J.C.; CORTES, M.L.; FORKERT, R. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell*, v. 122, p. 303-315, 2004.

JOHNSON, J.; BAGLEY, J.; SKAZNIK-WIKIEL, M.; LEE, H.J.; ADAMS, G.B.; NIIKURA, Y.; TSCHUDY, K.S.; TILLY, J.C.; CORTES, M.L.; FORKERT, R.; SPITZER, T.; IACOMINI, J.; SCADDEN, D.T.; TILLY, J.L. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. *Cell*, v. 122, p. 303-315, 2005.

JOLLY, P.D.; TISDALL, D.J.; HEATH, D.A.; LUN, S.; McNATTY, K.P. Apoptosis in bovine granulosa cells in relation to steroid synthesis, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate response to follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and follicular atresia. *Biology of Reproduction*, v. 51, p. 934-944, 1994.

JORIO, A., MARIANA, J. C., LAHLOU-KASSI, A. Development of the population of ovarian follicles during the prepubertal period in D`man and Timahdite sheep. *Animal Reproduction Science*, v. 26, p. 239-250, 1991.

JUENGEL, J.L.; SAWYER, H.R.; SMITH, P.R.; QUIRKE, L.D.; HEATH, D.A.; LUN, S.; WAKEFIELD, S.J.; McNATTY, K.P. Origins of follicular cells and ontogeny of steroidogenesis in ovine fetal ovaries. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 191, p. 1-10, 2002.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO J. *Histologia Básica*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 10^a ed., 2004.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. A Histologia e seus Métodos de Estudo. In: JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. (Ed.), *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 1, p. 1-18, 1999.

KATSKA-KSIAZKIEWICZ L. Recent achievements in culture and preservation of ovarian follicles in mammals. *Reproductive Biology*, v. 6, p. 3-16, 2006.

KAUFMAN, M. H. Parthenogenesis: a system facilitating understanding of factors that influence early mammalian development. In: HARRISON, R.J.; HOLMES, L. R. Progress in Anatomy. London: *Cambridge University Press*, v.1, p.1-34, 1981.

KIM, W.I.; GONG, S. P.; YOO, P. C.; CHOI, J. H.; KIM, D. Y.; LIM, J. L. Derivation of developmentally competent oocytes by the culture of preantral follicles retrieved from adult ovaries: maturation, blastocyst formation, and embryonic stem cell transformation. *Fertility and Sterility*, v. 92, p.1716 -1723, 2009.

LIU, J.; VAN DER ELST, J.; VAN DEN BROECKE, R.; DHONT, M. Live offspring by in vitro oocytes from cryopreserved primordial mouse follicles after sequential in vivo transplantation and in vitro maturation. *Biology of reproduction*, v. 64, p. 171-178, 2001.

LOGAN, K.A.; JUENGEL, J.L.; McNATTY, K.P. Onset of Steroidogenic Enzyme Gene Expression During Ovarian Follicular Development in Sheep. *Biology of Reproduction*, v. 66, p. 906-916, 2002.

LOI, P.; LEDDA, S.; FULKA Jr. Development of parthenogenetic and cloned ovine embryos: effect of activation protocols. *Biology of Reproduction.*, v. 58, p.1177-1187, 1998.

LOPES, C. A. P.; SANTOS, R. R.; CELESTINO, J. J. H.; MELO, M. A.; CHAVES, R. N.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; BÃO, S. N.; JEWGENOW, K.; FIGUEIREDO, J. R. Short-term preservation of canine preantral follicles: Effects of temperature, medium and time. *Animal Reproduction Science*, v. 115, p. 201-214, 2009

LUCCI C. M.; AMORIM, C.A, BÃO S.N.; FIGUEIREDO J.R.; RODRIGUES A.P.R.; SILVA J.R.; GONÇALVES P.B.D. Effect of the interval of serial sections of ovarian in the

tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, v. 56, p. 39-49, 1999.

LUCCI, C. M.; SILVA, R.V.; CARVALHO, C. A.; FIGUEIREDO, J. R.; BÁO, S. N. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. *Small Ruminant Research: The Journal of the International Goat Association*, v. 41, p. 61-69, 2001.

LUZ, V.B.; SANTOS, R.R.; ARAÚJO, V.R.; CELESTINO, J.J.H.; MAGALHÃES-PADILHA, D.M.; CHAVES, R.N.; BRITO, I.R.; SILVA, T.F.P.; ALMEIDA, A.P.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R. The effect of LIF in the absence or presence of FSH on the *in vitro* development of isolated caprine preantral follicles. *Reproduction in Domestic Animals*. v. 47, p. 379-384, 2012a.

LUZ, V. B.; ARAÚJO, V. R.; DUARTE, A. B. G.; CELESTINO, J.J.H.; SILVA, T. F.P.; MAGALHÃES-PADILHA, D.M.; CHAVES, R.N.; BRITO, I.R.; A. P. ALMEIDA, CAMPELLO, C.C.; FELTRIN, C.; BERTOLLINI, M.; SANTOS, R.R.; FIGUEIREDO, J. R. Eight-Cell Parthenotes Originated From In Vitro Grown Sheep Preantral Follicles. *Reproductive Sciences*. v. 19, p. 1219-1225, 2012b.

MAGALHÃES, D. M.; ARAÚJO, V. R.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T.; SILVA, R.C.; LUCCI, C. M.; BÁO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Different Follicle-Stimulating Hormone (FSH) sources influence caprine preantral follicle viability and development *in vitro*. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 46, p. 378-386, 2009.

MAGALHÃES, D.M.; DUARTE, A. B. G.; ARAÚJO, V. R.; BRITO, I. R.; SOARES, T. G.; LIMA, I. M. T.; LOPES, C. A. P.; CAMPELLO, C. C. C.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. In vitro production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. *Theriogenology*, v. 75, P.182–188, 2011.

MAGALHÃES, D. M.; FERNANDES, D. D.; MORORÓ, M. B. S.; SILVA, C. M. G.; RODRIGUES, G. Q.; BRUNO, J. B.; MATOS, M. H. T.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Effect of the medium replacement interval on the viability, growth and *in vitro* maturation of isolated caprine and ovine pre-antral follicles. *Reproduction in Domestic Animals*, 2010.

MARTINEZ-MADRID, B.; CAMBONI, A.; DOLMANS, M. M.; NOTTOLA, S.; LANGENDONCKT, A. V.; DONNEZ, J. Apoptosis and ultrastructural assessment after cryopreservation of whole human ovaries with their vascular pedicle. *Fertility and Sterility*, v. 87, p. 1153-1165, 2007.

MATOS, M. H. T.; VAN DEN HURK, R.; MARTINS, F. S.; SANTOS, R. R.; LUQUE, M. C. A.; SILVA, J. R. V.; CELESTINO, J. J. H.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Histological and ultrastructural features of caprine preantral follicles after *in vitro* culture in the presence or absence of indole-3-acetic acid. *Animal Reproduction*, v. 3, p. 415-422, 2006.

MATOS, M.H.T.; BRUNO, J.B.; ROCHA, R.M.P.; LIMA-VERDE, I.B.; SANTOS, K.D.B.; SARAIVA, M.V.A.; SILVA, J.R.V.; MARTINS, F.S.; CHAVES, R.N.; BÁO, S.N.; FIGUEIREDO, J.R. In vitro development of primordial follicles after long-term culture of goat ovarian tissue. *Research in Veterinary Science*, v. 90, p. 404–411, 2011.

MATOS, M. H. T.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Técnicas para avaliação da qualidade de folículos ovarianos pré-antrais cultivados *in vitro*. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 31, p. 433-442, 2007.

MCLAUGHLIN, E. A.; MCIVER, S. C. Awakening the oocyte: controlling primordial follicle development. *Reproduction*, v. 137, p.1-11, 2009.

McNATTY, K. P.; FIDLER, A. E.; JUENGEL, J. L.; QUIRKE, L. D.; SMITH, P. R.; HEATH, D. A.; LUNDY, T.; O'CONNELL, A.; TISDALL, D. J. Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.163, p. 11-20, 2000.

MILLER, W. R.; AUCHUS, R. J. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocrine Reviews*, v.32, p. 81-151, 2011.

MINGOTI, G.Z.; GARCIA, J.M.; ROSA-E-SILVA, A.A. Steroidogenesis in cumulus cells of bovine cumulus oocyte complexes matured *in vitro* with BSA and different concentrations of steroids. *Animal Reproduction Science*, v. 69, p. 175-186, 2002.

MORITA, Y.; TILLY, J. L. Oocyte apoptosis: Like sand through an hourglass. *Developmental Biology*, v. 213, p. 1-17, 1999.

MOTLIK, J.; PAVLOK, A.; KUBELKA, M.; KALOUS, J; KALAB, P. Interplay between CDC2 kinase and MAP kinase pathway during maturation of mammalian oocytes. *Theriogenology* v. 49, p. 461-469, 1998.

MURUVI, W.; PICTON, H. M.; RODWAY, R. G.; JOYCE, I. M. *In vitro* growth of oocytes from primordial follicles isolated from frozen-thawed Lamb ovaries. *Theriogenology*, v. 64, p.1357-1370, 2005.

NATION, A.; SELWOOD, L. The production of mature oocytes from adult ovaries following primary follicle culture in a marsupial. *Reproduction*, v. 138, p. 247-255, 2009.

NORBURY, C. J.; HICKSON, I. D. Cellular responses to DNA damage. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 41, p. 367-401, 2001.

O'BRIEN, M. J.; PENDOLA, J. K.; EPPIG, J. J. A revised protocol for *in vitro* development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their development competence. *Biology of Reproduction*, v. 8, p. 1682-1686, 2003.

PARSHAD, R.K.; KAUR, R.; NATT, J.K. Structural heterogeneity of yolk spheres in hierarchical follicles from hen ovary: a histochemical study. *British Poultry Science*, v. 49, p. 265-272, 2008.

PACCHIAROTTI, J.; MAKI, C.; RAMOS, T.; MARH, J.; HOWERTON, K.; WONG, J.; PHAM, J.; ANORVE, S.; CHOW, Y.C.; IZADYAR, F. Differentiation potential of germ line stem cells derived from the postnatal mouse ovary. *Differentiation*, v. 79, p. 159-170, 2010.

PICTON, H. M.; HARRIS, S. E.; MURUVI, W.; CHAMBERS, E. L. The *in vitro* growth and maturation of follicles. *Reproduction*, v. 136, p. 703-715, 2008

QU, J.; GODIN, P.A.; NISOLLE, M. AND DONNEZ, J. Distribution and epidermal growth factor receptor expression of primordial follicles in human ovarian tissue before and after cryopreservation. *Human Reproduction*, v.15, p. 302±310, 2000.

RACHID, M.A., VASCONCELOS, A.C., NUNES, V.A. Apoptosis in the lymphoid depletion induced by T-2 toxin in broiler chicks. Histomorphometry of the bursa of Fabricius. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 52, p. 6, 2000.

RAHMAN, A. N. M. A.; ABDULLAH, R. B.; WAN KHADIJAH, W. E. A review of reproductive biotechnologies and their applications in goat. *Biotechnology*, v. 7, p. 371-384, 2008.

ROSSETO, R., LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T.; SARAIVA, M. V. A.; MARTINS, F. S.; FAUSTINO, L. S.; ARAÚJO, V. R.; SILVA, C. M.; NAME, K. P.; BÃO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R.; BLUME, H. Interaction between ascorbic acid and follicle-stimulating hormone maintains follicular viability after long-term *in vitro* culture of caprine preantral follicles. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 37, p. 112-123, 2009

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

SARAIVA, M. V. A.; ROSSETTO, R.; BRITO, I. R.; CELESTINO, J. J. H.; SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; ALMEIDA, A. P.; BRUNO, J. B.; MAGALHÃES, D. M.; MATOS, M. H. T.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Dynamic médium produces caprine embryo from preantral follicles grown *in vitro*. *Reproductive Sciences*, v.17, p. 1135-1143 2010.

SAUMANDE, J. Ovogenèse et folliculogenèse. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, v. 157, p. 29-38, 1981.

SERAFIM, M. K.; ARAUJO, V. R.; SILVA, G. M.; DUARTE, A. B.; ALMEIDA, A.P.; CHAVES, R. N.; CAMPELLO, C. C.; LOPES, C. A.; FIGUEIREDO, J. R.; SILVA, L. D. Canine preantral follicles cultured with various concentrations of follicle stimulating hormone (FSH). *Theriogenology*, v. 74, p. 749-755, 2010.

SHAW, J. M.; ORANRATNACHAI, J. M.; TROUNSON, A. O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*, v. 53, p. 59-72, 2000.

SKINNER, M. K. Regulation of primordial follicle assembly and development. *Human Reproduction Update*, v. 11, p. 461, 2005.

SILVA, J. R. V.; FERREIRA, M. A. L.; COSTA, S. H. F.; SANTOS, R. R.; CARVALHO, F. C. A.; RODRIGUES APR, LUCCI, C. M.; BÃO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Degeneration rate of preantral follicles in the ovaries of goats. *Small Ruminant Research*, v. 43, p. 203-209, 2002.

SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; COSTA, S. H. F.; ANDRADE, E. R.; NUNES, A. P. A.; FERREIRA, F. V. A.; LÔBO, R. N. B.; FIGUEIREDO, J. R. Survival and growth of goat primordial follicles after *in vitro* culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. *Animal Reproduction Science*, v. 81, p. 273-286, 2004.

SILVA, J. R. V. Growth factors in goat ovaries and the role of activin-A in the development of early-staged follicles. *Phd Thesis*. Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine, p.142, 2005.

SILVA, J. R. V.; THARASANIT, T.; TAVERNE, M. A. M.; VAN DER WEIJDEN, G. C.; SANTOS, R. R.; FIGUEIREDO, J. R.; VAN DEN HURK, R. The activin-follistatin system and *in vitro* early follicle development in goats. *Journal of Endocrinology*, v. 189, p. 113-125, 2006.

SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; SARAIVA, M. V. A.; ROSSETTO, R.; FIGUEIREDO, J.R. Influência da tensão de oxigênio na maturação oocitária e cultivo *in vitro* de folículos e embriões. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 34, p. 233-242, 2010.

SILVA, G. M.; ARAÚJO, V. R.; DUARTE, A. B. G.; CHAVES, R. N.; SILVA, C. M. G.; LOBO, C. H.; ALMEIDA, A. P.; MATOS, M. H. T.; TAVARES, L. M. T.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J. R. Ascorbic acid improves the survival and *in vitro* growth of isolated caprine preantral follicles. *Animal Reproduction*, v. 8, p. 14-24, 2011.

SILVA, C.M.G.; CASTRO, S.V.; FAUSTINO, L.R.; RODRIGUES, G.Q.; BRITO, I.R.; ROSSETO, R.; SARAIVA, M.V.A.; CAMPELLO, C.C.; LOBO, C.H.; SOUZA, C.E.A.; MOURA, A.A.A.; DONATO, M.A.M.; PEIXOTO, C.A.; FIGUEIREDO, J.R. The effects of epidermal growth factor (EGF) on the *in vitro* development of isolated goat secondary follicles and the relative mRNA expression of EGF, EGF-R, FSH-R and P450 aromatase in cultured follicles. *Research in Veterinary Science*, v. 94, p. 453-461, 2013.

SMITZ, J.; DOLMANS, M. M.; DONNEZ, J.; FORTUNE, J. E.; HOVATTA, O.; JEWGENOW, K.; PICTON, H. M.; PLANCHA, C.; SHEA, L. D.; STOUFFER, R. L.; TELFER, E. E.; WOODRUFF, T. K.; ZELINSKI, M. B. Current achievements and future research directions in ovarian tissue culture, *in vitro* follicle development and transplantation: implications for fertility preservation. *Human Reproduction Update*, v. 16, p. 395-414, 2010.

TAMURA, K.; MATSUSHITA, M.; ENDO, A.; KITSUKAKE, M.; KOGO, H. Effect of insulin-like growth factor-binding protein 7 on steroidogenesis in granulosa cells derived from equine chorionic gonadotropin-primed immature rat ovaries. *Biology of Reproduction*, v. 77, p. 485-491, 2007.

TELFER, E. E.; McLAUGHLIN, M.; DING, C.; THONG, K. J. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. *Human Reproduction*, v. 23, p. 1151-1158, 2008.

THORBUM, A. Death receptor-induced cell killing. *Cellular Signaling*, v. 16, p.139-44, 2004

TROUNSON, A. The derivation and potential use of human embryonic stem cells. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 13, p. 523-532, 2001.

VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M.M.; BECKER, J.F. *In vivo* and *in vitro* development of preantral follicles. *Theriogenology*, v. 47, p. 73-82, 1997.

VAN DEN HURK, R.; SPEK, E.R.; HAGE, W.J.; FAIR, T.; RALPH VAN DER HURK; R.; ZHAO; J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, v. 63, p. 1717-1751, 2005.

WALTERS, K.A.; ALLAN, C.M.; HANDELSMAN, D.J. Androgen actions and the ovary. *Biology of Reproduction*, v. 78, p. 380-389, 2008.

WANDJI, S. A.; SRSEN, V.; NATHANIELSZ, P. W.; EPPIG, J. J.; FORTUNE, J. E. Initiation of growth of baboon primordial follicles *in vitro*. *Human Reproduction*, v. 12, p. 1993-2001, 1997.

WHITE, Y.A.R.; WOODS, D.C.; TAKAI, Y.; ISHIHARA, O.; SEKI, H.; TILLY, J.L. Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. *Nature*, v. 18, p. 413-421, 2012.

WOOD, T. C.; MONTALI, R. J.; WILDT, D. E. Follicle-oocyte atresia and temporal taphonomy in cold-stored domestic cat ovaries. *Molecular Reproduction Development*, v. 46, p. 190-200, 1997.

WU, J.; BENJAMIN, R. E.; CARRELL, D. T. *In vitro* growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. *Biology of Reproduction*, v. 64, p. 375-381, 2001.

ZEISS, C. J. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. *Veterinary Pathology*, v. 40, p. 481-495, 2003

ZOU, K.; YUAN, Z.; YANG, Z.; LUO, H.; SUN, K.; ZHOU, L.; XIANG, J.; SHI, L.; YU, Q.; ZHANG, Y.; HOU, R.; WU, J. Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. *Nature Cell Biology*, v. 11, p. 631-636, 2009.