



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

PATRÍCIA MAGALHÃES DE ANDRADE

**EFEITO DOS MEIOS DE CULTIVO DE BASE α -MEM E TCM-199 E DO
FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL (EGF) SOBRE O
DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS
CAPRINOS E OVINOS INCLUSOS EM FRAGMENTOS DE TECIDO
OVARIANO**

**FORTALEZA – CE
2013**

PATRICIA MAGALHÃES DE ANDRADE

EFEITO DOS MEIOS DE CULTIVO DE BASE α -MEM E TCM-199 E DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL (EGF) SOBRE O DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS E OVINOS INCLUSOS EM FRAGMENTOS DE TECIDO OVARIANO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para 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 Responsável – Francisco Welton Silva Rios – CRB-3/919

A553e Andrade, Patrícia Magalhães de
 Efeito dos meios de cultivo de base α -MEM e TCM-199 e do Fator de Crescimento Epidermal (EGF) sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos e ovinos incluídos em fragmentos de tecido ovariano / Patrícia Magalhães de Andrade. -- 2013.
 CD-ROM. 61 f.; il. (algumas color.): 4 ¾ pol.

 “CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico, acondicionado em caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm)”.
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias, Fortaleza, 2013.
 Área de Concentração: Reprodução e Sanidade de Pequenos Ruminantes.
 Orientação: Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo.
 Co-orientação: Profa. Dra. Roberta Nogueira Chaves.

 1. Desenvolvimento folicular. 2. α -MEM. 3. TCM-199. 4. Caprino. 5. Ovino. I. Título.

CDD: 636.08

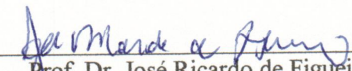
PATRICIA MAGALHÃES DE ANDRADE

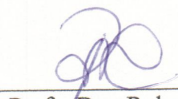
EFEITO DOS MEIOS DE CULTIVO DE BASE α -MEM E TCM-199 E DO FATOR
DE CRESCIMENTO EPIDERMAL (EGF) SOBRE O DESENVOLVIMENTO *IN*
VITRO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS E OVINOS INCLUSOS EM
FRAGMENTOS DE TECIDO OVARIANO

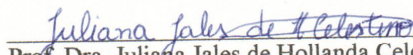
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Aprovada em: 08 /07/ 2013

BANCA EXAMINADORA


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


Profa. Dra. Roberta Nogueira Chaves
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)
(Coorientadora/Examinadora)


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

*Dedico aos meus pais com amor,
Francisca e Valdemar por essa conquista!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora por estarem presente a cada momento de minha vida me dando conhecimento, fé, força e esperança.

À Universidade Estadual do Ceará (UECE) e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) pela capacitação profissional que me proporcionaram.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo incentivo concedido na forma de bolsa de estudo, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), 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 orientador, Dr. José Ricardo de Figueiredo, por ter me recebido no LAMOFOPA como apoio técnico e me incentivado a seguir carreira acadêmica, pelos aconselhamentos e todo conhecimento transmitido e pela paciência e confiança durante esses anos. Muito obrigada!

A minha coorientadora, Dra. Roberta Nogueira Chaves, por ser uma pessoa maravilhosa e uma ótima profissional, pelos ensinamentos transmitidos, tanto técnicos como científicos, e toda disponibilidade e contribuição para o desenvolvimento dessa pesquisa. Muito obrigada!

À examinadora externa, Dra. Maria Gorete Flores Salles pela disponibilidade e participação na banca examinadora

À suplente Dra. Juliana Jales Holanda Celestino pela disponibilidade, prestatividade e pela participação na banca examinadora.

A Profa. Ana Paula Ribeiro Rodrigues pelos conhecimentos transmitidos e disponibilidade na correção do artigo.

Ao Prof. Claudio Cabral Campello pelo auxílio nas análises estatísticas e pelo conhecimento em histologia. Pela paciência de explicar cada ponto e por toda ajuda.

Aos colegas do curso de mestrado pela espontaneidade e alegria na troca de informações e materiais, numa rara demonstração de amizade e solidariedade.

As minhas amigas “superpoderosas” e que se tornaram minhas irmãs, Anelise Maria Vasconcelos Alves, Laritza Ferreira de Lima, Rebeca Magalhães Rocha Pedrosa que estiveram comigo desde o início que atuei como técnica no LAMOFOPA até a execução dessa dissertação. Sem vocês seria impossível concluir esse trabalho. Pelos bons momentos, ensinamentos e força que nunca me fizeram desistir sempre me incentivando e me ajudando nos momentos difíceis. Amo vocês. É uma amizade para se levar para toda a vida.

À Adeline de Andrade Carvalho que foi uma peça fundamental para a conclusão dessa pesquisa e pela amizade, disponibilidade e pelo profissionalismo.

À Valdevane Rocha Araújo pelo convívio, incentivo e pelos ensinamentos técnicos e científicos. Durante o período do mestrado, você foi de grande importância por sempre ter me ajudado. É meu exemplo de profissional.

Ao meu amigo e ex-técnico José Leandro da Silva Neto pelo conhecimento transmitido da histologia clássica, pelos momentos de descontração e pela troca de experiência que me ajudou muito desenvolver os trabalhos durante o período de técnica. Ao ex-técnico Zandor Camelo pela amizade e momento de descontração.

Às amigas e técnicas Antonia Lindemara Sousa Rodrigues e Lidiane Sales por serem pessoas que receberam os meus ensinamentos técnicos e se tornaram grandes amigas. O meu muito obrigado à Priscilla de Melo Campos por ser é uma pessoa maravilhosa e sempre me ajudou me dando força.

Às Doutoradas Ticiane Franco Pereira da Silva, Ana Kelen Felipe Lima, Edmara Chaves Costa que me ajudaram no início dessa caminhada e por toda disponibilidade de ajuda profissional e pessoal, e pela amizade.

Aos meus pais, Francisca Magalhães e Valdemar de Andrade, por ter me dado a vida e me ensinou a viver com dignidade e por todo amor, carinho e força e pelo deslocamento para UECE. Ao Meu irmão Wagner Enoque Magalhães de Andrade pelo convívio, amor e por sempre estar disponível para ir me buscar na universidade desde a graduação até a pós-graduação. A minha sobrinha Julia Saldanha de Andrade e a minha ex-cunhada Joyce Saldanha pelo o carinho. Amo vocês.

Ao Meu Amor, Adalberto Lima, pela compreensão, companheirismo e amor constante. Por estar ao meu lado, nos momentos bons e difíceis da minha vida. Te amo!

Aos meus amigos da graduação, em especial às minhas amigas, Eliseanne Lidia (irmã) e Eliza Santiago, pela convivência e pelos bons momentos e por toda amizade que cultivamos até hoje.

Às minhas amigas distantes mais sempre presentes, Sanely Lorenço Calliman, Valesca Luz, Gabriela Liberalino de Lima, Priscila Ramos de Azevedo que passaram no LAMOFOPA mais se tornaram grandes amigas, companheiras, pelos momentos de alegria e pelas palavras de conforto.

Aos meus amigos e companheiros do Restaurante Universitário, Michelle Karen Brasil Serafim, Francisco Léo Nascimento de Aguiar, Francielli Osmarini Lunardi, Allana Ferreira da Costa Pessoa, Denise Damasceno Guerreiro, Hudson Henrique Vieira Correia, Francisca Tuelly Bandeira de Oliveira, Andréa Moreira pelo convívio, companheirismo e troca de informações.

Aos professores do PPGCV pelos conhecimentos compartilhados.

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: Profa. Dra. Ana Paula Ribeiro Rodrigues, Dr. Fabrício Sousa Martins, Dra. Ana Beatriz Graça Duarte, Dr. Carlos Henrique Lobo, Dr. Régis Siqueira de Castro Teixeira, Dr. Rodrigo Tenório Padilha, Dr. Anderson Almeida, Luciana Rocha Faustino, Cleidson Manoel Gomes da Silva, Isadora Machado Teixeira Lima, Giovanna Quintino Rodrigues, Deborah de Melo Magalhães Padilha, Ívina Rocha Brito, Hiédely Kenia Machado Luz, Simone Vieira Castro, Lívia Schell Wanderley, Rafael Rosseto de Sousa, Gerlane Modesto da Silva, Johanna Leiva Revilla, Tatiana Góis Soares, Anderson Henrique Castro Cordeiro, Mirlla Baracho Ferreira, Emmanuel Teles Sales, Paula Correia, José Arnaldo Moreira de Sousa, Renato Félix da Silva, Luana Gaudêncio, Ana Carolina Valente Cavalcante, Marcelo Ricardo Barros Oliveira de Souza Pereira pela convivência durante todos esses anos, além de todos os conhecimentos transmitidos. Em especial à Paula correia que me ajudou com a dissertação.

A Alzenira de Andrade Ferreira por ser uma mãe que sempre ajudou com a parte burocrática e pela amizade.

Aos funcionários do programa, Adriana Maria Sales Albuquerque, Antônio César Camelo e demais funcionários por toda a ajuda e suporte em todos os procedimentos acadêmicos. Ao senhor Araripe motorista do transporte pela idas e vindas dentro da Universidade e que se tornou um grande amigo.

Finalmente, agradeço a todos que aqui não foram citados, mas ajudaram direta ou indiretamente.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito dos meios de base (Alfa Meio Essencial Mínimo α -MEM e Meio de Cultivo Tecidual-199 TCM-199) associados ou não ao fator de crescimento epidermal (EGF) sobre o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais (FOPA) inclusos em tecido ovariano caprino e ovino. Em experimentos separados, os fragmentos ovarianos de ambas as espécies foram analisados imediatamente após a coleta (controle não cultivado) ou após cultivo por 1 ou 7 dias em α -MEM⁺ ou TCM-199⁺ na ausência ou presença de 10 ng/ml de EGF. Antes e após o cultivo, os fragmentos foram destinados para histologia clássica e microscopia de fluorescência. Os resultados mostraram uma redução no percentual de folículos normais a partir do dia 1 de cultivo em relação ao controle não cultivado em todos os tratamentos testados, independente da espécie ($P < 0,05$). Ao avaliar a viabilidade folicular, pode-se observar em ovinos que todos os tratamentos reduziram o percentual de folículos viáveis quando comparados ao controle não cultivado. Entretanto, em caprinos, o cultivo realizado com TCM-199⁺ após 7 dias manteve a viabilidade folicular similar à encontrada no tecido fresco ($P > 0,05$). No que se refere à ativação, foi observado um aumento significativo no percentual de folículos em desenvolvimento em todos os tratamentos após 7 dias de cultivo quando comparado ao controle não cultivado em ambas as espécies. Em conclusão, o TCM-199⁺ preservou a viabilidade dos folículos pré-antrais caprinos após o cultivo *in vitro*. Entretanto, em ovinos, após 7 dias de cultivo somente o α -MEM⁺/EGF e TCM-199⁺ obtiveram oócitos maiores em relação ao controle não cultivado. Portanto, recomenda-se a utilização do TCM-199⁺ no cultivo de FOPA em ambas as espécies.

Palavras-Chaves: Desenvolvimento folicular. α -MEM. TCM-199. Caprino. Ovino.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of culture media (Alfa Minimum Essential Medium α -MEM and Tissue Culture Medium-199 TCM-199) in absence or presence of Epidermal Growth Factor (EGF) on *in vitro* culture of caprine and ovine preantral follicles enclosed in ovarian tissue. The fragments of ovarian cortex from both species were immediately analyzed after collection (non-cultured control) or cultured for 1 or 7 days in α -MEM⁺ or TCM-199⁺ in absence or presence of EGF (10 ng/ml). Before and after the culture, the fragments of ovarian cortex were analyzed by classical histology and fluorescence microscopy. After 1 day of culture, all treatments decreased the percentage of morphologically normal follicles when compared to non-cultured control in both species ($P < 0.05$). In fluorescence microscopy, it was observed viable follicles decreasing in all treatments when compared to non-cultured control in ovine. However, in caprine, the culture with TCM-199⁺ after 7 day maintained the follicle viability similar to fresh tissue ($P > 0.05$). Regarding to activation, it was observed an increase of percentage of growing follicles in all treatments after 7 days of culture when compared to non-cultured control in both species. However, in ovine, after 7 days, only the treatments α -MEM⁺/EGF and TCM-199⁺ showed oocytes larger ($P < 0.05$) than non-cultured control. In conclusion, the TCM-199⁺ preserved the caprine preantral follicle viability after *in vitro* culture. However, the media α -MEM⁺/EGF and TCM-199⁺ increased the oocyte diameter after 7 days of culture in ovine. Therefore, it is recommended to use the TCM-199⁺ in the culture of preantral follicles in both species.

Keywords: Follicle development. α -MEM. TCM-199. Caprine. Ovine.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de literatura

Figura 1:	Estrutura do ovário dos mamíferos, evidenciando os folículos ovarianos em diferentes estádios de desenvolvimento.....	20
-----------	---	----

Capítulo I

Figura 1:	Photomicrographs of preantral follicles analyzed by fluorescence microscopy and histology. Histological sections after staining with periodic acid Schiff-hematoxylin, showing (A) normal preantral follicle and (B) a degenerated follicle after culture for 7 days. Note the retracted oocyte with a pyknotic nucleus (B). GC: granulosa cell; O: Oocyte; Nu: oocyte nucleus (bar = 50 μ m). Assessment of the viability of preantral follicles using fluorescent probes. (C) Viable preantral follicle marked in green by calcein-AM and (D) degenerated preantral follicle marked in red by ethidium homodimer 1 (bar = 50 μ m).....	38
Figura 2:	Percentages of viable sheep and goat preantral follicles (mean $\pm$ SD) in the non-cultured control and after 7 days of culture in medium α -MEM ⁺ and TCM-199 ⁺	39

LISTA DE TABELAS

Revisão de literatura

Tabela 1	Principais resultados obtidos em diferentes espécies com a utilização de diversos meios de base para o cultivo <i>in vitro</i> de FOPA.....	25
-----------------	---	----

Capítulo I

Table 1:	Percentages of morphologically normal ovine and caprine preantral follicles (mean $\pm$ SD) in the fresh control (non-cultured) and after 1 or 7-day culture in medium α -MEM ⁺ and TCM-199 ⁺ in the absence or presence of EGF.....	39
Table 2:	Percentage (mean $\pm$ SD) of developing follicles in the non-cultured control and after <i>in vitro</i> culture for 1 or 7 days in α -MEM ⁺ and TCM-199 ⁺ in the absence or presence of EGF.....	40
Table 3:	Follicular and oocyte diameter (mean $\pm$ SD) of ovine and caprine preantral follicles in the non-cultured control and after 7 day culture in α -MEM ⁺ and TCM-199 ⁺ in the absence or presence of EGF.....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR: Anfiregulina

BMP-15: *Protein morphogenetic -15* (Proteína Morfogenética-15)

BSA: *Bovine serum albumin* (Albumina Sérica Bovina)

BTC: Betacelulina

CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CNPQ: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CGP: Células Germinativas Primordiais

FOPA: Folículos Ovarianos Pré-antrais

FSH: *Follicle Stimulating Hormone* (Hormônio Folículo Estimulante)

EBSS: *Earle's Balanced Salt Solution* (Solução Salina Equilibrada de Earle)

EGF: *Epidermal Growth Factor* (Fator de Crescimento Epidermal)

EGF-R: *Epidermal Growth Factor of Receptor* (receptor para Fator de Crescimento Epidermal)

EPR: Epiregulina

FAVET: Faculdade de Veterinária

Fig.: *Figure* (Figura)

GDF-9: *Growth differentiation factor-9* (Fator de Crescimento e Diferenciação-9)

ITS: *Insulin, Transferrin and Selenium* (Insulina, Transferrina e Selênio)

HB-EGF: Fator de Crescimento Semelhante ao EGF ligado à Heparina

HC: Histologia Clássica

LAMOFOPA: Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-antrais

MOIFOPA: Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais

RNA_m: Ácido Ribonucléico Mensageiro

mg: Miligrama

ml: Mililitros

mm³: Milímetros cúbicos

MEM: *Minimum Essential Medium* (Meio Essencial Mínimo)

MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão

MF: Microscopia de Fluorescência

n: Número Total de Observações

ng: Nanogramas

Nu: Nucleus (núcleo)

NRG 1, 2, 3, 4: Neuregulins 1, 2, 3, 4 (Neuregulinas 1, 2, 3, 4)

NCSU23: *North Carolina State University medium 23*

O: *Oocyte* (Oócito)

P450 aromatase: Citocromo P450 Aromatase

PPGCV: Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

P<0.05: Probabilidade de Erro Menor que 5%

P>0.05: Probabilidade de Erro Maior que 5%

TCM-199: *Tissue Culture Medium 199* (Meio de Cultivo Tecidual-199)

TCM-199⁺: *Supplemented Tissue Culture Medium 199* (Meio de Cultivo Tecidual-199 Suplementado)

SAC: Solução à Base de Água de Coco

TGF- α : Transforming Growth Factor Alfa (Fator de Crescimento Transformante-Alfa)

UECE: Universidade Estadual do Ceará

α -MEM: *Alpha Minimum Essencial Medium* (Meio Essencial Mínimo Alfa)

α -MEM⁺: *Supplement Alpha Minimum Essencial Medium* (Meio Essencial Mínimo Alfa Suplementado)

μ g: Micrograma

%: *Percentage* (Porcetagem)

$\pm$: Mais ou Menos

$^{\circ}$ C: Grau Celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Ovário dos mamíferos	19
2.2 Oogênese e foliculogênese	20
2.3 População e atresia folicular	22
2.4 Aplicações da biotécnica de MOIFOPA	23
2.5 Estado atual do cultivo <i>in vitro</i> de folículos pré-antrais em diferentes espécies	23
2.6 Importância da composição do meio	24
2.6.1 Meios de cultivo de base	25
2.6.2 Fator de Crescimento Epidermal (EGF)	28
2.7 Técnicas de avaliação da eficiência do cultivo <i>in vitro</i>	29
3. JUSTIFICATIVA	31
4. HIPÓTESE CIENTÍFICA	32
5. OBJETIVOS	33
5.1 Objetivo Geral	33
5.2 Objetivos Específicos	33
6. CAPÍTULO I-Efeito dos meios de cultivo de base α-MEM e TCM-199 e do fator de crescimento epidermal (EGF) sobre a sobrevivência e desenvolvimento <i>in vitro</i> de folículos pré-antrais inclusos em fragmentos de tecido ovariano	34
7. CONCLUSÕES	47
8. PERSPECTIVAS	48
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a ovinocaprinocultura intensificou seu crescimento mundial, sobretudo em países em desenvolvimento, como o Brasil (FONSECA, 2005). Esse fato demonstra claramente a necessidade de maiores estudos acerca da reprodução destes animais. Neste contexto, o desenvolvimento e a utilização de biotécnicas de reprodução são condições indispensáveis para o aumento da eficiência reprodutiva dos rebanhos caprinos e ovinos. Dentre essas biotécnicas, a manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA) se destaca pela potencialidade de recuperar milhares de oócitos viáveis inclusos em folículos pré-antrais e, posteriormente, possibilitar seu desenvolvimento até a maturação, prevenindo o processo de atresia que ocorre largamente nos ovários (FIGUEREIDO et al., 2010). Desta forma, a MOIFOPA representa uma alternativa para o fornecimento de oócitos maduros a outras biotécnicas como a fecundação *in vitro* e a clonagem (FIGUEIREDO et al., 2008; McLAUGHLIN et al., 2010).

Apesar de todas as conquistas alcançadas até o momento com a MOIFOPA, as taxas de produção *in vitro* de embriões a partir de folículos pré-antrais (FOPA) de ovinos e caprinos ainda são baixas, o que ressalta a necessidade de mais estudos para o seu aprimoramento. Nesse sentido, o desenvolvimento de um sistema de cultivo *in vitro* eficiente que permita o resgate desses inúmeros folículos antes da atresia é um ponto crucial para promover o desenvolvimento folicular (FIGUEIREDO et al., 2008). Diversos estudos *in vitro* demonstram que o desenvolvimento folicular é influenciado por inúmeros fatores, incluindo as condições de cultivo e, principalmente, a composição do meio de cultivo de base. O meio de cultivo deve garantir o fornecimento adequado de eletrólitos, antioxidantes, aminoácidos, substratos energéticos e vitaminas (PICKTON et al., 2008). Além disso, podem ser adicionado ao meio de cultivo de base hormônios e fatores de crescimento, como por exemplo, o Fator de Crescimento Epidermal (EGF) que já possui efeitos positivos comprovados na manutenção da sobrevivência e em promover o crescimento folicular em ovino e caprino (ANDRADE et al., 2005; CELESTINO et al., 2009).

Diferentes meios de base comerciais têm sido empregados no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos, dentre os quais se destaca o Meio Essencial Mínimo (MEM) (SILVA et al., 2004a; MATOS et al., 2007), o Alfa Meio Essencial Mínimo (α -MEM) (CHAVES et al., 2010; FAUSTINO et al., 2011), o Meio de Cultivo Tecidual 199 (TCM-199) (ARUNAKUMARI et al., 2007) e o meio McCoy's (TELFER et al., 2008). Em bovinos, a comparação entre os meios de cultivo α -MEM, TCM-199 e McCoy's no cultivo *in vitro* de FOPA isolados revelou que o meio de base influencia significativamente a viabilidade e ultraestrutura folicular, sendo mais indicado para bovinos o TCM-199 (ROSSETTO et al., 2012). No entanto, em pequenos ruminantes, apesar de

vários trabalhos utilizarem esses meios de cultivo de base, nenhum estudo havia sido conduzido visando comparar a eficiência entre esses meios de cultivo de base associados ou não ao EGF no desenvolvimento *in vitro* de FOPA inclusos em tecido ovariano de caprinos e ovinos.

Para uma melhor compreensão deste trabalho, a revisão de literatura a seguir abordará aspectos relacionados ao ovário dos mamíferos, oogênese e foliculogênese, população e atresia folicular, aplicações da biotécnica de MOIFOPA, estado atual do cultivo *in vitro*, importância da composição do meio de cultivo de base, com destaque para os meios de base α -MEM e TCM-199. Além disso, será abordada uma breve descrição sobre o EGF e técnicas de avaliação do cultivo *in vitro* de folículos ovarianos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Ovário dos mamíferos

O ovário é um órgão pertencente ao sistema reprodutor das fêmeas, composto de vários tipos de células diferenciadas que trabalham em conjunto para garantir sua função normal (BRISTOL-GOULD e WOODRUFF, 2006). Este órgão possui duas regiões distintas: a medular e a cortical. A região medular é constituída por tecido conjuntivo frouxo, rico em vasos sanguíneos e linfáticos e nervos, os quais são responsáveis pela nutrição e sustentação do ovário (HAFEZ, 2004). A região cortical contém folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento, bem como corpos lúteos, albicans e hemorrágicos (LIU et al., 2006) mostrado na figura 1. Esta gônada feminina é responsável pelo crescimento e maturação dos oócitos, bem como a produção de hormônios esteroides e fatores de crescimento necessário para obter tal finalidade (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Assim, o ovário desempenha as funções gametogênica e endócrina. Estas funções são exercidas pela interação de dois fenômenos que ocorrem no ovário, isto é, a oogênese e a foliculogênese (SAUMANDE, 1991; FIGUEIREDO et al., 2008).

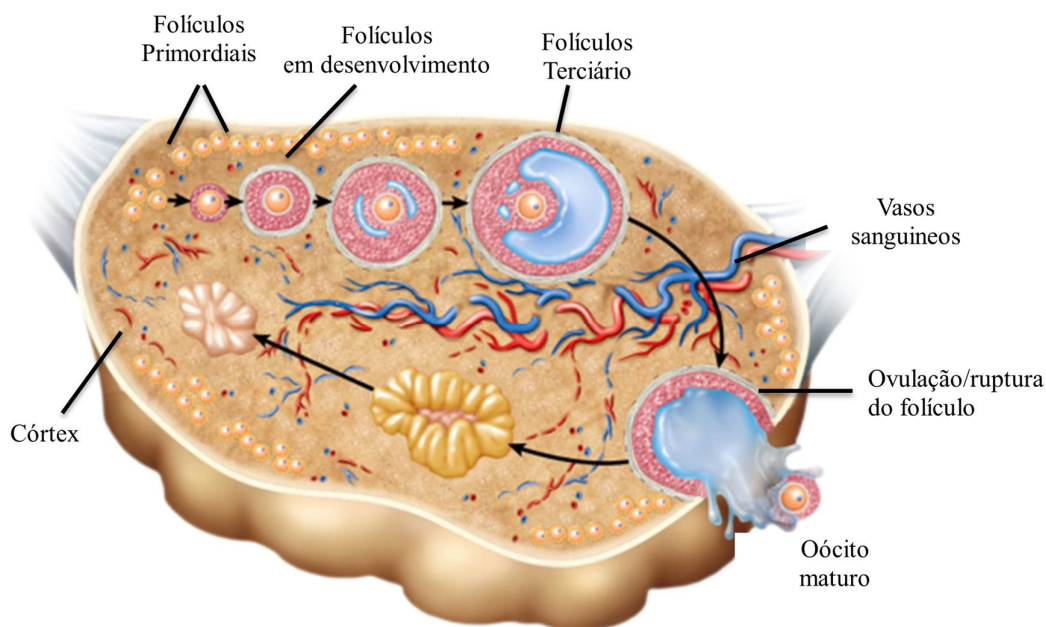


Figura 1: Estrutura do ovário dos mamíferos, evidenciando os folículos ovarianos em diferentes estádios de desenvolvimento (HAFEZ, 2004).

2.2 Oôgenese e Foliculogênese

Nos mamíferos, a formação dos folículos ovarianos inicia-se ainda no período pré-natal e engloba os processos de oogênese e foliculogênese (FIGUEIREDO et al., 2008). A oogênese consiste na formação e diferenciação das células germinativas primordiais (CGP) até a formação do oócito haploide fecundado (BRISTOL-GOULD e WOODRUFF, 2006). Nos estágios iniciais do desenvolvimento ovariano, ocorre a migração das CGP do saco vitelínico para a gônada primitiva com sua posterior colonização (EPPIG et al., 2004). Imediatamente após a diferenciação das gônadas, ocorre a transformação das CGP em oogônias meioticamente ativas e, então, em oócitos primários (SUH et al., 2002). Em seguida, uma camada de células somáticas planas conhecidas também como células da pré-granulosa, originárias do mesonéfron ou de células mesoteliais oriundas do epitélio da superfície ovariana, circundam os oócitos primários formando os folículos primordiais (MAGOFFIN, 2005; MAHESHWARI e FOWLER, 2008), iniciando assim a foliculogênese.

A foliculogênese pode ser definida como o processo de formação, crescimento e maturação folicular, iniciando com a formação do folículo primordial e culminando com o folículo pré-ovulatório (FIGUEIREDO et al., 2008). Esse processo ocorre no interior do córtex ovariano em todos os mamíferos (WILLIAMS e ERICKSON, 2012).

Os folículos podem ser classificados em pré-antrais ou não-cavitários e antrais ou cavitários. Os folículos pré-antrais são compostos pelos folículos primordiais, intermediários ou de transição, primários e secundários. Os folículos antrais são compostos pelos folículos terciários ou pré-ovulatórios (FIGUEIREDO et al., 2008).

Os folículos primordiais são os menores folículos encontrados no ovário, compreendem 90 a 95% da população folicular e constituem o *pool* de reserva folicular. Para que os folículos primordiais iniciem a fase de crescimento é necessário que sejam ativados, isto é, que ocorra a mudança na morfologia das células da granulosa de pavimentosa para cúbica, a retomada da proliferação dessas células e o início do crescimento oocitário (HIRSHFIELD, 1991). Além disso, mecanismos seletivos pelos quais alguns folículos crescem e outros permanecem quiescentes ainda são desconhecidos, entretanto é conhecida a participação de fatores endócrinos (gonadotrofinas) e fatores intra-ovarianos (fatores de crescimento e peptídeos) (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005). Após a ativação, os folículos que apresentam células da granulosa com ambos os formatos pavimentoso e cúbico são chamados de folículos de transição (SILVA et al., 2004a).

Os folículos primários são formados por um oócito imaturo central circundado por uma camada de células da granulosa de formato cúbico. À medida que os folículos iniciam o crescimento, as proteínas que irão formar a zona pelúcida começam a ser sintetizadas (LEE et al.,

2000). Estudos têm demonstrado que o crescimento de folículos primários é estimulado por vários fatores, como o fator de crescimento e diferenciação-9 (GDF-9 - MARTINS et al., 2008) e a proteína morfogenética óssea-15 (BMP-15 - CELESTINO et al., 2011b), que são expressos até o estágio posterior de crescimento.

Os folículos secundários são formados por um oócito imaturo circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa de formato cúbico. As células da granulosa apresentam uma extensa rede de junções *gap* que permite a passagem de nutrientes, íons inorgânicos, mensageiros e pequenos metabólitos entre as células (KIDDER e MHAWI, 2002). O núcleo assume uma posição excêntrica e as organelas começam a se mover para a periferia (LUCCI et al., 2001). Com o desenvolvimento folicular, também aumenta a quantidade de microvilos e a zona pelúcida é claramente visível ao redor do oócito (PARROT e SKINNER, 2000). Inicia-se também a formação das células da teca externa a partir do estroma intersticial (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005).

Com o crescimento dos folículos secundários e a organização das células da granulosa em várias camadas, ocorre a formação de uma cavidade repleta de líquido denominada antro. A partir desse estágio, os folículos passarão a ser classificados como terciários ou antrais. O fluído antral é uma importante fonte de substâncias regulatórias e/ou moduladoras derivadas do sangue ou secreções foliculares, como por exemplo, esteroides, gonadotrofinas, fatores de crescimento e outras substâncias. A produção deste fluído é intensificada pelo aumento da vascularização folicular e permeabilidade dos vasos sanguíneos, as quais ocorrem com o desenvolvimento do folículo (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005).

2.3 População e Atresia Folicular

Acreditava-se que a reserva folicular é definida na vida fetal, entretanto estudos atuais indicam que pode haver a formação de oócitos após o nascimento (WHITE et al., 2012). Estudos anteriores têm demonstrado à teoria da neofoliculogênese em duas vertentes a primeira por JOHNSON ET AL. (2004), ao observarem que o epitélio da superfície do ovário de camundongos fêmeas adultas apresentam células-tronco germinativas que poderiam sustentar a renovação folicular pós-natal. Posteriormente, foi sugerida outra vertente, pela mesma equipe, de que a medula óssea e/ou sangue periférico poderiam servir como reservatório de células germinativas para o ovário de ratas adultas (JOHNSON et al., 2005). Recentemente, estudos demonstraram o nascimento de filhotes de camundongos após a fecundação *in vitro* de oócitos originados a partir de células troncos germinativas (ZOU et al., 2009). Estes estudos indicam que pode haver uma grande mudança na biologia reprodutiva de fêmeas mamíferas. No entanto, a importância destes resultados ainda depende de provas definitivas.

A população folicular difere entre as espécies, independente da neofoliculogênese, sendo de aproximadamente 1.500 na camundonga (SHAW et al., 2000), 33.000 na ovelha (AMORIM et al., 2000), 35.000 na cabra (LUCCI et al., 1999) e aproximadamente 2.000.000 na mulher (BAKER et al., 1963). Ao longo da vida do animal, ocorre uma redução ordenada no número de FOPA (SHAW et al., 2000). Essa redução é devido a dois fenômenos que ocorrem naturalmente no ovário: (i) a ovulação e (ii) a atresia ou morte folicular. Somente uma pequena parte (0,1%) dos folículos primordiais chega à ovulação (NUTTINCK et al., 1993), pois a maioria (99,9%) torna-se atrésico, durante as fases de crescimento e maturação oocitária (OTALA et al., 2002).

A atresia folicular pode ocorrer por via degenerativa (SAUMANDE, 1991) e/ou apoptótica (FIGUEIREDO et al., 2008). Na via degenerativa, a isquemia pode ser uma das causas do desencadeamento da morte folicular, resultando em alterações na permeabilidade da membrana celular, aumento de água intracelular, vacuolização citoplasmática e degeneração (BARROS et al., 2001). A análise histológica e ultraestrutural de folículos primordiais e primários degenerados mostraram um oócito retraído com núcleo picnótico e numerosos vacúolos no ooplasma. Já em folículos secundários, foram observadas alterações, tanto no oócito, quanto nas células da granulosa (aumento de volume) (SILVA et al., 2002).

No que se refere à apoptose, sabe-se que este é um evento geneticamente determinado, ou seja, depende da expressão de genes pró e anti-apoptóticos, e é observada nos folículos ovarianos durante toda a vida fetal e adulta (FIGUEIREDO et al., 2008). Uma característica marcante da apoptose é a ativação de nucleases endógenas que quebram o DNA a cada 180-200 pares de bases (YU et al., 2005). Também é caracterizada pela vacuolização citoplasmática e condensação da cromatina, bem como pelo aparecimento de corpos apoptóticos (HUSSEIN, 2005).

Diante disso, visando evitar a enorme perda folicular pela atresia, nas últimas décadas, têm sido desenvolvido vários modelos de cultivo *in vitro* que possibilitam o estudo dos fatores que controlam a atresia e o crescimento folicular.

2.4 Aplicações da biotécnica de MOIFOPA

Em virtude da grande perda folicular que ocorre naturalmente *in vivo* e na tentativa de utilizar de maneira eficiente o potencial de gametas femininos no futuro, muitos estudos vêm desenvolvendo a biotécnica de MOIFOPA, também conhecida como ovário artificial. Esta biotécnica visa o resgate de FOPA do ambiente ovariano e seu posterior cultivo *in vitro* até a sua completa maturação, evitando a atresia (FIGUEIREDO et al., 2007).

Esta biotécnica é de grande importância tanto para a pesquisa fundamental quanto para a reprodução animal. No tocante à pesquisa fundamental, a MOIFOPA poderá contribuir para a elucidação dos mecanismos implicados na foliculogênese inicial. Já para a reprodução animal, o

isolamento de milhares de FOPA a partir de um único ovário e o posterior cultivo *in vitro* dos oócitos neles inclusos até o estágio de maturação, poderá contribuir para a multiplicação de animais de alto valor zootécnico ou em vias de extinção (FIGUEIREDO et al., 2007).

Além disso, a biotécnica de MOIFOPA representa uma excelente alternativa para incrementar e auxiliar no desenvolvimento de pesquisas relacionadas à indústria farmacêutica visando avaliar em caráter pré-clínico o efeito de drogas sobre oócitos em diferentes estádios de desenvolvimento (de folículos primordiais até folículos antrais), bem como desenvolver a imunoesterelização com anticorpos anti-zona pelúcida (FIGUEIREDO et al., 2010).

2.5 Estado atual do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais em diferentes espécies

Um notável progresso tem sido observado no cultivo *in vitro* de FOPA em diferentes espécies animais. Em felinos (JEWGENOW, 1996) e eqüinos (HAAG et al., 2013), observou-se o crescimento folicular após o cultivo *in vitro*, porém, sem a formação de antro. Nas espécies humana (TELFER et al., 2008), bovina (ROSSETTO et al., 2012) e canina (SERAFIM et al., 2010), os folículos secundários isolados foram cultivados *in vitro* por diferentes períodos e se desenvolveram até a fase antral. Com relação aos estudos com as espécies domésticas, os resultados mais relevantes foram obtidos em suínos (WU e TIANG, 2007), bubalinos (GUPTA et al., 2008), ovinos (ARUNAKUMARI et al., 2010; LUZ et al., 2012) e caprinos (SARAIVA et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2011), os quais obtiveram a produção de embriões após o cultivo de FOPA, posterior à maturação e à fertilização *in vitro* dos oócitos.

Apesar dos grandes avanços no cultivo *in vitro* de FOPA com as espécies supracitadas, os resultados mais satisfatórios foram obtidos a partir de estudos realizados com animais de laboratório. CARROLL et al. (1990) obtiveram o nascimento de camundongos após congelamento e descongelamento, maturação e fecundação *in vitro* a partir de folículos primários. Posteriormente, EPPIG e O'BRIEN (1996) obtiveram o nascimento de um camundongo a partir de folículos primordiais crescidos, maturados e fertilizados *in vitro*. Posteriormente, essa mesma equipe, aperfeiçoando o seu protocolo, relatou a produção de embriões e nascimento de 59 camundongos saudáveis a partir de FOPA cultivados, maturados e fecundados *in vitro* (O'BRIEN et al., 2003). Apesar desses resultados, a produção de oócitos maduros a partir do cultivo de FOPA ainda está longe de alcançar os níveis máximos de sua potencialidade devido às condições de cultivo serem inadequadas, parte disso decorre das poucas análises sobre a eficiência dos meios de cultivo de base associada às características espécie-específicas.

2.6 Importância da composição do meio

Um fator importante para obtenção de sucesso no cultivo *in vitro* de FOPA é a composição do meio de cultivo de base. Estes meios são normalmente ricos em componentes importantes para a manutenção e o crescimento folicular *in vitro* como eletrólitos, antioxidantes, aminoácidos, substratos energéticos e vitaminas (PICTON et al., 2008). Além de tais substâncias, tem sido demonstrado que os meios também devem conter preparações comerciais de insulina, transferrina e selênio (ITS) (DEMEESTERE et al., 2005) e que podem ser frequentemente enriquecidos com fontes protéicas (soro fetal bovino, soro de vaca em estro, albumina sérica bovina - BSA), hormônios, peptídeos e diversos fatores de crescimento em diferentes combinações e concentrações, que são importantes para sobrevivência, proliferação e diferenciação celular (FIGUEIREDO et al., 2011).

FIGUEIREDO et al. (1994) descreveram que a sobrevivência *in vitro* dos FOPA bovinos foi reduzida na ausência de hipoxantina e substratos energéticos, tais como piruvato e glutamina. Em caprinos, a adição simultânea de piruvato, glutamina, hipoxantina, BSA e ITS ao meio de cultivo de base (MEM) reduziu significativamente a percentagem de folículos morfologicamente degenerados em comparação ao meio não suplementado (SILVA et al., 2004a). Apesar da utilização rotineira de concentrações suprafisiológicas de insulina (10 µg/ml) em preparados comerciais de ITS adicionados ao meio de cultivo de FOPA caprinos, CHAVES et al. (2011) demonstraram que uma concentração 1000 vezes mais baixa de insulina (10 ng/ml) foi mais eficiente para promover a sobrevivência e crescimento de FOPA *in situ*.

Devido à importância da composição do meio de cultivo de base, faz-se necessário estabelecer um meio de cultivo *in vitro* capaz de assegurar a sobrevivência e o desenvolvimento de FOPA. Entretanto, a comparação da eficácia de meios de composição complexa como o α -MEM e o TCM-199, na presença ou ausência de EGF, ainda não foi realizada no cultivo *in vitro* de FOPA caprinos e ovinos. Essas informações terão destaque e serão descritos a seguir.

2.6.1 Meios de cultivo de base

O meio de base utilizado no cultivo *in vitro* de FOPA pode ter grande influência sobre a sobrevivência e crescimento dos folículos ovarianos, em decorrência de sua composição. Os meios de cultivo de base comumente empregados com sucesso no cultivo *in vitro* de FOPA são o α -MEM e TCM-199 (PICTON et al., 2008). O α -MEM é utilizado com sucesso no cultivo *in vitro* de FOPA ovinos e caprinos para a manutenção da sobrevivência e promoção da ativação folicular (CHAVES et al., 2010; LIMA et al., 2013). Já o TCM-199 é usado com frequência como meio de transporte de ovários caprinos (COSTA et al., 2005) e ovinos (MATOS et al., 2004). Além disso, este meio foi comprovadamente capaz de manter a sobrevivência folicular (JAVED et al., 2010), além de

estimular o crescimento folicular e a síntese de DNA de FOPA caprino e ovino (RAJARAJAN et al., 2006; ARUNAKUMARI et al., 2007). O cultivo de FOPA isolados, tanto com a utilização de α -MEM quanto TCM-199, foi realizado com sucesso, inclusive com a obtenção de embriões a partir de oócitos cultivados e maturados *in vitro* (α -MEM: SARAIVA et al., 2010, LUZ et al., 2012; TCM-199: ARUNAKUMARI et al., 2010).

Em um estudo inicial sobre a influência da utilização de diferentes meios de cultivo de base sobre o cultivo *in situ* de FOPA caprinos, SILVA et al. (2004a) demonstraram que a utilização de MEM, sem o acréscimo de frações de solução à base de água de coco (SAC), aumentou o percentual de folículos ativados. Já MARTINS et al. (2005) demonstraram que a utilização de MEM, SAC ou as soluções conjuntas dessas substâncias promoveram ativação dos folículos primordiais em caprinos.

Em estudos com humanos, WRIGHT et al. (1999) demonstraram que o α -MEM foi mais eficiente para promover a diferenciação e crescimento folicular nos estágios de desenvolvimento que o meio Waymouth e a Solução Salina Equilibrada de Earle (EBSS). Já em suínos, a utilização de TCM-199 aumentou o crescimento folicular em relação ao meio da North Carolina State University medium 23 (NCSU23) (MAO et al., 2002). Este mesmo meio (TCM-199) mostrou-se mais eficaz para manter a viabilidade e a ultraestrutura folicular quando comparado ao α -MEM, McCoy's no cultivo *in vitro* de FOPA bovinos (ROSSETO et al., 2012). Além disso, o TCM-199 resultou em maior crescimento e sobrevivência folicular, bem como maior quantidade de oócitos em vesícula germinal quando comparado ao meio Leibovitz 15 e NCSU23 (JAVED et al., 2010). Os principais resultados obtidos com a utilização de diferentes meios de base estão resumidos na tabela 1.

Tabela 1: Principais resultados obtidos em diferentes espécies com a utilização de diversos meios de cultivo de base para o cultivo *in vitro* de FOPA.

Meio de Cultivo	Espécies	Sistema de Cultivo	Melhores Resultados	Referência
MEM	Búfalos	Isolados	Obtenção de embriões a partir de oócitos cultivados e maturados <i>in vitro</i> a partir de FOPA com células somáticas por 100 dias de cultivo.	Gupta et al., 2008
	Caprino	<i>In situ</i>	Redução da percentagem de folículo morfológicamente degenerados quando adicionado piruvato, glutamina, hipoxantina, BSA e ITS ao MEM.	Silva et al., 2004

	Bovino	<i>In situ</i>	Crescimento e sobrevivência de FOPA quando adicionado ácido ascórbico (50 µg/ml) no cultivo <i>in situ</i> de 8 dias.	Andrade et al., 2012
	Gatas	<i>In situ</i>	Promoção da sobrevivência de folículos primordiais no cultivo de 15 dias em gel de agarose.	Fujiara et al., 2012
NCSU23	Suíno	Isolados	Crescimento de FOPA, obtenção de oócitos maduros e embriões após cultivo por 3 dias com FSH e EGF, seguido de fertilização <i>in vitro</i> .	Wu e Tiang, 2007
TCM-199	Bovino	Isolados	Obtenção de crescimento folicular, formação de antro e manutenção da ultraestrutura após 16 dias de cultivo.	Rossetto et al., 2012
	Camundongo	Isolados	Promoção do crescimento, manutenção da sobrevivência e obtenção de folículos em vesícula germinativa após cultivo por 6 dias.	Javed et al., 2010
	Ovino	Isolados	Obtenção oócitos maduros e embriões após cultivo de FOPA por 6 dias	Arunakumari et al., 2010
α-MEM	Camundongo	Isolados	Crescimento folicular após 6 dias de cultivo <i>in vitro</i> .	Nonowaki et al., 2010
		Isolados	Obtenção de embriões e nascimentos de crias viáveis após cultivo de FOPA isolados obtidos a partir do cultivo <i>in situ</i> de tecido ovariano.	O'Brien et al., 2003
	Caprino	Isolados	Obtenção de oócitos maduros e embrião após 18 dias de cultivo.	Magalhães et al., 2011
		<i>In situ</i>	Promoção da sobrevivência e crescimento de FOPA quando associado a insulina (10 ng/ml).	Chaves et al., 2011
	Ovino	Isolados	Maturação oocitária e obtenção de mórula após cultivo de FOPA e ativação partenogênética.	Luz et al., 2012
	Cadela	Isolados	Crescimento folicular e formação de antro após 18 dias de cultivo de	Serafim et al., 2010

			folículos secundários isolados.	
Waymouth	Ovino	Isolados	Manutenção do crescimento oocitário e sobrevivência folicular após 28 dias de cultivo <i>in vitro</i> utilizando oócitos de folículos isolados a partir de tecido ovariano criopreservado.	Murivi et al., 2005
	Camundongo	<i>In situ</i>	Manutenção do crescimento e desenvolvimento dos folículos isolados quando utilizado na primeira fase o cultivo <i>in situ</i> .	O'Brien et al., 2003
	Bovino	Isolados	Formação de antro após cultivo de 28 dias.	Gutierrez et al., 2000
MCCoy'5a	Bovino	<i>In situ</i>	Aumento do crescimento, formação de antro e expressão de proteínas envolvidas na conexão intercelular (junções <i>gaps</i>) após cultivo com adição de ativina e FSH.	Mclaughlin et al., 2010
	Humano	<i>In situ</i> e isolados (2 passos)	Cultivo <i>in vitro</i> folículos primordiais em fragmentos de tecido ovariano até o estágio de folículos secundários avançados na presença de ativina	Telfer et al., 2008

Adaptado de DUARTE 2011

2.6.2 Fator de Crescimento Epidermal (EGF)

O EGF é um fator de crescimento intraovariano, proteico e mitogênico, pertencente à família EGF. Esta família é constituída por 8 membros: o fator de crescimento transformante-alfa (TGF- α), o fator de crescimento semelhante ao EGF ligado à heparina (HB-EGF), a anfiregulina (AR), a epiregulina (EPR), a betacelulina (BTC) e as neuregulinas (NRG 1-4). Esses membros são importantes mediadores da função ovariana e do desenvolvimento folicular (CONTI et al., 2006; SILVA et al., 2010). O EGF tem sido implicado na formação, desenvolvimento e sobrevivência *in vitro* de folículos secundários em roedores (DEMEESTRE et al., 2005) e espécies domésticas como os caprinos (CELESTINO et al., 2011a), provavelmente, pela sua ação positiva sobre a proliferação das células da granulosa e/ou inibição da apoptose celular.

A proteína EGF tem sido encontrada no oócito e nas células da granulosa de folículos em todos os estádios (EPPIG et al., 2001; CELESTINO et al., 2011a), enquanto que o RNAm para o

EGF foi descrito somente no oócito e nas células da granulosa de folículos antrais suínos (SILVA et al., 2011). Já os seus receptores de membrana chamados de ERBB/EGFR, que são do tipo tirosina quinase, se expressam nos folículos ovarianos caprinos em todos os estádios de desenvolvimento folicular e no epitélio germinativo do ovário (SILVA et al., 2006).

Estudos *in vitro* têm demonstrado em ovinos, que o EGF (100 ng/ml) ou EGF e FSH (100 ng/ml) adicionada ao meio de cultivo foram mais eficazes para manter a sobrevivência e viabilidade de folículos primordiais ativados após 6 dias de cultivo (ANDRADE et al., 2005). Já em caprinos, SILVA et al.(2004b) observaram a mesma eficácia da interação de EGF e FSH na manutenção da viabilidade folicular, estimulando o aumento do diâmetro folicular após 5 dias. CELESTINO et al. (2009) testaram diferentes concentrações de EGF (0, 1, 10, 50, 100 e 200 ng/ml) e observaram que as concentrações mais baixas de EGF (1 e 10 ng/ml) promovera a ativação e estimulara a transição de folículos primordiais para primários em caprinos. Como observado pela mesma equipe (CELESTINO et al., 2011a), após adição de EGF ao cultivo *in vitro* de folículos secundários isolados, os níveis de RNAm para EGF foram maiores do que nos estádios iniciais e a concentração de 10 ng/ml de EGF foi capaz de promover o crescimento folicular. SILVA et al. (2012) observaram que o EGF (50 ng/ml) promoveu a formação de antro, crescimento folicular e a retomada da meiose de folículos secundários em caprino e foram verificados os efeitos do EGF sobre os níveis de RNAm para EGF, receptores para EGF, receptor para o FSH e aromatase P450, e observou-se que esses níveis variaram de acordo com o estágio de desenvolvimento folicular (na fase antral inicial ou tardia). Além disso, a partir da utilização de um meio de base que continha EGF (50 ng/ml) suplementado com FSH sequencial e LH foi possível a obtenção do primeiro embrião caprino oriundos de folículos secundários isolados cultivados *in vitro* (SARAIVA et al., 2010).

2.7 Técnicas de avaliação do cultivo *in vitro* de folículos ovarianos

Existem diferentes técnicas de avaliação da qualidade dos folículos ovarianos antes e após o cultivo *in vitro*, as quais permitem o monitoramento das alterações ocorridas durante o cultivo, sendo, portanto, de grande importância para a melhoria dos sistemas de crescimento *in vitro* de FOPA. A avaliação da qualidade folicular após o cultivo *in vitro* pode ser realizada por diferentes técnicas. Dentre elas, podemos destacar a histologia clássica (HC), a microscopia eletrônica de transmissão (MET), a microscopia de fluorescência (MF) e a biologia molecular.

A HC é uma técnica considerada de baixo custo e de fácil execução, importante para a avaliação dos FOPA cultivados *in vitro*, pois além de permitir uma análise quantitativa, ou seja, de um grande número de folículos cultivados, permite ainda verificar a mudança na morfologia das células da granulosa de pavimentosa para cúbica, além de analisar a integridade morfológica do

oócito e das células da granulosa. Tais avaliações permitem, portanto, a classificação dos folículos quanto ao seu estágio de desenvolvimento (primordial, transição, primário ou secundário), e ainda quanto às suas características morfológicas (normais ou atresicos) (SILVA et al., 2004a).

A MET é considerada uma técnica qualitativa e acurada, que permite a avaliação da integridade de membranas celulares e organelas citoplasmáticas (SALEHNIA, MOGHADAM, VELOJERDI, 2002). Ela se mostra uma ferramenta valiosa para detectar modificações morfológicas iniciais decorrentes da atresia, as quais podem ser observadas apenas em um nível ultraestrutural, antes de se tornarem mais visíveis e possíveis de serem identificadas por microscopia óptica (NOTOLLA et al., 2011). Tal técnica possibilita, portanto, discernir a qualidade do oócito e das células da granulosa (LUCCI et al., 2001; LOPES et al., 2009), sendo deste modo, comumente utilizada como uma técnica complementar à HC.

Na MF são utilizados marcadores fluorescentes, os quais quando excitados por comprimentos de onda específicos, absorvem energia e emitem luz de maior comprimento de onda (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). A MF é considerada uma técnica confiável, prática e rápida para analisar a viabilidade folicular (LOPES et al., 2009), tendo sido empregada para avaliação da viabilidade de FOPA após o cultivo *in vitro* em diversos trabalhos (BRUNO et al., 2009; SILVA et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2010). Dentre os corantes vitais utilizados podemos citar os marcadores fluorescentes (calceína-AM e etídio homodímero-1). A calceína-AM é um marcador de fluorescência verde, que indica clivagem através da atividade esterases intracelulares, considerando os folículos viáveis. Já o etídeo homodímero-1 é um marcador de fluorescência vermelha, que indica ruptura da membrana plasmática e marca a cromatina, considerando os folículos não viáveis (CARVALHO et al., 2011).

Atualmente, alguns estudos (ALMEIDA et al., 2010; CELESTINO et al., 2011a; LIMA et al., 2011) têm associado técnicas de biologia molecular para verificar a presença de RNAm para fatores necessários ao desenvolvimento folicular (SILVA et al., 2011) bem como observar a presença de proteínas (SILVA et al., 2006) e genes (SONG et al., 2011) relacionados a substâncias essenciais, como hormônios e fatores de crescimento importantes para promoção do desenvolvimento e maturação folicular e oocitária.

3. JUSTIFICATIVA

Os FOPA representam cerca de 90 a 95% de toda a população folicular, armazenando assim a grande maioria dos oócitos presentes nos ovários dos mamíferos. Entretanto, a grande maioria desses folículos morre por atresia, o que reduz significativamente o potencial reprodutivo das fêmeas.

Neste contexto, sabendo-se do grande valor econômico que as espécies caprina e ovina representam especialmente para o Nordeste brasileiro, é de extrema importância o desenvolvimento de um sistema de cultivo *in vitro* capaz de ativar esses folículos e assegurar seu posterior crescimento até a maturação, otimizando o aproveitamento do potencial oocitário desses animais de alto valor zootécnico e incrementando a eficiência reprodutiva nessas espécies. Para que os folículos primordiais entrem na fase de crescimento, é necessário que sejam ativados, isto é, que ocorra a proliferação das células da granulosa e o aumento do volume citoplasmático do oócito. Assim, é importante o desenvolvimento de um sistema de cultivo que promova a ativação e que propicie o crescimento destes folículos até o estágio pré-ovulatório fornecendo um grande número de oócitos viáveis que poderão ser destinados para as diferentes biotécnicas. Entretanto, as taxas de produção *in vitro* de embriões a partir de FOPA de espécies domésticas ainda são baixas, demonstrando que ainda são necessários mais estudos para o aprimoramento da biotécnica (FIGUEIREDO et al., 2008)

Nesse aspecto, um fator de extrema importância, ainda a ser aprimorado, é a constituição do meio de cultivo de base (α -MEM e TCM-199) de FOPA caprinos e ovinos, os quais são rotineiramente utilizados em cultivos *in vitro* de FOPA inclusos em tecido ovariano.

Além disso, diversos estudos têm avaliado o efeito de fatores de crescimento adicionado ao meio de cultivo como o fator de crescimento epidermal (EGF) que influencia no processo de ativação e mantém a sobrevivência de FOPA em ovinos e caprinos (ANDRADE et al., 2005; CELESTINO et al., 2009). Entretanto, ainda não há estudos que comparem a eficiência dos meios de cultivo de base (α -MEM x TCM-199), na presença ou ausência de EGF, sobre a sobrevivência e o desenvolvimento folicular em caprinos e ovinos após cultivo *in situ* de curta duração.

A fim de alcançar tais objetivos, foram empregadas as técnicas de histologia clássica e de microscopia de fluorescência para verificar a morfologia e viabilidade de FOPA caprinos e ovinos cultivados, e, conseqüentemente, melhor avaliar a eficiência dos meios de cultivo testados.

4. HIPÓTESE CIENTÍFICA

Diante do exposto foram formuladas as seguintes hipóteses:

- 1) O tipo de meio de cultivo de base (α -MEM e TCM-199) interfere na viabilidade de FOPA caprinos e ovinos.
- 2) A adição de EGF aos meios de cultivo de base α -MEM e TCM-199 melhora o desenvolvimento *in vitro* de FOPA caprinos e ovinos inclusos em fragmentos de tecido ovariano após o cultivo de curta duração.

5. OBJETIVOS

5.1 Geral:

- Avaliar o efeito de dois diferentes meios de cultivo de base (α -MEM e TCM-199) acrescidos ou não de EGF sobre o cultivo *in vitro* de FOPA caprinos e ovinos.

5.2. Específicos:

- Comparar a eficiência dos meios de cultivo de base α -MEM e TCM-199 sozinhos ou adicionados de EGF sobre o desenvolvimento folicular caprino e ovino.
- Analisar a viabilidade e sobrevivência folicular dos FOPA caprinos e ovinos cultivados inclusos no tecido ovariano.

6. CAPITULO I

Efeito da composição de meios de cultivo de base e da presença do fator de crescimento epidermal (EGF) sobre a sobrevivência e desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais inclusos em fragmentos de tecido ovariano caprino e ovino

(Effect of culture medium composition α -MEM and TCM-199 and Epidermal Growth Factor (EGF) addition on in vitro development and survival of caprine and ovine preantral follicles enclosed in fragments ovarian tissue)

Períodico: *Animal Reproduction Science*

(Submetido em Maio de 2013)

Effect of culture medium composition α -MEM and TCM-199 and Epidermal Growth Factor (EGF) addition on *in vitro* development and survival of caprine and ovine preantral follicles enclosed in fragments ovarian tissue

Patrícia Magalhães de Andrade^{*a}, Roberta Nogueira Chaves^b, Anelise Maria Costa Vasconcelos Alves^a, Rebeca Magalhães Pedrosa Rocha^a, Laritza Ferreira de Lima^a, Adeline de Andrade Carvalho^a, Ana Paula Ribeiro Rodrigues^a, Claudio Cabral Campello^a and José Ricardo de Figueiredo^a

^a Laboratory of Manipulation of Oocytes and Preantral Follicles, Faculty of Veterinary, State University of Ceará, Campus Itaperi, Fortaleza, 60740-903 CE, Brazil.

^b Laboratory Morphofunctional, Health Sciences Center University of Fortaleza, Fortaleza, 60811-905 CE, Brazil.

* Corresponding author:

Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV)

Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-Antrais (LAMOFOPA)

Av. Paranjana, 1700, Campus do Itaperi.

Fortaleza – CE – Brasil. CEP: 60714-903

Tel.: +55.85.3101.9852; Fax: +55.85.3101.9840

E-mail address: patyandrade.bio@gmail.com (Patrícia Magalhães de Andrade)

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of culture media (Alfa Minimum Essential Medium α -MEM and Tissue Culture Medium-199 TCM-199) in absence or presence of Epidermal Growth Factor (EGF) on *in vitro* culture of caprine and ovine preantral follicles enclosed in ovarian tissue. The fragments of ovarian cortex from both species were immediately analyzed after collection (non-cultured control) or cultured for 1 or 7 days in α -MEM⁺ or TCM-199⁺ in absence or presence of EGF (10 ng/ml). Before and after the culture, the fragments of ovarian cortex were analyzed by classical histology and fluorescence microscopy. After 1 day of culture, all treatments decreased the percentage of morphologically normal follicles when compared to non-cultured control in both species ($P < 0.05$). In fluorescence microscopy, it was observed viable follicles decreasing in all treatments with 7 days when compared to non-cultured control in ovine. However, in caprine, the culture with TCM-199⁺ maintained the follicle viability after 7 days of culture similar to fresh tissue ($P > 0.05$). Regarding to activation, it was observed an increase of percentage of growing follicles in all treatments after 7 days of culture when compared to non-cultured control in both species. However, in ovine, after 7 days, only the treatments α -MEM⁺/EGF and TCM-199⁺ showed oocytes larger ($P < 0.05$) than non-cultured control. In conclusion, the TCM-199⁺ preserved the caprine preantral follicle viability after *in vitro* culture. Furthermore, the media α -MEM⁺/EGF and TCM-199⁺ increased the oocyte diameter after 7 days of culture in ovine. Therefore, it is recommended to use the TCM-199⁺ in the culture of preantral follicles in both species.

Keywords: Follicle development. α -MEM. TCM-199. Viability. Caprine. Ovine.

1. Introduction

Several studies using *in vitro* culture of preantral follicles have been performed in order to obtain larger number of mature oocytes. These studies have focused primarily on the action of hormones and growth factors in the late follicular phase (Van den Hurk & Zhao, 2005; Baerwald et al., 2012). However, to obtain a greater number of mature oocytes in the end of *in vitro* culture, it is also necessary to know and investigate the role of different substances added in the culture medium on the activation and growth of early preantral follicles.

Among commonly used culture media are highlight the Minimum Essential Medium (MEM: Silva et al., 2004, Chaves et al., 2008), the Alfa Minimum Essential Medium, the modified MEM (α -MEM: Chaves et al., 2010; Faustino et al., 2011) and the Tissue Culture Medium 199 (TCM-199: Javed et al., 2010; Rossetto et al., 2012). These media (α -MEM and TCM-199) have been used alone or added with other substances in the *in vitro* culture of caprine and ovine preantral follicles and were able to maintain the survival and viability, and to promote the early follicular development

(Chaves et al., 2011; Lima et al., 2013; Hemamalini et al., 2003). In addition, growth factors as EGF promotes *in vitro* survival maintenance, viability and development of preantral follicles enclosed in caprine and ovine ovarian tissue (Andrade et al., 2005; Celestino et al., 2009).

Although there are studies using various types of culture media in caprine and ovine, there are no studies comparing the efficiency between α -MEM and TCM-199 media in the presence or absence of EGF on the preantral folliculogenesis in these species. Thus, the aim of this study was to evaluate the efficiency of culture media α -MEM and TCM-199 in the presence or absence of EGF on survival, growth and viability of caprine and ovine preantral follicles enclosed in ovarian tissues.

2. Material and Methods

Unless stated otherwise, the culture media and other chemicals used in this study were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Ovaries were collected at a local slaughterhouse from mixed-breed caprine (n = 5) and ovine (n = 5). In the laboratory, the cortex from each pair of ovaries was then removed and cut into 9 fragments (9 mm³). The fragments were placed in MEM with HEPES and then one slice of tissue was immediately fixed for histological (non-cultured control: day 0). The remaining slices of ovarian cortex were cultured individually for 1 or 7 days in 1 ml of a culture medium in 24-well culture dishes at 39 °C, in an atmosphere at 5% CO₂ in air. The basic culture media, referred to as α -MEM⁺ or TCM-199⁺, consisted of α -MEM or TCM-199 supplemented with 5.5 µg/ml transferrin, 5 ng/ml selenium, 2 mM glutamine, 2 mM hypoxanthine, 1.25 mg/ml bovine serum albumin and antibiotics (100 µg/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin) for both species. The insulin concentrations were different between species: 10 ng/ml for goats (Chaves et al., 2011) and 10 µg/ml for sheep (Lima et al., 2013). The medium was supplemented or not with EGF (10 ng/ml). This EGF concentration was chosen based on a previous work (Celestino et al., 2009). Every 2 days, all the culture medium was refreshed.

Non-cultured control and cultured tissues were processed for histology and analyzed in regard to development parameters as described by Silva et al. (2004). Follicular viability was assessed by epifluorescence microscopy using a marker for live (calcein-AM) or dead (ethidium homodimer-1) cells as previously described by Lima et al. (2013) and shown in Fig. 1.

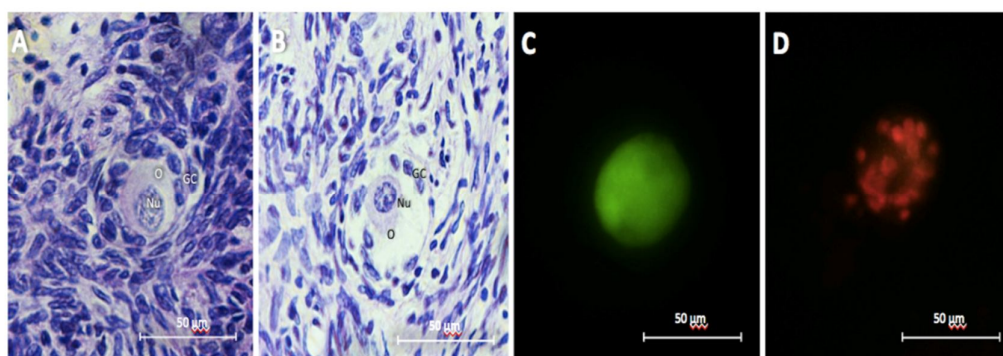


Fig.1. Photomicrographs of preantral follicles analyzed by fluorescence microscopy and histology. Histological sections after staining with periodic acid Schiff-hematoxylin, showing (A) normal preantral follicle and (B) a degenerated follicle after culture for 7 days. Note the retracted oocyte with a pyknotic nucleus (B). GC: granulosa cell; O: Oocyte; Nu: oocyte nucleus (bar = 50 µm). Assessment of the viability of preantral follicles using fluorescent probes. (C) Viable preantral follicle marked in green by calcein-AM and (D) degenerated preantral follicle marked in red by ethidium homodimer-1 (bar = 50 µm).

Follicular viability evaluated by fluorescent markers (discrete variable) was analyzed using Chi-square test and results were expressed as percentages. Continuous variables as follicular surviving and activation were analyzed using PROC MIXED of SAS (2002), including *repeated* statement to account for autocorrelation between sequential measurements. Comparisons among culture medium were further analyzed by the LSD test. A probability of $P < 0.05$ indicated a significant difference and results were expressed as mean $\pm$ S.D.

3. Results

From day 1 onwards of *in vitro* culture, all treatments reduced the percentage of morphologically normal follicles when compared to non-cultured control in both species ($P < 0.05$; Table 1). Only in caprine specie there was a reduction in the percentages of morphologically normal follicles in all treatments with the progression of the culture period ($P < 0.05$).

Table 1. Percentages of morphologically normal ovine and caprine preantral follicles (mean $\pm$ SD) in the fresh control (non-cultured) and after 1 or 7-day culture in medium α -MEM⁺ and TCM-199⁺ in the absence or presence of EGF.

Treatments	Ovine		Caprine	
	Follicular Survival (%)		Follicular Survival (%)	
Control	84,00 $\pm$ 6,41		92,66 $\pm$ 1,49	
	Day 1	Day 7	Day 1	Day 7
α MEM ⁺	71.33 $\pm$ 3.80 *	70.00 $\pm$ 9.72 *	86.00 $\pm$ 4.35 * ^A	68.67 $\pm$ 8.69 * ^B
α MEM ⁺ /EGF	66.00 $\pm$ 4.35*	66.67 $\pm$ 5.27 *	82.67 $\pm$ 7.60 * ^A	71.33 $\pm$ 6.91 * ^B
TCM-199 ⁺	67.33 $\pm$ 9.35 *	68.67 $\pm$ 10.70 *	77.50 $\pm$ 7.39 * ^A	72.00 $\pm$ 6.92 * ^B
TCM-199 ⁺ /EGF	70.67 $\pm$ 7.23 *	63.33 $\pm$ 6.67 *	86.00 $\pm$ 4.94 * ^A	76.67 $\pm$ 2.36 * ^B

*Differs significantly from the non-cultured control (P<0.05)

^{A, B} Capital letters represent distinct differences between columns (days of culture) within the same specie

Only the treatments in absence of EGF were analyzed by fluorescence microscopy owing to EGF addition had not promoted effect in the percentages of morphologically normal follicles verified through the histological analysis. In quantitative analysis by fluorescence microscopy, we observed that both culture media decreased the percentages of viable follicles in the end of culture when compared to non-cultured control in ovine (Figure 2). However, in caprine, only the treatment with α -MEM⁺ (80%) decreased (P<0.05) the percentages of viable follicles when compared to non-cultured control (100%). On the other hand, TCM-199⁺ maintained follicular viability when compared to non-cultured control.

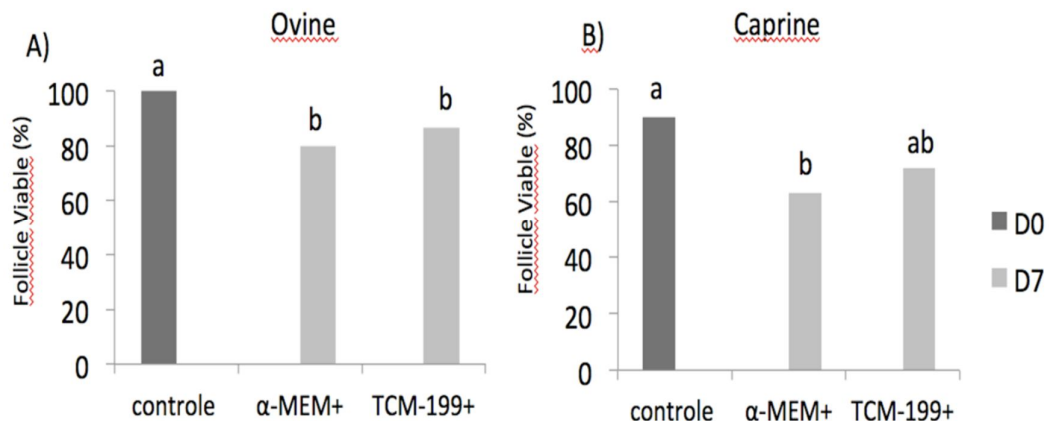


Fig. 2. Percentages of viable sheep and goat preantral follicles (mean $\pm$ SD) in the non-cultured control and after 7 days of culture in medium α -MEM⁺ and TCM-199⁺.

After 7 days of culture, the proportion of primordial follicles (data not shown) was reduced significantly, as the outcome of an increase in the proportion of developing follicles. In all treatments (Table 2), it is noteworthy that for goats, it was observed a precocious follicular development in both culture media used, since it was observed a significant increase ($P < 0.05$) in the percentage of developing follicles already on day 1 of culture when compared to the non-cultured control.

Table 2. Percentage (mean $\pm$ SD) of developing follicles in the non-cultured control and after *in vitro* culture for 1 or 7 days in α -MEM⁺ and TCM-199⁺ in the absence or presence of EGF.

Treatments	Ovine Follicular Development (%)		Caprine Follicular Development (%)	
Control	27.06 $\pm$ 5,09		23.04 $\pm$ 6,07	
	Day 1	Day 7	Day 1	Day 7
α MEM ⁺	19.43 $\pm$ 5.04 ^B	76.42 $\pm$ 14.94 ^{*A}	53.55 $\pm$ 6.93 ^{*B}	78.74 $\pm$ 9.05 ^{*A}
α MEM ⁺ /EGF	18.09 $\pm$ 10.18 ^B	82.01 $\pm$ 7.17 ^{*A}	62.54 $\pm$ 10.17 ^{*B}	82.83 $\pm$ 8.02 ^{*A}
TCM-199 ⁺	21.68 $\pm$ 7.80 ^B	78.80 $\pm$ 3,51 ^{*A}	58.97 $\pm$ 8.43 ^{*B}	85.28 $\pm$ 4.47 ^{*A}
TCM-199 ⁺ /EGF	16.45 $\pm$ 11.09 ^B	69.42 $\pm$ 14.86 ^{*A}	59.35 $\pm$ 10,81 ^{*B}	85.28 $\pm$ 3.62 ^{*A}

*Differs significantly from the non-cultured control ($P < 0.05$).

^{A, B} Capital letters represent distinct differences between columns (days of culture) within the same species.

The table 3 shows the follicular and oocyte diameters in non-cultured control (fresh tissue) and after 1 and 7 days of culture in both species. In goats, there were no significant differences among non-cultured control and evaluated treatments in follicular and oocyte diameters. However, in sheep, after 1 day of culture it was observed an increase in the oocyte diameter in all treatments when compared to the non-cultured control. After 7 days, only α -MEM⁺ in presence of EGF and the TCM-199⁺ alone obtained oocytes larger ($P < 0.05$) than non-cultured control. Moreover, with the

progression of the culture period, there was a reduction of oocyte diameter in treatment TCM-199⁺ in presence of EGF.

Table 3. Follicular and oocyte diameter (Mean $\pm$ SD) of ovine and caprine preantral follicles in the non-cultured control and after 7 day culture in α -MEM⁺ and TCM-199⁺ in the absence or presence of EGF.

Treatments	Ovine		Ovine		Caprine		Caprine	
	Follicular Diameter (μ m)		Oocyte Diameter (μ m)		Follicular Diameter (μ m)		Oocyte Diameter (μ m)	
Control	31.98 $\pm$ 8.46		14.24 $\pm$ 2.62		32.73 $\pm$ 5.24		23.46 $\pm$ 4.94	
	Day 1	Day 7	Day 1	Day 7	Day 1	Day 7	Day 1	Day 7
α MEM ⁺	28.37 $\pm$ 4.26	30.23 $\pm$ 8.81	18.99 $\pm$ 3.04*	17.36 $\pm$ 5.29	31.52 $\pm$ 3.84	29.80 $\pm$ 5.35	21.73 $\pm$ 2.92	19.67 $\pm$ 2.97
α MEM ⁺ /EGF	29.87 $\pm$ 4.02	29.44 $\pm$ 6.59	20.23 $\pm$ 3.46 *	18.27 $\pm$ 4.38*	32.74 $\pm$ 4.67	32.22 $\pm$ 5.62	21.96 $\pm$ 4.14	20.18 $\pm$ 4.86
TCM-199 ⁺	28.14 $\pm$ 3.70	32.51 $\pm$ 8.10	19.61 $\pm$ 1.39*	18.54 $\pm$ 4.86*	29.27 $\pm$ 3.34	31.37 $\pm$ 8.77	20.60 $\pm$ 3.34	19.84 $\pm$ 5.42
TCM-199 ⁺ /EGF	30.54 $\pm$ 4.00	25.84 $\pm$ 6.05	20.55 $\pm$ 2.77* ^A	15.90 $\pm$ 5.17 ^B	31.66 $\pm$ 4.74	31.47 $\pm$ 7.64	21.57 $\pm$ 3.18	20.29 $\pm$ 5.47

*Differs significantly from the non-cultured control (P<0.05).

^{A, B} Capital letters represent distinct differences between columns (days of culture) within the same specie.

4. Discussion

The present study evaluated the effect of culture media α -MEM and TCM-199 in presence or absence of EGF in survival, viability and growth of caprine and ovine preantral follicles. In both species and culture media there was a reduction in percentage of morphologically normal follicles after 7 days of culture when compared to non-cultured control. Regarding to follicle activation, i.e, the primordial to primary follicle transition, after 7 days of culture, we observed an increasing in the percentage of developing follicles in all treatments in ovine and caprine compared to control. This activation result is probably due to the rich composition of the used media (α -MEM e TCM-199), which are composed for several nutrients such as amino acids, antioxidants, inorganic salts and glucose that may stimulate follicular activation (Javed et al., 2010; Haag et al., 2013). Amino acids provides energy sources and precursor protein synthesis (Fujiara et al., 2012) and antioxidant responsible for protecting cells against reactive oxygen species (ROS) (Rossetto et al., 2009).

In the present study, the addition of EGF in the culture media had not promoted effect in the survival, activation and growth. However, in caprine (Celestino et al., 2009) and ovine (Andrade et al., 2005), there was a beneficial effect of the addition of EGF on survival and follicular development after culture of preantral follicles enclosed in ovarian tissue. The divergent in results might be related to the differences between the used culture media, since these studies used MEM, which is a simple media with inorganic salts and glucose. The simple composition of this medium is not sufficient for follicular development, thus the effect of EGF was more evident. In addition, other differences between our study and the studies of Celestino et al. (2009) and Andrade et al. (2005) might promote distinct results. One of the differences is the source of used EGF, once previous studies used human recombinant. However, in our study, we used the EGF from mouse submaxillary glands, which has shown good results in goat secondary follicles growth (Silva et al., 2012). Furthermore, studies with recombinant follicle stimulating hormone (FSH) have shown that different sources of substances might influence on *in vitro* culture cells (Magalhães et al., 2009; Calongos et al., 2008), which may have occurred in this study in referred to EGF.

Evaluation of follicular diameter showed no difference between days of culture in both species and culture media in presence or absence of EGF. However, in sheep, we observed an increase in the oocyte diameter after 7 days of culture in α -MEM⁺ medium supplemented with EGF and in TCM-199⁺ without the addition of EGF. This result clearly shows that, contrary to α -MEM⁺, when modified TCM-199 was used in the culture of ovine preantral follicles, no addition of growth factors was necessary for promoting oocyte growth. Differences in the medium composition (compound type and/or concentration) between the aforementioned media may explain this effect. However, which variable(s) counterbalance the additional effect of EGF remains to be investigated.

5. Conclusion

In conclusion, the TCM-199⁺ preserved the caprine preantral follicle viability after *in vitro* culture. However, the media α -MEM⁺/EGF and TCM-199⁺ increased the oocyte diameter after 7 days of culture in ovine. Therefore, it is recommended to use the TCM-199⁺ in the culture of preantral follicles in both species.

Acknowledgments

This work was supported by CNPq and RENORBIO. P. M. Andrade is a recipient of a grant from CAPES (Brazil).

References

- Andrade, E.R., Seneda, M.M., Alfieri, A.A., Oliveira, J.A., Bracarense, A.P.F.R.L., Figueiredo, J.R., Toniolli, R. 2005. Interactions of indole acetic acid with EGF and FSH in the culture of ovine preantral follicles. *Theriogenology*, 64, 1104-1113.
- Baerwald, A.R., Adams, G.P., Pierson, R.A. 2012. Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review. *Hum. Reprod. Up.* 18, 73-91.
- 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. 2009. Recombinant epidermal growth factor maintains follicular ultrastructure and promotes the transition to primary follicles in caprine ovarian tissue cultured *in vitro*. *Reprod. Sci.* 16, 239-246.
- Chaves, R.N., Martins, F.S., Saraiva, M.V., Celestino, J.J., Lopes, C.A., Correia, J.C., Verde, I.B., Matos, M.H., Bão, S.N, Name, K.P., Campello, C.C., Silva, J.R., Figueiredo, J.R. 2008. Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured *in vitro*. *Reprod. Fertil. Dev.* 20, 5, 640-647.
- Chaves, R.N., Alves, A.M., Duarte, A.B., Araújo, V.R., Celestino J.J., Matos, M.H., Lopes C.A., Campello, C.C., Name, K.P., Bão S.N., Figueiredo J.R. 2010. Nerve growth factor promotes the survival of goat preantral follicles cultured *in vitro*. *Cel. Tiss. Org.* 192, 272-282.
- Chaves, R.N., Alves, A.M.C.V., Faustino, L.R., Oliveira, K.P.L., Campelo, C.C., Lopes, C.A.P., Bão, S.N., Figueiredo, J.R. 2011. How the concentration of insulin affects the development of preantral follicles in goats. *Cel. Tiss. Res.* 346, 451-456.
- Faustino, L.R., Rossetto, R, Lima, I.M., Silva, C.M., Saraiva, M.V., Lima, L.F, Silva, A.W., Donato, M.A., Campello, C.C., Peixoto, C.A., Figueiredo, J.R., Rodrigues, A.P. 2011. Expression of keratinocyte growth factor in goat ovaries and its effects on preantral follicles within cultured ovarian cortex. *Reprod. Sci.* 18, 1222-1229.

- Fujihara, M., Comizzoli, P., Wildt, E.D., Songsasen, N. 2012. Cat and dog primordial follicles enclosed in ovarian cortex sustain viability after *in vitro* culture on agarose gel in a protein-free medium. *Reprod. Domest. Anim.* 47, 102-108.
- Haag, K.T., Magalhães-Padilha, D.M., Fonseca, G.R., Wischral, A., Gastal, M.O., King, S.S., Jones, K.L., Figueiredo, J.R., Gastal, E.L. 2013. *In vitro* culture of equine preantral follicles obtained via the biopsy pick-up method. *Theriogenology*. 79, 911-917.
- Hemamalini, N.C., Rao, B.S., Tamilmani, G., Amarnath D., Vagdevi, R., Naidu, K.S., Reddy, K.K., Rao, V.H. 2003. Influence of transforming growth factor- α , insulin-like growth factor-II, epidermal growth factor or follicle stimulating hormone on *in vitro* development of preantral follicles in sheep. *Small. Rumin. Res.*, 11–22, 2003.
- Javed, A., Ghani, M.J., Soufian, S., Rezaei-Zarchi, S., Kalantar, S.M. 2010. An *in vitro* comparative study of growth media, sera and FSH effects on the growth and maturation of Syrian mice preantral follicles and enclosed-oocytes. *Iran. J. Vet. Res.* 11, 145-153.
- Lima, L.F., Rocha, R.M.P., Alves, A.M.C.V., Saraiva, M.V.A., Araujo, V.R., Lima, I.M.T., Lopes, C.A.P., Bão, S.N., Campello, C.C., Rodrigues, A.P.R., Figueiredo, J.R. 2013. Dynamized follicle-stimulating hormone affects the development of ovine preantral follicles cultured *in vitro*. *Homeopathy*. 102, 41-48.
- Magalhães, D.M., Araújo, V.R., Lima-Verde, I.B., Matos, M.H.T., Silva, R.C., Lucci, C.M., Bão, S. N., Campello, C.C.; Figueiredo, J.R. 2009. Different follicle stimulating hormone (FSH) sources influence caprine preantral follicle viability and development *in vitro*. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 46, 378-386.
- Rossetto, R., Lima-Verde, I.B, Matos, M.H.T., Saraiva, M.V.A., Martins, F.S., Faustino, L.R., Araújo, V.R., Silva, C.M.G., Name, K.P.O., Bão, S.N., Campello, C.C., Figueiredo, J.R., Blume, H. 2009. Interaction between ascorbic acid and FSH maintains follicular viability after long term *in vitro* culture of caprine preantral follicles. *Domest. Anim. Endocrinol.* 37, 112-123.
- Rossetto, R., Saraiva, M.V.A., Santos, R.R., Silva, C.M.G., Faustino, L.R., Chaves, R.N., Brito, I.R., Rodrigues, G.Q., Lima, I.M.T., Donato, M.A.M., Peixoto, C.A., Figueiredo, J.R. 2012. Effect of medium composition on the *in vitro* culture of bovine pre-antral follicles: morphology and viability do not guarantee functionality. *Zygote*, 21, 125-128.
- Silva, J.R.V., Hurk, V.D., Costa, S.H.F., Andrade, E.R., Nunes, A.P.A., Ferreira, F.V.A., Lôbo, R.N.B., Figueiredo, J.R. 2004. Survival and growth of goat primordial follicles after *in vitro* culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. *Anim. Reprod. Sci.* 81, 273-286.
- Silva, C.M.G., Castro S.V., Faustino, L.R., Rodrigues, G.Q., Brito, I.R., Rossetto, 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. 2013. 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. Res. Vet. Sci. 94, 453-461.

Van Den Hurk, R., Zhao, J. 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. Theriogenology.

7. CONCLUSÃO

O meio de base TCM-199⁺ foi capaz de manter a viabilidade após 7 dias de cultivo na espécie caprina. Já na espécie ovina, o α -MEM⁺ adicionado de EGF e o TCM-199⁺ sozinho destacaram-se por possibilitar o aumento do diâmetro oocitário. Desta forma, recomenda-se a utilização do TCM-199⁺ no cultivo de FOPA em ambas as espécies.

8. PERSPECTIVAS

O presente trabalho permitiu determinar um meio de cultivo de base que pudesse ser utilizado tanto na espécie ovina quanto na caprina, no caso específico o TCM-199⁺. No entanto, futuros estudos serão necessários para elucidar quais suplementos deverão ser adicionados ao meio de cultivo de base para assegurar o crescimento dos folículos primordiais inclusos em fragmentos ovarianos até o estágio de folículos secundários avançados. O isolamento destes últimos seguido do seu cultivo até o estágio de folículo pré-ovulatório será fundamental para a produção de embriões a partir de FOPA.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.; LUCCI, C.M.; FIGUEIREDO, J.R.; GONÇALVES, P.B.D. Effect of sectioning on the number of isolated ovine preantral follicles. *Small Ruminant Research*, v.37, p.269-277, 2000.

ANDRADE, E.R.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A.A.; OLIVEIRA, J.A.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; FIGUEIREDO, J.R.; TONIOLLI, R. Interactions of indole acetic acid with EGF and FSH in the culture of ovine preantral follicles. *Theriogenology*, v. 64, p.1104-1113, 2005.

ANDRADE, E.R.; VAN DER HURK, R.; LISBOA, L.A.; HERTEL, M.F.; MELO-STERZA, F.A.; MORENO, K.; BRACARENSE, A.P.F.R.L.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A.A. Effects of ascorbic acid on in vitro culture of bovine preantral follicles. *Zygote*, p.1-10, 2012.

ARUNAKUMARI, G.; SHANMUGASUNDARAM, N.; RAO, V.H. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. *Theriogenology*, v.74, p.884-94, 2010.

ARUNAKUMARI, G.; VAGDEVI, R.; RAO, B.S.; NAKE, B.R.; NAIDU, K.S.; SURESH KUMAR, R.V.; RAO, V.H. Effect of hormones and growth factors on in vitro development of sheep preantral follicles. *Small Ruminant Research*, v.70, p.93-100, 2007.

BAKER, T.G. A quantitative and cytological study of germ cells in human ovaries. *Department of anatomy, University of Birmingham*, p.39-44, 1963.

BAERWALD, A.R.; ADAMS, G.P.; PIERSON, R.A. Ovarian antral folliculogenesis during the human menstrual cycle: a review. *Human Reproduction Update*, v. 18, p. 73-91, 2012.

BARROS, L.F.; HERMOSILLA, T.; CASTRO, J. Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. *Comparative Biochemistry and Physiology*, v. 130, p. 401-409, 2001.

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

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.; BÁO, S.N.; SILVA, J.R.V.; 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.

CARROLL, J.; WHITTINGHAM, D.G.; WOOD, M.J.; TELFER, E.; GOSDEN, R.G. Extraovarian production of mature viable mouse oocytes from frozen primary follicles. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 90, p. 21-327, 1990.

CARVALHO, A.A.; FAUSTINO, L.R.; SILVA, C.M.G.; CASTRO, S.V.; LUZ, H.K.M.; ROSSETTO, R. ; LOPES, C.A.P.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; COSTA, A.P.R.; Influence of vitrification techniques and solutions on the morphology and survival of preantral follicles after in vitro culture of caprine ovarian tissue. *Theriogenology*, v.76, p. 933–941, 2011.

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.; BÁO, 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.

CELESTINO, J.J. ; BRUNO, J.B.; SARAIVA, M.V.; ROCHA, R.M.; BRITO, I.R.; DUARTE, A.B. ; ARAÚJO, V.R.; SILVA, C.M.; MATOS, M.H. ; CAMPELLO,C.C.; SILVA, J.R.; FIGUEIREDO, J.R. Steady-state level of epidermal growth factor (EGF) mRNA and effect of EGF on in vitro culture of caprine preantral follicles. *Cell Tissue Research*, v.344, p.539-550, 2011a.

CELESTINO, J.J.H.; LIMA-VERDE I.B.; BRUNO, J.B.; MATOS, M.H.T.; CHAVES.R.N.; SARAIVA, M.V.A.; SILVA, C.M.G.; FAUSTINO, L.R.; ROSSETTO, R.; LOPES,C.A.P.; DONATO, M.A.M.; PEIXOTO, C.A.; CAMPELLO, C.C.; SILVA, J.R.V.; FIGUEIREDO, J.R. Steady-state level of bone morphogenetic protein-15 in goat ovaries and its influence on in vitro development and survival of preantral follicles. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 338, p.1–9, 2011b.

CHAVES, R.N.; MARTINS, F.S.; SARAIVA, M.V.; CELESTINO, J.J.; LOPES, C.A.; CORREIA, J.C.; VERDE, I.B.; MATOS, M.H.; BÁO, S.N; NAME, K.P.; CAMPELLO, C.C.; SILVA, J.R.; FIGUEIREDO, J.R. Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured in vitro. *Reproduction Fertility Development*, n. 20, v. 5, p. 640-647, 2008.

CHAVES, R.N.; LIMA-VERDE, I.B.; CELESTINO, J.J.H.; DUARTE, A.B.G.; ALVES, A.M.C.V.; MATOS, M.H.T.; CAMPELLO, C.C.; NAME, K.P.O.; BÁO, S.N.; BURATINI, J. ; FIGUEIREDO,J.R. Fibroblast growth factor-10 maintains the survival and promotes the growth of cultured goat preantral follicles. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 39, p. 249–258, 2010.

CHAVES, R.N.; ALVES, A.M.C.V.; FAUSTINO, L.R.; OLIVEIRA, K.P.L.; CAMPELO,C.C.; LOPES,C. A. P. ; BÁO ,S.N.; FIGUEIREDO, J. R. How the concentration of insulin affects the development of preantral follicles in goats. *Cell Tissues Research*, v.346, n. 3, p. 451-456, 2011.

CONTI, M.; HSIEH, M.; PARK, J.Y. & SU, Y.Q. Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles. *Molecular Endocrinology*, 20, p.715-723, 2006.

COSTA, S.H.F.; ANDRADE, E.R.; SILVA, J.R.V.; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A; LOBO, R.N B.; ORASHI, O.M.; FIGUEIREDO, J.R .Preservation of goat preantral follicles enclosed ovarian tissue in saline or TCM 199 solutions. *Small Ruminant Research*, v.58, p.189-193, 2005.

DEMEESTERE, I.; CENTNER, J.; GERVY, Y.; DELBAERE, A. Impact of various endocrine and paracrine factors on *in vitro* culture of preantral follicles in rodents. *Reproduction*, v. 130, p. 147-156, 2005.

DUARTE, A.B.G; Influência da interação folicular, do fluido folicular e do fator de crescimento semelhante à insulina II (IGF-II) no desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais isolados caprinos, Fortaleza 2011 p.70, Tese (Doutorando em Biotecnologia), Universidade Estadual do Ceará, RENORBIO.

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.

EPPIG, J.J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, v. 122, p. 829-838, 2001.

EPPIG, J.J.; VIVEIROS, M.M.; BIVENS, C.M.; DE LA FUENTE, R. Regulation of mammalian oocyte maturation. In: LEUNG, P.C., ADASHI, E.Y. (Eds.), *The ovary*, 2004.

ERICKSON, G.F. An analysis of follicles development and ovum maturation. In: *Seminars in Reproductive Endocrinology*, san Diego-California, p.233-254, 1986.

FAUSTINO L.R.; ROSSETTO R.; LIMA I.M.; SILVA, C.M; SARAIVA, M.V.; LIMA L.F.; SILVA, A.W.; DONATO, M.A.; CAMPELLO, C.C.; PEIXOTO, C.A.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES A.P., Expression of keratinocyte growth factor in goat ovaries and its effects on preantral follicles within cultured ovarian cortex. *Reproduction Science*, v. 12, p.1222-1229, 2011.

FIGUEIREDO, J. R. ; HULSHOF, S. C. J. ; HURK, R. F. J. H. S. V. D. ; NUSGENS, B. ; BEVERS, M. M. ; ECTORS, F. ; BECKERS, J. F. Preservation of oocyte and granulosa cell morphology in bovine preantral follicles cultured *in vitro*. *Theriogenology*, v. 41, p. 1333-1346, 1994.

FIGUEIREDO, J.R.; CELESTINO, J.J.H.; RODRIGUES, A.P.R.; SILVA, J.R.V. Importância da biotécnica de MOIFOPA para o estudo da foliculogênese e produção *in vitro* de embriões em larga escala. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.31, p.143-152, 2007.

FIGUEIREDO J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; SILVA, J. R. V. Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais – MOIFOPA. In: Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal, Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF, São Paulo: Editora Roca, p. 303-327, 2008.

FIGUEIREDO, J. R.; FAUSTINO, L.R.; CELESTINO, J.J.H.; RODRIGUES, A.P.R. Advances in artificial ovary in goats. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 38, p. 417-477, 2010.

FIGUEIREDO, J. R.; CELESTINO, J. J. H.; FAUSTINO, L. R.; RODRIGUES, A. P. R. *In vitro* culture of caprine preantral follicles: Advances, limitations and prospects. *Small Ruminant Research*, v. 98, p. 192-195, 2011.

FONSECA, J. F. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16, 2005.Goiânia, GO. Anais: Palestras.

FUJIHARA, M.; COMIZZOLI, WILDT, E.D AND SONGSASEN,N. Cat and Dog Primordial Follicles Enclosed in Ovarian Cortex Sustain Viability after *In vitro* Culture on Agarose Gel in a Protein-Free Medium, *Reproduction Domestic Animal*,v, 47 (Suppl. 6), p.102–108, 2012.

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.

GUTIERREZ, C. G.; RALPH, J. H. ; TELFER, E.E.; WILMUT, J. ; 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.

HAAG, K.T.; MAGALHÃES-PADILHA, D.M.; FONSECA, G.R.; WISCHRAL, A.; GASTAL, M.O.; KING, S.S.; JONES, K.L.; FIGUEIREDO, J.R.; GASTAL, E.L. *In vitro*

culture of equine preantral follicles obtained via the biopsy pick-up method. *Theriogenology*, v. 79, p. 911-917, 2013.

HAFEZ, E.S.E. Anatomy of Female Reproduction. In: *Reproduction in Farm Animals*, 7th edition, Williams & Wilkins, USA, p. 20-58, 2004.

HEMAMALINI, N.C.; RAO, B.S.; TAMILMANI, G.; AMARNATH D.; VAGDEVI, R.; NAIDU, K.S.; REDDY, K.K.; RAO, V.H. Influence of transforming growth factor- α , insulin-like growth factor-II, epidermal growth factor or follicle stimulating hormone on *in vitro* development of preantral follicles in sheep. *Small Ruminant Research*, p.11–22, 2003.

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.

JAVED, A.; GHANI, M. J.; SOUFIAN, S.; REZAEI-ZARCHI, S. AND KALANTAR, S. M. An *in vitro* comparative study of growth media, sera and FSH effects on the growth and maturation of Syrian mice preantral follicles and enclosed-oocytes. *Iranian Journal of Veterinary Research, Shiraz University*, v. 11, no. 2, 2010.

JEWGENOW, K. N.; STOLTE, M. Isolation of preantral follicles from nondomestic cats viability and ultrastructural investigations. *Animal Reproduction Science*, v. 44, p. 183-193, 1996.

JOHNSON, J.; CANNING, J.; KANEKO, T.; PRU, J.K.; TILLY, J.; Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*, v.428, p.145-150, 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.

JUNQUERIA, L.C.U.; CARNEIRO, J. Histologia básica, 10. Ed. Rio de Janeiro: *Guanabara Koognam* 2004.

KIDDER, G.M.; MHAWI, A. A. Gap junction and ovarian folliculogenesis. *Reproduction*, v.123, p.613-620, 2002.

LEE, V.H. Expression of Rabbit Zona Pellucida-1 Messenger Ribonucleic Acid During Early Follicular Development. *Biology of Reproduction*. v. 63, p. 401, 2000.

LIMA, I.M.T.; BRITO, I.R.; RODRIGUES, G.Q.; SILVA, C.M.G.; MAGALHÃES-PADILHA, D.M.; LIMA, L.F.; CELESTINO, J.J.H.; CAMPELLO, C.C.; SILVA, J.R.V.; FIGUEIREDO, J.R. RODRIGUES, A.P.R. Presence of c-kit mRNA in goat ovaries and improvement of in vitro preantral follicle survival and development with kit ligand. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 345, p.38–47, 2011.

LIMA, L.F.; ROCHA, R.M.P.; ALVES, A.M.C.V.; SARAIVA, M.V.A.; ARAUJO, V.R.; LIMA, I.M.T.; LOPES, C.A.P.; BÁO, S.N.; CAMPELLO, C.C.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Dynamized follicle-stimulating hormone affects the development of ovine preantral follicles cultured in vitro. *Homeopathy*, 102, 41-48, 2013

LIU, K.; RAJAREDDY, S.; LIU, L.; JAGARLAMUDI, K.; BOMAN, K.; SELSTAM, G.; REDDY, P. Control of mammalian oocyte growth and early follicular development by the oocyte PI3 kinase pathway: new roles for an old timer. *Development Biology*, v. 299, p. 1-11, 2006.

LOPES, C. A. P.; SANTOS, R. R.; CELESTINO, J. J. H.; MELO, M. A.; CHAVES, R.N.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; BÁO, 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.; BÁO, 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, R.; BÁO, S.N. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. *Small Ruminant Research*, v. 41, p. 61-69, 2001.

LUZ,V.B.; ARAÚJO,V.R.; DUARTE, A.B. ; CELESTINO,J.J.; SILVA,T.F.; MAGALHÃES PADILHA, D.M.; CHAVES, R.N; BRITO, I.R; ALMEIDA, A.P.; CAMPELLO, C.C.; FELTRIN, C.; BERTOLINI M.; SANTOS, R.R; FIGUEIREDO, J.R. Eight-cell parthenotes originated from in vitro grown sheep preantral follicles. *Reproduction Science*, v.11, p.1219-1225, 2012.

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. *Brazil Journal Veterinary Research Animal Science* v.46, p. 378-386, 2009.

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 Domestic Animal*, v. 46, p. 134–140, 2010.

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.; 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.

MAGOFFIN, D.A. Ovarian theca cell. *Int J Biochemical Cell Biology*, v. 37, p. 1344-1349, 2005.

MAHESHWARI, A.; FOWLER, P. A. Primordial follicular assembly in human revisited. *Zygote*, v. 4, p. 285-296, 2008.

MAO, J.; WU, G.; SMITH, M. F.; MCCAULEY, T. C.; CANTLEY, T. C.; PRATHER, R. S.; DIDION, B. A.; DAY, B. N. Effects of culture medium, serum type and various concentrations of follicle stimulating hormone on porcine preantral follicular development and antrum formation in vitro. *Biology of Reproduction*, v. 67, p. 1197-1203, 2002.

MATOS, M.H.T.; ANDRADE, E.R.; LUCCI, C.M.; FIGUEIREDO, J.R. Morphological and ultrastructural analysis of sheep primordial follicles preserved in 0.9% saline solution and TCM 199. *Theriogenology*, v.62, p.65-80, 2004.

MATOS M. H. T.; LIMA-VERDE I. B. ; LUQUE, M. C. A.; MAIA-JR, J. E. ; SILVA, J. R. V. ;CELESTINO, J. J. H. ;MARTINS, F. S.;BÁO, S. N.; LUCCI, C.M. ; FIGUEIREDO, J. R. ; Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability in vitro. *Zygote*, v.15, p.173–182, 2007.

MARTINS, F. S.; VAN DEN HURK, R.; SANTOS, R. R.; SILVA, J. R. V.; MATOS, M. H. T.; CELESTINO, J. J. H.; RODRIGUES, A. P. R.; PESSOA, C.; FERREIRA, F. V. A.; FIGUEIREDO, J. R. Development of goat primordial follicles after *in vitro* culture of ovarian tissue in Minimal Essential Medium supplemented with coconut water. *Animal Reproduction*, v. 2, p. 106-113, 2005.

MARTINS, F. S.; CELESTINO, J. J.; SARAIVA, M. V.; MATOS, M. H.; BRUNO, J.B.; ROCHA-JUNIOR, C. M.; LIMA-VERDE, I. B., LUCCI, C. M.; BAO, S. N.;FIGUEIREDO, J. R. Growth and differentiation factor-9 stimulates activation of goat primordial follicles in vitro and their progression to secondary follicles. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 20, n. 8, p. 916–924, 2008.

MCLAUGHLIN, M.; BROMFIELD, J. J.; ALBERTINI, D. F.; TELFER, E. E. Activin promotes follicular integrity and oogenesis in cultured pre-antral bovine follicles. *Molecular Human Reproduction*, v. 16, p. 644-653, 2010.

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, n. 6, p. 1357-1370, 2005.

NONOWAKI, S.; TAKAHASHI, K.; HORIUCHI, T. Culture Media Affect Follicle Survival and Oocyte Maturation in Preantral Mouse Follicle Cultures. *Journal of Mammalian Ova Research*, v. 27, p. 35-41, 2010.

NOTTOLA, S. A.; CECCONI, S.; BIANCHI, S.; MOTTA, C.; ROSSI, G.; CONTINENZA, M. A.; MACCHIARELLI, G. Ultrastructure of isolated mouse ovarian follicles cultured in vitro. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 9, p. 3, 2011.

NUTTINCK, F.; MERMILLOD, P. M.; DESSY, F. Characterization of in vitro growth of bovine preantral ovarian follicles: a preliminary study. *Theriogenology*, v. 39, p. 811-821, 1993.

O'BRIEN, M.J.; PENDOLA, J.K.; EPPIG, J.J. A revised protocol for in vitro development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. *Biology of Reproduction*, v. 68, p.1682–1686, 2003.

OTALA, M.; ERKKILA, K.; TUURI, T.; SJOBERG, J.; SUOMALAINEN, L.; SUIKKARI, A.M.; PENTIKAINEN, V.; DUNKEL, L. Cell death and its suppression in human ovarian tissue culture. *Molecular Human Reproduction* v.8, p.228-236, 2002.

PARROT, J.A. & SKINNER, M.K. Kit ligand on ovarian stromal cells: effects on theca cell recruitment and steroid production. *Molecular Reproduction Development*, v. 55, p. 55-64, 2000.

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.

RAJARAJAN, K.; RAO, B.S.; VAGDEVI, R.; TAMILMANI, G.; ARUNAKUMARI, G.; SREENU, M.; AMARNATH, D; NAIK, B. R.; RAO, V.H. Effect of various growth factors on the in vitro development of goat preantral follicles. *Small Ruminant Research*, v. 63, p. 204–212, 2006.

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

ROSSETO,R.; SARAIVA, M.V.A.; SANTOS,R.R.; SILVA,C.M.G.; FAUSTINO,L.R.; CHAVES,R.N.; BRITO,I.R.; RODRIGUES,G.Q.; LIMA,I.M.T.; DONATO, M.A.M.; PEIXOTO, C.A.; FIGUEIREDO, J.R.Effect of medium composition on the *in vitro* culture of bovine pre-antral follicles: morphology and viability do not guarantee functionality.*Zygote*, v.21, p.125-128, 2012.

SALEHNIA, M.; MOGHADAM, E. A.; VELOJERDI, M. R. Ultrastructure of follicles after vitrification of mouse ovarian tissue. *Fertility and Sterility*, v. 78, p. 644-645, 2002.

SARAIVA, M. V.; ROSSETTO, R.; BRITO I. R.; CELESTINO, J. J.; SILVA, C.M. ; ALMEIDA, A.P.; BRUNO, J. B.; MAGALHÃES, D. M.; MATOS, M. H.; CAMPELLO, C. C. ; FIGUEIREDO, J.R. Dynamic medium containing FSH, LH and EGF produces caprine embryo from preantral follicles grown in vitro. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.38, p.712, 2010.

SAUMANDE, J. La folliculogenèse chez lês ruminants. *Rec. Vétérinaire*, v. 167, p. 205-218, 1991.

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. 749-55, 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.

SILVA, C. M. G.; MATOS, M. H. T.; RODRIGUES, G. Q.; FAUSTINO, L. R.; PINTO, L. C.; CHAVES, R. N.; ARAÚJO, V. R.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. *In vitro* survival and development of goat preantral follicles in two different oxygen tensions. *Animal Reproduction Science*, v.117, p. 83-89, 2010.

SILVA, C.M.G.; FAUSTINO, L.R.; CELESTINO, J.J. H.; RODRIGUES, A.P.R.; FIGUEIREDO, J.R. Família fator de crescimento epidermal e seu papel na função ovariana e desenvolvimento embrionário. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.4, n.4, p.215-226, 2010.

SILVA, C.M.G.; CASTRO S.V.; FAUSTINO, L.R.; RODRIGUES, G.Q.; BRITO I.R.; ROSSETTO, 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 Veterinary Science*, v.94, p. 453-461, 2013.

SILVA, J.R.V.; FERREIRA, M.A.L.; COSTA, S.H.F.; SANTOS, R.R.; CARVALHO, F.C.A.; RODRIGUES, A.P.R.; LUCCI, C.M.; 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.; HURK, V.D.; 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, 2004a.

SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; MATOS, M. H. T.; SANTOS, R. R.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; FIGUEIREDO, J. R. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during *in vitro* culture of caprine ovarian cortical tissue. *Theriogenology*, v. 61, p. 1691-1704, 2004b.

SILVA, J.R.V.; VAN DEN HURK, R.; FIGUEIREDO, J.R. Expression of mRNA and protein localization of epidermal growth factor and its receptor in goat ovaries. *Zygote*, v.14, p.107-117, 2006.

SILVA, V.B.; ZÚCCARI, C.E.S.N.; COSTA E SILVA, E.V. Fatores de crescimento envolvidos no desenvolvimento de folículos pré-antrais. *Veterinária em Foco*, v.8, n.2, p121-131, 2011.

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; CAMPELO, 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.

SONG, H.J.; KANG, E.J.; MAENG G.H.; OCK, S.A; LEE, S.L. ; YOO, J.G.; JEON ,B.G.; RHO, G.J. Influence of epidermal growth factor supplementation during in vitro maturation on nuclear status and gene expression of canine oocytes. *Research in Veterinary Science*.v. 91 p.439–445, 2011.

SUH C.S.; SONNTAG, B.; ERICKSON, G.F. The ovarian life cycle: a contemporary view. *Reviews*, v 3, p.5-12, 2002.

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.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, v.63, p. 1717-1751, 2005.

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

WILLIAMS, C.J.; ERICKSON, G.F. Morphology and physiology of the ovary. *Endotext*, Chapter 1, 2012.

WRIGHT, C. S.; HOVATTA, O.; MARGARA, R.; TREW, G.; WINSTON, R. M. L.; FRANKS, S.; HARDY, K. Effects of follicle-stimulating hormone and serum substitution on the in-vitro growth of human ovarian follicles. *Human Reproduction*, v. 14, p. 1555-1562, 1999.

WU, J & TIAN, Q. Role of follicle stimulating hormone and epidermal growth factor in the development of porcine preantral follicle in vitro. *Zygote*, v. 15, p. 233-240, 2007.

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.