

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

CLEIDSON MANOEL GOMES DA SILVA

**EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE OXIGÊNIO SOBRE
O CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS**

**FORTALEZA
2009**

CLEIDSON MANOEL GOMES DA SILVA

EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE OXIGÊNIO SOBRE O
CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Ciências Veterinárias do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Veterinária 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
2009

S586e

Silva, Cleidson Manoel Gomes da

Efeito de Diferentes Concentrações de Oxigênio Sobre o Cultivo *In Vitro* de Folículos Pré-Antrais Caprinos / Cleidson Manoel Gomes da Silva. — Fortaleza, 2009.

81p.; il.

Orientador: Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias) - Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

1. Caprino. 2. Oxigênio. 3. Folículos Pré-Antrais. 4. Cultivo. Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.

CDD: 636 39

CLEIDSON MANOEL GOMES DA SILVA

EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE OXIGÊNIO SOBRE O
CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS

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

Aprovado em: 07/12/2009

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. José Roberto Viana Silva
Universidade Federal do Ceará
Examinador

Prof. Dr. Claudio Afonso Pinho Lopes
Universidade Estadual do Ceará
Examinador

Aos meus pais, Manoel Marra da Silva e Edna Gomes de Faria Silva

Dedico...

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Ceará (UECE), em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) que através de sua equipe de funcionários – professores, secretários e coordenadores, muito contribuíram para minha formação profissional.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro na forma de bolsa de estudo, indispensável para a realização desse trabalho.

Ao pai celestial por ter me concedido a vida e ter me dado muita força e proteção durante todos esses anos que estou longe de minha família.

Aos meus amados Pais, Manoel Marra da Silva e Edna Gomes de Faria Silva, que são os responsáveis pelo meu sucesso, sempre presentes em minha vida.

Às minhas irmãs Selma e Célia, pelas orações, companheirismo e atenção. Sem vocês jamais teria tido a oportunidade de estudar e de ter uma profissão. Aos meus cunhados Laércio e Vilmar, pela força, amizade e principalmente pela lealdade com a minha família.

Aos meus sobrinhos Beatriz, Gustavo, Gabrielly e Guilherme, pela a alegria que proporcionam em toda nossa família. A cada dia me mostra a simplicidade da vida, através de um simples sorriso inocente.

À minha namorada Liliane, que compartilha comigo vários objetivos de vida, especialmente pelo seu carinho e atenção ao longo dessa árdua caminhada.

A todos os familiares, avós, tios, tias, primos e primas que torceram por mim na busca da realização deste sonho. Em especial ao meu primo Wanderley Marra, pelo incentivo aos estudos na fase final do ensino médio.

À professora Dra. Tânia Vasconcelos Cavalcante, por ter acreditado em meu potencial e principalmente pela sua sincera amizade. Sem sua indicação jamais teria conseguido fazer uma pós-graduação.

Ao orientador prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo pela oportunidade e confiança na execução deste projeto. Muito obrigado por ter sido um exemplo a ser seguido como pesquisador e pessoa.

A todos os colegas do LAMOFOPA, incluindo doutorandos, mestrandos, alunos de iniciação científica e técnicos, pela oportunidade de conhecê-los e compartilhar diferentes idéias e experiências de vida. É bastante interessante pensar que, em alguma ocasião, seja realizando experimento ou redigindo artigo, tive a oportunidade de trabalhar diretamente com todos os doutorandos e mestrandos do laboratório. Este fato é bastante gratificante, e dentre essas pessoas, sem querer causar ciúmes, gostaria de chamar a atenção em especial para doutoranda Luciana Rocha Faustino, que durante todo esse período foi, sem dúvida uma das pessoas que mais contribuiu para a execução deste trabalho.

À minha nova família cearense, Eudes, Simone e Oscar, pela convivência saudável e companheirismo e, sobretudo, pela nossa amizade.

Aos amigos Leonardo e Marcela pela força e amizade, principalmente no primeiro ano de mestrado.

À professora Elda e sua irmã Elza, pela orientação e recepção na casa de seus familiares ao chegar à cidade de Fortaleza-CE.

À Dra. Maria Helena Tavares de Matos, pela grande colaboração na escrita deste trabalho, além de sua valiosa contribuição para minha formação profissional, especialmente na fase inicial deste projeto.

Ao Professor Dr. Claudio Cabral Campello pelo auxílio nas análises estatísticas dos dados, por todas as suas valiosas idéias, paciência e atenção disponibilizada.

À professora Ana Paula Ribeiro Rodrigues, pela confiança, atenção e ensinamentos repassados a mim.

À banca examinadora, por ter aceitado prontamente o convite e, sobretudo, pela sua prestimosa colaboração ao corrigir o presente trabalho. Em especial ao Dr. Cláudio Afonso

Pinho Lopes, pela atenção e disponibilidade, sem sua ajuda jamais teria feito essa defesa com o artigo publicado em um periódico internacional.

Ao laboratório de virologia (LABOVIR) da UECE, especialmente à professora Dra. Maria de Fátima, por disponibilizar o microscópio de fluorescência, fundamental para parte experimental desse trabalho.

“Existem apenas duas maneiras de ver a vida. Uma é pensar que não existem milagres e a outra é que tudo é um milagre.”

Albert Einstein

RESUMO

O presente estudo visou avaliar o efeito de duas concentrações de oxigênio (O_2) sobre a sobrevivência e o desenvolvimento de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro*. Folículos ovarianos pré-antrais ($\geq 150 \mu m$) foram isolados a partir de fragmentos do córtex ovariano e individualmente cultivados por 30 dias sob duas diferentes concentrações de O_2 (5 e 20%). O desenvolvimento folicular foi avaliado com base na formação da cavidade antral, aumento do diâmetro folicular, presença do complexo *cumulus*-oócito viável e oócitos $\geq 110 \mu m$. A viabilidade dos folículos classificados como vivos durante a avaliação morfológica foi confirmada utilizando-se marcadores fluorescentes. Oócitos e células da granulosa foram considerados viáveis quando apresentavam o citoplasma marcado positivamente com calceína-AM (verde) e a cromatina não- marcada com etídio homodímero-1 (vermelho). Os dados de sobrevivência, formação de antro e retomada da meiose após o cultivo *in vitro* foram comparados pelo teste Qui-quadrado. O diâmetro folicular e taxa de crescimento após o cultivo foram avaliados utilizando-se o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis. Os resultados mostraram que com a progressão do período de cultivo do dia 6 para o dia 12, houve uma diminuição na sobrevivência folicular em ambas as concentrações de O_2 ($P < 0,05$). Quando as concentrações de O_2 foram comparadas em cada um dos diferentes dias de cultivo, a de 20% foi mais eficiente na promoção do aumento do diâmetro folicular a partir do dia 24 de cultivo quando comparado com a de 5% de O_2 ($P < 0,05$). Por outro lado, folículos cultivados na presença de 5% de O_2 tiveram um aumento na percentagem de formação de antro a partir do dia 12 até final do cultivo, quando comparado com a concentração de 20% de O_2 ($P < 0,05$). Contudo, não foram verificadas diferenças significativas na percentagem de oócitos crescidos entre as diferentes concentrações de O_2 testadas. No entanto, é importante enfatizar que 16,7% dos oócitos oriundos de folículos cultivados na presença de 20% de O_2 retomaram a meiose. Em conclusão, a concentração de 20% de O_2 foi mais eficiente na promoção do crescimento folicular e retomada da meiose de oócitos obtidos de folículos pré-antrais de cabras crescidos *in vitro*.

Palavras-Chave: Caprino. Oxigênio. Folículos Pré-Antrais. Cultivo.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the effect of two different oxygen (O₂) concentrations on the survival and development of goat preantral follicles cultured *in vitro*. Preantral ovarian follicles ($\geq 150 \mu\text{m}$) were isolated from ovarian cortex fragments and individually cultured for 30 days under two different O₂ concentrations (5% and 20%). Follicle development was evaluated on the basis of antral cavity formation, increase in follicular diameter, presence of healthy *cumulus* oocyte complexes and fully grown oocytes. Viability of follicles classified as live through the morphological evaluation was confirmed using fluorescent markers. Oocytes and granulosa cells were considered live if the cytoplasm was stained positively with calcein-AM (green) and if chromatin was not labeled with ethidium homodimer-1 (red). Data from follicular survival, antrum formation and meiotic resumption after *in vitro* culture were compared by the Chi-square test. Follicular diameter and growth rate after culture were compared by use of the Kruskal-Wallis non-parametric test. Results showed that with progression of culture period from 6 to 12 days, a decrease in follicular survival was observed in both O₂ concentrations ($P < 0.05$). When the O₂ tensions were compared to each other in the different days of culture, 20% O₂ was more efficient in promoting an increase in follicular diameter from day 24 of culture onwards than 5% O₂ ($P < 0.05$). However, follicles cultured with 5% O₂ had an increased percentage of antrum formation from day 12 to the end of culture, as compared with 20% O₂ ($P < 0.05$). Moreover, there were no differences in the percentage of fully developed oocytes with the different O₂ tensions. It is important to emphasize that 16.7% of oocytes from follicles cultured in 20% O₂ resumed meiosis. In conclusion, the concentration of 20% O₂ was more efficient in promoting follicular growth and oocyte meiosis resumption from preantral follicles of goats when grown *in vitro*.

Keywords: Goat. Oxygen. Preantral Follicles. Culture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cortes histológicos de folículos pré-antrais (A - primordial; B - transição; C - primário e D - secundário) e folículos antrais (E - terciário inicial e F - terciário avançado), após coloração com Ácido Periódico de Schiff (PAS) - Hematoxilina. O: oócito; CG: células da granulosa; ZP: zona pelúcida; CT: células da teca; A: antro..... 20

Figura 2 - Espécies reativas de oxigênio (ERO) formadas a partir da redução do oxigênio (O_2) em água durante o metabolismo celular. Essas moléculas correspondem aos radicais superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroxila ($OH^\cdot$) que podem induzir a peroxidação lipídica de membranas biológicas e danos no DNA. 26

Fig. 1 - Preantral follicles from goats at day 0 (A) and antral follicle after 6 days of *in vitro* culture with 20% of O_2 (B) (50x); Oocyte surrounded by compact layer of *cumulus* cells (C) and showing expanded *cumulus* cells after IVM (D); Fully grown oocyte from preantral follicle cultured for 30 days under 20% O_2 . Note the chromatin configuration, showing an intact germinal vesicle (E) and metaphase I (F) (1000x) after lacmoid staining. 58

Fig. 2 - Viability assessment of ovarian follicles from goats *in vitro* cultured under different O_2 concentrations (5 and 20%). (A) An isolated follicle classified as viable since cells were labeled by calcein-AM (green fluorescence). (B) A follicle considered non-viable (E) as cells were marked with ethidium homodimer-1 (red fluorescence). 59

Fig. 3 - Effect of different O_2 tensions (5 and 20%) on the percentage of healthy follicles after 30 days of culture.

^{a, b, c, d} differs among days of culture in the same tension of O_2 ($P < 0.05$). 60

Fig. 4 - Follicular diameter after *in vitro* culture under different O_2 concentrations during 30 days (5 and 20%).

^{a, b, c, d} differs among days of culture in the same tension of O_2 ($P < 0.05$)

^{A, B} differs among tensions of O_2 in the same period of culture ($P < 0.05$). 61

Fig. 5 - Effect of different O_2 concentrations (5 and 20%) on percentage of antrum formation after culture of preantral follicles of goats for 30 days.

^{A, B} differs among tensions of O_2 with the same period of culture ($P < 0.05$). 62

LISTA DE TABELAS

Table 1 - Meiotic stages of goat oocytes from preantral follicles cultured for 30 days in two different oxygen tensions (5 and 20%).....	63
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

A - Antro

AI - Anáfase

ATP - Adenosina Trifosfato

Ca²⁺ - Cálcio

CG - Células da Granulosa

CT - Células da Teca

DNA - Ácido Desoxirribonucleíco

ERO - Espécies reativas de oxigênio

FAVET - Faculdade de Veterinária

Fig - Figura

FOPA - Folículos Ovarianos Pré-Antrais

rFSH - Recombinant Follicle Stimulating Hormone (Hormônio Folículo Estimulante Recombinante)

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

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

LH - Luteinizing Hormone (Hormônio Luteinizante)

MEM - Meio Essencial Mínimo

MI - Metáfase I

MII- Metáfase II

MIV - Maturação *in vitro*

mL - Mililitro

mm - Milímetro

MOIFOPA - Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais

MPF- Fator promotor de maturação

Na⁺ - Sódio

O - Oócito

OH⁻ - Hidroxila

O⁻ - Superóxido

O₂ - Oxygen (Oxigênio)

PAS - Ácido Periódico de Schiff

pH - Potencial Hidrogeniônico

P<0,05 - Probabilidade de erro menor do que 5%

PIV - Produção *in vitro* de embriões

PPGCV - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias

TI - Telófase I

UECE -Universidade Estadual do Ceará

VG - Vesícula germinativa

μL - Microlitro

μm - Micrômetro

°C - Graus Celsius

% - Percentagem

50x - Aumento de 50 vezes

1000x - Aumento de 1000 vezes

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1 Introdução	19
2.2 Foliculogênese	19
2.3 População e atresia folicular.....	21
2.4 Cultivo folicular	22
2.5 Maturação oocitária	24
2.6 Cultivo embrionário	25
2.7 Implicações do oxigênio no cultivo celular <i>in vitro</i>	25
2.8 Considerações finais	29
2.9 Referências Bibliográficas	30
3 JUSTIFICATIVA	36
4 HIPÓTESE CIENTÍFICA.....	37
5 OBJETIVOS	38
5.1 OBJETIVO GERAL.....	38
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
6 CAPÍTULO I (<i>In vitro</i> survival and development of goat preantral follicles in two different oxygen tensions).....	39
7 CONCLUSÃO.....	64
8 PERSPECTIVAS.....	65
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
ANEXO A.....	74

1 INTRODUÇÃO

Estudos realizados durante as duas últimas décadas têm criado oportunidades extraordinárias para a reprodução animal e proporcionado uma grande revolução na multiplicação de animais de elevado potencial econômico. Especialmente nos ruminantes domésticos, sabe-se que os ovários contêm milhares de folículos pré-antrais. No entanto, poucos destes folículos desenvolvem-se até o estágio de folículo pré-ovulatório, pois a grande maioria morre por atresia após iniciar o crescimento *in vivo* (FIGUEIREDO *et al.*, 2008). Diante disso, o grande desafio da Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais (MOIFOPA) é desenvolver um meio de cultivo dinâmico, que assegure o crescimento e maturação *in vitro* de oócitos oriundos de folículos pré-antrais.

Nesse sentido, a MOIFOPA tem sido citada como uma alternativa valiosa para a padronização de outras biotécnicas, como a clonagem, FIV e transgenia, uma vez que poderá ser utilizada uma população de oócitos homogênea e oriunda de um mesmo animal, o que reduzirá substancialmente o intervalo entre gerações. Além disso, recentemente, a MOIFOPA, tem avançado significativamente no contexto da foliculogênese ovariana (FIGUEIREDO *et al.*, 2008). Em animais de laboratório, utilizando essa biotécnica, O'Brien *et al.* (2003) demonstraram que é possível a obtenção de crias viáveis a partir de folículos primordiais de camundongas cultivados *in vitro*. Em animais domésticos, já foram descritos na literatura, a produção *in vitro* de embriões a partir de folículos secundários em suínos (WU e TIAN, 2007) e bubalinos (GUPTA *et al.*, 2008).

No que se refere aos caprinos, apesar de ainda não haver resultados similares no tocante à produção de embriões oriundos de folículos pré-antrais cultivados *in vitro*, tem sido prioritário o desenvolvimento de pesquisas que visam compreender os diversos fatores relacionados ao desenvolvimento folicular na fase pré-antral. Para tanto, têm sido testados diferentes sistemas de cultivo (*in situ* ou isolados), meios de cultivo, suplementos, a presença ou ausência de fatores de crescimento e hormônios de forma simultânea e/ou em sequência específica, bem como a atmosfera gasosa, em particular, a concentração de oxigênio (O₂). Atualmente, esta tem recebido notável atenção, por ser um componente essencial para manutenção da viabilidade e desenvolvimento folicular (CLARK *et al.*, 2006), sendo comprovada a sua importância no cultivo *in vitro* de embriões bovinos (CÔRREA *et al.*, 2008).

O tópico “revisão de literatura” mostrado a seguir, constitui o artigo de revisão intitulado “Papel do oxigênio no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos e embriões”,

submetido para publicação no periódico “*Revista Brasileira de Reprodução Animal*”. Esta revisão abordará temas relacionados à foliculogênese dos mamíferos, incluindo a população e atresia folicular, além de fornecer importantes informações sobre o cultivo folicular e embrionário com ênfase na tensão atmosférica de O₂.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Papel do oxigênio no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos e embriões

(Role of oxygen on in vitro culture of ovarian follicles and embryos)

Cleudson Manoel Gomes da Silva¹, Luciana Rocha Faustino, Márcia Viviane Alves Saraiva,
Rafael Rossetto, José Ricardo de Figueiredo

Laboratório de manipulação de oócitos e folículos ovarianos pré-antrais - LAMOFOPA,
Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil.

¹correspondência: gomesvet@hotmail.com; tel + 55 (85) 3101-9852

Resumo

O cultivo *in vitro* de folículos ovarianos em diferentes categorias, visa fornecer subsídios para uma melhor compreensão sobre os fatores que regulam a foliculogênese, bem como, aumentar a produção de embriões desenvolvidos *in vitro*, incrementando a eficiência reprodutiva de animais de interesse zootécnico ou em vias de extinção. Nesse sentido, vários estudos têm sido realizados buscando estabelecer condições que assegurem o desenvolvimento folicular *in vitro* até que seus oócitos estejam aptos à maturação e fecundação. Dentre essas condições, a atmosfera gasosa, especialmente a concentração de oxigênio tem recebido notável atenção, por se mostrar um componente essencial para manutenção da viabilidade folicular e embrionária.

Palavras chave: oxigênio, folículo, embrião, cultivo

Abstract

In vitro culture of ovarian follicles in different categories provides a better understanding of the factors that governing the folliculogenesis and increases embryo in vitro production, raising the reproductive efficiency of animals with high genetic merit or at risk of extinction. In this regard, several studies have been conducted to establish conditions that ensure follicular in vitro development until their oocytes are suitable for maturation and

fertilization. Among these conditions the gas atmosphere, especially oxygen tension has received considerable attention, to be an essential component for maintenance of follicular and embryonic viability.

Keywords: *oxygen, follicle, embryo, culture*

2.1 Introdução

Nas últimas décadas, várias pesquisas têm sido realizadas na área de reprodução animal visando aumentar o potencial reprodutivo de animais de alto valor zootécnico ou em vias de extinção. Nesse sentido, vem sendo desenvolvidos inúmeros modelos de estudos visando elucidar os mecanismos que regulam a foliculogênese e seus principais eventos, incluindo a atresia (FORTUNE, 2003). Dentre esses modelos, destaca-se o cultivo *in vitro*, cujo principal objetivo é promover o desenvolvimento folicular inicial até a completa maturação do oócito. O crescimento, a maturação e a fecundação *in vitro* de oócitos oriundos de folículos pré-antrais poderá maximizar a produção *in vitro* de embriões, além de consistir numa importante ferramenta para a elucidação dos mecanismos que regulam a foliculogênese desde sua fase inicial até a fase final (FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

Entretanto, o desenvolvimento de um sistema de cultivo eficiente, consiste hoje em um fator limitante para o sucesso do crescimento folicular inicial, fazendo-se necessário, a padronização de importantes parâmetros como o meio de cultivo, fatores de crescimento e hormônios que serão adicionados ao meio, bem como a atmosfera gasosa e em particular, a tensão de oxigênio (O₂). Atualmente a concentração de O₂ tem recebido notável atenção, pois constitui um componente essencial para manutenção da viabilidade e para o desenvolvimento folicular e embrionário (CLARK *et al.*, 2006).

A presente revisão de literatura visa fornecer uma melhor compreensão sobre os aspectos relacionados à foliculogênese dos mamíferos, incluindo a população e atresia folicular, além de fornecer importantes informações sobre o cultivo folicular e embrionário com ênfase na tensão atmosférica de O₂.

2.2 Foliculogênese

A foliculogênese é um processo que se inicia com a formação do folículo primordial e culmina com o desenvolvimento do folículo de De Graaf, também conhecido como pré-

ovulatório (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005). Durante esse processo, a morfologia folicular é alterada, uma vez que o oócito cresce e suas células circundantes se multiplicam e diferenciam (BRISTOL-GOULD e WOODRUFF, 2006). De acordo com o grau de evolução, os folículos podem ser classificados em folículos pré-antrais (primordiais, transição, primários e secundários) e antrais (terciários e pré-ovulatórios) (SILVA *et al.*, 2004). Dessa forma, a foliculogênese pode ser dividida em duas fases distintas: 1) **fase pré-antral**, que é caracterizada pela ativação dos folículos primordiais e formação do folículo primário, com posterior transição destes folículos para secundários e 2) **fase antral**, caracterizada pelo surgimento de uma cavidade repleta de líquido denominada antro, bem como pelo crescimento dos folículos terciários e posterior diferenciação destes em folículos pré-ovulatórios (Figura 1).

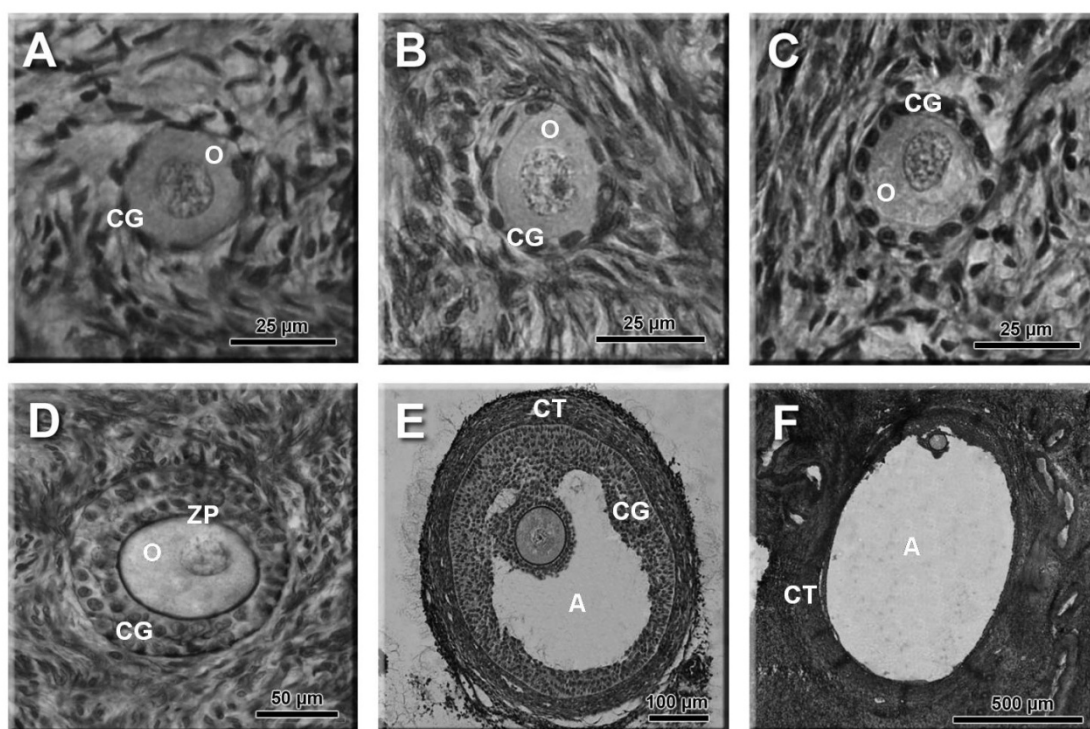


Figura 1 - Cortes histológicos de folículos pré-antrais (A - primordial; B - transição; C - primário e D - secundário) e folículos antrais (E - terciário inicial e F - terciário avançado), após coloração com Ácido Periódico de Schiff (PAS) - Hematoxilina. O: oócito; CG: células da granulosa; ZP: zona pelúcida; CT: células da teca; A: antro.

As características morfológicas que marcam a ativação folicular relacionam-se com o aumento do diâmetro oocitário, a proliferação das células da granulosa e a mudança na morfologia destas células de pavimentosas para cúbicas. Durante este período, os folículos

que apresentam células da granulosa pavimentosas e cúbicas são denominados folículos de transição (FORTUNE, 2003). Em seguida, quando o oócito é circundado por uma camada completa de células da granulosa de morfologia cúbica, os folículos passam a ser denominados primários (GOUGEON e BUSO, 2000). Durante o crescimento destes folículos, as células da granulosa sofrem proliferação e ocorre um aumento do oócito em tamanho e conteúdo protéico (PICKTON; BRIGGS; GOSDEN, 1998). Posteriormente, duas ou mais camadas de células da granulosa são formadas ao redor do oócito, originando os folículos secundários. Nesta fase ocorre a diferenciação das células do estroma em células da teca e é possível a visualização da zona pelúcida em torno do oócito (FORTUNE, 2003). Com o desenvolvimento dos folículos secundários e organização das células da granulosa em múltiplas camadas ocorre a formação de uma cavidade repleta de líquido denominada antro, que confere a classificação destes folículos antrais em terciários e pré-ovulatórios (BARNETT *et al.*, 2006).

Segundo Campbell (2009), grandes avanços foram obtidos nas últimas décadas com relação à biologia das células somáticas e germinativas de folículos ovarianos. A partir desses estudos é notório que o desenvolvimento folicular parece ocorrer em três fases distintas. Na primeira, o desenvolvimento folicular ocorre na ausência de gonadotrofinas e parece ser controlado apenas pela expressão de fatores de crescimento locais. Na segunda fase, os folículos passam a ser responsivos, mas não requerem a presença de hormônios gonadotróficos para manter o desenvolvimento, sendo esta a fase mais prolongada. Já na terceira fase, existe uma alta dependência gonadotrófica para o desenvolvimento dos folículos antrais, que pode ser dividida em três etapas: recrutamento, seleção e dominância (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005), sendo a formação de folículos pré-ovulatórios um pré-requisito para a ovulação e posterior formação do corpo lúteo, bem como para a manutenção da fertilidade (DRUMMOND, 2006).

2.3 População e atresia folicular

Os folículos pré-antrais representam 90% da população folicular, sendo que 95% deste total é constituído por folículos primordiais (FIGUEIREDO *et al.*, 2008), que representam o estoque de gametas femininos (LIU *et al.*, 2001). Segundo Katska-Ksiazkiewicz (2006), a população de folículos pré-antrais difere entre as espécies, além de ser observada uma grande variação individual, sendo de aproximadamente 1.500 na camundonga (SHAW; ORANRATNACHAI; THOUNSON, 2000), 35.000 na cabra (LUCCI *et al.*, 1999), 160.000

na ovelha (DRIANCOURT; WEBB; FRY, 1991), 235.000 na vaca (BETTERIDGE *et al.*, 1989) e 2.000.000 na mulher (ERICKSON, 1986). Apesar da grande população folicular presente no ovário dos mamíferos, a maioria destes (cerca de 99,9%) não chega à ovulação, morrendo por um processo denominado atresia, o qual pode ocorrer por via degenerativa (necrose) (BRAS; QUEENAN; SUSIN, 2005) e/ou apoptótica (HUSSEIN, 2005).

Na via degenerativa, a isquemia pode ser uma das principais causas do desencadeamento da morte folicular (FARBER, 1982), resultando em alterações na permeabilidade da membrana celular, aumento de água intracelular, vacuolização citoplasmática e, conseqüentemente, degeneração (BARROS; HERMOSILLA; CASTRO, 2001). Padanilam (2003) demonstrou que uma sobrecarga de íons Na^+ e acúmulo de íons Ca^{2+} com concomitante mudança na permeabilidade da membrana celular, os quais estão associados com modificações no volume e aumento na água intracelular, também podem participar e levar ao processo necrótico. Além da isquemia, outros fatores que podem levar à degeneração são estímulos tóxicos, degenerativos e imunológicos, podendo tais fatores também induzir a apoptose.

No que concerne à via apoptótica, sabe-se que se trata de um evento geneticamente determinado, ou seja, depende da expressão de genes pró e anti-apoptóticos. A característica marcante desse mecanismo é a fragmentação do DNA a cada 180-200 pares de bases (HUSSEIN, 2005). Diversos fatores podem levar à apoptose, dentre eles destacam-se o estresse oxidativo causado pelas espécies reativas de oxigênio, a irradiação, a ativação de genes promotores da apoptose, danos no DNA, as citocinas, as proteínas virais, bem como a deficiência de fatores de sobrevivência da célula (JOHNSON, 2003).

2.4 Cultivo folicular

O cultivo *in vitro* de folículos ovarianos é uma das etapas da biotécnica de MOIFOPA, e vem sendo amplamente empregado com o intuito de avaliar o efeito de diferentes substâncias, em diferentes concentrações e em diferentes fases do desenvolvimento folicular, a fim de se mimetizar *in vitro* os eventos que ocorrem *in vivo* no ovário. Além disso, o cultivo folicular tem por objetivo fornecer um grande número de oócitos viáveis para posterior utilização em outras biotécnicas como fecundação *in vitro*, visando a produção de embriões, transgenia e clonagem. Entretanto, para alcançar esses objetivos, é necessário o desenvolvimento de um sistema de cultivo *in vitro* ideal para cada etapa do desenvolvimento folicular.

Nas últimas duas décadas vários sistemas de cultivo *in vitro* foram desenvolvidos e os resultados foram dependentes do tipo de meio utilizado, sistema de cultivo adotado, espécie animal estudada, bem como da atmosfera gasosa utilizada (EPPIG e SCHOEDER, 1989; BOLAND *et al.*, 1993; FORTUNE, 2003). Apesar dos esforços empregados, em animais domésticos ainda não foi desenvolvido um sistema de cultivo adequado para promover o completo desenvolvimento de folículos pré-antrais iniciais (primordiais, de transição e primários) até o estágio de pré-ovulatório.

Nesse sentido, diversos estudos vêm sendo realizados a fim de se verificar a influência de diferentes fatores, tais como duração do cultivo, influência das diferentes substâncias utilizadas (suplementos, hormônios e fatores de crescimento (THOMPSON *et al.*, 1990; MATOS *et al.*, 2007; ERICKSON, 2001) bem como diferentes regimes de troca de meio, sobre a elaboração de um sistema de cultivo adequado.

Os folículos pré-antrais podem ser cultivados inclusos no tecido ovariano, ou seja, *in situ* ou na forma isolada. Em roedores, a pequena dimensão dos ovários possibilita o cultivo do órgão inteiro, o que tem sido bastante útil para o estudo da foliculogênese inicial em pequenas espécies de mamíferos (FORTUNE, 2003). Já em animais domésticos de médio e grande porte, devido às grandes dimensões dos ovários, não é possível a utilização deste modelo. Para estes animais, o cultivo de pequenos fragmentos de córtex ovariano, rico em folículos primordiais, tem sido realizado para o estudo da ativação e do crescimento folicular em diferentes espécies como caprinos (SILVA *et al.*, 2006), ovinos (ANDRADE *et al.*, 2005), bovinos (BRAW-TAL e YOSSEFI, 1997) e humanos (TELFER *et al.*, 2008). Esse sistema de cultivo tem como principal vantagem a manutenção da integridade folicular e das interações entre as células foliculares e do estroma, facilitando a perfusão do meio para o tecido ovariano (TELFER, 1996).

Uma outra forma de cultivo folicular é a isolada, que permite o monitoramento diário do crescimento, bem como a análise do efeito *in vitro* de hormônios e fatores de crescimento sobre cada categoria folicular (ABIR *et al.*, 2001). Após o isolamento e posterior cultivo de grandes folículos secundários, foi obtida a formação de antro em ovinos (CECCONI *et al.*, 1999), bovinos (GUTIERREZ *et al.*, 2000) e caprinos (HUAMIN e YONG, 2000), bem como a maturação oocitária em ovinos (TAMILMANI *et al.*, 2005) e, mais recentemente, a produção de embriões em bubalinos (GUPTA *et al.*, 2008) e suínos (WU e TIAN, 2007). Entretanto, o nascimento de crias saudáveis a partir do cultivo de folículos pré-antrais e posterior maturação oocitária e fecundação *in vitro* foi relatado apenas em camundongos (O'BRIEN; PENDOLA; EPPIG, 2003).

2.5 Maturação oocitária

A maturação oocitária é uma etapa que sucede o cultivo folicular e define de fato, à obtenção do sucesso no desenvolvimento *in vitro* dos folículos ovarianos. Os oócitos dos folículos cultivados ou não, encontram-se em prófase I da meiose e *in vivo* somente após a puberdade, por ação hormonal, ocorre a retomada e finalização deste processo (GONÇALVES *et al.*, 2008). Semelhante ao que ocorre *in vivo*, a maturação *in vitro*, envolve mudanças nucleares e citoplasmáticas do oócito, que devem ocorrer de forma simultânea de modo a capacitar a fecundação e possibilitar o desenvolvimento embrionário adequado (DODE; ADONA; RODOVALHO, 2000).

Os eventos nucleares da meiose envolvem a reorganização da rede de microtúbulos, o rompimento do envoltório nuclear, a condensação dos cromossomos e a progressão para metáfase I (MI), anáfase I (AI), telófase I (TI), expulsão do primeiro corpúsculo polar e parada no estágio de metáfase II (MII) (CHA e CHIAN, 1998). Esses eventos são desencadeados por uma cascata de fosforilação e desfosforilação das enzimas quinases e fosfoquinases que atuam no fator promotor de maturação (MPF), responsável pela retomada e término da maturação oocitária em mamíferos (GONÇALVES *et al.*, 2007). O MPF apresenta baixa atividade quando o oócito está em fase de vesícula germinativa, ocorrendo um aumento gradativo dos níveis deste fator no decorrer da meiose que atinge a atividade máxima no estágio de MI (GONÇALVES *et al.*, 2008).

No que se refere às mudanças citoplasmáticas, ocorre reprogramação na síntese protéica, mudança na atividade do MPF, desenvolvimento dos mecanismos de liberação de Ca^{2+} , aumento de deposição lipídica, redução do aparelho de Golgi, alinhamento dos grânulos da cortical próximos à membrana plasmática e expansão das células do *cumulus* (DIELEMAN *et al.*, 2002). Essa série de mudanças estruturais e bioquímicas representa o estágio final da preparação do oócito para a fecundação. Entretanto, para que isso ocorra, o oócito precisa ter competência meiótica, que pode ser definida como a habilidade do oócito em iniciar e concluir a meiose sob condições artificiais (HEWITT e ENGLAND, 1998). Morfologicamente, os oócitos com maior potencial para retomada da meiose devem apresentar ooplasma homogêneo, estar completamente envolvidos por diversas camadas compactas de células do *cumulus* (GONÇALVES *et al.*, 2008) e apresentar diâmetro acima de 110 μm (CROZET; DAHIRL; GALL, 2000).

Diversos estudos com animais domésticos têm demonstrado bons resultados com relação à aquisição de oócitos meioticamente competentes obtidos a partir de folículos pré-

antrais (ovinos: TAMILMANI *et al.*, 2005; ARUNAKUMARI *et al.*, 2007; suínos: WU; BENJAMIN; CARRELL, 2001; bubalinos: GUPTA *et al.*, 2008). Entretanto, esses resultados ainda são bastante variados, possivelmente devido à natureza heterogênea dos oócitos imaturos utilizados para a PIV de embriões, falta de controle da atmosfera gasosa (concentração de O₂) e componentes do meio de cultivo durante a maturação oocitária (SIRARD, 2001).

2.6 Cultivo embrionário

Em procedimentos *in vitro*, após a fecundação, os embriões no estágio de uma célula ou zigoto são transferidos para o cultivo onde permanecem por um período de sete a nove dias, até atingirem o estágio de blastocisto, quando então podem ser transferidos para o útero de fêmeas receptoras que levarão a gestação a termo (DODE; ADONA; RODOVALHO, 2000).

É sabido que a qualidade oocitária é um fator determinante para que embriões produzidos *in vitro* possam chegar ao estágio de blastocisto, contudo diversos estudos ressaltam que as condições de cultivo também são fatores preponderantes, influenciando, principalmente, a qualidade dos embriões (LONERGAN *et al.*, 2003). Essas condições de cultivo envolvem vários fatores, como o tipo de meio, a atmosfera gasosa, a densidade (quantidade de embriões/volume de meio), o tipo de suplementação protéica e a presença ou não de co-cultivo (DONNAY *et al.*, 1997; KITAGAWA *et al.*, 2004; WRENZYCKI; HERRMANN; CARNWATH, 1999; OLIVEIRA; LOPES; RODRIGUES, 2005).

Dentre esses fatores um aspecto de grande importância no ambiente de cultivo embrionário é a atmosfera gasosa, especialmente a concentração de O₂, que tem grande influência na produção e na qualidade dos embriões, devido principalmente, ao estresse oxidativo.

2.7 Implicações do oxigênio no cultivo celular *in vitro*

2.7.1 Citotoxicidade das espécies reativas de oxigênio

Alguns estudos sugerem que baixas concentrações de O₂ podem ser inadequadas para sustentar o metabolismo celular aeróbico. Por outro lado, o ambiente com altas concentrações deste gás pode ser nocivo devido ao estresse oxidativo causado pelo aumento de espécies

reativas de oxigênio (ERO), que são produzidas naturalmente durante o metabolismo celular ou em desordens biológicas (GIGLI; BYRD; FORTUNE, 2006).

O estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção e a eliminação de radicais livres (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). De acordo com Mignotte e Vayssiere (1998), o acúmulo dessas substâncias pode gerar necrose em decorrência da peroxidação lipídica em diversas biomoléculas, ou, até mesmo, danos no DNA. Além disso, podem causar a oxidação de moléculas chaves, liberando proteases, lipases e nucleases dentro das mitocôndrias, culminando com a morte celular (FIERS *et al.*, 1999). As principais ERO formadas durante a redução do O_2 são os radicais superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroxila (OH^-) (GUÉRIN; MOUATASSIM; MENÉZO, 2001; FERREIRA e MATSUBARA, 1997), conforme demonstrado na figura 2.

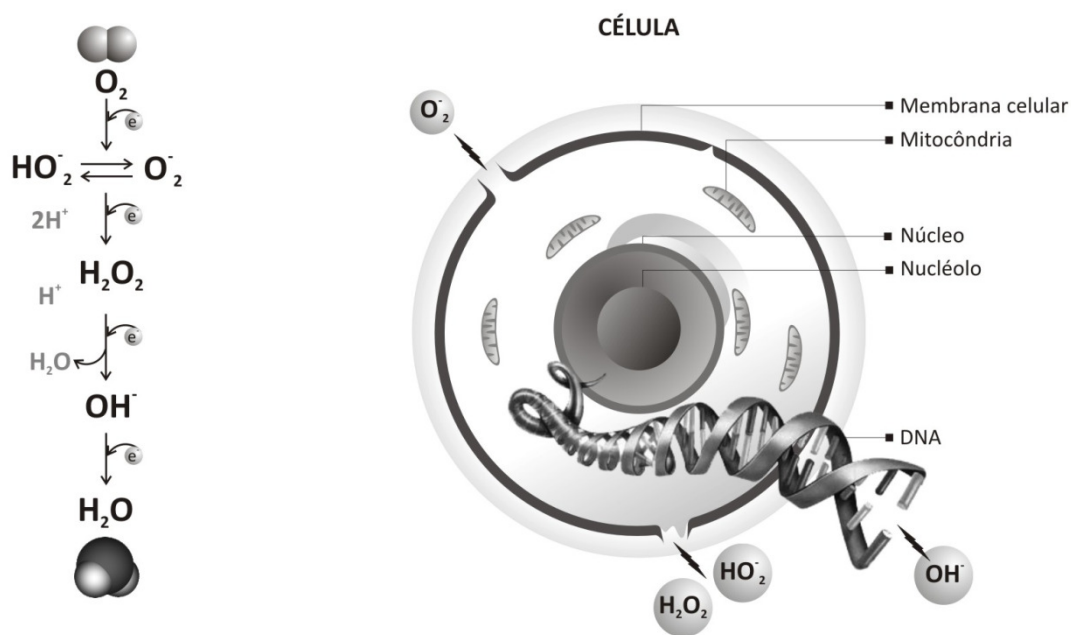


Figura 2 - Espécies reativas de oxigênio (ERO) formadas a partir da redução do oxigênio (O_2) em água durante o metabolismo celular. Essas moléculas correspondem aos radicais superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hidroxila (OH^-) que podem induzir a peroxidação lipídica de membranas biológicas e danos no DNA.

Segundo Barreiros, David e David (2006), baixas concentrações das ERO também podem modular a expressão de genes que governam processos fisiológicos em diferentes células e estruturas, como gametas e embriões. Entretanto, altas concentrações promovem

diversos efeitos deletérios às funções celulares, podendo alterar várias moléculas como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

Diversos estudos mostram que o desenvolvimento folicular e embrionário é extremamente susceptível às injúrias causadas pelas ERO durante o cultivo *in vitro* (GOTO *et al.*, 1993). Nesse contexto, a concentração de O₂ tem recebido notável atenção por se mostrar um componente essencial para manutenção da viabilidade celular (CLARK *et al.*, 2006). Nas secções seguintes, serão enfatizados estudos que utilizaram diferentes concentrações de O₂ para o desenvolvimento folicular, maturação oocitária e cultivo embrionário *in vitro*, bem como para a manutenção da viabilidade dessas estruturas.

2.7.2 Influência do oxigênio no desenvolvimento folicular

Além dos inúmeros aspectos já mencionados, os sistemas de cultivo *in vitro* visam amenizar os danos celulares causados pelas ERO durante a manipulação e o cultivo folicular. Essas substâncias podem causar diversos danos, incluindo degeneração folicular, disfunções metabólicas e indução da apoptose ou necrose (LIMA-VERDE *et al.*, 2007). Assim, diversos métodos têm sido desenvolvidos visando minimizar a formação das ERO, dentre eles podemos destacar a redução da concentração de O₂ nos sistemas de cultivo *in vitro*, redução do tempo de manipulação sob luz incandescente (estereomicroscópio), adição de antioxidantes ao meio de cultivo e a realização de um co-cultivo com células somáticas (CÔRREA *et al.*, 2008).

Especificamente, com relação à concentração de O₂ poucos estudos relatam o efeito desse gás sobre o desenvolvimento folicular em animais domésticos e humanos. Sabe-se que, nos diferentes sistemas de cultivo de folículos e de embriões, a atmosfera gasosa normalmente utilizada é de 5% de CO₂ ou 20% de O₂. Entretanto, segundo Guérin, Mouatassim e Menézo (2001), esta concentração de O₂ é mais elevada que a observada no ovário e no útero. De acordo com Barnett e Bavister (1996), a concentração intra-uterina de O₂ está no intervalo entre 1,5 a 7%. Dessa forma, a ineficiência do desenvolvimento folicular quando alta concentração de O₂ (20%) é utilizada pode ser atribuído à produção excessiva de ERO. Em folículos pré-antrais ovinos, Cecconi *et al.* (1999) demonstraram que baixos níveis de O₂ (5%) foram eficazes para aumentar as taxas de formação de antro após seis dias de cultivo. Por outro lado, observou-se que a concentração de 20% de O₂ estimulou o desenvolvimento de folículos pré-antrais inclusos em fragmentos ovarianos bovinos (GIGLI; BYRD; FORTUNE,

2006), além de aumentar significativamente a taxa de formação de blastocistos após o cultivo de oócitos suínos (PARK *et al.*, 2005). Entretanto, na literatura, ainda não há uma padronização sobre a concentração ideal de O₂ a ser utilizada no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais.

2.7.3 Ação do oxigênio durante a maturação oocitária

O O₂ que chega ao oócito é fundamental para o estabelecimento da competência meiótica e o subsequente desenvolvimento embrionário. Hashimoto *et al.* (2000) verificaram que a utilização de 5% de O₂ na maturação de oócitos bovinos, reduziu significativamente a viabilidade oocitária, quando comparado à concentração de 20%. Já em suínos os níveis de O₂ não exerceu efeitos na maturação de oócitos (PARK *et al.*, 2005). Segundo Banwell *et al.* (2007), em camundongas, diferentes concentrações de O₂ (2, 5 e 20%) não influenciaram a habilidade dos oócitos de retomarem a meiose e serem fecundados. Por outro lado, Preis, Seidel e Gardner (2007) observaram nessa mesma espécie, que a utilização de 5% de O₂ na maturação de oócitos favoreceu o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto em relação à concentração de 20%.

Em folículos humanos, bovinos e suínos estudos tem sugerido que a utilização de 2% de O₂ pode afetar a fosforilação oxidativa e conseqüentemente a síntese de ATP, além de apresentar alta correlação com anormalidades cromossômicas e diminuição na taxa de gestação (CHUI *et al.*, 1997). Por outro lado, 20% de O₂ representa uma condição não fisiológica, possibilitando o aumento do estresse oxidativo durante a maturação, contribuindo para ocorrência de alterações citogenéticas (BANWELL *et al.*, 2007). Dessa forma, apesar da grande variação nos resultados, concentrações intermediárias por se aproximarem dos níveis fisiológicos parecem ser as mais benéficas durante a maturação oocitária (HARVEY, 2007).

2.7.4 Efeito do oxigênio no desenvolvimento embrionário *in vitro*

A presença de elevados níveis de O₂ no cultivo aumenta as concentrações de ERO, o que pode afetar drasticamente a qualidade embrionária (HARVEY, 2007). Koerber *et al.* (1998) relataram várias alterações na expressão gênica de embriões pré-implantacionais de coelhas após serem incubados por 4 horas com 20% de O₂. Outros estudos observaram ainda que a utilização de uma baixa concentração de O₂ (5%) aumentou significativamente a produção de embriões suínos (KITAGAWA *et al.*, 2004), e bovinos (LONERGAN;

O'KEARNEY-FLYNN; BOLAND, 1999; YUAN *et al.*, 2003) contraditoriamente ao observado em 20% de O₂. Além disso, mais recentemente, Banwell *et al.* (2007) observaram que diferentes concentrações de O₂ (2, 5, 10 e 20%) durante a maturação oocitária podem alterar o número de células da massa celular interna e/ou trofotoderma de blastocistos de camundongos. Estes autores sugeriram que baixas concentrações desse gás (5%) parecem favorecer o subsequente desenvolvimento embrionário.

Fatehi *et al.* (2005) observaram que as taxas de clivagem e formação de blastocisto foram significativamente inferiores em oócitos desnudos fecundados *in vitro* em comparação aos oócitos com células do *cumulus* presente. Além disso, estudos em bovinos têm demonstrado que o desenvolvimento embrionário pode ser obtido com sucesso utilizando-se 5% ou 20% de O₂.

Foi demonstrado que quando a concentração de 20% de O₂ é utilizada faz-se necessário realizar um co-cultivo com células somáticas (CÔRREA *et al.*, 2008). Acredita-se que essas células podem secretar substâncias embriotróficas ou remover compostos deletérios ao desenvolvimento embrionário. Ademais, as células somáticas podem facilitar o crescimento embrionário reduzindo os níveis de substâncias tóxicas (ERO) nas imediações do embrião (KHURANA e NIEMAN, 2000).

2.8 Considerações finais

Conforme demonstrado, diversos sistemas de cultivo *in vitro* de folículos e embriões vêm tentando minimizar os efeitos tóxicos causados pela produção de ERO através da utilização de diferentes tensões de O₂, uma vez que as ERO podem comprometer o desenvolvimento folicular, a maturação oocitária e a posterior produção *in vitro* de embriões. Entretanto, pode-se verificar que o conhecimento disponível hoje, ainda não permite uma definição sobre a melhor tensão de O₂ a ser utilizada no cultivo *in vitro* seja de complexo *cumulus*-oócitos, folículos ou embriões. Portanto, mais estudos são necessários para esclarecer a ação do O₂ e, assim, estabelecer um protocolo de maior eficiência, no que diz respeito à qualidade e desenvolvimento de folículos pré-antrais visando à produção *in vitro* de embriões em larga escala.

2.9 Referências Bibliográficas

- Abir R, Fisch B, Nahun R, Orvieto E, Nitke, S, Okon E. Ben-Rafael Z.** Turner`s syndrome and fertility: Current status and possible future prospects. *Hum Reprod*, v.7, p.603-610, 2001.
- Andrade ER, Seneda MM, Alfieri AA, Oliveira JA, Rodrigues APF, Bracarense L, Figueiredo JR, 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.
- Arunakumari G, Vagdevi R, Rao BS, Naik BR, Naidu KS, Suresh Kumar RV, Rao VH.** Effect of hormones and growth factors on *in vitro* development of sheep preantral follicles. *Small Rum Res*, v.70, p.93-100, 2007.
- Barnett DK, Bavister BD.** What is the relationship between the metabolism of preimplantacion of embryos and their developmental competence? *Mol Reprod Dev*, v.43, p.105-133, 1996.
- Barnett KR, Schilling C, Greenfeld CR, Tomic D, Flaws JA.** Ovarian follicle development and transgenic mouse models. *Hum Reprod Update*, v.10, p.1-19, 2006.
- Barreiros ALBS, David JM, David JP.** Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim Nov*, v.29, p.113-123, 2006.
- Barros LF, Hermosilla T, CASTRO J.** Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. *Comp Biochem Phys A*, v.130, p.401-409, 2001.
- Banwell KM, Lane M, Russell DL, Kind KL, Thompson JG.** Oxygen concentration during mouse oocyte maturation affects embryo and fetal development. *Human Reprod*, v.22, p.2768-2775, 2007.
- Betteridge KJ, Smith C, Stubbings RB, Xu KP, King WA.** Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes. *J Reprod Fertil*, v.38, p.87-98, 1989.
- Boland NI, Humpherson PG, Leese JH, Gosden RG.** Pattern of lactate production and steroidogenesis during growth and maturation of mouse ovarian follicles *in vitro*. *Biol Reprod*, v.48, p.787-806, 1993.
- Bras M, Queenan B, Susin SA.** Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry*, v.70, p.231-239, 2005.
- Braw-Tal R, Yossefi S.** Studies *in vivo* and on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. *J Reprod Fertil*, v.109, p.165-171, 1997.
- Bristol-Gould S, Woodruff TK.** Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology*, v.66, p.5-13, 2006.

- Cecconi S, Barboni B, Coccia M, Mattioli M.** Development of sheep preantral follicles. *Biol Reprod*, v.60, p.594-601, 1999.
- Campbell BK.** The endocrine and local control of ovarian follicle development in the ewe. *Anim Reprod*, v.6, p.159-171, 2009.
- Cha KY, Chian RC.** Maturation *in vitro* of immature human oocytes for clinical use. *Human Reprod*, v.4, p.103-120, 1998.
- Chui DK, Pugh ND, Walker SM, Gregory L, Shaw RW.** Follicular vascularity the predictive value of transvaginal power Doppler ultrasonography in an *in vitro* fertilization programme: a preliminary study. *Hum Reprod*, v.12, p.191-196, 1997.
- Clark AR, Stokes YM, Lane M, Thompson JG.** Mathematical modelling of oxygen concentration in bovine and murine *cumulus*-oocyte complexes. *Reproduction*, v.131, p.999-1006, 2006.
- Côrrea AG, Rumpf R, Mundima TCD, Franco MM, Dode MAN.** Oxygen tension during culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress. *Anim Reprod Sci*, v.104, p.132-142, 2008.
- Crozet N, Dahirl M, Gall L.** Meiotic competence of *in vitro* grown goat oocytes. *J. Reprod. Fertil*, v.118, p.367-373, 2000.
- Dieleman SJ, Hendriksen PJM, Viuff D, Thomsen PD, Hyttel P, Knijn HM, Wrenzycki C, Kruip TA, Niemann H, Gadella BM, Bevers MM, Vos PL.** Effects of *in vivo* prematuration and *in vivo* final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. *Theriogenology*, v.57, p.5-20, 2002.
- Dode MAN, Adona PR, Rodovalho NCM.** Retenção da meiose de ovócitos bovinos em líquido folicular de folículos de vários tamanho. *Arq Fac Vet UFRGS*, v.28, p.241, 2000.
- Donnay I, Van Langendonckt A, Auquier P, Grisart B, Vansteenbrugge A, Massip A, Dessy F.** Effects of co-culture and embryo number on the *in vitro* development of bovine embryos. *Theriogenology*, v.47, p.1549-1561, 1997.
- Driancourt MA, Webb R, Fry RC.** Does follicular dominance occur in ewe? *J. Reprod Fertil*, v.93, p.63-70, 1991.
- Drummond AE.** The role of steroids in follicular growth. *Reprod Biol Endocrinol*, v.4, p.1-11, 2006.
- Eppig JJ, Schroeder AC.** Capacity of mouse oocyte from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation and fertilization *in vitro*. *Biol Reprod*, v.41, p.268-276, 1989.

- Erickson GF.** An analysis of follicle development and ovum maturation. *Sem Reprod Endocri*, v.4, p.233-254, 1986.
- Erickson GF.** Role of growth factors in ovary organogenesis. *J Soc Gynecol Investig*, v.8, p.13-16, 2001.
- Fatehi AN, Roelen BA, Colenbrander B, Schoevers EJ, Gadella BM, Beverst MM, Van den Hurk R.** Presence of *cumulus* cells during *in vitro* fertilization protects the bovine oocyte against oxidative stress and improves first cleavage but does not affect further development. *Zygote*, v.13, p.177-185, 2005.
- Farber JL.** Membrane injury and calcium homeostasis in the pathogenesis of coagulative necrosis. *Lab Invest*, v.47, p.114-123, 1982.
- Ferreira ALA, Matsubara LS.** Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Bras*, v.43, p.61-68, 1997.
- Fiers W, Beyaert R, Declercq W, Vandenabeele P.** More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene*, v.18, p.7719-7730, 1999.
- Figueiredo JR, Rodrigues APR, Amorim CA, Silva JRV.** Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*, Roca: São Paulo, 2ª ed., 2008, p.303-327.
- Fortune JE.** The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.135-163, 2003.
- Gigli I, Byrd DD, Fortune JE.** Effects of oxygen tension and supplements to the culture medium on activation and development of bovine follicles. *Theriogenology*, v.66, p.344-353, 2006.
- Gonçalves PBD, Barreta MH, Sandri LR, Ferreira R, Antoniazzi AQ.** Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.212-217, 2007.
- Gonçalves PBD, Oliveira MAL, Mezzalira A, Montagner MM, Visitin JA, Costa LFS.** Produção *in vitro* de embriões. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*, Roca: São Paulo, 2ª ed., 2008, p.261-291.
- Goto K, Noda Y, Mori T, Nakano M.** Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured. *Free Radic Biol Med*, v.15, p.69-75, 1993.
- Gougeon A, Busso D.** Morphologic and functional determinants of primordial and primary follicles in the monkey ovary. *Mol Cell Endocrinol*, v.163, p.33-41, 2000.
- Guérin P, Mouatassim S, Ménéz Y.** Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human Reprod*, v.7, p.175-189, 2001.

- Gupta PS, Ramesh HS, Manjunatha BM, Nandi S, Ravindra JP.** Production of buffalo embryos using oocytes from *in vitro* grown preantral follicles. *Zygote*, v.16, p.57-63, 2008.
- Gutierrez CG, Ralph JH, Telfer EE, Wilmut I, Webb R.** Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. *Biol Reprod*, v.62, p.1322-1328, 2000.
- Halliwell B, Gutteridge JMC.** Free radicals in biology and medicine. 3.ed. New York: Oxford University Press Inc, 1999.
- Harvey AJ.** The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. *Anim Reprod Sci*, v.98, p.113-128, 2007.
- Hashimoto S, Minami N, Takakura R.** Low oxygen tension during *in vitro* maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine *cumulus*-oocyte complexes. *Mol Reprod Devel*, v.57, p.353-360, 2000.
- Hewitt DA, England GCW.** Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocyte maturation *in vitro*. *Anim Reprod Sci*, v.55, p.63-75, 1998.
- Huamin Z, Yong Z.** *In vitro* development of caprine ovarian preantral follicles. *Theriogenology*, v.54, p.641-650, 2000.
- Hussein, MR.** Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Human Reprod Update*, v.11, p.162-178, 2005.
- Johnson AL.** Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. *Anim Reprod Sci*, v.78, p.185-201, 2003.
- Katska-Ksiazkiewicz L.** Recent achievements in culture and preservation of ovarian follicles in mammals. *Reprod Biol*, v.6, p.3-16, 2006.
- Khurana NK, Niemann H.** Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, *cumulus* cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology*, v.54, p.741-756, 2000.
- Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A, Watanabe T.** Effects of oxygen concentration and antioxidants on the developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology*, v.62, p.1186-1197, 2004.
- Koerber S, Navarrete SA, Tetens F, Kiichenhoff A, Fischer B.** Increased expression of NADH-Ubiquinone Oxidoreductase chain 2 (NDR) in preimplantation rabbit embryos cultured with 20% oxygen concentration. *Mol Reprod Dev*, v.9, p.394-399, 1998.
- Lima-Verde IB, Bruno JB, Matos MHT, Rodrigues APR, Figueiredo JR, Oliveira MAL, Lima PF.** Implicações do estresse oxidativo no ovário e no embrião mamífero. *Med Vet*, p.81-88, 2007.

- Liu J, Van Der Elst J, Van Den Broeck R, Dhont M.** Live offspring by oocytes from cryopreserved primordial mouse follicles after sequential *in vivo* transplantation and maturation. *Biol Reprod*, v.64, p.171-178, 2001.
- Lonergan P, O’Kearney-Flynn M, Boland MP.** Effect of protein supplementation and presence of an antioxidant on the development of bovine zygotes in synthetic oviduct fluid medium under high or low oxygen tension. *Theriogenology*, v.51, p.1565-1576, 1999.
- Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A, Fair T, Boland MP.** Oocytes and embryos quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reprod Dom Anim*, v.38, p.259-267, 2003.
- Lucci CM, Amorim CA, B  o SN, Figueiredo JR, Rodrigues APR, Silva JR, Gonçalves PBD.** Effect of the interval of serial sections of ovarian in the *tissue chopper* on the number of isolated caprine preantral follicles. *Anim Reprod Sci*, v.56, p.39-49, 1999.
- Matos MHT, Lima-Verde IB, Bruno JB, Lopes CAP, Martins FS, Santos KDB, Rocha RMP, Silva JRV, B  o SN, Figueiredo JR.** Follicle stimulating hormone and fibroblast growth factor-2 interact and promote goat primordial follicle development *in vitro*. *Reprod Fertil Dev*, v.19, p.677–684, 2007.
- Mignotte B, Vayssiere JL.** Mitochondria and apoptosis. *Eur J of Bioch*, v.252, p.1-15, 1998.
- O’Brien MJ, Pendola JK, Eppig JJ.** A revised protocol for development of mouse oocyte from primordial follicles dramatically improves their development competence. *Biol Reprod*, v.68, p.1682-1686, 2003.
- Oliveira ATD, Lopes RFF, Rodrigues JL.** Gene expression and developmental competence of bovine embryos produced *in vitro* under varying embryo density conditions. *Theriogenology*, v.64, p.1559-1572, 2005.
- Padanilam BJ.** Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *Am J Physiol-Renal*, v.284, p.608-627, 2003.
- Park JI, Hong JY, Yong HY, Hwang WS, Lim JM, Lee ES.** High oxygen tension during oocyte maturation improves development of porcine oocytes after fertilization. *Anim Reprod Sci*, v.87, p.133-141, 2005.
- Picton H, Briggs D, Gosden R.** The molecular basis of oocyte growth and development. *Mol Cell Endocrinol*, v.145, p.27-37, 1998.
- Preis KA, Seidel GEJ, Gardner DK.** Reduced oxygen concentration improves the developmental competence of mouse oocytes following *in vitro* maturation. *Mol Reprod Dev*, v.74, p.893-903, 2007.

- Shaw JM, Oranratnachai A, Trounson AO.** Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. *Theriogenology*, v.53, p.59-72, 2000.
- Silva JRV, Van den Hurk, Matos MHT, Santos RR, Pessoa C, Moraes MO, Figueiredo JR.** Influences of FSH and EGF on primordial follicles during *in vitro* culture of caprine ovarian cortical tissue. *Theriogenology*, v.61, p.1691-1704, 2004.
- Silva JRV, Tharasanit T, Taverne MAM, Van Der Weijden GC, Santos RR, Figueiredo JR, Van den Hurk R.** The activin-follistatin system and *in vitro* early follicle development in goats. *J Endocrinol*, v.189, p.113-125, 2006.
- Sirard MA.** Resumption of meiosis: Mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology*, v.55, p.1241-1254, 2001.
- Tamilmani G, Rao BS, Vagdevi R, Amarnath D, Naik, BR, Mutharao M, Rao VH.** Nuclear maturation of oocytes in sheep preantral follicles cultured *in vitro*. *Small Rumin Res*, v.60, p.295-305, 2005.
- Telfer EE.** The development of methods for isolation and culture of preantral follicles from bovine and porcine ovaries. *Theriogenology*, v.45, p.101-110, 1996.
- Telfer EE, McLaughlin M, Ding C, Joo Thong K.** A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. *Human Reprod*, v.23, p.1151-1158, 2008.
- Thompson JG, Simpson AC, Pugh PA, Donnelley PE, Tervit HR.** Effect of oxygen concentration on *in-vitro* development of pre-implantation sheep and cattle embryos. *J Reprod Fertil*, v.89, p.573-578, 1990.
- 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.
- Wrenzycki C, Herrmann D, Carnwath JW.** Alterations in the relative abundance of gene transcripts in pre-implantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. *Mol Reprod Devel*, v.53, p.8-18, 1999.
- Wu J, Benjamin RE, Carrell DT.** *In vitro* growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. *Biol Reprod*, v.64, 375-381, 2001.
- 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.
- Yuan YQ, Van Soom A, Coopman FOJ, Mintiens K.** Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured *in vitro*. *Theriogenology*, v.59, p.1585-1596, 2003.

3 JUSTIFICATIVA

Conforme demonstrado na revisão de literatura, várias pesquisas têm sido realizadas no contexto da reprodução animal, visando aumentar o potencial reprodutivo de animais de alto valor zootécnico ou em vias de extinção. Para atingir esse fim, diversas biotécnicas têm sido desenvolvidas. Dentre elas, podemos destacar a Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais (MOIFOPA), que vem sendo utilizada rotineiramente por diversos pesquisadores.

A MOIFOPA se fundamenta em dois objetivos principais: 1) resgatar os folículos pré-antrais (FOPA) do ambiente ovariano antes que eles se tornem atrésicos e 2) cultivar os FOPA e, conseqüentemente, os oócitos imaturos neles inclusos, até estarem aptos a serem maturados e fecundados *in vitro*. Estes objetivos se baseiam no fato de que os FOPA compreendem cerca de 95% de toda população folicular presente no ovário dos mamíferos. No entanto, pouco desses folículos chegam ao estágio pré-ovulatório, morrendo por um processo denominado de atresia folicular.

Tendo em vista essa grande perda de folículos pré-antrais e, conseqüentemente, dos oócitos neles contidos, que ocorre naturalmente *in vivo*, vários estudos têm testado e avaliado a influência de diferentes fatores no cultivo *in vitro* (tipo de meio utilizado, presença ou ausência de gonadotrofinas e/ou fatores de crescimento, bem como a atmosfera gasosa). Nesse sentido, estudos têm verificado que a atmosfera gasosa, especialmente a concentração de oxigênio (O_2) é um componente essencial para manutenção da viabilidade e desenvolvimento folicular, bem como durante a maturação oocitária *in vitro*. Entretanto, até o momento, ainda não haviam sido testadas diferentes concentrações de O_2 sobre a sobrevivência e o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos cultivados na forma isolada. Assim, a utilização de marcadores fluorescentes (calceína-AM e edítio homodímero-1) para avaliar a viabilidade folicular pode fornecer dados precisos sobre o “status” folicular (viável ou não viável) ao final do período de cultivo.

Desta forma, a padronização da concentração de oxigênio para o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos é de grande relevância para o desenvolvimento de um sistema de cultivo dinâmico, que visa o crescimento e maturação *in vitro* de oócitos oriundos de folículos ovarianos pré-antrais caprinos, tendo em vista a produção *in vitro* de embriões em larga escala.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

- A concentração de oxigênio afeta positivamente a viabilidade e influencia o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

- Estudar o efeito de duas concentrações de oxigênio (5% e 20%) sobre o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos isolados.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito de diferentes concentrações de oxigênio (5% e 20%) sobre a viabilidade, crescimento e formação de antro de folículos ovarianos pré-antrais caprinos;
- Analisar a taxa de retomada da meiose de oócitos oriundos de folículos pré-antrais caprinos isolados cultivados *in vitro*, na presença de diferentes concentrações de oxigênio citadas anteriormente.

6 CAPÍTULO I

Sobrevivência e desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos em duas diferentes concentrações de oxigênio

In vitro survival and development of goat preantral follicles in two different oxygen tensions

Resumo

O presente estudo visa avaliar o efeito de duas diferentes concentrações de oxigênio (O_2) sobre a sobrevivência e o desenvolvimento de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro*. Folículos ovarianos pré-antrais ($\geq 150 \mu m$) foram isolados a partir de fragmentos do córtex ovariano de cabras e individualmente cultivados por 30 dias sob duas diferentes concentrações de O_2 (5% e 20% O_2). O desenvolvimento folicular foi avaliado com base na formação da cavidade antral, aumento no diâmetro folicular, presença do complexo *cumulus*-oócito viável e oócitos completamente crescidos. Os resultados mostraram que com a progressão do período de cultivo do dia 6 para o dia 12, houve uma diminuição na sobrevivência folicular em ambas as concentrações de O_2 (5 e 20%). Quando as concentrações de O_2 foram comparadas em cada um dos diferentes dias de cultivo, a de 20% foi mais eficiente na promoção do aumento do diâmetro folicular a partir do dia 24 de cultivo quando comparado com a de 5% de O_2 ($P < 0.05$). Por outro lado, folículos cultivados na presença de 5% de O_2 tiveram um aumento na percentagem de formação de antro a partir do dia 12 até final do cultivo, quando comparado com a concentração de 20% de O_2 ($P < 0.05$). Contudo, não foram verificadas diferenças significativas na percentagem de oócitos crescidos entre as diferentes concentrações de O_2 testadas. No entanto, apenas oócitos (16.7%) oriundos de folículos cultivados na presença de 20% de O_2 retomaram a meiose. Em conclusão, a concentração de 20% de O_2 foi mais eficiente na promoção do crescimento folicular e retomada da meiose de oócitos obtidos de folículos pré-antrais de cabras crescidos *in vitro*.

Palavras-chave: Caprino, Oxigênio, Folículos pré-antrais, Cultivo

***In vitro* survival and development of goat preantral follicles in two different oxygen tensions**

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.

Faculty of Veterinary Medicine, Laboratory of Manipulation of Oocyte and Preantral
Follicles (LAMOFOPA), State University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

*Corresponding address: Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV);
Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-Antrais (LAMOFOPA)
Universidade Estadual do Ceará (UECE); Av. Paranjana, 1700, Campus do Itaperi; Fortaleza
– CE – Brasil. CEP: 60740-000; Tel.: 5585-3101-9852; Fax: 5585-3101-9840;
E-mail address: gomesvet@hotmail.com (Cleudson Manoel Gomes da Silva)

Abstract

The aim of the present study was to evaluate the effect of two different oxygen (O₂) concentrations on survival and development of preantral follicles of goats cultured *in vitro*. Preantral ovarian follicles ($\geq 150 \mu\text{m}$) were isolated from ovarian cortex fragments of goats and individually cultured for 30 days under two different O₂ concentrations (5% and 20% O₂). Follicle development was evaluated on the basis of antral cavity formation, increase in follicular diameter, presence of healthy *cumulus* oocyte complexes and fully grown oocytes. Results showed with progression of culture period from 6 to 12 days, a decrease in follicular survival was observed in both O₂ concentrations (P<0.05). When the O₂ tensions were compared to each other in the different days of culture, 20% O₂ was more efficient in promoting an increase in follicular diameter from day 24 of culture onwards than 5% O₂ (P<0.05). However, follicles cultured with 5% O₂ had an increased percentage of antrum formation from 12 days to the end of culture, compared with 20% O₂ (P<0.05). Moreover, there were no difference in percentage of fully developed oocytes with the different O₂ tensions. However, only oocytes (16.7%) from follicles cultured in 20% O₂ resumed meiosis. In conclusion, concentration of 20% O₂ was more efficient in promoting follicular growth and oocyte meiosis resumption from preantral follicles of goats when grown *in vitro*.

Keywords: Goat, Oxygen, Preantral follicles, Culture

1. Introduction

In vitro culture of preantral follicles has been largely studied to understand factors controlling early ovarian folliculogenesis, rather than in promoting oocyte growth and maturation (Hartshorne, 1997). In addition, follicular culture can be used to evaluate *in vitro* effects of different substances that can affect ovarian function and fertility (e.g., hormones, antibiotics and anti-inflammatory agents). Progress has occurred after culture of large secondary follicles, such as formation of the antral cavity (sheep: Cecconi *et al.*, 1999; cattle: Gutierrez *et al.*, 2000; goats: Huamin & Yong, 2000), oocyte maturation (sheep: Tamilmani *et al.*, 2005) and, more recently, embryo production (buffalo: Gupta *et al.*, 2008). However, the most satisfactory results were observed in mice, in which birth of viable animals occurred after *in vitro* culture of preantral follicles (O'Brien *et al.*, 2003).

Several factors (medium composition, hormones, growth factors, peptides and gas atmosphere) influence preantral follicle development during *in vitro* culture and have been used to establish a culture system that promotes preantral follicle growth and results in oocytes capable of undergoing *in vitro* maturation and fertilization (Mao *et al.*, 2002). Among these factors, oxygen (O₂) concentration has received special attention because it is an essential component for maintenance of cellular viability (Clark *et al.*, 2006). Studies demonstrated that *in vitro* culture of mice (Smitz *et al.*, 1996) and cattle (Gigli *et al.*, 2006) preantral follicles with 20% O₂ improved follicular development and survival, cellular differentiation, besides promoting an increase in the number of meiotically competent oocytes. In sheep, Cecconi *et al.* (1999) demonstrated that 5% O₂ promoted greater rates of growth, viability, follicular antrum formation and estradiol secretion in isolated secondary follicles, than 20% O₂. However, there are no reports on the possible role of different O₂ concentrations on goat preantral follicle viability and development *in vitro*. Thus, the aims of

the present study were to evaluate effect of different O₂ concentrations on survival and growth of preantral follicles of goats after long-term culture *in vitro*, as well as on oocyte capability of undergoing meiotic resumption.

2. Material and methods

2.1. Chemicals

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

2.2. Source of ovaries

Ovaries (n = 16) were collected at a local slaughterhouse from eight adult (1 to 3 years old) mixed-breed goats and used to perform four replicates of the experiment (two goats/replicate). Immediately postmortem, ovaries were washed in 70% alcohol followed by two rinses in Minimum Essential Medium (MEM) supplemented with 100 µg/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. Ovaries were transported within 1 hour to the laboratory in MEM at 4°C.

2.3. Isolation and selection of preantral follicles

In the laboratory, surrounding fat tissue and ligaments were stripped off from the ovaries. Ovarian cortical slices (1 to 2 mm in diameter) were cut from the ovarian surface using a surgical blade under sterile conditions. The ovarian cortex was subsequently placed in

fragmentation medium, consisting of MEM plus HEPES. Preantral follicles of approximately $\geq 150 \mu\text{m}$ in diameter were visualized under a stereomicroscope (SMZ 645 Nikon, Tokyo, Japan) and manually dissected from strips of ovarian cortex using 25 gauge (25 G) needles. After isolation, follicles were transferred to 100 μL drops containing fresh medium under mineral oil to further evaluation of the follicular quality. Follicles with a visible oocyte, surrounded by granulosa cells, an intact basement membrane and no antral cavity were selected for culture.

2.4. Preantral follicle culture

After selection, follicles were individually cultured in 25 μL drops of culture medium in petri dishes (60 x 15 mm, Corning, USA). Culture medium consisted of α -MEM (pH 7.2 - 7.4) supplemented with 1.25 mg/mL bovine serum albumin (BSA), ITS (insulin 6.25 ng/mL, transferrin 6.25 ng/mL and selenium 6.25 ng/mL), 2 mM glutamine, 2 mM hypoxanthine, 1000 ng/mL recombinant Follicle Stimulating Hormone (rFSH) and 50 $\mu\text{g/mL}$ of ascorbic acid under mineral oil. Concentrations of rFSH (Tecnopec, Brazil) and ascorbic acid were chosen based on previous studies (Figueiredo *et al.*, unpublished data). Incubation was conducted at 39° C, for 30 days. Fresh media were prepared immediately before use and incubated for 1 h prior to use. For the experimental conditions, two O_2 tensions were tested in a standard incubator: 5% O_2 (gas mixture: 5% O_2 , 5% CO_2 , 90% N_2) and 20% O_2 (gas mixture: 20% O_2 , 5% CO_2 in air). Every other day, 15 μL of the culture media were replenished by fresh medium. The culture was replicated four times, and at least 27 follicles were used per treatment.

2.5. Morphological evaluation of follicle development

Follicles were classified according to morphological characteristics, and those showing morphological signs of degeneration, such as darkness of oocytes and surrounding *cumulus* cells or those with misshapen oocytes were classified as degenerated. Oocyte and follicular diameter were measured only in healthy follicles at x and y dimension (90°) by using an ocular micrometer (50x magnification) inserted into a stereomicroscope (SMZ 645 Nikon, Tokyo, Japan) every 6 days of culture. Antral cavity formation was defined as a visible translucent cavity within the granulosa cell layers. With follicular growth, mean daily increase in follicular diameter was calculated as follows: diameter of viable follicles at day 30 minus diameter of viable follicles at day 0 divided by the days of *in vitro* culture (30).

2.6. *In vitro* maturation of caprine oocytes from *in vitro* cultured follicles

At the end of the 30 day culture period, all healthy follicles were carefully and mechanically opened with 26 G needles under stereomicroscope for oocyte recovery. Only oocytes $\geq 110 \mu\text{m}$, with homogeneous cytoplasm and surrounded by at least one compact layer of *cumulus* cells were selected for *in vitro* maturation (IVM). The recovery rate (%) was calculated by dividing number of oocytes $\geq 110 \mu\text{m}$ by number of viable follicles at day 30 of culture x 100. The selected *cumulus* oocyte complexes were washed three times in maturation medium composed of TCM199 supplemented with 10% fetal calf serum, 100 $\mu\text{g/mL}$ of Luteinizing Hormone (LH) and 5 $\mu\text{g/mL}$ of rFSH. After washing, the oocytes were transferred to 50 μL drops of maturation medium, under mineral oil and then, incubated for 26 h at 39° C with 5% CO₂ in air. At the end of the maturation period, oocytes were fixed in acetic acid:ethanol (1:3) for 24 h and the assessment of chromatin configuration was

performed after lacmoid staining.

2.7. Assessment of preantral follicle viability

For a more precise evaluation of follicular quality after 30 days of culture, live/dead fluorescent staining was performed on isolated cultured goat preantral follicles. Briefly, follicles were incubated in 100 μ L droplets of MEM containing 4 μ M calcein-AM and 2 μ M ethidium homodimer-1 (Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe, Germany) at 37° C for 15 min. Afterwards, follicles were washed three times in MEM and examined under a DMLB fluorescence microscope (Leica, Germany). The emitted fluorescent signals of calcein-AM and ethidium homodimer-1 were collected at 488 and 568 nm, respectively. Oocytes and granulosa cells were considered live if the cytoplasm was stained positively with calcein-AM (green) and if chromatin was not labeled with ethidium homodimer-1 (red).

2.8. Statistical analysis

Data from follicular survival, antrum formation and meiotic resumption after *in vitro* culture were expressed as percentages and compared by the Chi-square test. Follicular diameter and growth rate after culture did not show homoscedasticity and hence were compared by use of the Kruskal-Wallis non-parametric test (SAS, 1999). Results were expressed as mean $\pm$ SEM and differences were considered to be significant when $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Effects of oxygen tension on preantral follicle survival

Preantral follicles selected for culture had a centrally located oocyte and normal granulosa cells, which were enclosed by an intact basal membrane (Figure 1A). Effects of different O₂ tensions (5 and 20%) on follicular survival, antrum formation and extrusion were evaluated at 0, 6, 12, 18, 24 and 30 days of culture. As depicted in Figure 3, follicular survival was maintained up to 6 days of culture with both O₂ tensions tested (5 and 20%) when compared with day 0. Nevertheless, with progression of culture period from 6 to 12 days, a decrease in follicular survival was observed in both O₂ concentrations (P<0.05). Moreover, when follicles were cultured with 5% O₂, there was a reduction in percentage of normal follicles from day 12 to day 24 (P<0.05).

Viability of follicles classified as live through the morphological evaluation was confirmed using the fluorescent markers calcein-AM and ethidium homodimer-1. While the first probe detected intracellular esterase activity of viable cells (Figure 2A), the later labeled nucleic acids of non-viable cells with plasma membrane disruption (Figure 2B). All follicles cultured for 30 days with both O₂ tensions (5 and 20%) an apparent normal at morphological evaluations had oocyte and granulosa cells stained in green with calcein-AM, and were not marked by ethidium homodimer-1. In addition, there was not any difference between the O₂ tensions with each day of culture.

3.2. Effects of oxygen tension on follicular growth and antral cavity formation

Mean initial diameter of follicles before culture (Day 0) was 209.37 ± 33.69 and 215.99 ± 63.42 for 5% and 20% O₂, respectively, and there were no differences in follicle diameter. With the progression of the culture period from day 0 to 6 and from day 6 to 12, as well as from day 24 to 30, there was an increase in follicular diameter with both O₂ tensions (5% and 20%) (Figure 4; P<0.05). When the O₂ tensions were compared to each other at

different days of culture, 20% O₂ was more efficient in promoting a significant increase in follicular diameter from day 24 of culture onwards than 5% O₂ (P<0.05). Moreover, mean daily increase in follicular diameter after 30 days of *in vitro* culture under 20% O₂ (15.03 ± 5.42) was greater (P<0.05) than with 5% O₂ (9.38 ± 4.16).

Percentage of antral cavity formation after culture of preantral follicles with different O₂ tensions is depicted in Figure 5. The first antral follicles were observed as early as day 6 of culture with both treatments (Figure 1B). At day 18, all follicles cultured with 5% O₂ reached the antral stage and did not differ among days of culture with O₂ tensions tested. In addition, with up to 6 days of culture, percentage of antrum development was similar between both O₂ tensions. However, follicles cultured with 5% O₂ had an increased percentage of antrum formation from day 12 onwards compared with 20% O₂ (P<0.05).

3.3. Ability of *in vitro* grown oocytes to undergo meiotic resumption

Percentages of oocytes acceptable for IVM, at the end of the culture period (after 30 days) were 28.6% and 75% (≥ 110 μm) from normal follicles cultured with 5% and 20% O₂, respectively (Table 1). Oocytes had a homogeneous cytoplasm and were surrounded by at least one compact layer of *cumulus* cells, characterizing the *cumulus* oocyte complexes (COC), as shown in Figure 1C. At the end of the maturation period, expanded *cumulus* cells were visualized in some *cumulus* oocyte complexes (Figure 1D). With respect to the chromatin configuration, all fully grown oocytes from follicles cultured with 5% O₂ and 83.3% of those oocytes cultured with 20% O₂ had an intact germinal vesicle (Figure 1E). Oocytes (16.7%) from follicles cultured in 20% O₂ resumed meiosis, reaching the metaphase I stage, as shown in Figure 1F.

4. Discussion

The present study shows for the first time the influence of different O₂ tensions on survival, growth and antrum formation of isolated follicles of goats grown *in vitro* and the ability of these oocytes to resume meiosis. Results from studies in which adequate O₂ concentrations were used in *in vitro* culture of embryos, oocytes and follicles are inconsistent. However, most of studies have used 5% or 20% O₂ as the appropriate concentration for cellular culture, including oocytes (Banwell *et al.*, 2007) and early somite embryos (Ribes *et al.*, 2008; Hunter *et al.*, 2006).

In the present study, after using 5% and 20% O₂, follicular survival was reduced with the increase of culture period from 6 to 12 days. However, there was no difference between 5% or 20% O₂ in percentage of normal follicles with each day of culture, which was confirmed in viability assessment through fluorescence microscopy. This assay has been successfully used to evaluate viability of cattle (Schotanus *et al.*, 1997; Van den Hurk *et al.*, 1998) and goat (Santos *et al.*, 2006, 2007) preantral follicles. Similar results were observed by Booth *et al.* (2005) in the culture of pig embryos for 7 days, which did not verify any difference in percentage of blastocysts using 5% or 20% O₂. There are a few studies dealing with effects of long-term culture using animal or human ovarian follicles. Results of the present study suggest that the culture system used may not be appropriate to maintain a micro-environment capable of promoting acceptable preantral follicle survival after 30 days. This results from excessive manipulation of follicles during the isolation process, associated with the incapacity of the culture medium to maintain oocyte and granulosa cell viability after long-term culture (Gupta *et al.*, 2002). In addition, long-term culture might increase production of toxic metabolites and reactive oxygen species (ROS), such as H₂O₂ e O₂⁻. When cellular antioxidative defense is limited, these ROS may cause oxidation of important

molecules that normally release proteases, lipases, and nucleases from mitochondria (Fiers *et al.*, 1999) that likely lead to follicular degeneration, independent of O₂ tension used.

With regard to follicular growth, there was an increase in follicular diameter from day 6 of culture onwards in both O₂ tensions (5% and 20%). However, concentration of 20% O₂ was more efficient in allowing for increased follicular diameters from day 24 of culture than 5% O₂. These results were similar to those of Gigli *et al.* (2006), whose study showed that culture of ovarian tissue from cattle with 20% O₂ increased preantral follicle growth, compared with concentrations of 2%, 5% or 60% O₂. In addition, Smitz *et al.* (1996) verified that use of 20% O₂ in the culture of mice preantral follicles improved cellular growth and differentiation, besides increasing production of meiotically competent oocytes. Moreover, Park *et al.* (2005) obtained greater maturation, fertilization and embryo cleavage rates in pigs after culture with 20% O₂. Nevertheless, in other studies 5% O₂ was the most desirable O₂ concentration for *in vitro* development of pig and human embryos (Kitagawa *et al.*, 2004; Petersen *et al.*, 2005). In the present study, from 12 days of culture onwards, more follicles with an antral cavity developed after culture with 5% O₂ than 20% O₂. In sheep, similar to results from the present study, Cecconi *et al.* (1999) found 5% O₂ was more desirable for antrum formation after culture of secondary follicles than 20% O₂. However, in other studies, there was development of large secondary follicles from cattle and goats up to the antral stage after *in vitro* culture with 20% O₂ (Gutierrez *et al.*, 2000; Huamin & Yong, 2000).

According to the mathematical model proposed by Clark *et al.* (2006) and performed to evaluate the O₂ diffusion through mouse and cow *cumulus*-oocyte-complex, O₂ concentrations at the oocyte surface is approximately 5% to 15% less than in follicular fluid. Because follicular fluid hampers O₂ diffusion, lesser concentrations of O₂ may limit oxidative phosphorylation by reduction of mitochondrial function and ATP production in oocytes enclosed in follicles after antrum formation (Redding *et al.*, 2007). Thus, although 5% O₂

promoted greater antrum formation, this concentration was not effective in promoting follicular growth. This finding may be due to the lesser diffusion of O₂ in the follicular fluid, which can impair oocyte growth and inhibit meiosis resumption. Nevertheless, the concentration of 20% O₂ appeared to be the most suitable for *in vitro* follicular development because it ensures a greater O₂ diffusion. This finding is consistent with several studies because this concentration (20% O₂) is most commonly used for oocyte, follicle and embryo culture.

In previous studies, oocytes from goats smaller than 100 µm were not able to resume meiosis (Crozet *et al.*, 2000). This finding combined with those from the present study at the end of culture that only fully developed oocytes larger than 100 µm from viable follicles were optimal for use with IVM procedures. In the present study, *in vitro* culture of preantral follicles from goats in the presence of 20% O₂ was a more viable oocyte with regard to growth as 28.6% and 75% fully developed oocytes resulted from use of 5% and 20% O₂, respectively, after 30 days of culture. In addition, 16.7% of oocytes from follicles cultured with 20% O₂ resumed meiosis, reaching the metaphase I stage. These results are interesting, because few studies in domestic animals have achieved meiotically competent oocytes from *in vitro* culture of preantral follicles (sheep: Tamilmani *et al.*, 2005; Arunakumari *et al.*, 2007; pigs: Wu *et al.*, 2001; buffalo: Gupta *et al.*, 2008). Although the rate of meiotic resumption reported in the present study was less than desirable, to our knowledge, this is the first report where preantral follicles from goats grown *in vitro* resumed meiosis. In addition, after *in vitro* culture of antral follicles, Crozet *et al.* (2000) verified that only 1% of oocytes from goats resumed meiosis and achieved the metaphase I stage of development. Nevertheless, the small percentage of *in vitro*-grown oocytes with meiotic resumption was probably due to the culture conditions, which were insufficient to promote *in vitro* development of preantral follicles from goats and produce meiotically competent oocytes. A desirable culture system has not yet

been developed, however, and lack of success in this regard may be related to several intrinsic and extrinsic factors, such as follicular stage and medium composition (i.e., presence of different substances in different concentrations - hormones, growth factors, proteins, amino acids, peptides), which are involved simultaneously or in sequence during folliculogenesis (Demeestere *et al.*, 2005). In addition, with the larger species, early follicular and oocyte development follows a very lengthy and complex process (Gougeon, 1996). Therefore, an extended culture period may be required for oocytes to achieve *in vitro* maturation.

In conclusion, the present study provides evidence that O₂ tension affects *in vitro* development of cultured preantral follicles of goats, with 20% O₂ being optimal due to the greater rates of follicular growth. In addition, only oocytes grown *in vitro* in the presence of 20% O₂ were capable of resuming meiosis. However, more studies are necessary to establish an appropriate *in vitro* culture system, which allows maintenance of viability and promotes follicular growth, and further oocyte maturation and fertilization, thus improving embryo production.

5.Acknowledgments

This work was supported by CNPq (grant number 554812/2006-1). The authors thank Ana Beatriz Graça Duarte for MIV assistance and Juliana Jales de Hollanda Celestino for the correction of the manuscript.

6. Conflict of interest

There is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

7. References

- Arunakumari, G., Vagdevi, R., Rao, B.S., Naik, B.R., Naidu, K.S., Suresh-Kumar, R.V., Rao, V.H., 2007. Effect of hormones and growth factors on *in vitro* development of sheep preantral follicles. *Small Rumin Res*, 70, 93-100.
- Banwell, K.M., Lane, M., Russell, D.L., Kind, K.L., Thompson, J.G., 2007. Oxygen concentration during mouse oocyte *in vitro* maturation affects embryo and fetal development. *Hum Reprod*, v. 22, p. 2768-2775.
- Booth, P.J., Holm, P., Callesen, H., 2005. The effect of oxygen tension on porcine embryonic development is dependent on embryo type. *Theriogenology* 63, 2040-2052.
- Cecconi, S., Barboni, B., Coccia, M., Mattioli, M., 1999. *In vitro* development of sheep preantral follicles. *Biol. Reprod.* 60, 594-601.
- Clark, A.R., Stokes, Y.M., Lane, M., Thompson, J.G., 2006. Mathematical modelling of oxygen concentration in bovine and murine *cumulus*-oocyte complexes. *Reproduction* 131, 999-1006.
- Crozet, N., Dahirel, M., Gall, L., 2000. Meiotic competence of *in vitro* grown goat oocytes. *J. Reprod. Fertil.* 118, 367-373.
- Demeestere, I., Centner, J., Gervy, Y., Delbaere, A., 2005. Impact of various endocrine and paracrine factors on *in vitro* culture of preantral follicles in rodents. *Reproduction* 130, 147-156.
- Fiers, W., Beyaert, R., Declercq, W., Vandenabeele, P., 1999. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene* 18, 7719-7730.
- Gigli, I., Byrd, D.D., Fortune, J.E., 2006. Effects of oxygen tension and supplements to the culture medium on activation and development of bovine follicles *in vitro*. *Theriogenology* 66, 344-353.

- Gougeon, A., 1996. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses, *Endocr. Rev.* 17, 121-155.
- Gupta, P.S.P., Nandi, S., Ravindranatha, B.M., Sarma, P.V., 2002. *In vitro* culture of buffalo (*Bubalus bubalis*) preantral follicles. *Theriogenology* 57, 1839–1854.
- Gupta, P.S.P., Ramesh, H.S., Manjunatha, B.M., Nandiand, S., Ravindra, J.P., 2008. Production of buffalo embryos using oocytes from *in vitro* grown preantral follicles. *Zygote* 16, 57–63.
- Gutierrez, C.G., Ralph, J.H., Telfer, E.E., Wilmut, I., Webb, R., 2000. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. *Biol. Reprod.* 62, 1322-1328.
- Hartshorne, G.M., 1997. *In vitro* culture of ovarian follicles. *Rev Reprod*, 2, 94-104.
- Huamin, Z. & Yong, Z., 2000. *In vitro* development of caprine ovarian preantral follicles. *Theriogenology* 54, 641-650.
- Hunter III, E.S., Rogers, E., Blanton, M., Richard A., Chernoff, N., 2006. Bromochloro-haloacetic acids: Effects on mouse embryos *in vitro* and QSAR considerations. *Reprod. Toxicol.* 21, 260-266.
- Kitagawa, Y., Suzuki, K., Yoneda, A., Watanabe, T., 2004. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the *in vitro* developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology* 62, 1186-1197.
- Mao, J., Wu, G., Smith, M.F., Mccauley, T.C., Cantley, T.C., Prather, R.S., Didion, B.A., Day, B.N., 2002. Effects of culture medium, serum type, and various concentrations of follicle stimulating hormone on porcine preantral follicle development and antrum formation *in vitro*. *Biol. Reprod.* 67, 1197-1203.

- O'Brien, M.J., Pendola, J.K., Eppig, J.J., 2003. A revised protocol for *in vitro* development of mouse oocyte from primordial follicles dramatically improves their development competence. *Biol. Reprod.* 68, 1682-1686.
- Park, J.I., Hong, J.Y., Yong, H.Y., Hwang, W.S., Lim, J.M., Lee, E. S., 2005. High oxygen tension during *in vitro* oocyte maturation improves *in vitro* development of porcine oocytes after fertilization . *Anim. Reprod. Sci.* 87, 133-141.
- Petersen, A., Mikkelsen, A.L., Lindenberg, G.S., 2005. The impact of oxygen tension on developmental competence of post-thaw human embryos. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* 84, 1181-1184.
- Redding, G.P., Bronlund, J.E., Hart, A.L., 2007. Mathematical modelling of oxygen transport-limited follicle growth. *Reprod. Res.* 133, 1741-7899.
- Ribes, V., Stutzmann, F., Bianchetti, L., Guillemot, F., Dollé, P., Le Roux, I., 2008. Combinatorial signalling controls Neurogenin2 expression at the onset of spinal neurogenesis. *Dev. Biol.* 321, 470-481.
- Santos, R.R., Rodrigues, A.P.R., Costa, S.H.F., Silva, J.R.V., Matos, M.H.T., Lucci, C.M., Bão, S.N., Van den Hurk, R., Figueiredo, J.R. 2006. Histological and ultrastructural analysis of cryopreserved sheep preantral follicles. *Anim. Reprod. Sci.* 91, 249–263.
- Santos, R.R., Tharasanit, T., van Haeften, T., Figueiredo, J.R., Silva, J.R.V., van den Hurk, R. 2007. Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. *Cell Tissue Res.* 327, 167-176.
- Schotanus, K., Hage, W.J., Vanderstichele, H., van den Hurk, R. 1997. Effects of conditioned media from murine granulosa cell lines on the growth of isolated bovine preantral follicles. *Theriogenology* 48, 471-483.

- Smitz, J., Cortvrindt, R., Van Steirteghem, A.C., 1996. Normal oxygen atmosphere is essential for the solitary long-term culture of early preantral mouse follicles. *Mol. Reprod. Dev.* 45, 466-475.
- Tamilmani, G., Rao, B.S., Vagdevi, R., Amarnath, D., Naik, B.R., Mutharao, M., Rao, V.H., 2005. Nuclear maturation of oocytes in sheep preantral follicles cultured *in vitro*. *Small Rumin. Res.* 60, 295-305.
- Van den Hurk, R., Spek, E. R., Hage, W. J., Fair, T., Ralph, J. H., Schotanus, K. 1998. Ultrastructure and viability of isolated bovine preantral follicles. *Hum. Reprod. Update* 4, 833-841.
- Wu, J., Benjamin, R.E., Carrell, D.T., 2001. *In vitro* growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. *Biol. Reprod.* 64, 375-381.

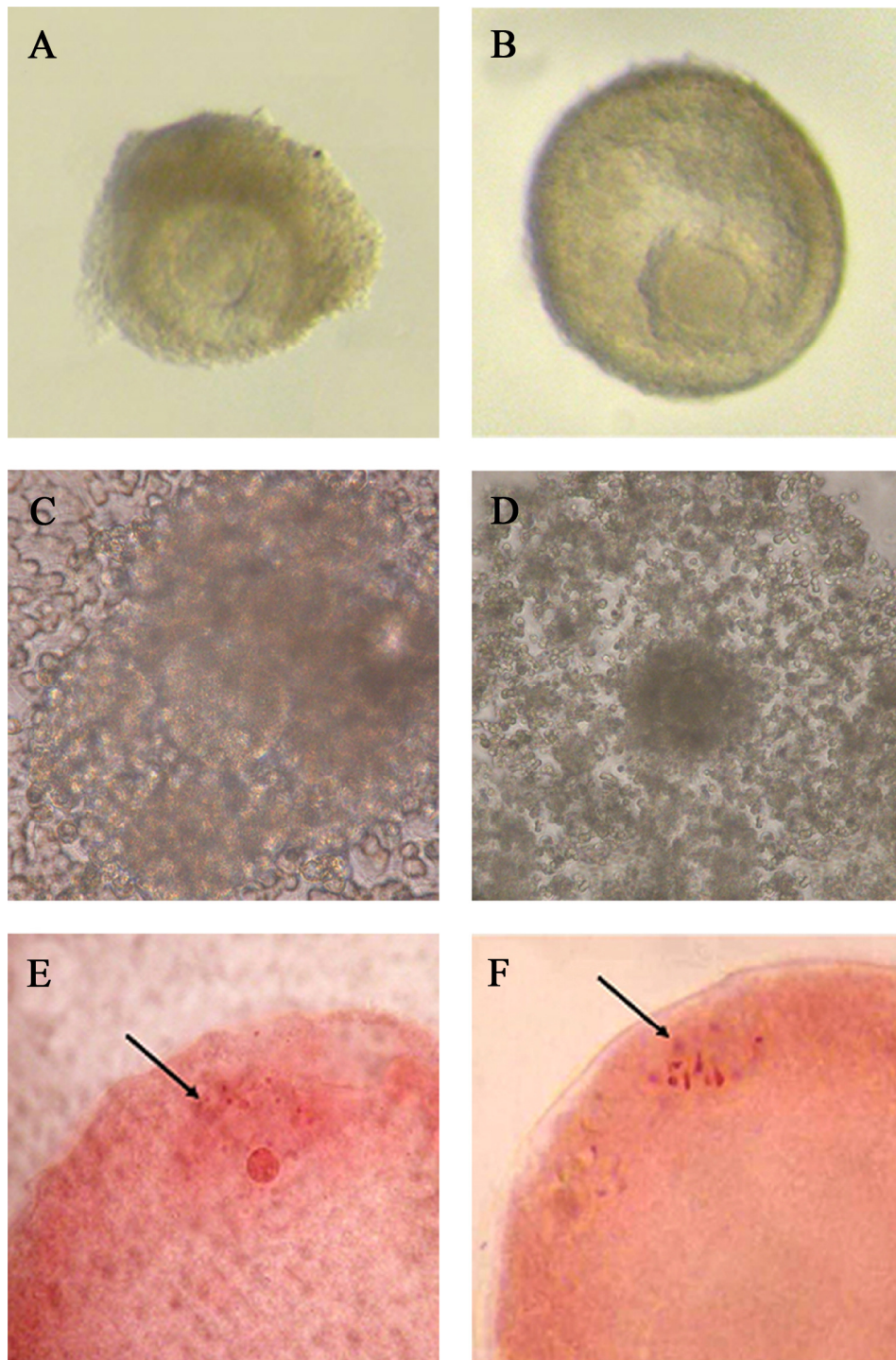


Fig. 1. Preantral follicles from goats at day 0 (A) and antral follicle after 6 days of *in vitro* culture with 20% of O₂ (B) (50x); Oocyte surrounded by compact layer of *cumulus* cells (C) and showing expanded *cumulus* cells after IVM (D); Fully grown oocytes from preantral follicle cultured for 30 days under 20% O₂. Note the chromatin configuration, showing an intact germinal vesicle (E) and metaphase I (F) (1000x) after lacmoid staining.

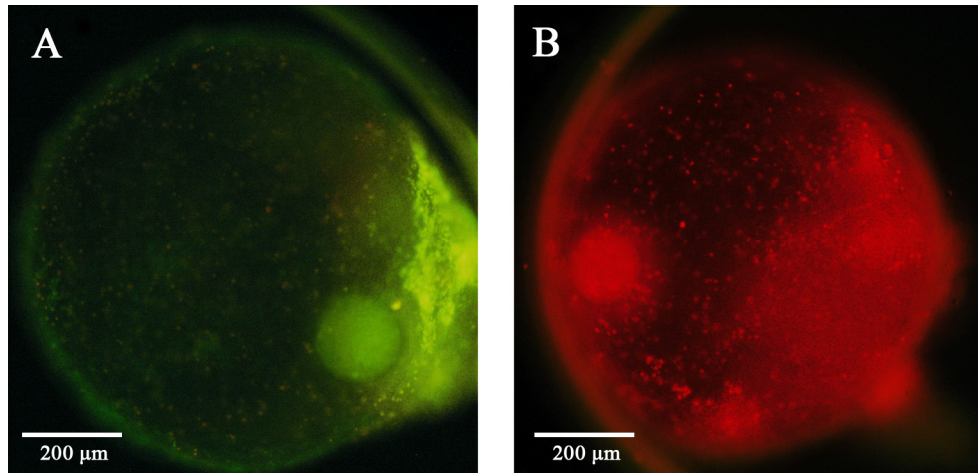


Fig. 2. Viability assessment of ovarian follicles from goats *in vitro* cultured under different O₂ concentrations (5 and 20%). (A) An isolated follicle classified as viable since cells were labeled by calcein-AM (green fluorescence). (B) A follicle considered non-viable (E) as cells were marked with ethidium homodimer-1 (red fluorescence).

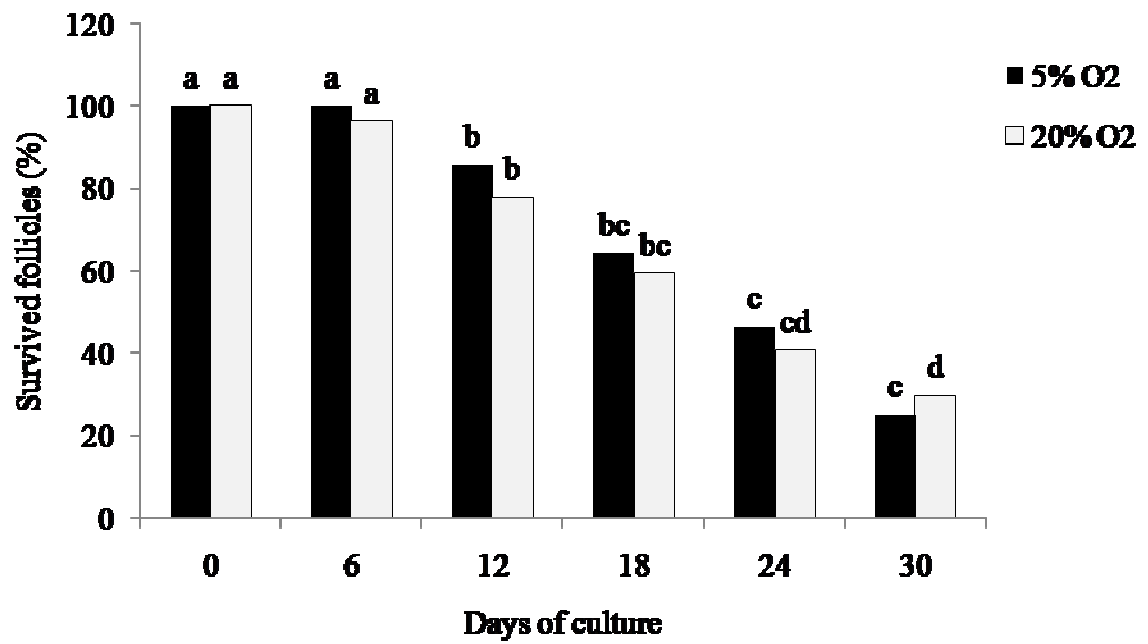


Fig. 3. Effect of different O₂ tensions (5 and 20%) on the percentage of healthy follicles after 30 days of culture.

a, b, c, d differs among days of culture on the same tension of O₂ ($P < 0.05$).

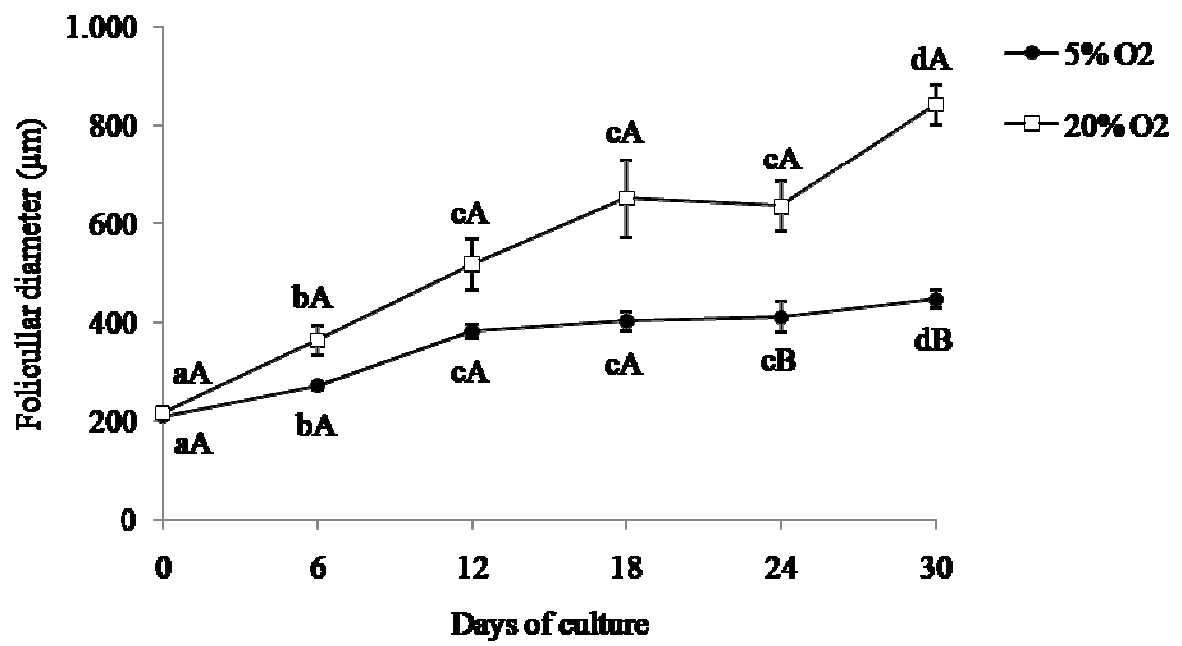


Fig. 4. Follicular diameter after *in vitro* culture under different O₂ concentrations during 30 days (5 and 20%).

a, b, c, d differs among days of culture in the same tension of O₂ (P<0.05).

A, B differs among tensions of O₂ in the same period of culture (P<0.05).

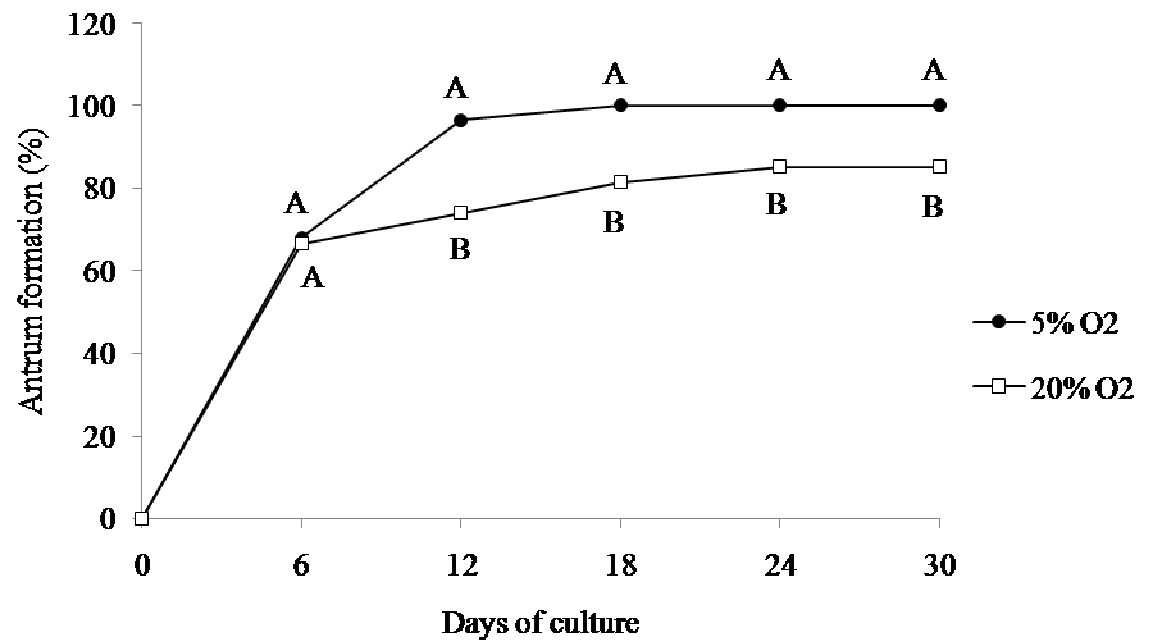


Fig. 5. Effect of different O₂ concentrations (5 and 20%) on percentage of antrum formation after culture of preantral follicles of goats for 30 days.

^{A, B} differs among tensions of O₂ with the same period of culture (P<0.05).

Table 1. Meiotic stages of goat oocytes from preantral follicles cultured for 30 days in two different oxygen tensions (5 and 20%).

Oxygen tension	Number of follicles (%)		Number of oocytes (%)		
	Cultured	Survived	Fully grown* ($\geq 110 \mu\text{m}$)	GV	MI
5%	28	7 (25)	2/7 (28.6)	2 (100)	0
20%	27	8 (29.6)	6/8 (75)	5 (83.3)	1 (16.7)

GV, germinal vesicle; MI, metaphase I.

* Only oocytes ($\geq 110 \mu\text{m}$) were selected to in vitro maturation procedure

7 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a concentração de oxigênio afeta positivamente o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos, sendo a concentração de 20% deste gás a mais indicada por proporcionar melhores taxas de desenvolvimento folicular e retomada da meiose.

8 PERSPECTIVAS

A padronização da concentração de 20% de O₂ para o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos isolados, realizada no âmbito do presente trabalho representa uma alternativa prática e a baixo custo para o estabelecimento de um sistema de cultivo base. Esta padronização constitui uma etapa fundamental para a realização de testes utilizando novos componentes que poderão ser adicionados ao meio de cultivo de forma simultânea e/ou em sequência específica.

No entanto, para que esse sistema seja utilizado de forma eficiente, mais estudos são necessários tanto em sistemas de cultivo de folículos pré-antrais *in situ*, como na forma isolada, para que os folículos presentes possam ter um desenvolvimento até estádios mais avançados, com uma alta taxa de viabilidade e consequente aplicação prática. Tal situação poderá maximizar o aproveitamento dos milhares de oócitos presentes nos ovários dos mamíferos, sobretudo nos caprinos, revolucionando a produção *in vitro* de embriões.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIR, R.; FISCH, B.; NAHUN, R.; ORVIETO, E.; NITKE, S.; OKON, E.; BEN-RAFAEL, Z. Turner`s syndrome and fertility: Current status and possible future prospects. *Human Reproduction*, v. 7, p. 603-610, 2001.
- ANDRADE, E. R.; SENEDA, M. M.; ALFIERE, A. A.; OLIVEIRA, J. A.; RODRIGUES, A. P. F.; BRACARENSE, 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.
- ARUNAKUMARI, G.; VAGDEVI, R.; RAO, B. S.; NAIK, 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.
- BANWELL, K. M.; LANE, M.; RUSSELL, D. L.; KIND, K. L.; THOMPSON, J. G. Oxygen concentration during mouse oocyte maturation affects embryo and fetal development. *Human Reproduction*, v. 22, p. 2768-2775, 2007.
- BARNETT, D. K.; BAVISTER, B. D. What is the relationship between the metabolism of preimplantation embryos and their developmental competence? *Molecular Reproduction and Development*, v. 43, p. 105-133, 1996.
- BARNETT, K. R.; SCHILLING, C.; GREENFELD, C. R.; TOMIC, D.; FLAWS, J. A. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. *Human Reproduction Update*, v. 10, p. 1-19, 2006.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v. 29, p. 113-123, 2006.
- BARROS, L. F.; HERMOSILLA, T.; CASTRO, J. Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. *Comparative Biochemistry and Physiology A*, v. 130, p. 401-409, 2001.
- BETTERIDGE, K. J.; SMITH, C.; STUBBINGS, R. B.; XU, K. P.; KING, W. A. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 38, p. 87-98, 1989.
- BOLAND, N. I.; HUMPHERSON, P. G.; LEESE, J. H.; GOSDEN, R. G. Pattern of lactate production and steroidogenesis during growth and maturation of mouse ovarian follicles *in vitro*. *Biology of Reproduction*, v.48, p.787-806, 1993.
- BOOTH, P. J.; HOLM, P.; CALLESEN, H. The effect of oxygen tension on porcine embryonic development is dependent on embryo type. *Theriogenology*, v. 63, p. 2040-2052, 2005.
- BRAS, M.; QUEENAN, B.; SUSIN, S. A. Programmed cell death via mitochondria: different modes of dying. *Biochemistry*, v. 70, p. 231-239, 2005.

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

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

CAMPBELL, B. K. The endocrine and local control of ovarian follicle development in the ewe. *Animal Reproduction*, v. 6, p. 159-171, 2009.

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

CHA, K. Y.; CHIAN, R. C. Maturation *in vitro* of immature human oocytes for clinical use. *Human Reproduction*, v. 4, p. 103-120, 1998.

CHUI, D. K.; PUGH, N. D.; WALKER, S. M.; GREGORY, L.; SHAW, R. W. Follicular vascularity the predictive value of transvaginal power Doppler ultrasonography in an *in vitro* fertilization programme: a preliminary study. *Human Reproduction*, v. 12, p. 191-196, 1997.

CLARK, A. R.; STOKES, Y. M.; LANE, M.; THOMPSON, J. G. Mathematical modelling of oxygen concentration in bovine and murine *cumulus*-oocyte complexes. *Reproduction*, v. 131, p. 999-1006, 2006.

CÔRREA, A. G.; RUMPF, R.; MUNDIMA, T. C. D.; FRANCO, M. M.; DODE, M. A. N. Oxygen tension during culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress. *Animal Reproduction Science*, v. 104, p. 132-142, 2008.

CROZET, N.; DAHIRL, M.; GALL, L. Meiotic competence of *in vitro* grown goat oocytes. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 118, p. 367-373, 2000.

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.

DIELEMAN, S. J.; HENDRIKSEN, P. J. M.; VIUFF, D.; THOMSEN, P. D.; HYTTEL, P.; KNIJN, H. M.; WRENZYCKI, C.; KRUIP, T. A.; NIEMANN, H.; GADELLA, B. M.; BEVERS, M. M.; VOS, P. L. Effects of *in vivo* prematuration and *in vivo* final maturation on developmental capacity and quality of pre-implantation embryos. *Theriogenology*, v. 57, p. 5-20, 2002.

DODE, M. A. N.; ADONA, P. R.; RODOVALHO, N. C. M. Retenção da meiose de ovócitos bovinos em líquido folicular de folículos de vários tamanhos. *Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS*, v. 28, p. 241, 2000.

DONNAY, I.; VAN LANGENDONCKT, A.; AUQUIER, P.; GRISART, B.; VANSTEENBRUGGE, A.; MASSIP, A.; DESSY, F. Effects of co-culture and embryo number on the *in vitro* development of bovine embryos. *Theriogenology*, v. 47, p. 1549-1561, 1997.

DRIANCOURT, M. A.; WEBB, R.; FRY, R. C. Does follicular dominance occur in ewes? *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 93, p. 63-70, 1991.

DRUMMOND, A. E. The role of steroids in follicular growth. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 4, p. 1-11, 2006.

EPPIG, J. J.; SCHROEDER, A. C. Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation and fertilization *in vitro*. *Biology of Reproduction*, v. 41, p. 268-276, 1989.

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

ERICKSON, G. F. Role of growth factors in ovary organogenesis. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, v. 8, p. 13-16, 2001.

FARBER, J. L. Membrane injury and calcium homeostasis in the pathogenesis of coagulative necrosis. *Laboratory Investigation*, v. 47, p. 114-123, 1982.

FATEHI, A. N.; ROELEN, B. A.; COLENBRANDER, B.; SCHOEVEERS, E. J.; GADELLA, B. M.; BEVERST, M. M.; VAN DEN HURK, R. Presence of *cumulus* cells during *in vitro* fertilization protects the bovine oocyte against oxidative stress and improves first cleavage but does not affect further development. *Zygote*, v. 13, p. 177-185, 2005.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 43, p. 61-68, 1997.

FIERS, W.; BEYAERT, R.; DECLER, C. Q. W.; VANDENABEELE, P. More than one way to die: apoptosis, necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene*, v. 18, p. 7719-7730, 1999.

FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; SILVA, J. R. V. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*, Roca: São Paulo, 2ª ed., 2008, p. 303-327.

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

GIGLI, I.; BYRD, D. D.; FORTUNE, J. E. Effects of oxygen tension and supplements to the culture medium on activation and development of bovine follicles. *Theriogenology*, v. 66, p. 344-353, 2006.

GONÇALVES, P. B. D.; BARRET, A. M. H.; SANDRI, L. R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A. Q. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 31, p. 212-217, 2007.

GONÇALVES, P. B. D.; OLIVEIRA, M. A. L.; MEZZALIRA, A.; MONTAGNER, M. M.; VISITIN, J. A.; COSTA, L. F. S. Produção *in vitro* de embriões. In: Gonçalves PBD,

Figueiredo JR, Freitas VJF. *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*, Roca: São Paulo, 2ª ed., 2008, p. 261-291.

GOTO, K.; NODA, Y.; MORI, T.; NAKANO, M. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 15, p. 69-75, 1993.

GOUGEON, A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses, *Endocrinology Review*, v. 17, p. 121-155, 1996.

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

GUÉRIN, P.; MOUATASSIM, S.; MENÉZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human Reproduction*, v. 7, p. 175-189, 2001.

GUPTA, P. S. P.; NANDI, S.; RAVINDRANATHA, B. M.; SARMA, P. V. *In vitro* culture of buffalo (*Bubalus bubalis*) preantral follicles. *Theriogenology*, v. 57, p. 1839-1854, 2002.

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

GUTIERREZ, C. G.; RALPH, J. H.; TELFER, E. E.; WILMUT, I.; WEBB, R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. *Biology of Reproduction*, v. 62, p. 1322-1328, 2000.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. 3.ed. New York: Oxford University Press Inc, 1999.

HARTSHORNE, G. M. *In vitro* culture of ovarian follicles. *Reviews of Reproduction*, v. 2, p. 94-104, 1997.

HARVEY, A. J. The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. *Animal Reproduction Science*, v. 98, p. 113-128, 2007.

HASHIMOTO, S.; MINAMI, N.; TAKAKURA, R. Low oxygen tension during *in vitro* maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine *cumulus*-oocyte complexes. *Molecular Reproduction Development*, v. 57, p. 353-360, 2000.

HEWITT, D. A.; ENGLAND, G. C. W. Synthetic oviductal fluid and oviductal cell coculture for canine oocyte maturation *in vitro*. *Animal Reproduction Science*, v. 55, p. 63-75, 1998.

HUAMIN, Z.; YONG, Z. *In vitro* development of caprine ovarian preantral follicles. *Theriogenology*, v. 54, p. 641-650, 2000.

- HUNTER, E. S.; ROGERS, E.; BLANTON, M.; RICHARD, A.; CHERNOFF, N. Bromochloro-haloacetic acids: Effects on mouse embryos *in vitro* and QSAR considerations. *Reproductive Toxicology*, v. 21, p. 260-266, 2006.
- HUSSEIN, M. R. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Human Reprod Update*, v. 11, p. 162-178, 2005.
- JOHNSON, A. L. Intracellular mechanisms regulating cell survival in ovarian follicles. *Animal Reproduction Science*, v. 78, p. 185-201, 2003.
- KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L. Recent achievements in culture and preservation of ovarian follicles in mammals. *Reproductive Biology*, v. 6, p. 3-16, 2006.
- KHURANA, N. K.; NIEMANN, H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, *cumulus* cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology*, v. 54, p. 741-756, 2000.
- KITAGAWA, Y.; SUZUKI, K.; YONEDA, A.; WATANABE, T. Effects of oxygen concentration and antioxidants on the developmental ability, production of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine embryos. *Theriogenology*, v. 62, p. 1186-1197, 2004.
- KOERBER, S.; NAVARRETE, S. A.; TETENS, F.; KIICHENHOFF, A. FISCHER, B. Increased expression of NADH-Ubiquinone Oxidoreductase chain 2 (NDR) in preimplantation rabbit embryos cultured with 20% oxygen concentration. *Molecular Reproduction and Development*, v. 9, p. 394-399, 1998.
- LIMA-VERDE, I. B.; BRUNO, J. B.; MATOS, M. H. T.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R.; OLIVEIRA, M. A. L.; LIMA, P. F. Implicações do estresse oxidativo no ovário e no embrião mamífero. *Medicina Veterinária*, v. 1, p. 81-88, 2007.
- LIU, J.; VAN DER ELST, J.; VAN DEN BROECK, R.; DHONT, M. Live offspring by oocytes from cryopreserved primordial mouse follicles after sequential *in vivo* transplantation and maturation. *Biology of Reproduction*, v. 64, p. 171-178, 2001.
- LONERGAN, P.; O'KEARNEY-FLYNN, M.; BOLAND, M. P. Effect of protein supplementation and presence of an antioxidant on the development of bovine zygotes in synthetic oviduct fluid medium under high or low oxygen tension. *Theriogenology*, v. 51, p. 1565-1576, 1999.
- LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; FAIR, T.; BOLAND, M. P. Oocytes and embryos quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. *Reproduction in Domestic Animal*, v. 38, p. 259-267, 2003.
- 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.

- 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 follicle development and antrum formation *in vitro*. *Biology of Reproduction*, v. 67, p. 1197-1203, 2002.
- MATOS, M. H. T.; LIMA-VERDE, I. B.; BRUNO, J. B.; LOPES, C. A. P.; MARTINS, F. S.; SANTOS, K. D. B.; ROCHA, R. M. P.; SILVA, J. R. V.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Follicle stimulating hormone and fibroblast growth factor-2 interact and promote goat primordial follicle development *in vitro*. *Reproduction, Fertility Development*, v. 19, p. 677–684, 2007.
- MIGNOTTE, B.; VAYSSIERE, J. L. Mitochondria and apoptosis. *European Journal of Biochemical*, v.252, p.1-15, 1998.
- O'BRIEN, M. J.; PENDOLA, J. K.; EPPIG, J. J. A revised protocol for development of mouse oocyte from primordial follicles dramatically improves their development competence. *Biology of Reproduction*, v. 68, p. 1682-1686, 2003.
- OLIVEIRA, A. T. D.; LOPES, R. F. F.; RODRIGUES, J. L. Gene expression and developmental competence of bovine embryos produced *in vitro* under varying embryo density conditions. *Theriogenology*, v. 64, p. 1559-1572, 2005.
- PADANILAM, B. J. Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. *American Journal Physiology of Renal*, v. 284, p. 608-627, 2003.
- PARK, J. I.; HONG, J. Y.; YONG, H. Y.; HWANG, W. S.; LIM, J. M.; LEE, E. S. High oxygen tension during oocyte maturation improves development of porcine oocytes after fertilization. *Animal Reproduction Science*, v. 87, p. 133-141, 2005.
- PETERSEN, A.; MIKKELSEN, A. L.; LINDENBERG, G. S. The impact of oxygen tension on developmental competence of post-thaw human embryos. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinava*. v. 84, p. 1181-1184, 2005
- PICTON, H.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R. The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular Cellular Endocrinology*, v. 145, p. 27-37, 1998.
- PREIS, K. A.; SEIDEL, G. E. J.; GARDNER, D. K. Reduced oxygen concentration improves the developmental competence of mouse oocytes following *in vitro* maturation. *Molecular Reproduction and Development*, v. 74, p. 893-903, 2007.
- REDDING, G. P.; BRONLUND, J. E.; HART, A. L. Mathematical modelling of oxygen transport-limited follicle growth. *Reproduction Research*, v. 133, p. 1741-7899, 2007.
- RIBES, V.; STUTZMANN, F.; BIANCHETTI, L.; GUILLEMOT, F.; DOLLÉ, P.; LE ROUX, I. Combinatorial signalling controls Neurogenin 2 expression at the onset of spinal neurogenesis. *Developmental Biology*, v. 321, p. 470-481, 2008.

SANTOS, R. R.; RODRIGUES, A. P. R.; COSTA, S. H. F.; SILVA, J. R. V.; MATOS, M. H. T.; LUCCI, C. M.; BÃO, S. N.; VAN DEN HURK, R.; FIGUEIREDO, J. R. Histological and ultrastructural analysis of cryopreserved sheep preantral follicles. *Animal Reproduction Science*, v. 91, p. 249-263, 2006.

SANTOS, R. R.; THARASANIT, T.; VAN HAEFTEN, T.; FIGUEIREDO, J. R.; SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R. Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. *Cell and Tissue Research*, v. 327, p. 167-176, 2007.

SCHOTANUS, K.; HAGE, W. J.; VANDERSTICHELE, H.; VAN DEN HURK, R. Effects of conditioned media from murine granulosa cell lines on the growth of isolated bovine preantral follicles. *Theriogenology*, v. 48, p. 471-483, 1997.

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

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

SILVA, 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, 2004.

SIRARD, M. A. Resumption of meiosis: Mechanism involved in meiotic progression and its relation with developmental competence. *Theriogenology*, v. 55, p. 1241-1254, 2001.

SMITZ, J.; CORTVRINDT, R.; VAN STEIRTEGHEM, A. C. Normal oxygen atmosphere is essential for the solitary long-term culture of early preantral mouse follicles. *Molecular Reproduction and Development*, v. 45, p. 466-475, 1996

TAMILMANI, G.; RAO, B. S.; VAGDEVI, R.; AMARNATH, D.; NAIK, B. R.; MUTHARAO, M.; RAO, V. H. Nuclear maturation of oocytes in sheep preantral follicles cultured *in vitro*. *Small Ruminant Research*, v. 60, p. 295-305, 2005.

TELFER, E. E. The development of methods for isolation and culture of preantral follicles from bovine and porcine ovaries. *Theriogenology*, v. 45, p. 101-110, 1996.

TELFER, E. E.; MCLAUGHLIN, M.; DING, C.; JOO THONG, K. 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.

THOMPSON, J. G.; SIMPSON, A. C.; PUGH, P. A.; DONNELLEY, P. E.; TERVIT, H. R. Effect of oxygen concentration on *in-vitro* development of pre-implantation sheep and cattle embryos. *Journal of Reproduction Fertility*, v. 89, p. 573-578, 1990.

VAN DEN HURK, R.; SPEK, E. R.; HAGE, W. J.; FAIR, T.; RALPH, J. H.; SCHOTANUS, K. Ultrastructure and viability of isolated bovine preantral follicles. *Human Reproduction Update*, v. 4, p. 833-841, 1998.

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.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; CARNWATH, J. W. Alterations in the relative abundance of gene transcripts in pre-implantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. *Molecular Reproduction and Development*, v. 53, p. 8-18, 1999.

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

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.

YUAN, Y. Q.; VAN SOOM, A.; COOPMAN, F. O. J.; MINTIENS, K. Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured *in vitro*. *Theriogenology*, v. 59, p. 1585-1596, 2003.

ANEXO A

Artigo publicado no periódico Animal Reproduction Science

Disponível em www.elsevier.com/locate/anireprosci