



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ - UFC
FACULDADE DE MEDICINA DE SOBRAL - FAMED
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA - PPGB

TÂNIA DE AZEVEDO LOPES

**INFLUÊNCIA DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA SOBRE A EXPRESSÃO
DE RNAm PARA GDF-9, BMP-15 E BMPR-IB EM FOLÍCULOS OVARIANOS
E ATIVAÇÃO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRIMORDIAIS EM MEIO
SUPLEMENTADO COM FITOHEMAGLUTININA E EGF.**

SOBRAL

2014

TÂNIA DE AZEVEDO LOPES

**INFLUÊNCIA DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA SOBRE A EXPRESSÃO
DE RNAm PARA GDF-9, BMP-15 E BMPR-IB EM FOLÍCULOS OVARIANOS
E ATIVAÇÃO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRIMORDIAIS EM MEIO
SUPLEMENTADO COM FITOHEMAGLUTININA E EGF.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Curso de Medicina, da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Macromoléculas
Orientador: Prof. Dr. José Roberto Viana Silva

SOBRAL

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca do Curso de Medicina – *Campus* de Sobral

-
- L856i Lopes, Tânia de Azevedo.
 Influência da artrite encefalite caprina sobre a expressão de RNAm para GDF-9, BMP-15 e BMPR-IB em folículos ovarianos e ativação in vitro de folículos primordiais em meio suplementado com fithomaglutinina. / Tânia de Azevedo Lopes. – 2014.
 99 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Curso de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2014.
 Área de Concentração: Macromoléculas.
 Orientação: Prof. Dr. José Roberto Viana Silva.
 Coorientação: Prof^a. Dr^a. Alice Andrioli Pinheiro.
1. Folículo ovariano. 2. Caprinos. I. Título.

TÂNIA DE AZEVEDO LOPES

**INFLUÊNCIA DA ARTRITE ENCEFALITE CAPRINA SOBRE A EXPRESSÃO
DE RNAm PARA GDF-9, BMP-15 E BMPR-IB EM FOLÍCULOS OVARIANOS
E ATIVAÇÃO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRIMORDIAIS EM MEIO
SUPLEMENTADO COM FITOHEMAGLUTININA E EGF.**

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Roberto Viana Silva – (Orientador)
(Universidade Federal do Ceará – UFC)

Prof. Dra. Alice Andrioli Pinheiro (Co-Orientadora)
(Embrapa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Caprinos e Ovinos)

Prof. Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha – (Examinador)
(Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA)

A Deus por sua bondade e misericórdia.
Aos meus queridos pais César e Zenilda, pelo
amor e exemplo de vida.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao autor da minha vida, Senhor dos meus dias, Dono dos meus sonhos. Ao Salvador da minha alma. Aquele sem o qual não seria nada. Autor e consumidor da minha fé, Jesus.

Aos meus amados pais, César e Zenilda Lopes, por todo amor incondicional dedicado a mim. Obrigada pelo exemplo de vida e de caráter. Vocês sempre serão meu maior amor. De onde vem o impulso da minha força de sonhar.

Aos meus irmãos Enark e Thisbe Lopes com os quais dividi momentos de alegrias e tristezas, e que sempre estão me incentivando e torcendo por mim assim como eu por eles.

A tia Cotinha e ao Pai Miguel (*in memoriam*) por terem estado no lugar dos avós que nunca tive. Por terem sido os braços que me ninaram, fazendo a maioria de todas as minhas vontades.

Aos primos irmãos Valdo, Zequinha, Raimundo, Márcia, Marcilene e Marcivânia Ribeiro. Obrigada por me amarem como irmãos, por terem sido meus protetores e incentivadores fazendo parte da minha infância e a tornando mais feliz.

As amigas Giselle Silva, Rosivânia Araújo, Cléa Maciel, Jéssika Tolentino, Hellen Guerreiro, Samille Alexandra, Aline e Raquel Lopes. Eu não seria capaz de criar uma escala pra definir qual é a mais importante. Todas vocês ocupam o mesmo lugar em meu coração. Obrigada por terem sido presentes. Por me amarem com suas orações, telefonemas, risos, conselhos. Obrigada por me tirarem de casa pra respirar, por compreenderem meus momentos mais sombrios. Vocês fazem parte dessa conquista.

Ao amigos Roberto Rebouças, por tantas vezes se mostrar disponível em me tirar do sufoco, pelo coração servo.

Ao meu Pequeno Grupo: Bianca Farias, Bia Maciel, Lívia Lima, Juliana Rodrigues, Júlia Tolentino e Teresa Cedro, com as quais posso aprender a ser um pouco melhor. Pelos momentos de alegria e crescimento espiritual. Por poder dividir a vida de uma forma leve e segura. Por serem minhas filhinhas mais lindas.

Ao querido Pastor Márcio Félix por ser um exemplo de liderança íntegra, amorosa e comprometida com a verdade da palavra. Obrigada por se deixar ser um canal de Deus para a vida da Igreja.

Aos amigos do GAP- Grupo e adoradores ao Pai. Por terem me ajudado a perceber um pouco da minha missão na faculdade como mensageira da verdade. Por todos os momentos de comunhão e compartilhamento. Por toda a alegria de estarmos juntos adorando ao mesmo Deus.

Aos que me acolheram quando cheguei nesta cidade apenas com um sonho. Por terem sido a minha família quando eu estava longe dos meus. Por todos os momentos tão preciosos que tive o privilégio de viver com vocês. Di, Daiane e DD, vocês são muito especiais pra mim.

Ao querido Lucas Piati, por ter sido a pausa do cansaço, a companhia mais presente. O sorriso mais despretenso e a surpresa mais singela. Por poder respirar fundo e esquecer por alguns segundos de todo o resto. A importância de sua amizade e do tanto que ela representa para mim.

Ao Meu Amor que ainda não sei. A gratidão antecipada das coisas que ainda não pude dizer e por todos os sonhos que ainda vamos viver.

Aos Amigos Jackson Costa e Amélia Araújo, por sua disposição em ajudar. Por renunciarem do seu tempo e das suas próprias coisas. Pela sua casa a qualquer dia e hora, sem restrição. Por todos os cafés, lanches, almoços e jantares. Por todas as risadas em meio a tanta coisa para fazer. Obrigada por colaborarem ativamente em todas as etapas de execução deste trabalho.

As queridas amigas Regislane Ribeiro e Moemia Portela por estarem presentes sempre que precisei. Por mesmo já tendo concluído suas obrigações enquanto grupo, nunca terem me negado ajuda e sempre se disporem com o coração sincero e alegre.

Ao amigo Renato Passos por seu incentivo desde o momento de fazer a seleção do mestrado, até sua ajuda no desenvolvimento das atividades do projeto e escrita.

Ao querido amigo João Garcia por sua paciência, seus fins de semanas e noites. Por se dispor a cuidar de minhas coisas com tanto cuidado como se fossem suas.

A estimada Ellen Cunha por dispor de suas habilidades manuais e do seu tempo. Por abrir mão de momentos tão preciosos com sua família para ajudar em meu trabalho. Sua ajuda foi essencial.

Ao caríssimo Adalberto Lima Júnior por seu trabalho tão bem desenvolvido durante a histologia, por toda sua paciência comigo. Sua atenção foi indispensável e muito importante.

Ao Professor José Roberto Viana Silva pela oportunidade de orientação. Pela sua disposição e atenção sempre que precisei. É uma honra tê-lo como orientador.

Meus sinceros agradecimentos a Dr^a Alice Andrioli Pinheiro (EMBRAPA – Caprinos), pela amizade, confiança, orientação e por ter disponibilizado o seu laboratório, seus animais e sua equipe para a realização deste trabalho.

Aos demais colegas do Laboratório de Cultivo de Células e Tecidos: Katianne Freitas, Glaucinete Borges, Anderson Weiny Barbalho, Taiã Gomes é uma honra fazer parte deste grupo.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela oportunidade de realização de um Curso de Mestrado.

A Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias-EMBRAPA , pelo fornecimento de seus profissionais, materiais, instrumentos e animais que foi de suma importância pra a realização desta pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo apoio financeiro para as pesquisas, pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos durante a realização do Curso de Mestrado, fundamentais para a concretização de minhas atividades de pesquisa.

Agradeço também a todos os funcionários da UFC, especialmente ao Sr. Almino Conrado, Edilda Albuquerque, Gade Sousa e as meninas da cantina pelo carinho e pela convivência em todo esse tempo.

A todos que não foram aqui mencionados, mas que direta ou indiretamente me ajudaram durante a realização deste trabalho. Minha mais singela homenagem.

A todos, muito obrigada!

“Porquanto, ainda que a figueira não floresça, nem haja fruto na vide; o produto da oliveira minta, e os campos não produzam mantimento; Todavia eu me alegrarei no Senhor, exultarei no Deus da minha salvação. O Senhor é minha força e me fará andar sobre as minhas alturas”.

(Habacuque, 3:17-19)

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi investigar os efeitos da artrite encefalite caprina (CAE) sobre a expressão de BMP-15, BMPR-IB e GDF-9 em folículos ovarianos, bem como os efeitos de fitohemaglutinina (PHA) e EGF na sobrevivência e ativação de folículos primordiais, e na expressão de genes para o sistema de TNF- α no tecido ovariano cultivado caprino. Os níveis de BMP-15, BMPR-IB e GDF-9 em folículos primordiais/primários e secundários, bem como em CCOs e parede folicular de folículos antrais foram avaliados por PCR em tempo real (experimento 1). Para os estudos *in vitro*, fragmentos de tecido ovariano foram cultivados por seis dias em α -MEM sozinho ou suplementado com EGF (100ug), PHA (10 μ g/mL) ou ambos (experimento 2). Antes e depois do cultivo, o tecido ovariano foi processado para análise morfológica ou armazenado para avaliar a expressão de RNAm para TNF- α e seus receptores. Os resultados mostraram que a expressão de BMP-15 e GDF-9 em folículos primordiais/primários de cabras infectadas foram significativamente maiores do que em animais saudáveis, mas a expressão de GDF-9 em folículos secundários de cabras infectadas foi significativamente menor. Além disso, a expressão de RNAm para BMP-15 na parede folicular de folículos antrais de cabras infectadas foi significativamente maior do que em cabras saudáveis. Após o cultivo dos fragmentos ovarianos em todos os meios testados, observou-se a redução nos percentuais de folículos primordiais, e aumento de folículos em desenvolvimento quando comparado ao grupo controle não cultivado. Além disso, houve um aumento significativo no diâmetro folicular após cultivo em meio suplementado com EGF. Após o cultivo de tecido ovariano de cabras infectadas em meio suplementado com PHA, os folículos primordiais apresentavam diâmetros maiores do que os de animais saudáveis. Além disso, observou-se um aumento nos níveis de RNAm para TNF- α após cultivo de tecido ovariano na presença de ambos EGF e PHA em animais saudáveis, mas este mesmo tratamento proporcionou uma redução de RNAm para TNF- α e aumento dos transcritos de TNFR-II em animais infectados. Pode-se concluir que a CAE influencia a expressão de RNAm para BMP-15 e GDF-9 em folículos ovarianos caprinos e a PHA e o EGF diferencialmente regulam a expressão de TNF- α e TNFR-II em tecidos ovarianos.

Palavras-chave: caprinos, ovário, folículos, CAEV, Fitohemaglutinina, TNF.

ABSTRACT

This study aims to investigate the effects of caprine arthritis encephalitis (CAE) on the expression of BMP-15, BMPR-IB and GDF-9 in ovarian follicles, as well as the effects of phytohemagglutinin (PHA) and EGF on the survival and activation of primordial follicles, and on expression of mRNA for TNF- α and its receptors in cultured goat ovarian tissue. The levels of BMP-15, BMPR-IB and GDF-9 in primordial/primary and secondary follicles, as well as in COCs and follicular walls from antral follicles were evaluated by real-time PCR (experiment 1). Ovarian tissues were cultured for six days in α -MEM⁺ alone or supplemented with EGF (100 μ g/mL), PHA (10 μ g/mL) or both (experiment 2). Before and after culture, ovarian fragments were processed for morphological analysis or stored to evaluate the expression of mRNA for TNF α and its receptors. The results showed that the expression of BMP-15 and GDF-9 in primordial/primary follicles from infected goats was significantly higher than in healthy animals, but the expression of GDF-9 in secondary follicles from infected goats was significantly lower. Additionally, the expression of mRNA for BMP-15 in follicular wall of antral follicles from infected goats was significantly higher than in healthy goats. After culturing ovarian fragments in all tested media, reduced percentages of primordial follicles, and increased of developing follicles was observed when compared to uncultured control. Furthermore, there was a significant increase in follicular diameter after culture in medium supplemented with EGF. Ovarian tissue from infected goats cultured in medium supplemented with PHA had primordial follicles with higher diameters than those from healthy animals. An increase in the levels of mRNAs for TNF- α was observed after culturing ovarian tissue in presence of both EGF and PHA in healthy animals, but this same treatment promoted a reduction of mRNAs for TNF- α and an increase of TNFR-II transcripts in infected animals. In conclusion, CAE influences the expression of mRNA for BMP-15 and GDF-9 in goat ovarian follicles and PHA and EGF differentially regulate the expression of TNF α and TNFR-II in cultured ovarian tissue.

Keywords: goat, ovary, follicles, CAEV, Phytohemagglutinin, TNF

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

ARTIGO

Figure 1 - Expression of mRNA for BMP-15, BMPR-IB and GDF-9 in different categories and follicular compartments in positive and negative for CAE animals. (A) Expression in primordial/primary follicles; (B) Expression in secondary follicles; (C) Expression in COCs (D) and follicular walls (E) from antral follicles.....

Figure 2 - Percentage (mean \pm SEM) of normal follicles in non-cultured tissues and tissues after culture for 6 days in α -MEM⁺ alone or with EGF, PHA or both, in healthy animals or affected by CAEV. *Differs significantly from control ($P < 0.05$); A,B Differs significantly between treatments ($P < 0.05$); a,b Differs between CAEV positive and healthy animals ($P < 0.05$).....

Figure 3 - Percentage (mean \pm SEM) of primordial follicles in non-cultured tissues and in tissues cultured for 6 days in α -MEM⁺ alone or with EGF, PHA or both, in healthy animals or affected by CAEV. *Differs significantly from control ($P < 0.05$); A,B Differs significantly between treatments ($P < 0.05$); a,b Differs between CAEV positive and healthy animals ($P < 0.05$)

Figure 4 - Percentage (mean \pm SEM) of developing follicles in non-cultured tissues and in tissues cultured for 6 days in α -MEM⁺ alone or with EGF, PHA or both, in healthy animals or affected by CAEV. * Differs significantly from control ($P < 0.05$); A,B Differs significantly between treatments ($P < 0.05$); a,b Differs between CAEV positive and healthy animals ($P < 0.05$).....

Figure 5- Levels of mRNA expression for TNF- α (A, B), TNFR-I (C, D) and TNFR-II (E, F) in non-cultured tissues and tissues cultured for 6 days in α -MEM⁺ alone or with EGF, PHA or both, in healthy animals (A, C, E) or affected by CAEV (B, D, E). a, b differs between treatments.....

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - **Table 1.** Primer pairs used in real-time PCR.....
- Table 2.** Follicle diameters in primordial and primary follicle in non-cultured
Tabela 2 - tissue (day 0) and in tissue cultured for 6 days in days in α -MEM⁺ alone or with
EGF, PHA or both, in healthy animals or affected by CAEV.....
-

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AI	Anáfase I
AMH	Hormônio Anti-Mülleriano
ATP	Adenosina Trifosfato
BMP	Proteína Morfogenética Óssea
BMP-15	Proteína Morfogenética Óssea 15
BMPR	Receptor de Proteína Morfogenética Óssea
BMPR- IA	Receptor de Proteína Morfogenética Óssea Tipo IA
BMPR- IB	Receptor de Proteína Morfogenética Óssea Tipo IB
BMPR- II	Receptor de Proteína Morfogenética Óssea Tipo II
CAE	Artrite Encefalite Caprina
CAEV	Vírus da Artrite Encefalite Caprina
CGPs	Células Germinativas Primordiais
CGs	Células da Granulosa
COC's	Complexos <i>cumulos</i> -oócito
CTs	Células da Teca
Cx	Conexina
Cx37	Conexina 37
Cx43	Conexina 43
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
EGF-R	Receptor do Fator de Crescimento Epidermal
FECXB	Polimorfismo do Gene que codifica BMP-15
FecB ^B	Polimorfismo da Linhagem Boorola
FecXB	Polimorfismo do Gene que codifica BMP-15
FecXG	Polimorfismo do Gene que codifica BMP-15
FecX ^H	Polimorfismo da Linhagem Hanna
FecXI	Polimorfismo da Linhagem Inverdale
FecXL	Polimorfismo do Gene que codifica BMP-15
FGF-2	Fator de Crescimento Fibroblástico 2
FOPAs	Folículos Ovarianos Pré-Antrais
FSH	Hormônio Folículo Estimulante

FSH-R	Receptor do Hormônio Folículo Estimulante
GDF-9	Fator de Crescimento e Diferenciação 9
GDF-9B	Fator de Crescimento e Diferenciação 9 B
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
KDa	Kilodalton
KL	Kit Ligand
LH	Hormônio Luteinizante
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógenos
MI	Metáfase I
MII	Metáfase II
mL	Mililitro
MMP-1	Metaloproteinases de Matriz 1
MPF	Fator Promotor da Meiose
Ng	Nanograma
PCNA	Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PHA	Fitohemaglutinina
RNA	Ácido Ribonucléico
RNAm	Ácido Ribonucléico mensageiro
RNAs	Ácidos Ribonucléicos mensageiros
SCNT	Transferência nuclear de células somáticas
SNC	Sistema Nervoso Central
TGF- β	Fatores de Crescimento Transformante – β
TI	Telófase I
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNFR I	Receptor Tipo I de Fator de Necrose Tumoral
TNFR II	Receptor Tipo II de Fator de Necrose Tumoral
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
VG	Vesícula Germinativa
VGBD	Quebra da Vesícula Germinativa
ZP	Zona Pelúcida
ZP1	Glicoproteína da Zona Pelúcida 1
ZP2	Glicoproteína da Zona Pelúcida 2

ZP3 Glicoproteína da Zona Pelúcida 3
Mm Micrômetro

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
A	Alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1	A Artrite Encefalite Caprina (CAE).....	22
2.2	O ovário mamífero.....	23
2.3	Oogênese.....	24
2.4	Foliculogênese.....	25
2.4.1	Folículos primordiais.....	25
2.4.2	Folículos primários.....	29
2.4.3	Folículos secundários.....	20
2.4.4	Folículos antrais.....	30
2.5	Maturação oocitária e ovulação.....	30
2.5.1	Maturação oocitária.....	30
2.5.2	Ovulação.....	33
2.6	População folicular e atresia.....	34
2.6.1	Atresia e apoptose.....	35
2.7	Lectinas.....	36
2.7.1	Fitohemaglutinina (PHA).....	37
3	HIPÓTESES CIENTÍFICAS.....	39
4	JUSTIFICATIVA.....	40
5	OBJETIVOS.....	41
5.1	Objetivos gerais.....	41
5.2	Objetivos específicos.....	41
6	ARTIGO I:	42
7	CONCLUSÕES.....	77
8	PERSPECTIVAS.....	78

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 79

1 INTRODUÇÃO

A caprinocultura tem um importante papel na economia brasileira, especialmente na região semi-árida da Região Nordeste do Brasil visto que esta região detém cerca de 90% de todo o rebanho caprino nacional. Neste contexto, destaca-se o estado do Ceará com 11% do rebanho (IBGE, 2010). Os caprinos são considerados economicamente atrativos por serem importantes fontes de carne, leite e pele (DUBEUF *et al.*, 2004). Visando aumentar a eficiência da caprinocultura, várias pesquisas com ênfase nas biotécnicas de reprodução assistida têm sido realizadas com o intuito de aumentar o potencial reprodutivo e a produtividade dos rebanhos. No entanto, algumas patologias podem interferir de forma direta ou indireta no aspecto reprodutivo dos caprinos causando uma perda significativa. Dentre estas enfermidades que afetam esta espécie está a artrite encefalite caprina (CAE), que é causada por um vírus do gênero Lentivirus, da família Retroviridae (HAASE, 1986), subfamília Lentiviridae. Esse vírus pode provocar artrite crônica progressiva, mastite, pneumonia em animais adultos e leucoencefalomielite em animais jovens (CORK *et al.*, 1974). Um dos métodos de controle da CAE é a separação e sacrifício de animais soropositivos (OIE, 1996), levando assim a perdas de animais com alto valor genético. Uma alternativa para o resgate e preservação desse material genético importante seria o uso de biotécnicas reprodutivas (ANDRIOLI; GOUVEIA; PINHEIRO, 2003).

Segundo relatos de ANDRIOLI-PINHEIRO *et al.* (1996) há uma expressiva resposta superovulatória em cabras soropositivas para o vírus da CAE, tendo assim a possibilidade de uma maior taxa de recuperação oocitária e embrionária (RICARTE, 2009). Estudos em ovinos já demonstraram que alterações na expressão do fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF-9), da proteína morfogenética óssea 15 (BMP-15) e o seu receptor de BMP do tipo IB aumentam as taxas de ovulação (HOLANDA *et al.*, 2006). Desta forma, é possível que a presença do CAEV nas células da granulosa de folículos caprinos, conforme demonstrado por ALI AL AHMAD *et al.* (2005), influencie positivamente as taxas de ovulação nesta espécie.

Considerando-se que o ovário mamífero contém milhares de oócitos inclusos em folículos pré-antrais, a obtenção de oócitos a partir de folículos pré-antrais é uma alternativa para a utilização do potencial oocitário de animais positivos para a CAE e de elevado potencial econômico. Já é bem conhecido que os folículos pré-antrais representam fonte potencial de oócitos fertilizáveis, mas poucos conseguem desenvolver-se até o estágio de folículo pré-ovulatório, visto que a grande maioria sofrerá atresia (MARKSTRÖM *et al.*, 2002). Assim, o desenvolvimento de condições de cultivo *in vitro* é indispensável para a

utilização destes oócitos em programas de fertilização *in vitro* (FIGUEIREDO *et al.*, 2008). A ativação dos folículos primordiais quiescentes resulta no crescimento do oócito e transição de folículos primordiais para os estágios posteriores (HILLIER, 2009). A comunicação parácrina que ocorre entre as células somáticas circundantes e o oócito é responsável pela ativação folicular. Além disso, alguns estudos têm indicado que a adição de lectinas mitogênicas de origem vegetal ao cultivo *in vitro* de oócitos induziu a retomada da meiose, indicando uma possível ação dessas moléculas durante a foliculogênese (CYERT e KIRSCHNER, 1988; KISHIMOTO, 1988). Desta forma, a avaliação do efeito da lectina fitohemaglutinina (PHA) durante a ativação e crescimento folicular em animais infectados por CAEV torna-se relevante para uma melhor compreensão dos diversos efeitos desta patologia na reprodução animal.

Para um maior esclarecimento da importância deste trabalho a revisão de literatura abordará aspectos relacionados à ativação, desenvolvimento e atresia folicular, com ênfase na utilização da lectina PHA no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais de animais afetados por CAEV.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A artrite encefalite caprina (CAE)

A CAE é uma doença viral, sendo que o vírus responsável por esta enfermidade pertence à família Retroviridae e ao gênero Lentivirus (CRAWFORD; ADAMS e CHEEVERS, 1980; ADAMS *et al.*, 1980). Os vírus deste grupo são caracterizados por produzirem doenças degenerativas, crônicas e progressivas, com longo período de incubação (SIGURDSSON, 1954). A CAE manifesta-se, clinicamente, em alterações no sistema nervoso central (SNC), articulações, pulmão e glândula mamária (AL-ANI e VESTWEBER, 1984; HAASE, 1986). Geralmente os animais adultos são acometidos por uma severa artrite e leucoencefalomielite em animais mais jovens (CORK *et al.*, 1974). As cabras naturalmente infectadas com o vírus CAE expressam o DNA proviral em diversos tecidos do seu trato genital, tais como útero, ovidutos, além da glândula mamária. A presença dos lentivírus nestes tecidos pode contribuir para a transmissão vertical da enfermidade (FIENI *et al.*, 2002). Entretanto, muitos animais infectados não desenvolvem sinais clínicos, mas permanecem portadores do vírus por toda vida (CUTLIP; SACKS e WEAVER, 1992).

A principal forma de transmissão do vírus é pela via digestiva através da ingestão de colostro e leite de animais infectados (MSELLI-LAKHAL *et al.*, 1999). A transmissão também pode ocorrer pelo contato direto prolongado e através de outras fontes de contaminação como sangue, fezes, saliva e secreções urogenitais (ROWE *et al.*, 1992). Em caprinos, já foi detectada a presença do DNA pró-viral do CAEV no sêmen (ANDRIOLI *et al.*, 1999; TRAVASSOS *et al.*, 1999; ALI AL AHMAD *et al.*, 2008a), e em células do *cumulus de* oócitos (ALI AL AHMAD *et al.*, 2005). Estudos realizados com tecidos do aparelho reprodutor de fêmeas demonstraram que as células da granulosa e células epiteliais de oviduto podem replicar o CAEV *in vitro* (LAMARA *et al.*, 2001). Andrioli *et al.* (2002) obtiveram crias negativas de cabras infectadas pelo CAEV através da transferência de embriões (TE). Em pesquisa recente foi observada a presença do DNA pró-viral do CAEV na zona pelúcida de oócitos de fêmeas positivas ao vírus, mas ainda não é conhecido se o material genético desses animais pode ser utilizado com segurança nas biotécnicas de fecundação *in vitro*. (CAVALCANTE *et al.*, 2013). A disseminação do vírus tem sido bastante preocupante por diversos fatores, como à ocorrência de animais portadores do vírus sendo assintomáticos, além de dificuldades como a lenta produção de anticorpos, indisponibilidade de vacinas e

ampla disseminação do vírus, especialmente pela comercialização de animais sem exames prévios, principalmente em rebanhos leiteiros (JOAG, 1996).

Um dos métodos de prevenção da CAE é a separação e sacrifício de animais soropositivos, levando assim a perdas de animais com alto valor genético. Neste contexto, o uso de biotécnicas reprodutivas surge como uma alternativa para o resgate e utilização do material genético desses animais. Por este motivo, é que se faz necessária à realização de pesquisas para se avaliar a susceptibilidade dos gametas e embriões e ainda os parâmetros reprodutivos de fêmeas caprinas acometidas com o CAEV.

Para que ocorra a transmissão de um patógeno através do embrião é necessário que ele esteja presente no interior do oócito, aderido à zona pelúcida (ZP), ou que esteja presente nos fluidos no qual os embriões são recolhidos, manipulados, criopreservados ou transferidos (SINGH, 1987; WRATHALL, 1995). ALI AL AHMAD *et al.* (2005), verificaram a presença do DNA proviral do CAEV em células da granulosa, mas não no oócito de folículos antrais de cabras infectadas naturalmente. Recentemente, em cabras portadora do vírus da artrite encefalite caprina, SILVA (2006) observou pela técnica de PCR a presença deste vírus nos folículos pré-antrais, porém, ainda não se sabe se o vírus estava presente no oócito ou nas células da granulosa, as quais já demonstraram ser permissivas a este vírus *in vitro* (LAMARA *et al.*, 2001). Folículos ovarianos de cabras infectadas com o vírus da CAE observados através de análise ultraestrutural foram detectados normais com as mesmas características de folículos de cabras sadias como observados por LUCCI *et al.* (2001), SILVA *et al.* (2002) e RICARTE (2005).

2.2 O ovário mamífero

As espécies mamíferas possuem o ovário como um órgão componente do sistema reprodutor feminino com duas funções principais: endócrina, responsável pela síntese e secreção de hormônios esteróides e diversos peptídeos essenciais para o desenvolvimento folicular, ciclo estral ou menstrual, bem como pela manutenção do trato reprodutivo (HIRSHFIELD, 1991). A segunda função é a gametogênica, que resulta na produção e liberação de oócitos fertilizáveis (SAUMANDE, 1991; BRISTOL-GOULD e WOODRUFF, 2006).

O ovário mamífero é subdividido em duas regiões, que podem ser classificadas como medular e cortical. A região medular é composta por tecido conjuntivo, nervos, artérias, veias e confere sustentação e nutrição ao ovário, estando localizada na maioria das espécies na

porção interna do ovário. Já na região do córtex estão localizadas as células germinativas (oócitos) e células somáticas (células da granulosa - CG, da teca - CT e do estroma) (McGEE; & HSUEH, 2000). Quando ocorre a ovulação, que é a expulsão do oócito maduro pelo folículo, forma-se uma estrutura na região cortical chamada de corpo lúteo (RICHARDS; PANGAS, 2010). Todas essas células e estruturas proporcionam um ambiente ideal para que ocorra o processo contínuo de desenvolvimento folicular, ovulação, formação e regressão do corpo lúteo, dirigidos por mecanismos de *feedback* entre o hipotálamo e a hipófise (GOUGEON, 2004; LEITÃO *et al.*, 2009).

2.3 Oogênese

A oogênese é o processo de formação e diferenciação dos gametas femininos. Tem início ainda na vida fetal (antes do nascimento), a partir da formação das células germinativas primordiais até a liberação do oócito haplóide fecundado (BRISTOL-GOULD e WOODRUFF, 2006). Em mamíferos, nos estágios iniciais do desenvolvimento do ovário, as células germinativas primordiais irão migrar do saco vitelínico para a gônada primitiva indiferenciada, colonizando-a (EPPIG *et al.*, 2004). Essas gônadas irão passar por um processo de diferenciação, e imediatamente as CGPs irão se diferenciar em oogônias que serão mitoticamente ativas e em sequência em oócitos primários (SUH *et al.*, 2002). Após esse processo, uma camada de células somáticas planas conhecidas também como células da pré-granulosa, que podem ser originárias do mesonéfron ou ainda das células mesoteliais oriundas do epitélio da superfície ovariana, circundam os oócitos primários formando os folículos primordiais (MAGOFFIN, 2005; MAHESHWARI & FOWLER, 2008), iniciando assim o processo de foliculogênese.

Após a formação dos folículos primordiais, as células da pré-granulosa irão parar de se multiplicar e entram em quiescência. Este é um período em que os oócitos primários inclusos nesses folículos estarão em prófase I da meiose, também conhecidos como vesícula germinativa (VG). Somente a partir da puberdade irá ocorrer a progressão da divisão meiótica, com a liberação do pico pré-ovulatório de FSH e LH, formação dos oócitos secundários e outra parada da meiose em metáfase II (GORDON, 1994). Caso haja fecundação, a meiose II será retomada dando origem ao oócito haplóide fecundado e finalizando a oogênese (FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

2.4 Foliculogênese

A foliculogênese é o processo de formação, crescimento e maturação folicular que ocorre no interior do córtex ovariano em todos os mamíferos (WILLIAMS e ERICKSON, 2012). O folículo ovariano é a unidade morfofuncional do ovário mamífero, tendo como função principal proporcionar um ambiente ideal para o crescimento e maturação do oócito (CORTVRINDT e SMITZ, 2001). Durante a foliculogênese, a morfologia folicular sofrerá inúmeras alterações devido à diferenciação das células circundantes (células da pré-granulosa, células da granulosa e células da teca) e ao crescimento do oócito (BRISTOL-GOULD e WOODRUFF, 2006).

De acordo com o grau de evolução, os folículos podem ser classificados em pré-antrais ou não-cavitários, e ainda antrais ou cavitários. Os folículos pré-antrais são os folículos primordiais, primários e secundários. Já os folículos antrais são os folículos terciários e pré-ovulatórios (FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

2.4.1 Folículos primordiais

O início da formação dos folículos primordiais ocorre com a colonização das células germinativas primordiais e diferenciação das oogônias em oócitos. Quando é iniciada a meiose, o oócito é circundado pelas células da pré-granulosa achatadas, originadas do mesonéfron ou do epitélio germinativo da superfície ovariana, já podendo ser observado o folículo primordial (McNATTY *et al.*, 2000). Após sua organização, o início do desenvolvimento dos folículos primordiais pode ocorrer dias, meses ou anos após a sua formação (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

Os folículos primordiais apresentam um oócito primário imaturo, estacionado na fase diplóteno da meiose I, com diâmetro em torno de 30 a 60 μm circundados por células da pré-granulosa (de formato achatado) que se diferenciam a partir do epitélio superficial do ovário ou dos túbulos mesonéfricos. Os folículos primordiais são os menores folículos encontrados no ovário, compreendendo 90 a 95% da população folicular e constituem o *pool* de reserva folicular (HIRSHFIELD, 1991). Estes folículos não são vascularizados, o que os faz incapazes do próprio suprimento sanguíneo. Essa condição torna extremamente necessária a atuação das junções intercomunicantes também chamadas de junções do tipo *gap* que irão ocorrer entre as células dos compartimentos foliculares (CG e oócito) e o estroma ovariano (ERICKSON e WILLIAMS, 2008). Essas junções irão facilitar a transferência de nutrientes

essenciais para o crescimento do oócito (EPPIG, 1991). Para a produção de ATP os folículos utilizam predominantemente a via glicolítica, sendo que os FOPAs parecem ser capazes de gerar energia suficiente em condições anaeróbias (BOLAND e GOSDEN, 1994). Mas para que ocorra o crescimento normal, maturação e esteroidogênese, o metabolismo folicular necessita presença de oxigênio.

Cada folículo primordial pode seguir caminhos distintos, em que poderão permanecer quiescentes durante o período de reprodução ou iniciar o crescimento e progredir até o estágio de folículo ovulatório, ou ainda morrer por atresia (McGEE & HSUEH, 2000; HANSEN, 2008). Ainda nessa fase, os oócitos primários irão aumentar consideravelmente de tamanho podendo ser detectados altos níveis de expressão de RNAm e acúmulo de ribossomos e polipeptídios (HYTTEL & FAIR, 1997).

A ativação dos folículos primordiais ocorre com a retomada da proliferação das células da granulosa em que os folículos primordiais irão recrutar células da granulosa de formato cúbico. Nessa fase eles serão denominados de folículos de transição, e podem ser reconhecidos pela presença de células da granulosa com ambos os formatos pavimentoso e cúbico transformando-se posteriormente em folículos primários, quando o oócito é circundado por uma camada completa de células da granulosa de formato cúbico (GOUGEON & BUSSO, 2000). Outra mudança importante é o aumento dos volumes citoplasmático e nuclear do oócito (HIRSHFIELD, 1991).

Os mecanismos de ativação que fazem com que os folículos primordiais cheguem a ser folículos primários ainda são pouco conhecidos. No entanto, já existem alguns estudos mostrando que o balanço entre fatores inibitórios ou estimulantes de origem sistêmica ou local, provavelmente regula essa ativação (VAN DENHURK & ZHAO, 2005). Os membros da família dos Fatores de Crescimento Transformante- β (TGF- β), como o Hormônio Anti-Mülleriano (AMH), Ativinas, Proteína Morfogénica Óssea-15 (BMP), Fator de Crescimento e Diferenciação 9 (GDF-9), bem como Kit Ligand (KL), Fator de Crescimento Fibroblástico 2 (FGF-2) e Fator de Crescimento Epidermal (EGF), estão associados à ativação e ao crescimento do folículo. De uma forma geral, esses fatores agem nos receptores que estão presentes nas células da granulosa e no oócito estimulando a organização de camadas celulares no folículo, importantes para o crescimento e diferenciação do oócito (McNATTY *et al.*, 1999; GOUGEON & BUSSO, 2000; PAULINI & MELO, 2011). O crescimento folicular no ovário irá sempre apresentar um grupo de folículos que são ativados e entram no *pool* de folículos em crescimento, o que é chamado de ondas foliculares. Após a ativação, os folículos

que apresentam células da granulosa com ambos os formatos pavimentoso e cúbico são chamados de folículos de transição (SILVA *et al.*, 2004a).

O crescimento *in vitro* de folículos primordiais irá depender dos métodos de cultivo que serão capazes de promover a ativação do folículo primordial, além da sua manutenção e crescimento até o estágio antral. Existem dois sistemas de cultivo folicular, ou seja, o cultivo *in situ*, onde os folículos são cultivados inseridos no fragmento ovariano ou no ovário inteiro, enquanto que no segundo sistema os folículos são cultivados isoladamente sobre a placa ou um substrato, caracterizando o sistema bidimensional, ou inserido no substrato, caracterizando o sistema tridimensional. Já foi demonstrado por vários autores que o cultivo de fragmentos de córtex ovariano é o método mais utilizado para o estudo da ativação dos folículos primordiais caprinos (ROSSETTO *et al.*, 2009), bovinos (BRAW-TAL e YOSSEFI, 1997), babuínos (WANDJI *et al.*, 1997) e humanos (ZHANG *et al.*, 2004.)

O cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais é uma técnica que vem sendo largamente empregada com o intuito de avaliar o efeito de diferentes substâncias, em diferentes concentrações e em diferentes fases do desenvolvimento folicular, a fim de mimetizar *in vitro* os eventos que ocorrem *in vivo* no ovário durante a foliculogênese. Nas últimas duas décadas, vários sistemas de cultivo foram desenvolvidos e os resultados são dependentes do tipo de meio, sistema de cultivo utilizado e da espécie animal estudada (EPPIG e SCHROEDER, 1989; BOLAND & GOSDEN, 1994; FORTUNE, 2003).

Estudos mostraram que o Fator de Crescimento Epidermal – EGF promove a ativação de folículos primordiais caprinos (SILVA *et al.*, 2004b), bem como a proliferação das células da granulosa de folículos pré-antrais (MORBECK *et al.*, 1993), o aumento do diâmetro de folículos pré-antrais bovinos (GUTIERREZ *et al.*, 2000), hamsters (ROY & TREACY, 1993), camundongos (BOLAND e GOSDEN, 1994) e humanos (ROY E KOLE, 1998), induz a transição de folículos suínos primários para secundários (MORBECK *et al.*, 1993), reduz os níveis de atresia em folículos pré-antrais bovinos cultivados *in vitro* e promove a ativação de folículos primordiais ovinos e a manutenção da viabilidade por até seis dias de cultivo (ANDRADE *et al.*, 2005). Além disso, o EGF exerce importantes funções no folículo ovariano estimulando a mitose nas células da granulosa e teca (CELESTINO *et al.*, 2009), induzindo o crescimento do oócito (GALL *et al.*, 2004), ajudando a manter a viabilidade folicular (CELESTINO *et al.*, 2009), favorecendo a produção de esteroides (JAMNONGJIT *et al.*, 2005), promovendo a expansão das células do *cumulus* (BOLAMBA *et al.*, 2006) e ainda exerce um papel determinante na maturação nuclear oocitária (FARIN *et al.*, 2007; HATOYA *et al.*, 2008) e citoplasmática (MERLO *et al.*, 2005; ROSSI *et al.*, 2006).

Além de exercer um importante papel no desenvolvimento embrionário inicial (KLONISCH *et al.*, 2001).

O EGF pertencente à família EGF e sua ação é mediada por um receptor de membrana, ErbB1, o qual é pertencente à superfamília ErbB (RIESE & STERN, 1998). O receptor EGF (EGF-R) é uma glicoproteína transmembranar (CARPENTER, 1999) que está localizado na membrana celular das células da granulosa, nas células da teca e no oócito em todos os estágios de desenvolvimento folicular e nas células intersticiais circundando pequenos folículos pré-antrais. A expressão da proteína para o receptor do EGF e o RNA mensageiro é regulada positivamente pelas gonadotrofinas e pelos esteróides (GARNETT *et al.*, 2002) e tem sido localizada em oócito e células da granulosa de folículos pré-antrais e antrais e também nas células luteais de suínos (SINGH *et al.*, 1995a) e ratas (TEKPETEY *et al.*, 1995). O EGF e seu receptor são expressos nos folículos ovarianos caprinos em todos os estágios de desenvolvimento folicular, no corpo lúteo e na superfície do epitélio ovariano (SILVA *et al.*, 2006b). A atividade biológica desses componentes é mediada por receptores do tipo tirosina quinase, localizados na superfície da membrana plasmática, responsáveis por iniciar e manter uma complexa rede de eventos que controlam o crescimento e a diferenciação celular (LAFKY *et al.*, 2008).

Além do EGF, dois outros fatores de crescimento são conhecidos por serem essenciais para o desenvolvimento folicular normal, ou seja, o fator de crescimento de diferenciação 9 (GDF-9) e o GDF-9B, que também é conhecido como proteína morfogenética óssea 15 (BMP-15). O GDF-9 é um fator secretado pelo oócito (CHANG *et al.*, 2002) e células da granulosa em caprinos (SILVA *et al.*, 2006b) e atua estimulando o crescimento de folículos primários e secundários, bem como a manutenção da viabilidade folicular e a proliferação de células da granulosa de humanos (HREINSSON *et al.*, 2002). A deleção do gene GDF-9 causou infertilidade com foliculogênese bloqueada no estágio primário em camundongos (DONG *et al.*, 1996), enquanto que o tratamento com GDF-9 estimulou o crescimento de folículos pré-antrais em ratas (VITT *et al.*, 2000), indicando participação fundamental do GDF-9 na regulação da foliculogênese pré-antral. A BMP-15 tem como primeiro alvo as células da granulosa e atua regulando sua proliferação e diferenciação (OTSUKA *et al.*, 2000). *In vitro* têm sido demonstrados que ele promove a proliferação das células da granulosa e estimula o desenvolvimento de folículos primordiais e primários em roedores, sendo assim um importante regulador da mitose das células da granulosa e do desenvolvimento folicular inicial (JUENGEL & McNATTY, 2005).

2.4.2 Folículos primários

O folículo primário é constituído de um oócito primário, circundado por uma camada de células da granulosa de formato cúbico. Esses folículos ainda não possuem células da teca diferenciadas e podem apresentar uma zona pelúcida em formação (CORTVRINDT e SMITZ, 2001), com as glicoproteínas (ZP1, ZP2 e ZP3) que circundam o oócito (LEE *et al.*, 2001; RANKIN *et al.*, 2001). Nessa fase folicular irá ocorrer o surgimento das junções *gap* entre estas células, que são os canais intercelulares que permitem a passagem de nutrientes, íons inorgânicos, segundos mensageiros e pequenos metabólitos de uma célula para outra, auxiliando também na comunicação direta entre as células da granulosa e o oócito, projetando-se através da zona pelúcida e chegando à membrana plasmática do oócito (JUNEJA *et al.*, 1999; SIMON *et al.*, 1997). Estes canais são compostos de conexinas (Cx), que são extremamente importantes no desenvolvimento de folículos primários (Cx43) e secundários (Cx37) (SIMON *et al.*, 1997; JUNEJA *et al.*, 1999), sendo que a conexina 43 (Cx43) é a mais abundante no ovário, uma vez que esta é expressa nas células da granulosa desde o início da foliculogênese (ACKERT *et al.*, 2001).

2.4.3 Folículos secundários

Os folículos secundários apresentam um oócito primário inteiramente circundado pela zona pelúcida e a presença de pelo menos duas camadas de células da granulosa de forma cúbica (SANTOS *et al.*, 2008). Folículos secundários em estágios avançados apresentam a zona pelúcida completamente formada e as células precursoras da teca se organizam paralelas à membrana basal para formar a camada da teca. O recrutamento das células da teca do estroma ovariano é um fator de extrema importância para o folículo (PARROTT & SKINNER, 2000).

Com o crescimento dos folículos secundários e a organização das células da granulosa em várias camadas, ocorre a formação do antro, que é uma cavidade repleta de líquido folicular. Este líquido, que é chamado de fluído antral, torna-se uma importante fonte de substâncias regulatórias e/ou moduladoras derivadas do sangue ou secreções foliculares, como os esteróides, gonadotrofinas, fatores de crescimento e outras substâncias. A produção deste fluido é intensificada pelo aumento da vascularização folicular e pela permeabilidade dos vasos sanguíneos (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005).

2.4.4 Folículos antrais

Com a formação do antro, os folículos serão classificados em terciários, antrais e posteriormente em pré-ovulatórios (BARNETT *et al.*, 2006). Com o desenvolvimento desses folículos, as células da granulosa são diferenciadas em células do *cumulus*, que estão próximas ao oócito e células murais as mais superficiais (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

O fluido antral é oriundo dos capilares da teca ou secreções das células foliculares, como, esteróides, fatores de crescimento e proteoglicanos. Com o desenvolvimento folicular irá ocorrer o aumento da vascularização, a permeabilidade dos vasos sanguíneos e por consequência do aumento na produção desse fluido. O aumento do líquido folicular ocorre em consequência da síntese de moléculas osmoticamente ativas oriundas das células da granulosa, que atuam carreando líquido para o interior do folículo (RODGERS, 2010). As células da granulosa estão organizadas em várias camadas com uma cavidade antral entre as camadas de células da granulosa. Já os folículos pré-ovulatórios apresentam todos os componentes presentes nos folículos terciários, com o oócito maduro e no estágio final do desenvolvimento folicular (FIGUEIREDO *et al.*, 1995).

2.5 Maturação oocitária e ovulação

2.5.1. Maturação oocitária

A maturação oocitária é um processo que compreende eventos tanto nucleares quanto citoplasmáticos em que ocorre o preparo do oócito para que esteja apto à fecundação (GOTARDI & MINGOTI, 2009). Na maioria das espécies de mamíferos, o início da meiose irá ocorrer ainda na vida fetal, em que o oócito estará no estágio de vesícula germinativa podendo o folículo se tornar atrésico ou retomar o seu desenvolvimento e a capacidade de induzir a ovulação (SIRARD *et al.*, 1989). Durante a fase de diplóteno da prófase I da primeira divisão meiótica irá ocorrer o desenvolvimento folicular e o crescimento oocitário ficará estático (ADONA e LEAL, 2006; VAN DEN HURK & ZHAO, 2005).

A maturação nuclear representa o retorno do primeiro bloqueio meiótico que irá até metáfase II (MII) (MINGOTI, 2000). Nesse processo ocorrerá a quebra da vesícula germinativa-VGBD (*do inglês, vesicle germinal break down*), condensação dos cromossomos, que irá marcar o final da prófase I e a progressão aos estádios de metáfase I (MI), anáfase I (AI), telófase (TI), até que se complete a primeira divisão meiótica, passando rapidamente

para metáfase MII, da segunda divisão meiótica. Ainda nessa fase ocorrerá a divisão dos cromossomos homólogos, ocorrendo a divisão do número de cromossomos permanecendo a metade no oócito (célula haplóide) e a outra metade sendo liberada no primeiro corpúsculo polar. Ocorrerá então o segundo bloqueio do ciclo celular até a fecundação (SIRARD, 2001).

Um importante fator envolvido na maturação do oócito é a proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK). O momento da ativação da MAPK varia nas diferentes espécies, (KOSAKO *et al.*, 1994). Além dos fatores promotores da maturação, o reinício da meiose também é regulado por fatores inibidores produzidos pelas células foliculares. Esse fato pode ser evidenciado pela manutenção de oócitos em VG quando co-cultivados com metades foliculares ou em meio condicionado pelas mesmas (SIRARD & FIRST, 1988; RICHARD & SIRARD, 1996; GIOMETTI *et al.*, 2005; BARRETA *et al.*, 2008).

A competência oocitária é a capacidade do oócito de desenvolver a maturação completa, fecundação, suportar o desenvolvimento embrionário, e induzir uma gestação (MINGOTI, 2000). Para que ocorra total competência do oócito para desenvolver a maturação nuclear e citoplasmática é necessário que tenha completado toda a sua fase de crescimento (ADONA, 2002). Relaciona-se a competência oocitária ao crescimento do folículo e a maioria das modificações que ocorrem no citoplasma e no núcleo na fase final de crescimento folicular e da maturação. Nesta etapa ocorre síntese de proteínas e armazenamento de RNAm, desenvolvimento de mecanismos reguladores de cálcio, alterações na atividade do MPF e da proteína quinase ativadora de mitógenos (MAPK) e redistribuição das organelas citoplasmáticas (ANGUITA *et al.*, 2007).

Na maturação *in vitro*, nem sempre os oócitos que atingem o estágio de metáfase II, estão aptos a apresentarem desenvolvimento embrionário normal após a fecundação. Isso se deve ao fato de adquirir a competência para sofrer a maturação meiótica antes da competência para formar embrião viável, sendo que essa última só ocorre na fase final da foliculogênese (DONNISON e PFEFFER, 2004).

Ao contrário das outras células somáticas, o oócito possui um o intervalo entre a síntese e a utilização do RNA que pode ser longo, sendo que essas moléculas são armazenadas em uma forma quiescente até o seu uso ao longo da maturação do oócito e desenvolvimento embrionário inicial (PICTON *et al.*, 1998). Essa eficiência no armazenamento assim como a reativação no momento certo das moléculas armazenadas irá determinar a qualidade do oócito e a sua competência para o desenvolvimento embrionário (SANDRI, 2007). Apesar de não perder a capacidade de produzir proteínas após a retomada da meiose, durante a maturação, tanto *in vivo* como *in vitro*, o oócito perde a capacidade de

realizar a transcrição (FOULADI NASHTA, 1998; BLONDIN e SIRARD, 1995). Portanto, é necessário que oócito tenha armazenado todos os estoques de RNAs para a condução das primeiras divisões zigóticas e a ativação do genoma embrionário, caso contrário não haverá uma fecundação bem sucedida (BREVINI-GANDOLFI e GANDOLFI, 2001).

Apenas oócitos que completaram o seu total crescimento possuem capacidade para ativar as duas vias do ciclo celular (ADONA e LEAL, 2006). Inúmeros fatores de crescimento sintetizados pelas células foliculares como pelo oócito atuam modulando o efeito de hormônios e regulando o desenvolvimento dos folículos ovarianos bem como a liberação do oócito maduro.

O GDF-9 é uma proteína homodimérica secretada pelo oócito, pertencente à família dos Fatores de Crescimento Transformante-TGF- β (CHANG *et al.*, 2002). Ele irá atuar promovendo no crescimento de folículos primários e na proliferação de células da teca de ratas (NILSSON & SKINNER, 2002), estimulando a manutenção da viabilidade folicular e a proliferação de células da granulosa de humanos (HREISSON *et al.*, 2002). Além disso, exerce efeito sinérgico com o FSH sobre o crescimento e a diferenciação de folículos pré-antrais em murinos (HAYASHI *et al.*, 1999). Na ausência do GDF-9, não ocorre a formação de folículos secundários, levando, conseqüentemente, à degeneração dos oócitos inclusos em folículos primários (DONG *et al.*, 1996). Na concentração de 200 ng/mL o GDF-9 promove a sobrevivência e a progressão dos folículos ao estágio secundário após sete dias de cultivo (HREISSON *et al.*, 2002). WANG & ROY (2004) propuseram que o GDF-9 pode influenciar a expressão de fatores de crescimento folicular como o KL e que, durante nove dias de cultivo, 10 ng/mL de GDF-9 estimulam o crescimento de folículos primordiais e que ainda em altas doses (200 ng/mL) ocorre o aumento da proporção de folículos secundários de hamster. O RNAm para o GDF-9 tem sido localizado em oócito de ovários bovinos, ovinos (BODENSTEINER *et al.*, 1999), caprinos (SILVA *et al.*, 2004b) e humanos (AALTONEN *et al.*, 1999). A sua expressão em oócitos de folículos primordiais de ovelhas e cabras levantou a possibilidade de que o GDF-9 é essencial para a ativação de folículos primordiais e o seu subsequente desenvolvimento. SILVA *et al.* (2004b) demonstraram que o GDF-9 e os seus receptores estão expressos em todos os tipos de folículos ovarianos na espécie caprina.

Outro fator extremamente importante é a BMP-15, também conhecida como fator de crescimento de diferenciação-9B (GDF-9B). É um dos membros da superfamília do TGF β da qual já foram identificados três tipos de receptores, receptores BMP tipo IA, tipo IB e II. Em roedores, ovinos e humanos, a BMP-15 mostrou estar expressa principalmente no oócito de folículos primários avançados (FINDLAY *et al.*, 2002). Já para a espécie caprina, a proteína

BMP-15 foi encontrada nos oócitos de todos os tipos de folículos e nas células da granulosa de folículos primários, secundários e antrais, mas não em folículos primordiais. Os RNAs para BMP-15, BMPR-IA, BMPR-IB e BMPR-II foram detectados nos folículos primordiais, primários, secundários, bem como no oócito e nas células da granulosa de folículos antrais (SILVA *et al.*, 2004b).

Estudos *in vitro* têm demonstrado que ele promove a proliferação das células da granulosa e estimula o desenvolvimento de folículos primordiais e primários em roedores, ou seja, é um importante regulador da mitose das células da granulosa e do desenvolvimento folicular inicial (FORTUNE, 2003; OTSUKA *et al.*, 2000; NILSSON e SKINNER, 2002). Em células da granulosa de ratas, foi mostrado que o BMP-15 recombinante estimulou a proliferação independente do FSH, mas diminuiu os efeitos do FSH no que se refere à produção de progesterona sem afetar a produção de estradiol (OTSUKA *et al.*, 2000). O BMP-15 é capaz de inibir a expressão do receptor de FSH (OTSUKA *et al.*, 2001) e estimular a expressão do KL nas células da granulosa de ratas (OTSUKA e SHIMASAKI, 2002), além de estimular a expressão do fator de crescimento epidermal (EGF) nas células do *cumulus* de camundongas (YOSHINO *et al.*, 2006). O BMP-15 tem um papel essencial nos estágios iniciais de desenvolvimento folicular (transição de primordial para primário), promovendo a proliferação das células da granulosa (DONG *et al.*, 1996).

2.5.2 Ovulação

Em ovelhas (JUENGEL *et al.*, 2002) observou-se que a BMP-15 apresenta um papel relevante no desenvolvimento folicular até o estágio ovulatório, sugerindo a efetiva participação desta proteína durante os estágios iniciais e finais da foliculogênese. Ovelhas Inverdale e hanna, por apresentarem mutações inativadoras da BMP-15 (FecXI e FecXH), constituem modelo interessante para a compreensão do papel desta proteína no controle da foliculogênese, bem como na determinação da fertilidade e da taxa de ovulação.

A importante atuação da BMP-15 na fertilidade de ovelhas foi confirmada em estudos complementares nesta espécie, nos quais se observou que mutações adicionais no gene que codifica a proteína BMP-15 (FecXB, FecXG e FecXL) foram determinantes do fenótipo de ovelhas Inverdale e Hanna, resultando em altas taxas de ovulação nas ovelhas heterozigotas e infertilidade nas homozigotas (HANRAHAN *et al.*, 2004; McNATTY *et al.*, 2005a). Nas ovelhas Inverdale, a prolificidade é resultante de uma mutação no gene da proteína morfogenética do osso 15 (BMP-15). Esse fator de crescimento está associado ao

aumento na taxa de ovulação ou esterilidade, dependendo de estar em heterozigose ou homozigose. Polimorfismo no gene GDF-9 também foi associado ao aumento da taxa de ovulação e da prolificidade. Animais homozigotos e heterozigotos para essas mutações têm exibido uma taxa de ovulação maior, e essa característica pode ter uma forte implicação em termos de produtividade dos rebanhos, na medida em que eleva as chances de ocorrência de gestações gemelares das ovelhas (DAVIS *et al.*, 1991; GALLOWAY *et al.*, 2000; HANRAHAN *et al.*, 2004).

Os primeiros trabalhos que demonstraram a relação genética entre alterações genéticas com o número de oócitos ovulados e número de crias foram descritos em 2001, quando foi mostrada uma alteração no gene que codifica o receptor de BMP do tipo IB (BMPR IB) afeta a taxa de ovulação em ovelhas da raça Merino (MULSANT *et al.*, 2002; SOUZA *et al.*, 2001; WILSON *et al.*, 2001). Desde então, muitos estudos têm caracterizado mutações nos genes BMPR IB, GDF-9 E BMP-15 que ocorrem naturalmente e associados à taxa de ovulação em ovelhas (McNATTY *et al.*, 2005a; DAVIS *et al.*, 2005, 2001, 1999; HANRAHAN *et al.*, 2004; ROYO-MARTINEZ *et al.*, 2008). Essas ovelhas são caracterizadas por uma elevada taxa de ovulação. Este fenótipo é, devido à ação do alelo FecBB de um gene principal nomeado FECB. A mutação do gene FecB está relacionada ao receptor de BMP-1B. As ovelhas que carregam essa alteração apresentam maior número de ovulação, porque mobilizam maior número de folículos primordiais para a ovulação ou porque têm um menor número de atresia (HOLANDA *et al.*, 2006). A mutação exerce ação principalmente no ovário, entretanto, atuações indiretas são observadas nos perfis hormonais. O FecB é um gene dominante com amplo efeito na taxa ovulatória (HOLANDA *et al.*, 2006).

Em caprinos, alguns estudos com transferência de embriões já demonstraram que cabras positivas para o CAEV podem apresentar um número maior de estruturas recuperadas (oócitos e embriões), o que seria um indicativo de maiores taxas de ovulação (RICARTE, 2009). Isto demonstra que a presença dos vírus da CAE nas células da granulosa dos folículos ovarianos pode influenciar a expressão de genes (Ex. GDF-9 e BMP-15) que exercem importantes funções durante o processo de ovulação.

2.6 População folicular e atresia

A população folicular ovariana foi estimada em 45.000 em caprinos (LUCCI *et al.*, 1999). Fatores como a idade (PETERS, 1976), a raça (CAHILL *et al.*, 1979; DRIANCOURT; CAHILL e BINDON, 1985), o estágio reprodutivo (ERICKSON, 1986), e a alimentação

(SCARAMUZZI *et al.*, 1993) podem afetar a população folicular ovariana tanto qualitativamente, quanto quantitativamente, como também os fatores genéticos (ERICKSON; REYNOLDS e MURPHREE, 1976a,b; CAHILL *et al.*, 1979). Em ruminantes, cerca de 90% da população ovariana é constituída por FOPAs (SAUMANDE, 1991), sendo estes os responsáveis pela renovação contínua dos folículos antrais no ovário (GUIBAULT *et al.*, 1986).

Após o início do crescimento folicular, dois fatos relevantes podem ocorrer: o desenvolvimento do folículo até a ovulação, fato que é relatado como um evento bastante raro (IRELAND, 1987), ou a morte folicular por atresia (ERICKSON, 1986), o que ocorre com grande frequência, em qualquer fase do crescimento folicular, na maioria das espécies (IRELAND, 1987; FORTUNE, 1994).

Com o subsequente desenvolvimento, os folículos antrais tornam-se dependentes de FSH que é o hormônio responsável pelo recrutamento (GINTHER *et al.*, 1996). Esse desenvolvimento pode ser subdividido nas fases de crescimento, recrutamento, seleção e dominância folicular (VAN DEN HURK & ZHAO, 2005). O recrutamento de um grupo de folículos antrais e a seleção de um folículo dominante são as principais características desta fase, e nas espécies monovulatórias, somente um folículo será ovulado (BAERWALD; ADAMS e PIERSON, 2003).

2.6.1 Atresia e apoptose

A grande maioria da população ovariana é composta de folículos primordiais, mas cerca de 99,9% irá sofrer atresia que é um processo degenerativo. Isso irá impedir a ovulação, ocasionando assim um grande desperdício no potencial reprodutivo do ovário (IRELAND, 1987). A atresia folicular ocorre de forma diferenciada em todos os estágios de desenvolvimento folicular (FORTUNE, 1994). Em algumas espécies, como murinos, a atresia é predominante em folículos antrais (HIRSHFIELD, 1988). Já em ovelhas, 50% dos folículos presentes nos ovários desaparecem durante a fase pré-antral (DRIANCOURT; CAHILL e BINDON, 1985).

A atresia ocorre por um processo de morte celular programada conhecido por apoptose, que pode ser observado nos folículos durante toda a vida fetal e adulta (TSAFIRI & BRAW, 1984). Nos folículos pré-antrais, as primeiras alterações indicativas de atresia ocorrem no oócito, como por exemplo, retração da cromatina nuclear e fragmentação oocitária (MORITA & TILLY, 1999). As alterações nas células da granulosa são raras, uma

vez que essas células são mais resistentes à degeneração que os oócitos (SILVA *et al.*, 2002). A célula irá sofrer fragmentação e surgirão corpos apoptóticos ligados à membrana, que serão fagocitados pelos macrófagos (HUSSEIN *et al.*, 2005).

Com o desenvolvimento folicular e o aparecimento da cavidade antral, surge um ambiente mais seguro e que garante maior resistência ao oócito. Assim, as primeiras alterações da atresia são observadas nas células da granulosa pela sensibilidade adquirida ao longo de seu desenvolvimento (SILVA *et al.*, 2002). O equilíbrio entre fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos é crucial para a definição do destino final dos folículos ovarianos, que poderão chegar à ovulação ou tornar-se atrésicos (HSU & HSUEH, 2000).

Com relação aos fatores que regulam a atresia, o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) pode estimular apoptose ou regular a expressão de genes, através da indução de muitos fatores de transcrição (HUNT & PHILLIPS, 2000). Esta citocina tem importante papel no estabelecimento da atresia folicular ou da ovulação (SAKUMOTO & OKUDA, 2004). De acordo com PRANGE-KIEL *et al.* (2001) e SAKUMOTO & OKUDA, 2004, os receptores funcionais do TNF são requeridos para que este possa cumprir suas funções no ovário, havendo dois tipos: o tipo I (TNFR1) e o tipo II (TNFR2). Destes, o tipo I parece ser tipicamente expresso no ovário, confirmando os efeitos do TNF sobre o desenvolvimento e diferenciação celular, devidos à via mediada por receptores. O TNF- α e seus receptores também estão presentes no corpo lúteo bovino, com as maiores expressões na luteólise (SKARZYNSKI *et al.*, 2005; OKANO *et al.*, 2006), sendo um potente estimulador das prostaglandinas luteais e da endotelina-1, em uma ação luteotrófica na fase luteal inicial (SAKUMOTO & OKUDA, 2004; ACOSTA *et al.*, 2007). A manutenção da comunicação entre o oócito e as células somáticas é de grande importância para manutenção da viabilidade folicular (HSUEH *et al.*, 1994; DONG *et al.*, 1996; McNATTY *et al.*, 2004). Essa comunicação é essencial para a foliculogênese, o crescimento e maturação oocitária (GILCHRIST *et al.*, 2004). Desta forma, o estudo de substâncias que contribuem para a manutenção da adesão entre as células, como por exemplo, a lectina PHA tem assumido grande relevância.

2.7 Lectinas

As lectinas são glicoproteínas que podem se ligar a açúcares de forma específica e reversível (CAVADA *et al.*, 2001). Elas despertam grande interesse nas investigações científicas por possuírem inúmeras atividades biológicas. Essa diversidade se dá pelo fato das

lectinas possuem a capacidade de se ligar aos carboidratos de células a que se associam tornando-se capazes de interagir com diversas substâncias dos fluidos biológicos e receptores da superfície celular, agindo como decodificadores de informações entre moléculas, células e microorganismos (SHARON & LIS, 1989, MISQUITH *et al.*, 1994). Entre tantas funções estão envolvidas em processos de reconhecimento e interações celulares (SELL *et al.*, 2000). Podem ser encontradas em plantas, animais e microorganismos (LIS & SHARON, 1986; MODY *et al.*, 1995, KENNEDY *et al.*, 1995). Estão localizadas geralmente na superfície celular ou em partículas intracelulares (SHARON & LIS, 1989).

2.7.1 Fitohemaglutinina (PHA)

A fitohemaglutinina (PHA) é uma lectina extraída do feijão (*Phaseolus vulgaris*). É uma glicoproteína tetramérica com peso molecular 125 KDa e composta de duas subunidades distintas não covalentemente ligadas com peso molecular entre 29 e 35 KDa. As subunidades são denominadas E e L, e referem-se à atividade de hemaglutinação de eritrócitos e leucócitos humanos, respectivamente. Estas subunidades são sintetizadas em paralelo no retículo endoplasmático e depois aleatoriamente combinadas para produzir cinco isolectinas denominadas L4, L3E1, L2E2, L1E3 e E4 (LEAVITT *et al.*, 1977). Estas isolectinas têm propriedades físico-químicas semelhantes e homologia estrutural, mas diferem na especificidade aos carboidratos e na atividade biológica, indicando que a diferença reside em pequenas variações nas suas estruturas primárias. O açúcar específico dessa lectina é N-acetilgalactosamina, mas ela é capaz de reconhecer estruturas oligossacarídicas (LIENER, 1990). A PHA pode exercer diversas atividades terapêuticas como estimular a linfopoiese, atrair células mononucleares ao sítio de injeção, agir como imunoestimulante, ativando a proliferação e ativação das células efectoras e estimular a produção de citocinas endógenas (MODY *et al.*, 1995). Devido à sua capacidade de estimular sub-populações de células T, a PHA tem sido usada como mitógeno para estudos *in vitro* de proliferação de vários tipos celulares (MYERS, 1995). Em caprinos, tanto os linfócitos T como B, são estimulados com a mesma intensidade pela PHA (GONZALEZ, 1989).

Como as lectinas mitogênicas, a PHA, promove a maturação oocitária e expansão das células do *cumulus* isoladas ou em associação no complexo *cumulus* oócito em ratas (FAGBOHUN e DOWNS, 1990). No entanto, em bovinos Wang, *et al.*, (2001), concluíram que a PHA não tem efeito aparente na maturação oocitária ou desenvolvimento de embriões a

partir de folículos bovinos. Mas a PHA tem sido usada para melhorar a eficiência da técnica de transferência nuclear de células somáticas (SCNT) em oócitos de diversas espécies (humanos: TESARIK *et al.*, 2000; caprinos: BEGIN *et al.*, 2004; bovinos: HONG *et al.*, 2005).

De acordo com CUNHA *et al.* (2013) a lectina PHA em cultivo de folículos pré-antrais, na concentração de 10µg/mL a PHA aumentou a taxa de formação de antro e estimulou um aumento nos níveis de expressão de RNAm para FSH-R e PCNA em folículos secundários caprinos cultivados *in vitro* por seis dias. Sugerindo o potencial mitogênico da PHA nessa concentração. Apesar disso, não foi observado aumento no diâmetro folicular após o período de cultivo em todos os grupos. A lectina PHA, nas concentrações testadas, não aumentou a sobrevivência folicular nem promoveu o aumento do diâmetro dos folículos.

3. HIPÓTESES

Conforme mostrado na revisão de literatura, a foliculogênese é um processo complexo regulado por diferentes hormônios e fatores de crescimento e esse processo pode ser alterado pela presença do vírus da CAE. Diante do exposto, foram formuladas as seguintes hipóteses científicas:

1) A presença do vírus da CAE altera a expressão de genes envolvidos com o processo de ovulação, ou seja, de BMP-15, BMPR-IB e GDF-9 em folículos pré-antrais, bem como em COC's e células da granulosa/teca de folículos antrais caprinos.

2) A presença do vírus da CAE influencia a ativação de folículos primordiais durante o cultivo *in vitro* de tecido ovariano de caprinos

3) A lectina fitohemaglutinina e o EGF auxiliam na manutenção da viabilidade de folículos primordiais caprinos e influencia expressão TNF e seus receptores durante o cultivo de tecido ovariano provenientes de cabras saudáveis e infectadas com o vírus da CAE.

4. JUSTIFICATIVA

As células da granulosa e do *cumulus* são susceptíveis ao CAEV (LAMARA *et al.*, 2001, ALI AL AHMAD *et al.*, 2005), mas as células de predileção da infecção do CAEV são as células do sistema monócito fagocitário e fibroblastos, principais componentes do córtex ovariano (ZINK *et al.*, 1990). Já foi observada a presença do DNA pró-viral do CAEV na zona pelúcida de oócitos de fêmeas positivas ao vírus, (CAVALCANTE *et al.*, 2013) mas ainda não é conhecido se a presença do vírus nos animais infectados influencia o desenvolvimento oocitário e a expressão gênica. Já é bem conhecido que alterações na expressão de BMPR-IB e de seus ligantes BMP-15 e GDF-9 aumentam as taxas de ovulação em ovelhas (CHU *et al.*, 2007), mas ainda não se sabe se os oócitos de cabras infectadas com CAEV apresentam alterações na expressão destes genes relacionados com maiores taxas de ovulação. O estudo dos níveis de RNAm para GDF-9, BMP-15 e BMP-RIB em folículos ovarianos de cabras positivas para CAEV é de grande importância para se entender se a presença do vírus da CAE influencia a foliculogênese e as taxas de ovulação em caprinos infectados, pois a presença do vírus nas células da granulosa dos folículos ovarianos pode influenciar a expressão desses genes que exercem importantes funções durante o processo de ovulação.

O estudo de substâncias de origem vegetal, como as lectinas, durante a ativação de folículos primordiais caprinos *in vitro* pode favorecer o desenvolvimento de sistemas de cultivo que reduzam as taxas de atresia folicular. *In vivo*, a atresia afeta cerca de 99,9% dos folículos ovarianos, sendo responsável pelo baixo rendimento do ovário mamífero no que concerne a produção de liberação de oócitos viáveis para a fecundação. As lectinas são uma classe de proteínas que se ligam a carboidratos e influenciam a aglutinação e proliferação celular (TEIXEIRA *et al.*, 2007). No entanto, ainda não se sabe se a fitohemaglutinina influencia as taxas de viabilidade e ativação de folículos primordiais em caprinos durante o cultivo de tecido ovariano *in vitro*. O estudo da ativação de folículos primordiais e o cultivo de folículos pré-antrais pode contribuir para uma melhor compreensão da foliculogênese inicial, e no futuro pode proporcionar uma alternativa para o aumento da eficiência reprodutiva de animais de alto valor zootécnico, passando pela utilização de ovários de animais portadores de patologias graves de ovidutos e/ou útero, até a recuperação de rebanhos eliminados por problemas sanitários (FIGUEIREDO; RODRIGUES e AMORIM, 2001).

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivos gerais

1) Avaliar os níveis de RNAm para GDF-9, BMP-15 e BMPR-IB em folículos pré-antrais, bem como em COC e células da granulosa/teca de folículos antrais provenientes de ovários de cabras saudáveis ou portadoras do CAEV.

2) Avaliar o efeito da lectina PHA sozinha ou em associação com EGF sobre a viabilidade e o desenvolvimento de folículos primordiais inclusos em fragmentos de tecido ovariano cultivados *in vitro*.

3) Verificar se a presença do vírus da CAE influencia a ativação de folículos primordiais caprinos durante o cultivo de tecido ovariano *in vitro*.

5.2 Objetivos específicos

1) Verificar o efeito da lectina PHA, do EGF e de sua interação sobre a expressão dos RNAs mensageiros para o Fator de Necrose Tumoral – α (TNF- α) e seus receptores TNFR-I e TNFR-II em animais saudáveis ou portadores do CAEV.

6.1 Artigo 1

Influence of caprine arthritis encephalitis on expression of mRNAs for GDF-9, BMP-15 and BMPR-IB in ovarian follicles and on in vitro activation of primordial follicles in medium supplemented with phytohemagglutinin and EGF

Tânia de A. Lopes¹; José Jackson do N. Costa¹; Regislane P. Ribeiro¹; José Renato de S. Passos¹; Maria Amélia A. Soares¹; João G. Alves Filho¹; Ellen de V. da Cunha¹; Alice Andrioli Pinheiro²; José Roberto V. Silva¹

¹Biotechnology Nucleus of Sobral – NUBIS, Federal University of Ceara, CEP 62042-280, Sobral, CE, Brazil. ²Goat and Sheep National Research Center (Brazilian Agricultural Research Corporation - EMBRAPA)

Corresponding address (J.R.V. SILVA): Biotechnology Nucleus of Sobral - NUBIS, Federal University of Ceara, Av. Comandante Maurocélvio Rocha Ponte 100, CEP 62041-040, Sobral, CE, Brazil. Phone / Fax: +55 88 36118000 [jrvsilva@ufc.br]

Abstract

This study aims to investigate the effects of caprine arthritis encephalitis (CAE) on the expression of BMP-15, BMPR-IB and GDF-9 in ovarian follicles, as well as the effects of phytohemagglutinin (PHA) and EGF on the survival and activation of primordial follicles, and on expression of mRNA for TNF- α and its receptors in cultured goat ovarian tissue. The levels of BMP-15, BMPR-IB and GDF-9 in primordial/primary and secondary follicles, as well as in COCs and follicular walls from antral follicles were evaluated by real-time PCR (experiment 1). Ovarian tissues were cultured for six days in α -MEM⁺ alone or supplemented with EGF (100 μ g/mL), PHA (10 μ g/mL) or both (experiment 2). Before and after culture,

ovarian fragments were processed for morphological analysis or stored to evaluate the expression of mRNA for TNF α and its receptors. The results showed that the expression of BMP-15 and GDF-9 in primordial/primary follicles from infected goats was significantly higher than in health animals, but the expression of GDF-9 in secondary follicles from infected goats was significantly lower. Additionally, the expression of mRNA for BMP-15 in follicular wall of antral follicles from infected goats was significantly higher than in healthy goats. After culturing ovarian fragments in all tested media, reduced percentages of primordial follicles, and increased of developing follicles was observed when compared to uncultured control. Furthermore, there was a significant increase in follicular diameter after culture in medium supplemented with EGF. Ovarian tissue from infected goats cultured in medium supplemented with PHA had primordial follicles with higher diameters than those from healthy animals. An increase in the levels of mRNAs for TNF- α was observed after culturing ovarian tissue in presence of both EGF and PHA in healthy animals, but this same treatment promoted a reduction of mRNAs for TNF- α and an increase of TNFR-II transcripts in infected animals. In conclusion, CAE influences the expression of mRNA for BMP-15 and GDF-9 in goat ovarian follicles and PHA and EGF differentially regulate the expression of TNF α and TNFR-II in cultured ovarian tissue.

Keywords: goat, ovary, follicles, CAEV, phytohemmagglutinin, TNF

Introduction

The caprine arthritis encephalitis (CAE) is an infectious disease caused by a virus called caprine arthritis encephalitis lentivirus (CAEV) which affects goats of all ages. Generally, the infected animals has sharp decline in production, compromising economically their productivity (Joag et al, 1996). According to reports from Andrioli-Pinheiro et al. (1996), infected animals have a significant superovulatory response which is indicative of

higher rate of ovulation and oocyte retrieval (Ricarte, 2009). In ovine species, previous studies have demonstrated that ewes with a mutation in the bone morphogenetic protein receptor type 1B (BMPR-IB) gene have significantly higher ovulation rates compared with their wild-type animals (McNatty et al., 2005; Fabre et al., 2006)). It has been suggested that this mutation influences the levels of BMP15 (McNatty et al. 2005). Mutations have also been identified in the BMP15 (Galloway et al., 2000) and GDF9 [Hanrahan et al., 2004] genes. Each of the above mutations results in an increased ovulation rate in heterozygous carriers due to a reduction in BMP-15 and GDF-9 synthesis, whereas primary ovarian failure is observed in those that are homozygous carriers. Previously, ALI AL AHMAD *et al.* (2005) have shown the presence of CAEV in granulosa cells of antral follicles, but it is still not known if the presence of CAEV in granulosa cells influence the expression of BMP-15, GDF-9 and BMPR-IB and consequently ovulation rate.

Currently it is known that various biotechnologies are used aiming the preservation of genetic material, such as ovarian follicles, oocytes and embryos from genetically superior animals and/or endangered species. Considering that infected goats are generally discarded, the use of reproductive biotechnologies can be an alternative to use the reproductive potential of these animals. Therefore, the *in vitro* culture of primordial follicle can be an alternative to study follicular development (Silva et al., 2004b; Hutt et al., 2006; Celestino et al., 2009; Araújo et al., 2010; Kim, 2012; Khalich-Philosoph et al., 2013; Portela et al., 2014) and atresia *in vitro* (Markström et al. 2002). It has been shown that follicular atresia occurs by an apoptotic process (Van Wezel et al., 1999). Apoptosis can be initiated externally to the cell by the binding of death ligands, such as tumor necrosis factor α (TNF α) to specific receptors (Hsu et al., 1996).

The activation of quiescent primordial follicles results in oocyte growth and transition of primordial follicles to later stages (Hillier, 2009). The paracrine communication

that occurs between the oocyte and surrounding somatic cells is responsible for follicular activation. Several hormones and growth factors such as EGF (Silva et al., 2004a), GDF-9 (Martins et al., 2010) and BMP-15 were tested during culture of goat pre-antral follicles. Additionally, substances that are not produced by the ovaries, such as phytohemagglutinin (PHA), have not yet been tested during activation of primordial follicles. Phytohemagglutinin is a lectin extracted from *Phaseolus vulgaris*, which bind to complex oligosaccharide containing N-acetylgalactosamine/galactose residues (Sell & Costa, 2003). In addition to recognize some sugars, lectins, like PHA, promote mitogenic stimulation of leukocytes (Sheng et al., 2000) and fibroblasts (Sell & Costa, 2003). Thus, evaluation of the effect of PHA during follicular activation and growth in animals infected by CAEV becomes relevant for a better understanding of follicular development.

The aim of the present study is to evaluate (1) the influence of CAEV on the expression of mRNAs for BMP-15, GDF-9 and BMPR-IB in goat ovarian follicles and (2) to investigate the effect of EGF, PHA or both on the activation of primordial follicles and expression of mRNA for TNF-alpha and TNF receptors in healthy and infected goats during culture of ovarian cortical tissue.

Materials and Methods

Chemicals

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

Experiment 1: Influence of CAE on the expression of mRNAs for BMP-15, GDF-9 and BMPR-I in goat ovarian follicles.

Ovaries (n=20) from healthy (n=5) and infected (n=5) goats were collected at Goat and Sheep National Research Center (Brazilian Agricultural Research Corporation - EMBRAPA). Immediately postmortem, the ovaries were washed in 70% ethanol for 10 seconds following two times in saline solution (0.9% NaCl) containing antibiotics (100 IU/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin) The ovaries were transported within 1 hour to the laboratory in saline solution containing antibiotics at 4°C (Chaves *et al.*, 2008).

In the laboratory, the ovaries from each animal were stripped of surrounding fat tissue and ligaments, then isolation of primordial/primary and secondary follicles, as well as COCs and follicular walls from antral follicles were performed. Primordial and primary follicles were isolated from ovarian tissue by using a mechanical procedure described by Lucci *et al.* (1999). Briefly, the ovarian cortex was cut into small fragments using a tissue chopper (The Mickle Laboratory Engineering Co., Gomshal, Surrey, UK). The ovarian fragments were then placed in α -MEM supplemented with 100 μ g/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin and then pipetted 40 times with a large Pasteur pipette (diameter 1600 μ m) and, subsequently, 40 times with a smaller pipette (diameter 600 μ m) to release the follicles. The suspension was successively filtered through 500 and 100 μ m nylon-mesh filters. Groups of 10 primordial / primary follicles were collected from healthy or infected goats and stored at -80°C until extraction of total RNA. To isolated secondary follicles, fine slices of the ovarian cortex (1–2 mm) were cut from the ovarian surface using a sterile scalpel blade. The slices were subsequently placed into fragmentation medium, consisting of α -MEM supplemented with 100 μ g/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin. Secondary follicles of approximately 0.2 mm diameter were identified under a stereomicroscope (SMZ 645; Nikon, Tokyo, Japan) and microdissected manually from strips of the ovarian cortex using 26-gauge needles. Follicles exhibiting a visible oocyte, surrounded by two or more layers of granulosa cells and an intact basal membrane and without an antral cavity within the granulosa were selected. Groups of 10

secondary follicles were collected from healthy or infected goats and stored at -80°C until extraction of total RNA. COCs from healthy and infected goats were aspirated from antral follicle with an 18 gauge needle and pooled in a 15 mL conical tube. After sedimentation, COCs were recovered and selected using a stereomicroscope (SMZ 645; Nikon, Tokyo, Japan). Only COCs with homogenous cytoplasm and at least five compact layers of cumulus cells were used (CAIXETA *et al.*, 2013) and stored at -80°C until extraction of total RNA. To collect the follicular walls, antral follicles 3 to 6 mm were isolated from the ovaries. The follicles were then cut in half with the aid of a scalpel blade according to the protocol used by Richard & Sirard (1996) and stored at -80°C until extraction of total RNA.

To evaluate gene expression for BMP-15, BMPR-IB and GDF-9, total RNA extraction was performed using Trizol[®] purification kit (Invitrogen, São Paulo, Brazil). According to the manufacturer's instructions, 800 μL of Trizol solution was added to each frozen samples and the lysate was aspirated through a 20-gauge needle before centrifugation at 10,000 g for 3 min at room temperature. Thereafter, all lysates were diluted 1:1 with 70% ethanol and subjected to a mini-column. After binding of the RNA to the column, DNA digestion was performed using RNase-free DNase (340 Kunitz units/mL) for 15 min at room temperature. After washing the column three times, the RNA was eluted with 30 μL RNase-free water. The RNA concentration was estimated by reading the absorbance at 260 nm and was checked for purity at 280 nm in a spectrophotometer (Amersham Biosciences, Cambridge, England) and 2 μg of total RNA was used for reverse transcription. Before the reverse transcription reaction, samples of RNA were incubated for 5 min at 70°C and then cooled in ice. Reverse transcription was performed in a total volume of 20 μL , which was comprised of 10 μL of sample RNA, 4 μL 5X reverse transcriptase buffer (Invitrogen, São Paulo, Brazil), 8 units RNase out, 150 units Superscript III reverse transcriptase, 0.036 U random primers (Invitrogen, São Paulo, Brazil), 10 mM DTT, and 0.5 mM of each dNTP. The mixture was

incubated for 1 h at 42°C, for 5 min at 80°C, and then stored at -20°C. Negative controls were prepared under the same conditions, but without the inclusion of the reverse transcriptase. Quantification of mRNA was performed using GoTaq® qPCR Master Mix. PCR reactions were composed of 1 µL cDNA as a template in 7.5 µL of GoTaq® qPCR Master Mix (Promega Corporation, Madison, WI, USA), 5.5 µL of ultra-pure water, and 0.5 µM of each primer. The primers were designed by using the PrimerQuestSM program (<http://www.idtdna.com>) to perform amplification of BMP-15, BMPR-IB, GDF-9 and housekeeping genes β -tubulin and β -actin (Table 1). These housekeeping were used to normalize expression of target genes. The specificity of each primer pair was confirmed by melting curve analysis of PCR products. The thermal cycling profile for the first round of PCR was: initial denaturation and activation of the polymerase for 10 min at 95°C, followed by 50 cycles of 15 sec at 95°C, 30 sec at 58°C, and 30 sec at 72°C. The final extension was for 10 min at 72°C. All reactions were performed in StepOne Real-Time PCR (Applied Biosystems). The delta-delta-Ct method was used to transform the Ct values into normalized relative expression levels (Livak and Schmittgen, 2001).

Levels of mRNA for BMP-15, BMPR-IB and GDF-9, in ovarian follicles, COCs and follicular walls were analyzed by using the non-parametric Kruskal–Wallis test and Dunn’s test for post hoc pair-wise comparisons. Data were expressed as mean \pm SEM. The differences were considered significant when $P < 0.05$.

Experiment 2: Influence of CAE on in vitro activation of primordial follicles in medium supplemented with PHA and EGF

Ovaries (n=20) from healthy (n=5) and infected (n=5) goats were collected as described in experiment 1. The culture system used was described in detail earlier by Silva *et al.* (2004). Briefly, ovarian cortical tissue from the same ovarian pair was cut in 10 slices (3

mm x 3 mm x 1 mm) using a scissor and scalpel under sterile conditions. For each group of animals (healthy or infected), after fragmentation, some pieces of goat ovarian cortex were directly fixed for histological or stored at -80°C for extraction of total RNA (uncultured controls). The remaining fragments were cultured *in vitro* for 6 days in 24-well culture dishes 1 mL of culture media. Culture was performed at 39°C in 5% CO₂ in a humidified incubator. The basic culture medium consisted of α -MEM (pH 7.2-7.4) supplemented with ITS (10 μ g/mL insulin, 5.5 μ g/mL transferrin, and 5 ng/mL selenium), 2 mM glutamine, 2 mM hypoxanthine, antibiotics 100 IU/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin, 50 μ g/mL ascorbic acid, 3.0 mg/mL of bovine serum albumin (α -MEM⁺). The ovarian cortical fragments were cultured in control medium (α -MEM⁺) alone or supplemented with EGF (100 μ g/mL), PHA (10 μ g/mL) or both (EGF+PHA). Every 2 days, the culture medium was replaced with fresh medium. After six days of culture, the pieces of ovarian tissue were fixed overnight at room temperature in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) for histological studies. Additionally, fragments from each treatment were collected and stored at -80°C until extraction of total RNA. This experiment was repeated five times.

After fixation, the ovarian fragments were dehydrated in a graded series of ethanol, clarified with xylene, and embedded in paraffin wax. For each piece of ovarian cortex, 7 μ m sections were mounted on slides and stained with eosin and hematoxylin. Coded anonymized slides were examined under a microscope (Nikon, Tokyo, Japan) at x100 and x400 magnification. The developmental stages of follicles were classified as primordial (one layer of flattened or flattened and cuboidal granulosa cells around the oocyte) or growing follicles (primary: one layer of cuboidal granulosa cells, and secondary: two or more layers of cuboidal granulosa cells around the oocyte). These follicles were further classified individually as histologically normal when an intact oocyte was present, surrounded by granulosa cells that are well organized in one or more layers, and have no pyknotic nucleus. Degenerated follicles

were defined as those with a retracted oocyte, that had a pyknotic nucleus and/or is surrounded by disorganized granulosa cells, which are detached from the basement membrane. The percentages of healthy primordial and developing follicles were calculated before (fresh control) and after culture in a particular medium. Furthermore, the follicular diameter of follicles on day 0 and day 6 days of culture, was determined as the mean of two perpendicular measures of each follicle, were examined under a microscope (SMZ 645, Nikon, Tokyo, Japan) at x100 and x400 magnification.

To evaluate the effects of EGF, PHA and their combination on mRNA expression for TNF- α , TNFR-I and TNFR-II, 6-day cultured fragments from each treatment using cortical tissues from healthy and infected animals were collected and then stored at -80°C until extraction of total RNA. Total RNA extraction, reverse transcription reaction and quantification of mRNA were performed as described previously. The primers to perform amplification of TNF- α , TNFR-I, TNFR-II and housekeeping genes β -tubulin and β -actin (Table 1). The percentages of morphologically normal follicles, as well as those of primordial and developing follicles after 6 days of culture were subjected to Fisher's exact test ($P < 0.05$). Levels of mRNA for TNF- α , TNFR-I and TNFR-II in cultured fragments were analyzed by using the non-parametric Kruskal–Wallis test and Dunn's test for post hoc pair-wise comparisons ($P < 0.05$). Data were expressed as mean \pm sem. The differences were considered significant when $P < 0.05$.

Results

Experiment 1: Influence of CAE on expression of mRNAs for BMP-15, GDF-9 and BMPR-IB in goat ovarian follicles.

The levels of mRNA for BMP-15 and GDF-9 in primordial / primary follicles from infected goats were significantly higher than those observed in follicles from healthy animals (Fig. 1A, C), $P < 0.05$). However, the presence of CAE did not affect the levels of mRNA for BMPR-IB in primordial and primary follicles (Fig. 1B, $P > 0.05$). On the other hand, the levels of mRNA for GDF-9 in secondary follicles from infected goats was significantly lower than those from healthy animals (Fig. 1F), $P < 0.05$). No significant difference in the levels of mRNA for BMP-15 and BMPR-IB were observed in secondary follicles collected from healthy and infected animals (Fig. 1D, E, $P > 0.05$). The levels of mRNA for BMP-15, BMPR-IB and GDF-9 in COCs collected from healthy and infected goats did not differ significantly (Fig. 1G, H, I, $P > 0.05$). In contrast, the expression of mRNA for BMP-15 in follicular walls collected from infected goats was significantly higher than those from healthy animals (Fig. 1J, $P < 0.05$), but no differences were observed in the expression of BMPR-IB and GDF-9 (Fig. 1K, L, $P > 0.05$).

Experiment 2: Influence of CAE, PHA and EGF on activation of primordial follicles and on expression of TNF α and its receptors.

After culturing of cortical tissue from infected and healthy goats, a total of 1,039 and 1,113 preantral follicles were analyzed, respectively. Both for healthy and infected animals, histological analysis showed that ovarian fragments cultured in all tested media had reduced percentages of normal follicles when compared to uncultured control (Fig. 2, $P < 0.05$). Furthermore, neither CAE nor in vitro treatments (EGF, PHA and EGF+PHA) influenced the percentage of morphologically normal follicles after culturing were observed (Fig. 2, $P > 0.05$).

Compared to uncultured control group, a significant reduction in the percentage of primordial follicles and increase of developing follicles was observed in all tested media after 6 days of culture of cortical tissue from both healthy and infected goats (Fig. 3 and 4,

$P < 0.05$). No significant effect of CAE, EGF, PHA or both EGF and PHA on primordial follicle activation was observed (Fig. 3 and 4, $P > 0.05$). For both healthy and infected goats, after 6 days of culture, there was a significant increase in follicular diameter after culturing ovarian tissue in medium supplemented with EGF, when compared with the uncultured control and other treatments. However, when healthy and infected animals were compared, a significant increase in the diameters of primordial follicles cultured with PHA was observed (Table 2).

After culturing ovarian tissue from healthy animals for 6 days in culture medium supplemented with EGF and PHA, a significant increase in the levels of mRNA for TNF- α was observed when compared to uncultured control (day 0) (Fig. 5A, $P < 0.05$). In contrast, culturing ovarian tissue from infected animals in this medium reduced the expression of transcripts for TNF- α (Fig. 5B, $P < 0.05$). Neither the CAE nor the presence of EGF, PHA or both in culture medium influenced the expression of mRNA for TNFR-I (Fig. 5C and D, $P > 0.05$). In healthy animals, EGF reduced significantly the levels of mRNA for TNFR-II when compared to those levels observed in tissues cultured in control medium (Fig. 5E, $P < 0.05$). No significant differences were observed among other treatments (Fig. 5E, $P > 0.05$). In infected animals, the presence of both PHA and EGF in culture medium increased significantly the levels of mRNA for TNFR-II when compared to tissues cultured in control medium (Fig. 5F, $P < 0.05$). No significant differences were observed among other treatments (Fig. 5F, $P > 0.05$).

Discussion

The present study is the first to show that CAE alters the levels of mRNA for BMP-15 and GDF-9 in goat ovarian follicles. The mRNA expression of BMP-15 and GDF-9 in primordial and primary isolated follicles was higher in infected than in healthy animals.

Previous studies have already demonstrated the presence of CAEV in preantral follicles (SILVA, 2006) and this study shows that the CAEV can influence the expression of BMP-15 and GDF-9. TGF- β family proteins, such as BMPs and GDF-9, have been linked to the regulation of primordial follicles activation (MATZUK *et al.*, 2002). BMP-15 has an important role in follicular activation, since its effect has been shown on the transition from primordial to primary follicles in mice (LEE *et al.*, 2001; MOORE & SHIMASAKI, 2005), and goats (CELESTINO *et al.*, 2011). Ewes with inactivating mutations in BMP-15 gene are completely infertile, having follicular development blocked at primary follicle stage (JUENGEL *et al.* 2002; HANRAHAN *et al.*, 2004). In addition, GDF-9 can positively influence the transition of primordial follicles to primary follicles. Transgenic mice deficient for GDF-9 are infertile and the follicles do not develop beyond primary stage (MATZUK *et al.*, 2002). This protein seems to act as a paracrine regulator of granulosa cell proliferation and differentiation into primordial follicles. The main activities of BMP-15 and GDF-9 in early folliculogenesis include stimulation of mitosis in the granulosa cells (YOSHINO *et al.*, 2006; GUERIPPEL *et al.*, 2006).

In secondary follicles, the expression of GDF-9 was significantly reduced in infected animals when compared with healthy animals, emphasizing that the effect of CAEV on GDF-9 expression is dependent on follicular stage of development. In murine species, GDF-9 is essential for the formation of secondary follicles, since in rats with a knockout of the gene for GDF-9, follicular development beyond the primary stage was not observed (DONG *et al.*, 1996). Similarly, with spontaneous mutations inactivating sheep GDF-9 gene (HANRAHAN *et al.*, 2004) and actively immunized against sheep GDF-9 had no preantral follicles developed at the stage of secondary follicles (JUENGEL *et al.*, 2002). In goats, SILVA *et al.*, (2004), evidenced that GDF-9 protein were found in the oocyte of all types of follicles and in the granulosa cells of primary, secondary, and antral follicles, but not primordial follicles. The

in vitro exposure of ovarian tissue to GDF-9 in rodents (NILSSON & SKINNER, 2003, 2002; WANG & ROY, 2004), goats (MARTINS et al., 2008) and women (HREINSSON et al., 2002) promoted developmental progression of primary follicles. In addition, another study showed that GDF-9 promoted the growth of preantral follicles in vitro and suppressed apoptosis in granulosa cells (ORISAKA et al., 2006). In the stage of secondary follicle, GDF-9 controls the biological function of inhibin and activin (ELVIN et al., 1999a,b).

In follicular walls from antral follicles, an increase in the expression of mRNA for BMP-15 was observed in follicles from infected animal. Previously, ALI AL AHMAD *et al.* (2005) have shown the presence of CAEV in granulosa cells of antral follicles, but not in the oocyte. Recent studies in mice, pigs and humans have demonstrated that BMP-15 and GDF-9 are expressed in granulosa and/or cumulus cells, but the oocyte is the main source of these factors in large antral follicles (MARGOULIS et al. 2009; SUN et al., 2010). CELESTINO et al. (2011) demonstrated that the levels of mRNA for BMP-15 in oocytes is many thousand times higher than in granulosa cells. Thus, we can hypothesize that this increase in expression of BMP-15 in follicular wall does not interfere with ovulation rate in goat with CAE. Previous studies showed a physiological relationship between lower biologically active concentrations of BMP-15 and higher ovulation rates after immunizing wild-type ewes against the entire mature BMP-15 protein (JUENGEL et al., 2002, McNATTY et al., 2007). Both the immunisation and mutation studies indicates that as the dose of biologically available BMP-15 decreases, the ovulation rate increases until BMP-15 concentrations are too low to support follicular growth (McNATTY et al., 2004, 2007; FABRE et al. 2006). No difference in the levels of mRNA for GDF-9 and BMPR-IB were observed in follicular walls. Mutations in the BMPR-IB gene are directly correlated with increased ovulation rates in ovine species (YAN-YADONG et al., 2005). Mutations in GDF-9 gene are related to reduced levels of mature protein or altered binding to cell surface receptors (McNATTY et al., 1997). Potential causes

of high rates of ovulation in heterozygote animals with the mutation in BMP-15 and GDF-9 genes, as well as homozygous mutation in BMPR-IB, are early maturation of follicular development due to the increase of LH receptors in granulosa cells (HENDERSON et al. 1987).

After 6 days of culture, no effect of CAE, EGF and PHA were observed during primordial to primary follicle transition *in vitro*. These results are probably due to the use of a culture medium rich of nutrients, such as vitamins, carbohydrates, amino acids and minerals that have been successfully used to culture primordial follicles. Furthermore, the medium is supplemented with ITS that has been considered a stimulator of early follicle development during culture (WRIGHT et al., 1999; RODRIGUES et al., 2010; SILVA et al., 2011a,b; LIMA et al., 2012). However, EGF increased follicular diameter after culture of ovarian tissue from both infected and healthy animals. Previous study also demonstrated that EGF is able to promote an increase in follicle and oocyte diameter in caprine species (SILVA et al., 2004). When comparing the diameters of primordial follicles between infected and healthy animals, PHA was effective in stimulating an increase in follicular diameter. Cunha et al., (2013) demonstrated that PHA maintains the follicular viability and ultrastructure, and promotes the formation of antral cavity after 6 days of culture *in vitro*.

An increase in the levels of mRNA for TNF- α was observed after culturing ovarian tissue in presence of both EGF and PHA in healthy animals, but this same treatment promoted a reduction in TNF- α transcripts in infected animals. Previous studies have demonstrated that TNF- α mRNA is detected in the synovial joint as early as early 6 days after infection with CAEV (LECHNER et al., 1997), and infected goats have elevated levels of TNF- α in serum (MDURVWA et al., 1994). Differences in the levels of TNF- α in serum can be related with the differences in TNF- α mRNA production after culturing ovarian tissue from healthy and infected animals. It has been demonstrated that CAEV infection may change the expression of

cytokines in macrophages. This finding suggests that CAEV may modulate the accessory functions of infected macrophages and the antiviral immune response in cultured ovarian tissue. Previous studies demonstrated that infected macrophages respond to this stimulation with a reduced expression of TNF- α (LECHNER et al., 1997).

Culture of ovarian tissue in medium supplemented with both EGF and PHA promoted an increase in expression of mRNA for TNFR-II in infected animals, but not in those healthy. The production of TNF- α is controlled by positive and negative feedback. It has been shown that IL10 and prostaglandins inhibit transcription of mRNA for TNF- α (TRACEY et al., 2008). The fact that EGF inhibits apoptosis, and stimulates proliferation of granulosa cells and synthesis of angiogenic factors (SHIMIZU et al., 2002) can be related with the difference in expression of TNF- α after culturing ovarian tissue in presence of EGF.

In conclusion, CAE influences the expression of mRNA for BMP-15 and GDF-9 in goat ovarian follicles and PHA and EGF differentially regulate the expression of TNF- α and TNFR-II in cultured ovarian tissue. This suggests that the CAEV can influence follicle development in infected goats.

Acknowledgments

This research was supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil, Grant number: 562686/2010-0).

References

- ANDRIOLI-PINHEIRO, A.; SALLES, H. O. ; PINHEIRO, R. R.; MOURA SOBRINHO, P. A.; MARQUES, M. A. J.; MORAES, J. B. Controle da Artrite Encefalite Caprina a Vírus (CAEV) através da transferência de embriões (TE). *In: XV Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias*, Campo Grande, PN13- 63, p. 391, 1996.
- ARAÚJO, V. R.; LIMA-VERDE, I. B.; NAME, K. P. O.; BÁO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V. S.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Bone Morphogenetic Protein-6 (BMP-6) induces atresia in goat primordial follicles cultured *in vitro*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n. 9, p.770-776, 2010.

CAIXETA, E. S., SUTTON Mc-DOWALL, M. L., GILCHRIST, R. B., THOMPSON, C. A. P., MACHADO, M. F., LIMA, P. F., BURATINI, J. Bone morphogenetic protein 15 and fibroblast growth factor 10 enhance cumulus expansion, glucose uptake, and expression of genes in the ovulatory cascade during *in vitro* maturation of bovine cumulus–oocyte complexes. **Reproduction**, v. 146, n. 1, p. 27-3, 2013.

CELESTINO, J. J.; LIMA-VERDE, I. B.; BRUNO, J. B.; MATOS, M. H.; CHAVES, R. N.; SARAIVA, M. V.; SILVA, C. M.; FAUSTINO, L. R.; ROSSETTO, R.; LOPES, C. A.; DONATO, M. A.; PEIXOTO, C. A.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Steady-state level of bone morphogenetic protein-15 in goat ovaries and its influence on *in vitro* development and survival of preantral follicles. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 338, n. 1-2, p. 1-9, 2011.

CELESTINO, J.J.H.; MATOS, M. H. T.; SARAIVA, M. V. A.; FIGUEIREDO, J. R. Regulation of ovarian folliculogenesis by Kit Ligand and the c-Kit system in mammals. **Animal Reproduction Science**, v.6, n.3, p.431-439, 2009.

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

CUNHA, E. V.; COSTA, J. J. N.; ROSSI, R. O. D. S.; SILVA, A. W. B.; PASSOS, J. R. S.; PORTELA, A. M. L. R.; PEREIRA, D. C. S. T.; DONATO, M. A. M.; CAMPLEO, C. C.; SARAIVA, M. V. A.; PEIXOTO, C. A.; SILVA, J. R. V.; SANTOS, R. P. **Phytohemagglutinin improves the development and ultrastructure of *in vitro*-cultured goat (*Capra hircus*) preantral follicles.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research, v. 46, n. 3, p. 245–252, 2013.

DONG, J. W.; ALBERTINI, D. F.; NISHIMORI, K.; KUMAR, T. R.; LU, N. F.; MATZUK, M. M. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. **Nature**, v. 383, p. 531–535, 1996.

ELVIN, J. A.; CLARK, A. T., WANG, P.; WOLFMAN, N. M.; MATZUK, M. M Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. **Molecular Endocrinology**, v. 13, p. 1035–1048, 1999b.

ELVIN, J. A.; YAN, C.; WANG, P.; NISHIMORI, K.; MATZUK, M. M. Molecular characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor 9-deficient ovary. **Molecular Endocrinology**, v. 13, p. 1018–1034, 1999a.

FABRE, S.; PIERRE, A.; MULSANT, P.; BODIN, L.; DI PASQUALE, E.; PERSANI, L.; MONGET, P.; MONNIAUX, D. Regulation of ovulation rate in mammals: contribution of sheep genetic models. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 4, n. 20, p. 1-12, 2006.

FABRE, S.; PIERRE, A.; MULSANT, P.; BODIN, L.; DI PASQUALE, E.; PERSANI, L.; MONGET, P.; MONNIAUX, D. Regulation of ovulation rate in mammals: contribution of

sheep genetic models. **Reproductive of Biology and Endocrinology**, v.4, n. 20, p.1-12, 2006.

GALLOWAY, S. M.; MCNATTY, K. P.; CAMBRIDGE, L. M.; LAITINEN, M. P.; JUENGEL, J. L.; JOKIRANTA, T. S.; MCLAREN, R. J.; LUIRO, K.; DODDS, K. G.; MONTGOMERY, G. W.; BEATTIE, A. E.; DAVIS, G. H.; RITVOS, O. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. **Nature Genetics**, v. 25, n. 3, p. 279-83, 2000.

GUERPEL, X.; BRUN, V.; GOUGEON, A. Oocyte bone morphogenetic protein 15, but not growth differentiation factor 9, is increased during gonadotropin-induced follicular development in the immature mouse and is associated with *cumulus oophorus* expansion. **Biology of Reproduction**, v. 75, p. 836–843, 2006.

HANRAHAN, J. P.; GREGAN, S. M.; MULSANT, P.; MULLEN, M.; DAVIS, G. H.; POWELL, R.; GALLOWAY, S. M. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 900–909, 2004.

HANRAHAN, J. P.; GREGAN, S. M.; MULSANT, P.; MULLEN, M.; DAVIS, G. H.; POWELL, R.; GALLOWAY, S. M. Mutations in the Genes for Oocyte-Derived Growth Factors GDF9 and BMP15 Are Associated with Both Increased Ovulation Rate and Sterility in Cambridge and Belclare Sheep (*Ovis aries*). **Biology of Reproduction**, v.70, p. 900–909, 2004.

HENDERSON, K. M.; McNATTY, K. P.; O'KEEFFE, L. E.; LUN, S.; HEATH, D. A.; PRISK, M. D. Differences in gonadotrophin-stimulated cyclic AMP production by granulosa cells from booroola x merino ewes which were homozygous, heterozygous or non-carriers of a fecundity gene influencing their ovulation rate. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 81, p. 395–402, 1987.

HILLIER, S. G. Paracrine support of ovarian stimulation. **Molecular Human Reproduction**, v.15, n.12, p. 843–850, 2009.

HREINSSON, J. G.; SCOTT, J. E.; RASMUSSEN, C.; SWAHN, M. L.; HSUEH, A. J.; HOVATTA, O. Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 87, p. 316-321, 2002.

HSU, H.; HUANG, J.; SHU, H. B.; BAICHWAL, V.; GOEDDEL, D. V. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. **Immunity**, v.4, n.4, p. 387-96, 1996.

HUTT, K. J.; MCLAUGHLI, E, A.; HOLLAND, M. K. KIT/KIT Ligand in mammalian oogenesis and folliculogenesis: Roles in rabbit and murine ovarian follicle activation and oocyte growth. **Biology of Reproduction**, v.75, p.42-433, 2006.

JOAG, S. V.; STEPHENS, E. B.; NARAYAN, O. Lentiviroses. *In*: FIELDS, M. D.; KNIPE, D. M. **Fields Virology**, 3. ed. New York: Raven Press, 1996. p. 1977-1996.

- JUENGEL, J. L.; HUDSON, N. L.; HEATH, D. A.; SMITH, P.; READER, K. L.; LAWRENCE, S. B.; O'CONNELL, A. R.; LAITINEN, M. P.; CRANFIELD, M.; GROOME, N. P.; RITVOS, O.; McNATTY, K. P. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1777–1789, 2002.
- KALICH-PHILOSOPH, LITAL.; RONESS, H.; CARMELY, A.; FISHEL-BARTAL, M.; LIGUMSKY, H.; PAGLIN, S.; WOLF, I.; KANETY, H.; SREDNI, B.; MEIROW, A. Cyclophosphamide Triggers Follicle Activation and “Burnout”; AS101 Prevents Follicle Loss and Preserves Fertility. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 185, p. 185, 2013.
- KIM, J. Y. Control of ovarian primordial follicle activation. **Clinical and Experimental Reproductive Medicine**, v.39, n.1, p.10-14, 2012.
- LAMARA, A.; FIENI, F.; MSELLI-LAKHAL, L.; TAINTURIER, D.; CHEBLOUNE, Y. Efficient replication of caprine arthritis-encephalitis virus in goat granulosa cells. **Virus Research**, v. 79, n. 1-2, p. 165-172, 2001.
- LECHNER, F.; MACHADO, J.; BERTONI, G.; SEOW, H. F.; DOBBELAERE, D. A.; PETERHANS, E. Caprine arthritis encephalitis virus dysregulates the expression of cytokines in macrophages. **Journal of Virology**, v. 71, p. 7488-7497, 1997.
- LEE, W. S.; OTSUKA, F.; MOORE, R. K.; SHIMASAKI, S. Effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 994-999, 2001.
- LIMA, I. M. T.; BRITO, I. R.; ROSSETTO, R.; DUARTE, A. B. G.; RODRIGUES, G. Q.; SARAIVA, M. V. A.; COSTA, J. J. N.; DONATO, M. A. M.; PEIXOTO, C. A.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. BMPR-IB and BMPR-II mRNA expression levels in goat ovarian follicles and the *in vitro* effects of BMP-15 on preantral follicle development. **Cell and Tissue Research**, v. 348, p. 225-238, 2012.
- LUCCI, C. M.; AMORIM, C. A.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P.; SILVA, J. R.; GONÇALVES, P. B. Effect of the interval of serial sections of ovarian tissue in the tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 56, n. 1, p. 39-49, 1999.
- MARGULIS, S.; ABIR, R.; FELZ, C.; NITKE, S.; KRISSE, H.; FISCH, B. Bone morphogenetic protein 15 expression in human ovaries from fetuses, girls, and women. **Fertility and Sterility**, v. 92, n. 5, p. 1666-1673, 2009.
- MARKSTRÖM, E.; SVENSSON, E. C.; SHAO, R.; SVANBERG, B.; BILLIG, H. Survival factors regulating ovarian apoptosis – dependence on follicle differentiation. **Reproduction**, v. 123, p. 23-30, 2002.
- MARTINS, F. S.; CELESTINO, J. J. H.; SARAIVA, M. V. A.; MATOS, M. H. T.; BRUNO, J. B.; ROCHA-JUNIOR, C. M. C.; LIMA-VERDE, I. B.; LUCCI, C. M.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Growth and differentiation factor-9 stimulates activation of goat primordial follicles *in vitro* and their progression to secondary follicles. **Reproduction Fertility and Development**, v. 20, p. 916-924, 2008.

MARTINS, F.S.; CELESTINO, J. J. H.; SARAIVA, M.V.A.; CHAVES, R.N.; ROSSETTO, R.; SILVA, C.M.G.; LIMA-VERDE, I.B.; LOPES, C.A.P., CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Interaction between growth differentiation factor 9, insulin-like growth factor I and growth hormone on the *in vitro* development and survival of goat preantral follicles. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 8, p. 728-736, 2010.

MATZUK, M. M.; BURNS, K. H.; VIVEIROS, M. M.; EPPIG, J. J. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. **Science**, v. 296, p. 2178–2180, 2002.

McNATTY, K. P.; HUDSON, N. L.; WHITING, L.; READER, K. L.; LUN, S.; WESTERN, A.; HEATH, D. A.; SMITH, P.; MOORE, L. G.; JUENGEL, J. L. The effects of immunizing sheep with different BMP-15 or GDF-9 peptide sequences on ovarian follicular activity and ovulation rate. **Biology of Reproduction**, v. 76, p. 552-560, 2007.

McNATTY, K. P.; JUNGEL, J. L., READER, K. L.; LUN, S.; MYLLYMAA, S.; LAWRENCE, S. B.; WESTERN, A.; MEERASAHIB, M. F.; MOTTERSHEAD, D. G.; GROOME, N. P.; RITVOS, O.; LAITINEN, M. P. Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function in ruminants. **Reproduction**, v. 129, p. 481-487, 1997.

McNATTY, K. P.; MOORE, L. G.; HUDSON, N. L.; QUIRKE, L. D.; LAWRENCE, S. B.; READER, K.; HANRAHAN, J. P.; SMITH, P.; GROOME, N. P.; LAITINEN, M.; RITVOS, O.; JUENGEL, J. L. The oocyte and its role in regulating ovulation rate: a new paradigm in reproductive biology. **Reproduction**, v. 128, p. 379–386, 2004.

McNATTY, K.P.; GALLOWAY, S. M.; WILSON, T.; SMITH, P.; HUDSON, N. L.; O'CONNELL, A.; BIBBY, A. H.; HEATH, D. A.; DAVIS, G. H.; HANRAHAN, J. P.; JUENGEL, J. L. Physiological effects of major genes affecting ovulation rate in sheep. **Genetics Selection Evolution**. v. 37, p. 25-38, 2005.

MDURVWA, E. G.; OGUNBIYI, P. O.; GAKOU, H. S.; REDDY, P. G. Pathogenic mechanisms of caprine arthritis–encephalitis virus. **Veterinary Research Communications**, v. 18, n. 6, p. 483–490, 1994.

MOORE, R. K.; SHIMASAKI, S. Molecular biology and physiological role of the oocyte factor, BMP-15. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 234, p. 67-73, 2005.

NILSSON, E. E.; SKINNER, M. K. Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 1265-1272, 2003.

NILSSON, E. E.; SKINNER, M. K. Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1018–1024, 2002.

- ORISAKA, M.; ORISAKA, S. J.; JIN-YI, C. J.; WANG, Y.; KOTSUJI, F.; ANDTSANG, B. K. Growth differentiation factor-9 is anti-apoptotic during follicular development from preantral to early antral stage. **Molecular Endocrinology**, v. 20, p. 2456–2468, 2006.
- PORTELA, A.M.L.R.; RIBEIRO, R.P.; COSTA, J.J.N.; ROSSI, R.O.D.S.; PASSOS, J.R.S.; VASCONCELOS, G.L.; DONATO, M.A.M.; PEIXOTO, C.A.; SARAIVA, M.V.A., VAN DEN HURK, R.; SILVA, J.R.V. Effects of different concentrations of concanavalin A and follicle stimulating hormone on goat primordial follicles activation, survival and gene expression. **Small Ruminant Research**, v. 116, n. 2, p.183-191, 2014.
- RICARTE, A. R. F. **Avaliação da susceptibilidade de gametas e embriões caprinos ao vírus da artrite encefalite caprina**. 2009. 114 f. Tese (Doutorado). Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, Ce.
- RODRIGUES, G. Q.; SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; BRUNO, J. B.; MAGALHÃES, D. M.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Bovine serum albumin improves *in vitro* development of caprine preantral follicles. **Animal Reproduction**, v. 7, p. 382-388, 2010.
- SELL, A. M.; COSTA, C. P. Effects of plant lectins on *in vitro* fibroblast proliferation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, p. 349-454, 2003.
- SHEN, Y.; MURAMATSU, S. I.; IKEGUCHI, K.; FUJIMOTO, K. I.; FAN, D. S.; OGAWA, M.; MIZUKAMI, H.; URABE, M.; KUME, A.; NAGATSU, I.; URANO, F.; SUZUKI, T.; ICHINOSE, H.; NAGATSU, T.; MONAHAN, J.; NAKANO, I.; OZAWA, K. Triple transduction with adeno-associated virus vectors expressing tyrosine hydroxylase, aromatic-L-amino-acid decarboxylase, and GTP cyclohydrolase I for gene therapy of Parkinson's disease. **Human Gene Therapy**, v. 11, p.509–1519, 2000.
- SHIMIZU, T.; JIANG, J-Y.; SASADA, H.; SATO, E. Changes of messenger RNA expression of angiogenic factors and related receptors during follicular development in gilts. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1846-1852, 2002.
- 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, 2004a.
- SILVA, C. M. G.; CASTRO, S. V.; FAUSTINO, L. R.; RODRIGUES, G. Q.; BRITO, I. R.; SARAIVA, M. V. A.; ROSSETTO, R.; SILVA, T. F. P.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Moment of addition of LH to the culture medium improves *in vitro* survival and development of secondary goat pre-antral follicles. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 579-584, 2011b.
- SILVA, G. M.; ARAÚJO, V. R.; DUARTE, A. B. G.; CHAVES, R. N.; SILVA, C. M. G.; LOBO, C. H.; ALMEIDA, A. P.; MATOS, M. H. T.; TAVARES, L. M. T.; CAMPELO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Ascorbic acid improves the survival and *in vitro* growth of isolated caprine preantral follicles. **Animal Reproduction**, v. 8, p. 14-24, 2011a.
- SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; VAN TOL, H. T. A.; ROELEN, B. A. J., FIGUEIREDO, J. R. Expression of growth differentiation factor 9 (GDF9), bone morphogenetic protein 15 (BMP15), and BMP receptors in the ovaries of goats. **Genetics**,

Gene Regulation, and Expression. **Molecular Reproduction and Development**, v. 70, p. 1-19, 2004.

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

SUN, R. Z.; LEI, L.; CHENG, L.; JIN, Z. F.; ZU, S. J.; SHAN, Z. Y.; WANG, Z. D.; ZHANG, J. X.; LIU, Z. H. Expression of GDF-9, BMP-15 and their receptors in mammalian ovary follicles. **Journal of Molecular Histology**, v. 41, p. 325–332, 2010.

TRACEY, D.; KLARESKOG, L.; SASSO, E. H.; SALFELD, J. G.; TAK, P. P. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 117, n. 244-279, 2008.

VAN WEZEL, I. L.; DHARMARAJAN, A. M.; LAVRANOS, T. C.; RODGERS, R. J. Evidence for alternative pathways of granulosa cell death in healthy and slightly atretic bovine antral follicles. **Endocrinology**, v.140, p. 2602-2612, 1999.

VAN WEZEL, I. L.; DHARMARAJAN, A. M.; LAVRANOS, T. C.; RODGERS, R. WANG, J.; ROY, S. K. Growth differentiation factor-9 and stem cell factor promote primordial follicle formation in the hamster: modulation by follicle-stimulating hormone. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 577–585, 2004.

WRIGHT, C. S.; HOVATTA, O.; MARGARA, R.; TREW, G.; WINSTON, R. M.; FRANKS, S.; HARDY, K. Effects of follicle-stimulating hormone and sérum substitution on the *in vitro* growth of human ovarian follicles. **Human Reproduction**, v. 14, p. 1555–1562, 1999. YA-DONG, Y.; MING-XING, C.; YONG-QING, Z.; LI, F.; SU-CHENG, Y.; LI-MIN, W.; QING-KUN, G.; DAI-QIN, H.; ZHAO-XIN, Z.; XI-JUN, W.; ZHAO-XIN, Z. Bone morphogenetic protein receptor IB as a candidate gene for prolificacy in Small Tail Han and Hu ewes. *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology*, v. 2, n.2, p. 125-130, 2005.

YOSHINO, O.; MCMAHON, H. E.; SHARMA, S.; SHIMASAKI, S. A unique preovulatory expression pattern plays a key role in the physiological functions of bmp-15 in the mouse. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, p. 10678–10683, 2006.

Table 1. Primer pairs used in real-time PCR.

Target gene	Primer sequence (5' → 3')	Sense (s), anti-sense (As)	Position	GenBank accession no.
β-Tubulin	TTCATTGGCAACAGCACAGCCA	S	1100–1121	GI:11405273 0
	TCGTTTCATGTTGCTCTCAGCCT	As	1229–1250	
β-Actin	ACCACTGGCATTGTCATGGACTCT	S	187-211	GI:28628620
	TCCTTGATGTCACGGACGATTTCC	As	386-410	
PCNA	TGCCGAGATCTCAGTCACAT	S	566-586	GI:77735938
	TATGGCAACAGCTTCCTCTCT	As	695-715	
GDF-9	ACAACACTGTTTCGGCTCTTCAACC	S	332 – 356	GI:51702523
	CCACAACAGTAACACGATCCAGGTT	As	426-451	
BMP-15	AAGTGGACACCCTAGGGAAA	S	237-257	GI: 8925958
	TTGGTATGCTACCCGGTTTGGT	AS	362-384	
BMPR-IB	TTTGGATGGGAAAGTGGCGT	S	653–672	GI:19387658 1
	TGCAGCAATGAAGCCCAAGA	AS	792–811	
TNF-α	CCACGTTGTAGCCGACATCA	S	466-485	GI:40269344 2
	ATGAGGTAAAGCCCGTCAGC	AS	578-597	
TNFR-I	CTGGTGATTGTCTTCGGGCT	S	936-955	GI: 2290397
	TGCCCCGCAAATGATGGAGTA	AS	1020-1039	
TNFR-II	GTAGCTCAGAGGCGTCTTCC	S	102-121	GI:2613148
	GCCGCTGCAAACATTGACA	AS	157 -175	

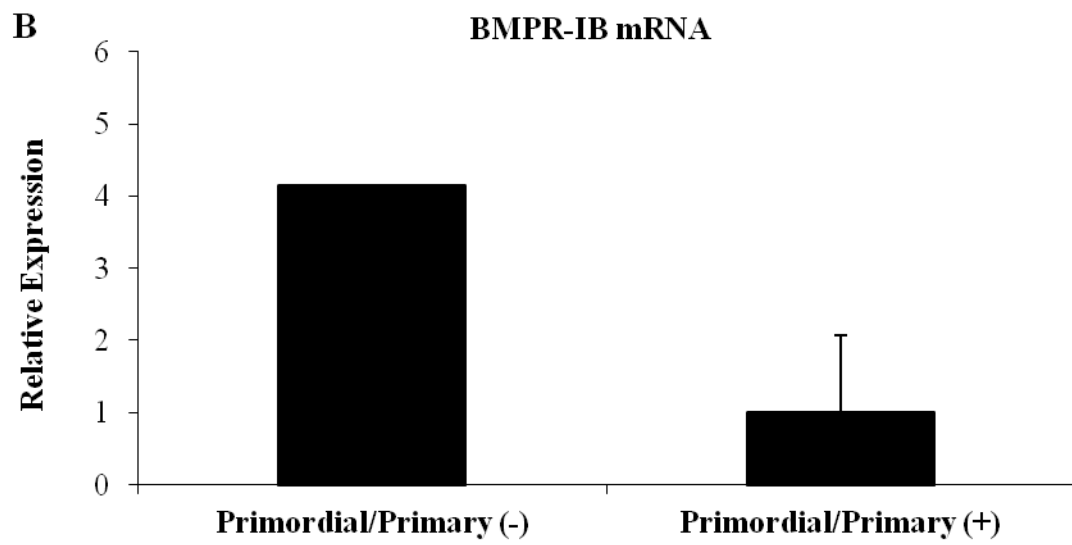
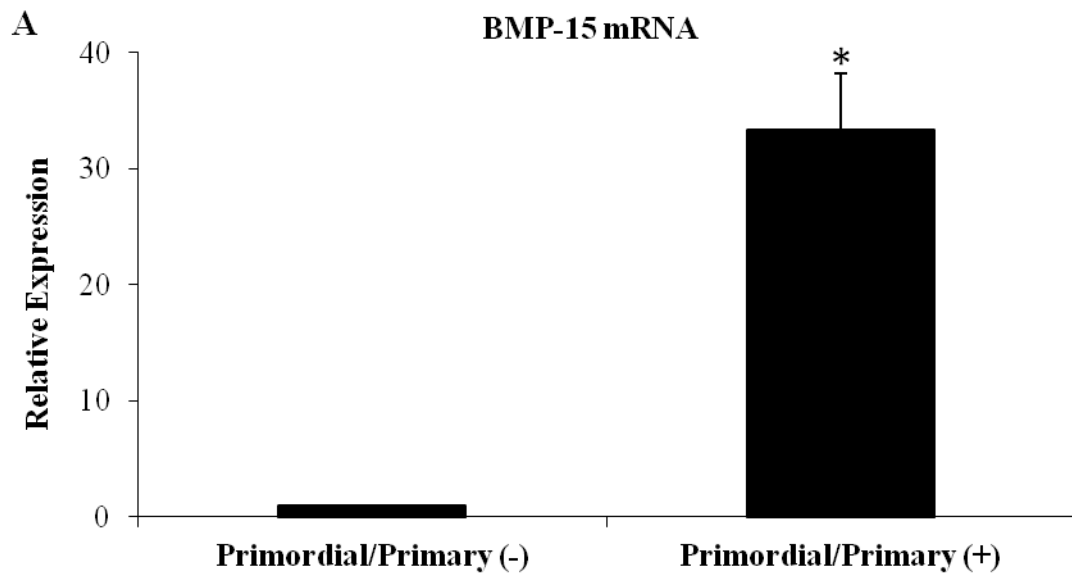
Table 2. Follicle diameters in primordial and primary follicle in non-cultured tissue (day 0) and in tissue cultured for 6 days in days in α -MEM⁺ alone or with EGF, PHA or both, in healthy animals or affected by CAEV.

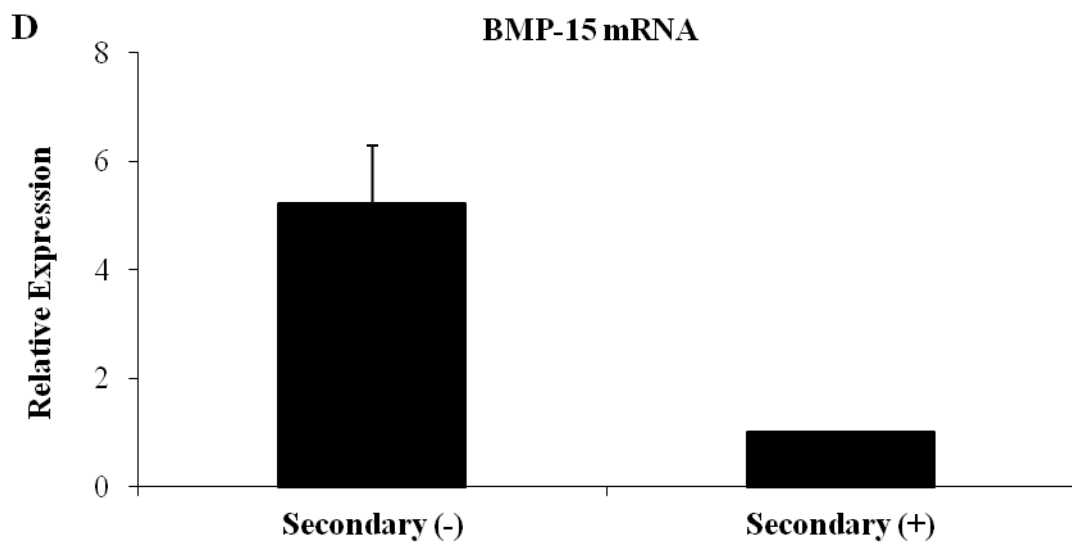
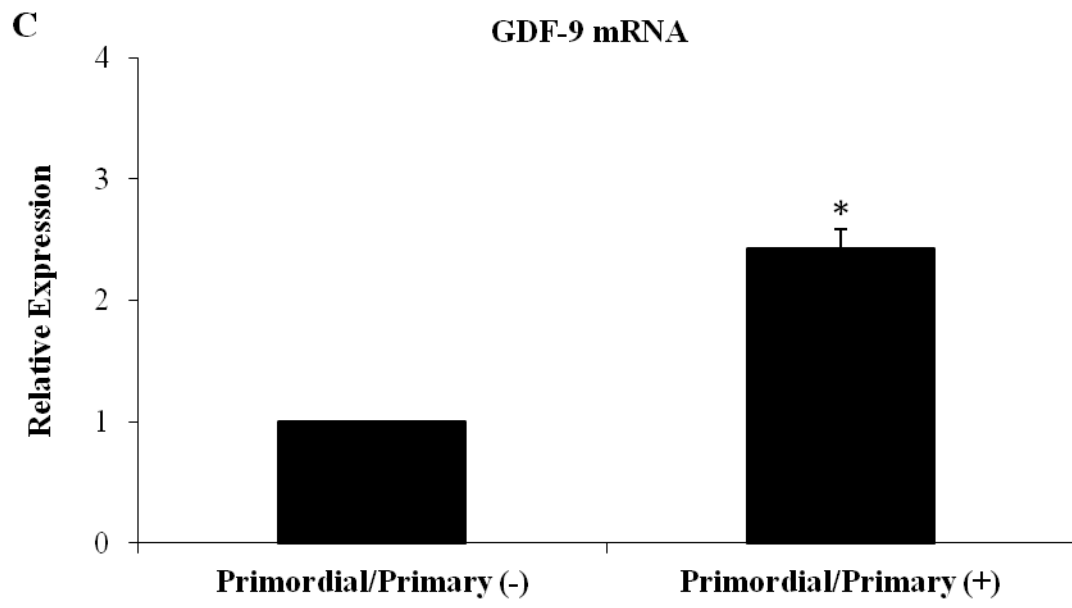
Follicles types		Follicle diameters (mean + S.E.M.)				
		Day 0, (non-cultured)	After 6 days culture			
			MEM	PHA	EGF	PHA+EGF
Primordial	Healthy	27.4±0.8 ^{aA}	26.8±0.7 ^{aA}	26.1±0.8 ^{aA}	32.2±0.4 ^{*bA}	27.4±0.8 ^{aA}
	Infected	27.8±0.7 ^{aA}	28.3±0.7 ^{aA}	28.5±0.8 ^{aB}	32.1±0.4 ^{*bA}	27.8±0.6 ^{aA}
Primary	Healthy	39.2±0.5 ^{aA}	39.2±0.7 ^{aA}	39.0±0.6 ^{aA}	44.0±0.3 ^{*bA}	39.2±0.5 ^{aA}
	Infected	39.1±0.5 ^{aA}	39.1±0.5 ^{aA}	39.7±0.5 ^{aA}	44.2±0.3 ^{*bA}	39.2±0.5 ^{aA}

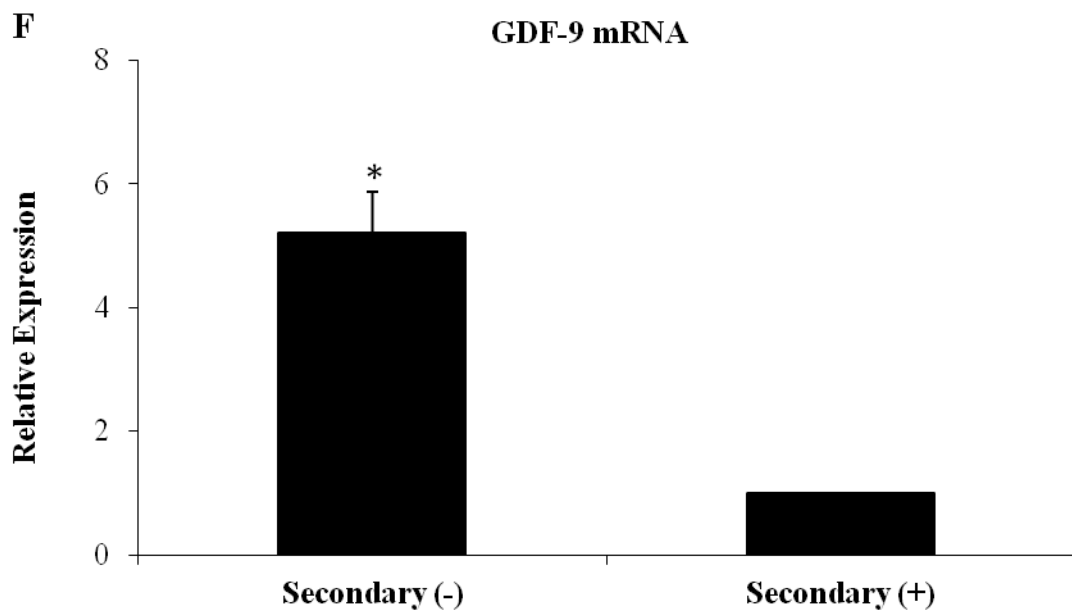
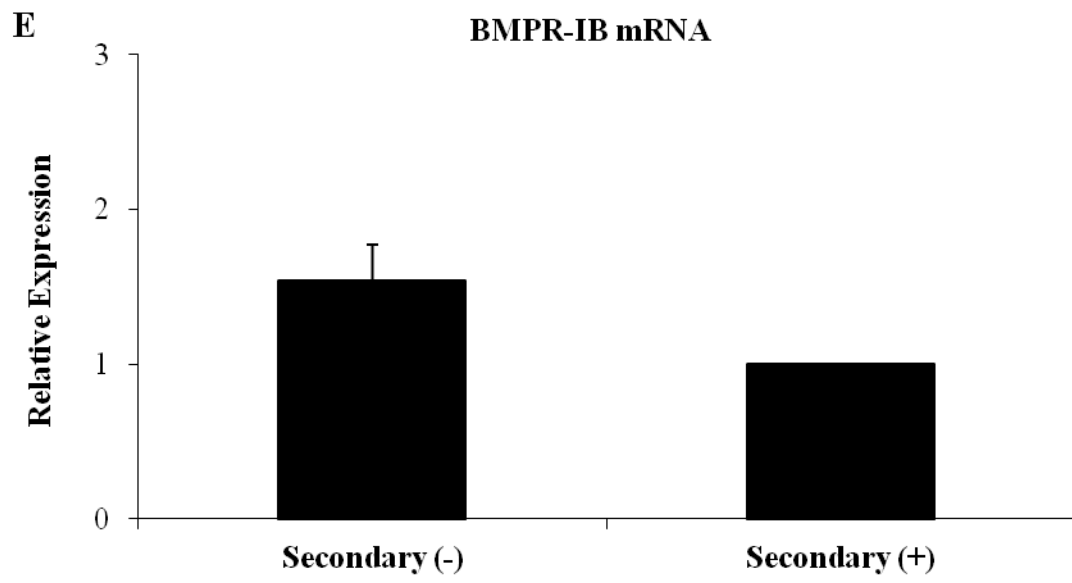
(*)Differs significantly from control (P < 0.05) (P<0.05).

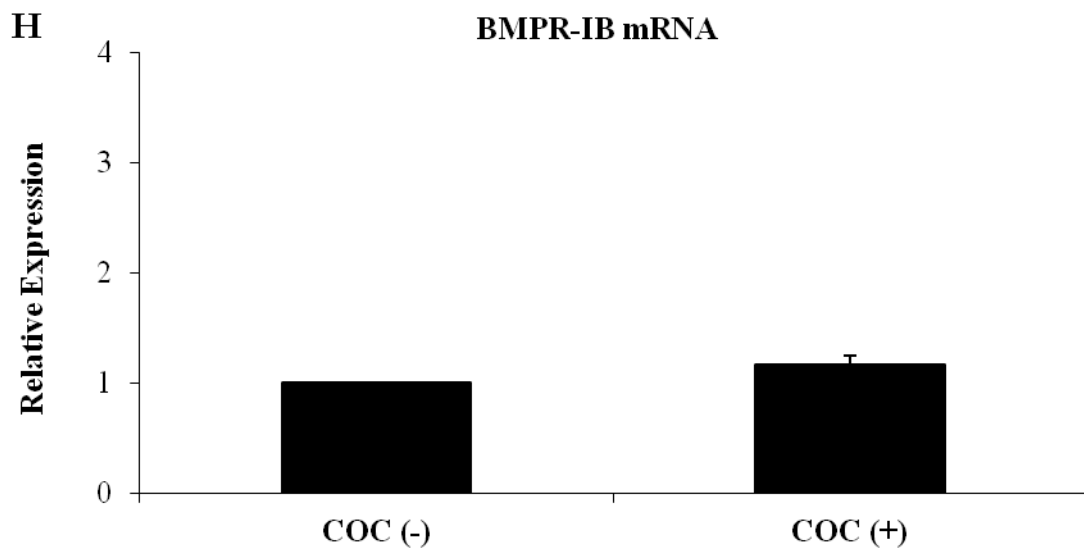
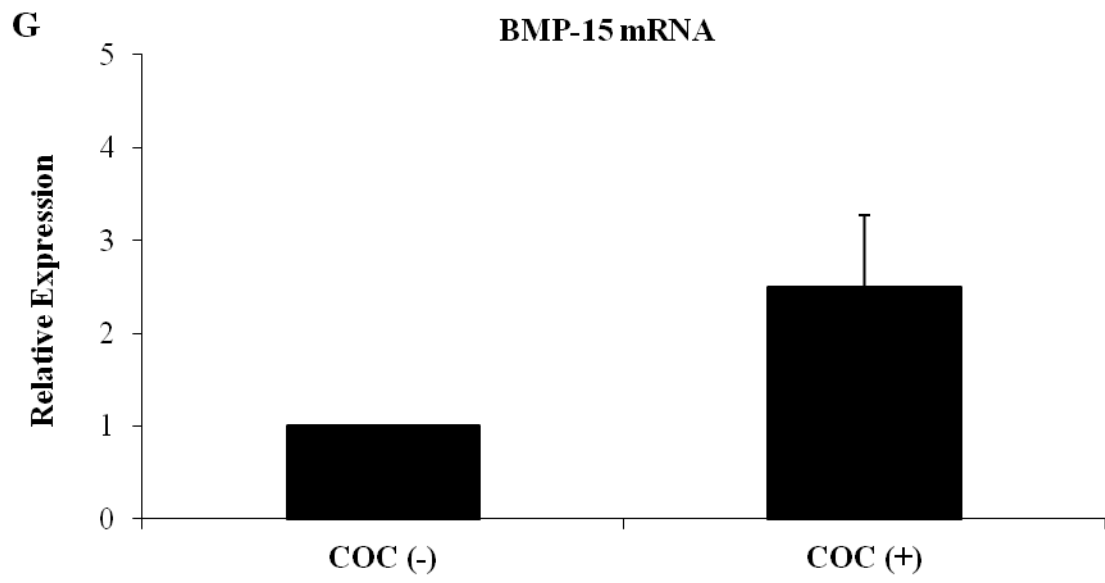
(a, b) Differs significantly between treatments after 6 days of culture(P<0 .05).

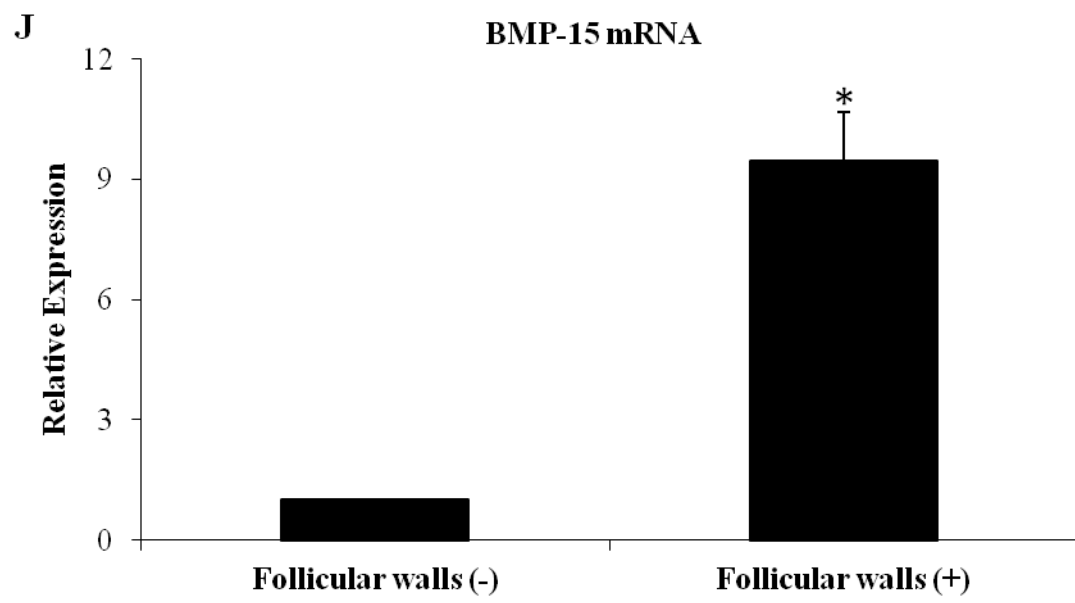
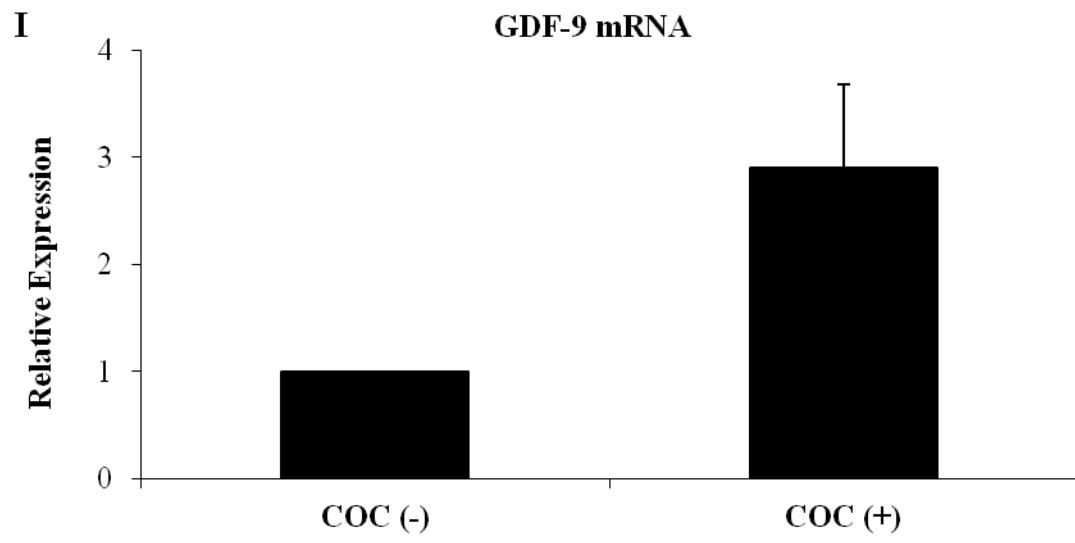
(A, B) Significant difference between infected and healthy animals (P<0.05).











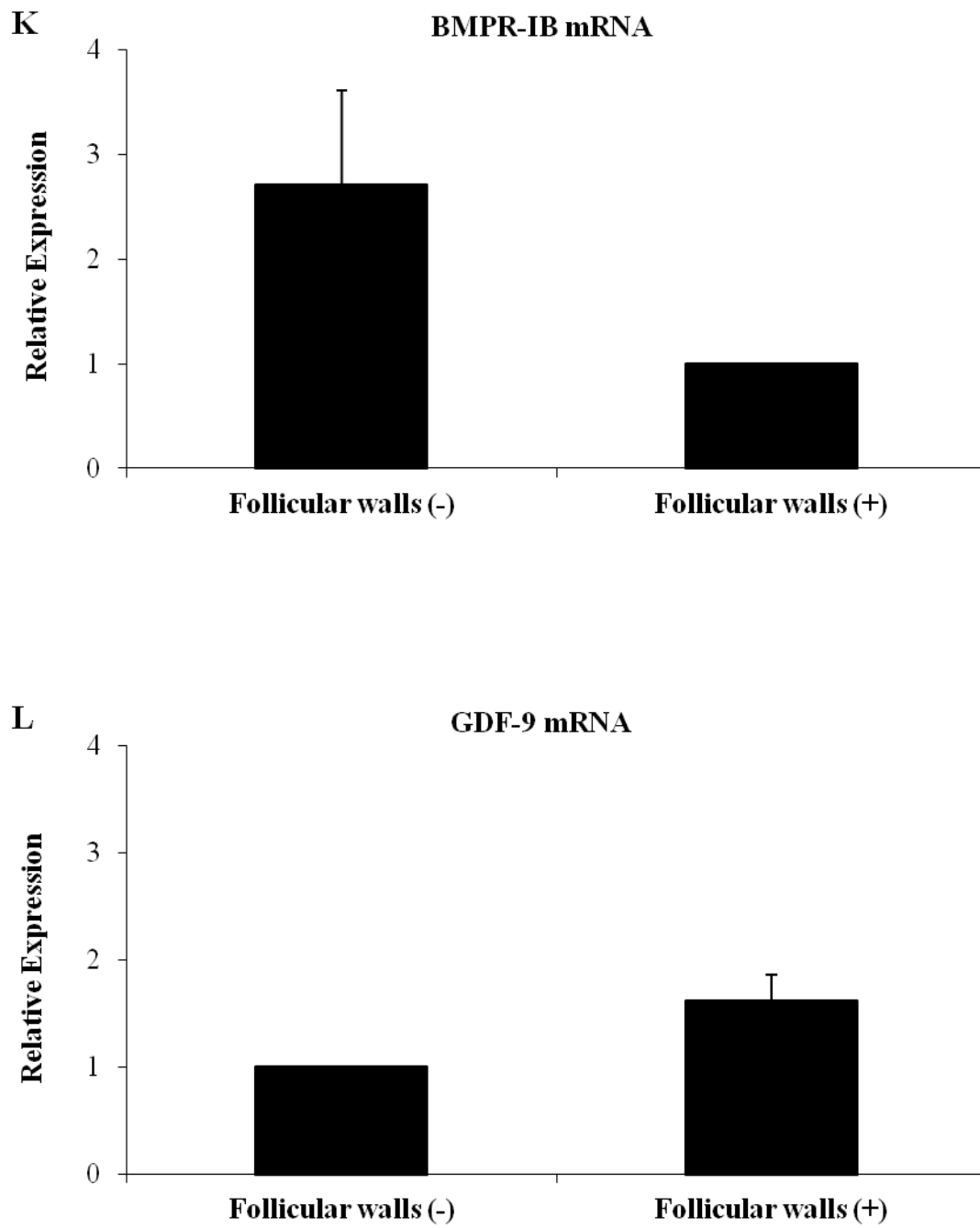


Figure 1. Expression of mRNA for BMP-15, BMPR-IB and GDF-9 in different categories and follicular compartments in infected and healthy animals. (A-C) Primordial/primary follicles; (D-F) Secondary follicles; (G-I) COCs and (J-L) Follicular walls from antral follicles. * Significant difference

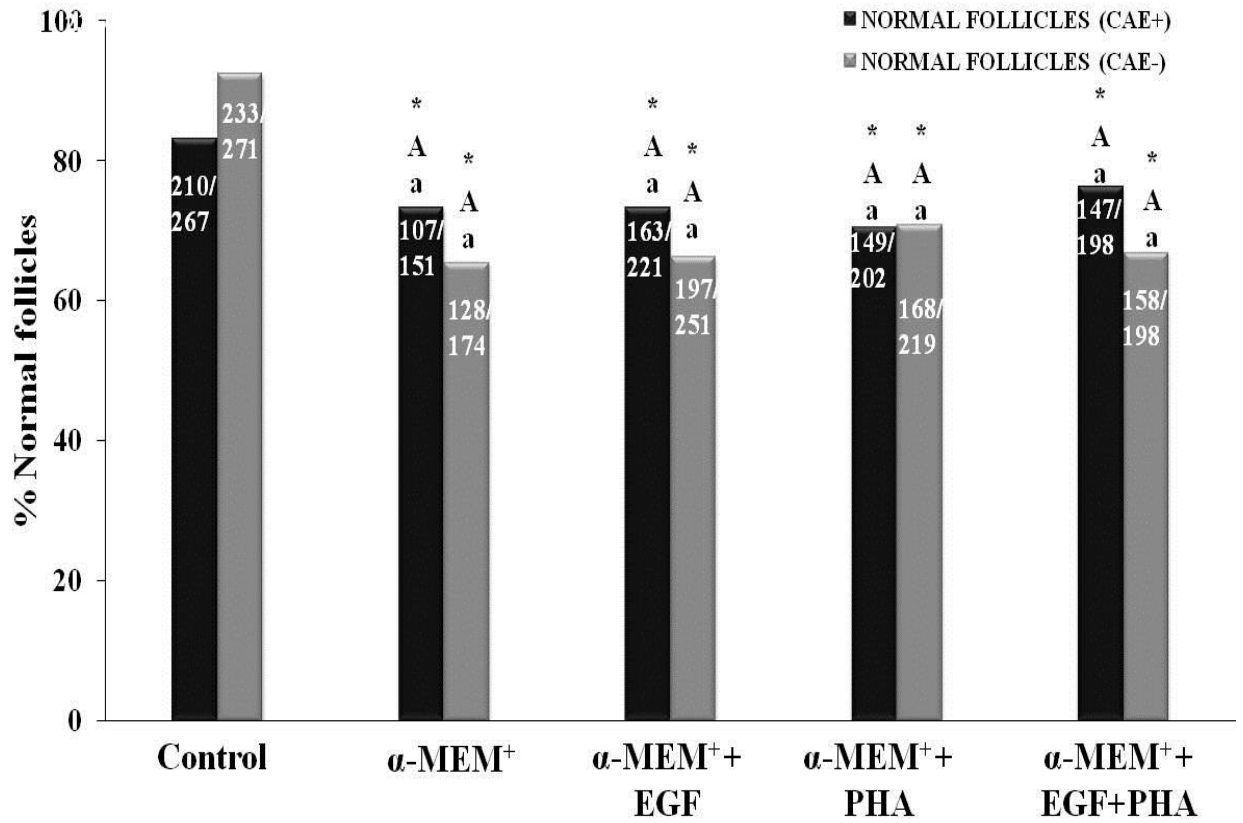


Figure 2. Percentage (mean \pm SEM) of normal follicles in non-cultured tissues and tissues after culture for 6 days in α -MEM⁺ alone or with EGF, PHA or both, in infected and healthy animals. *Differs significantly from control ($P < 0.05$); A,B Differs significantly between treatments ($P < 0.05$); a,b Differs between healthy animals and affected by CAE ($P < 0.05$).

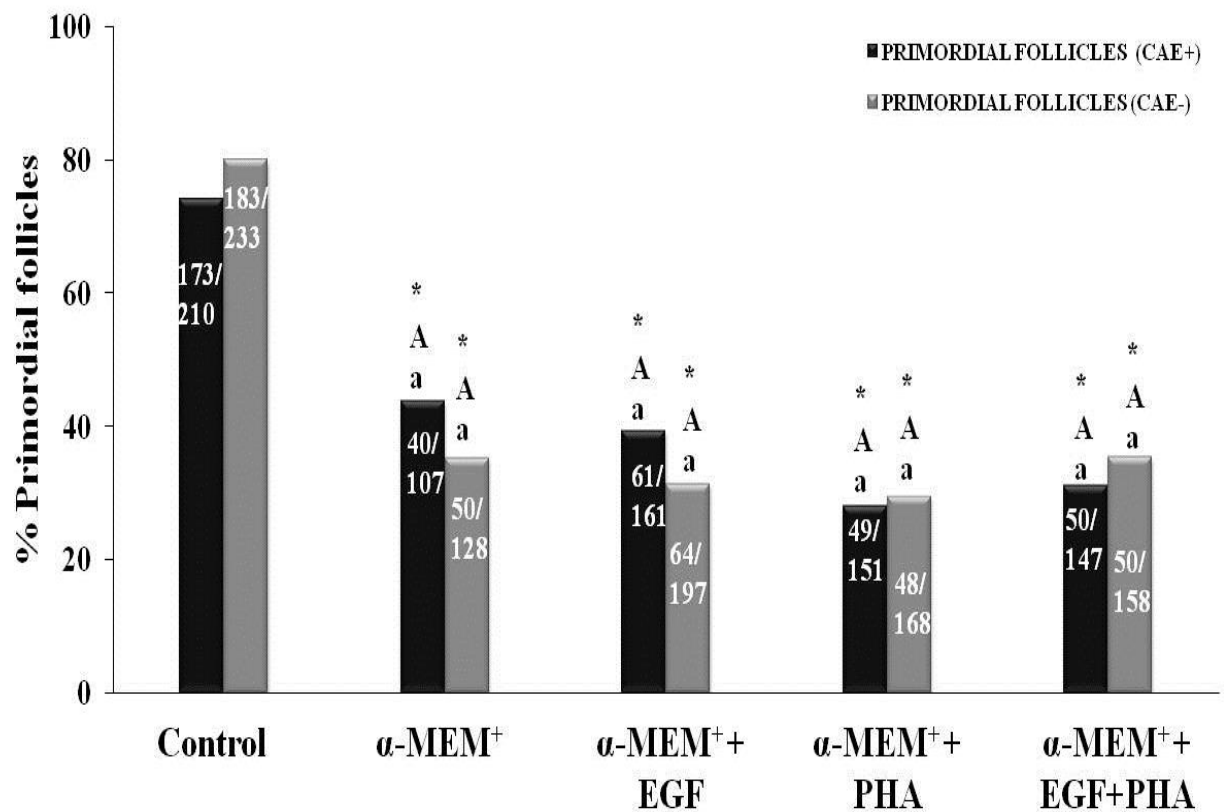


Figure 3. Percentage (mean \pm SEM) of primordial follicles in non-cultured tissues and in tissues cultured for 6 days in α -MEM⁺ alone or with EGF, PHA or both, in infected and healthy animals. *Differs significantly from control ($P < 0.05$); A,B Differs significantly between treatments ($P < 0.05$); a,b Differs between healthy animals and affected by CAE ($P < 0.05$).

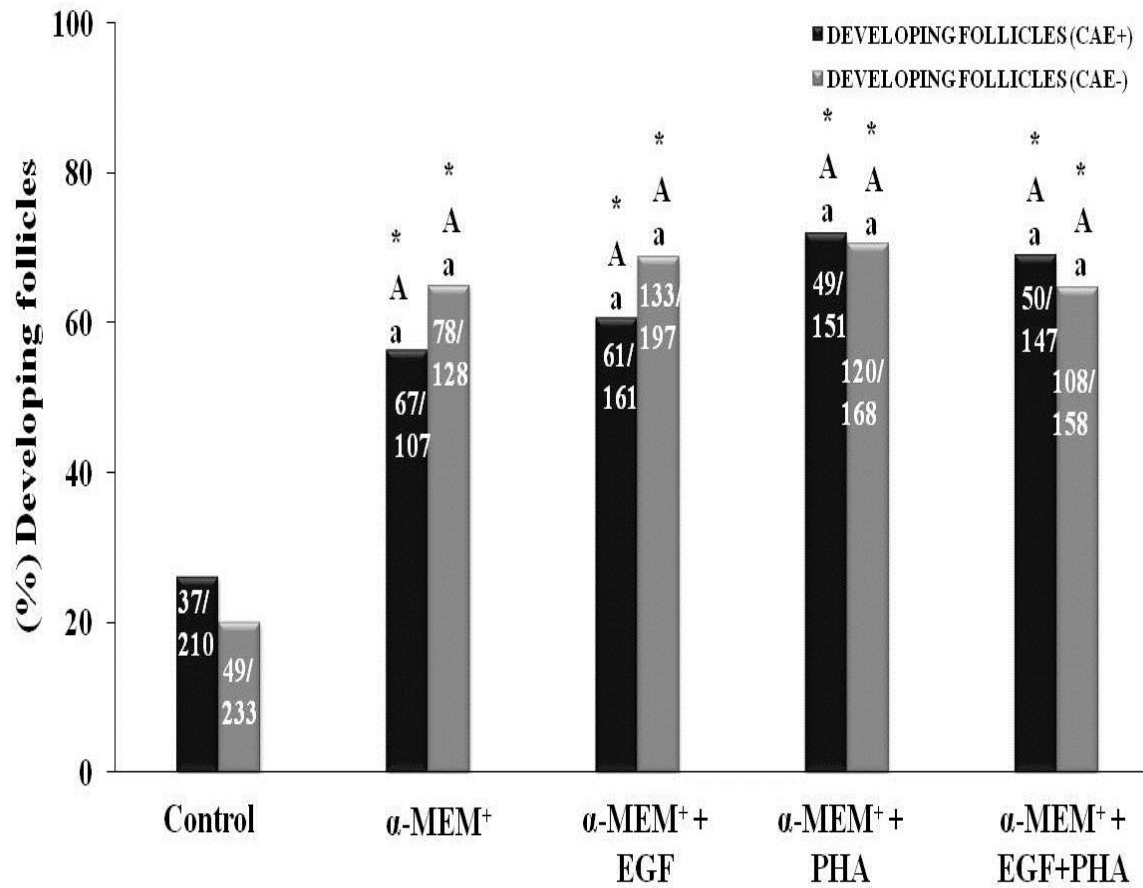
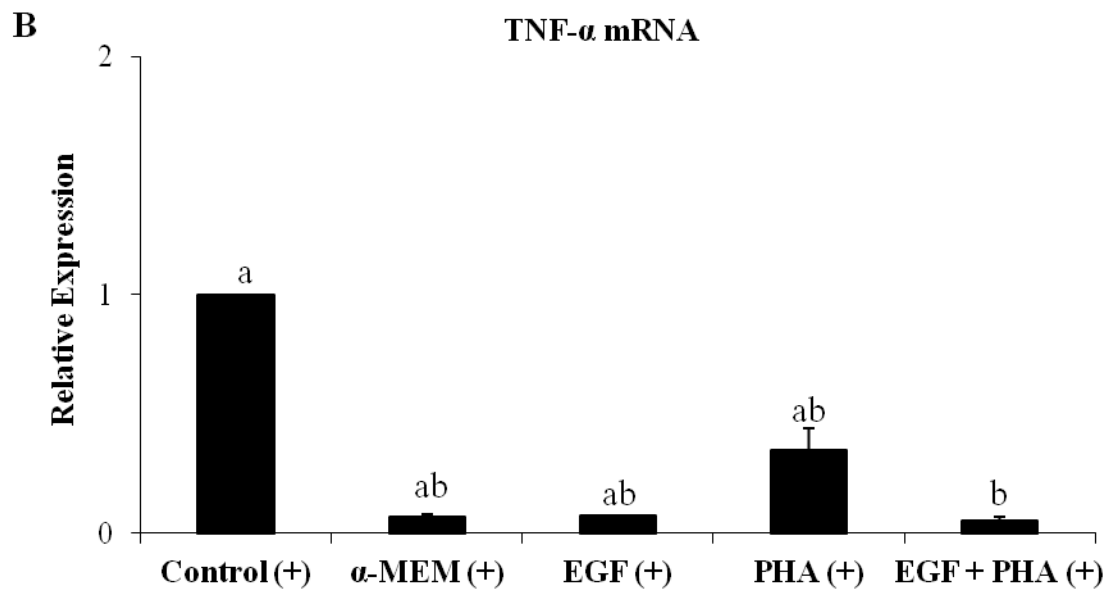
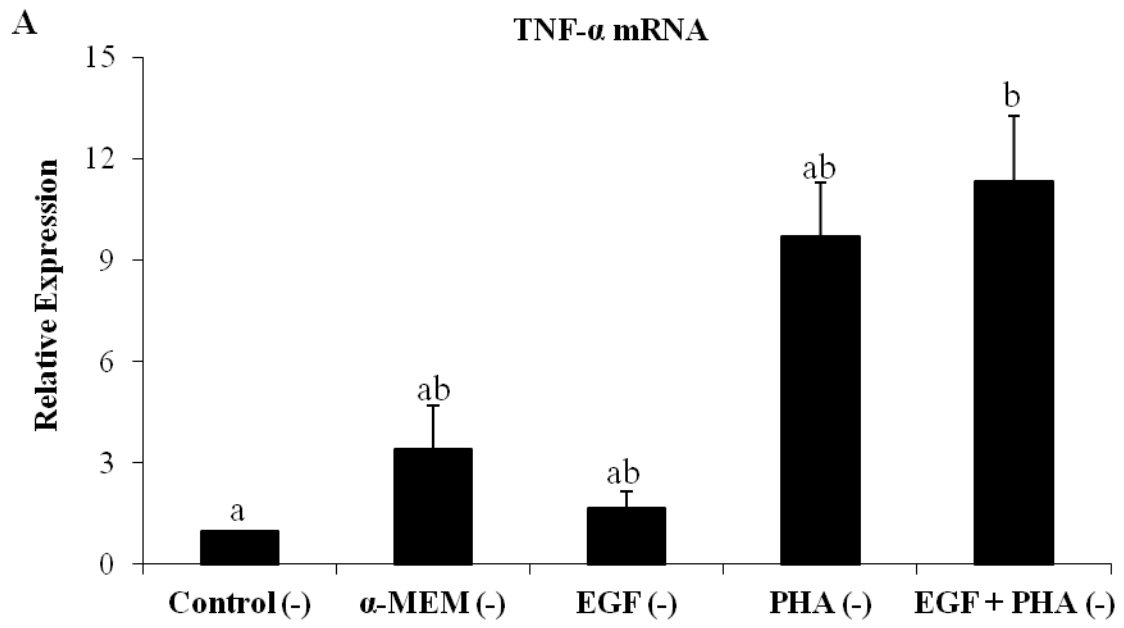
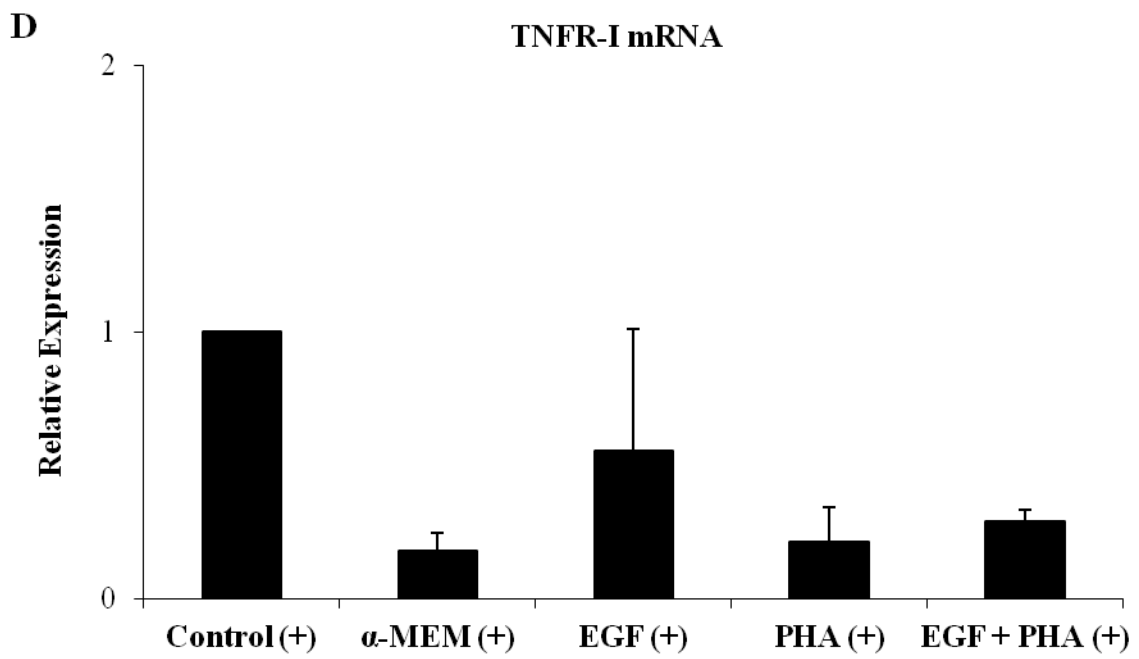
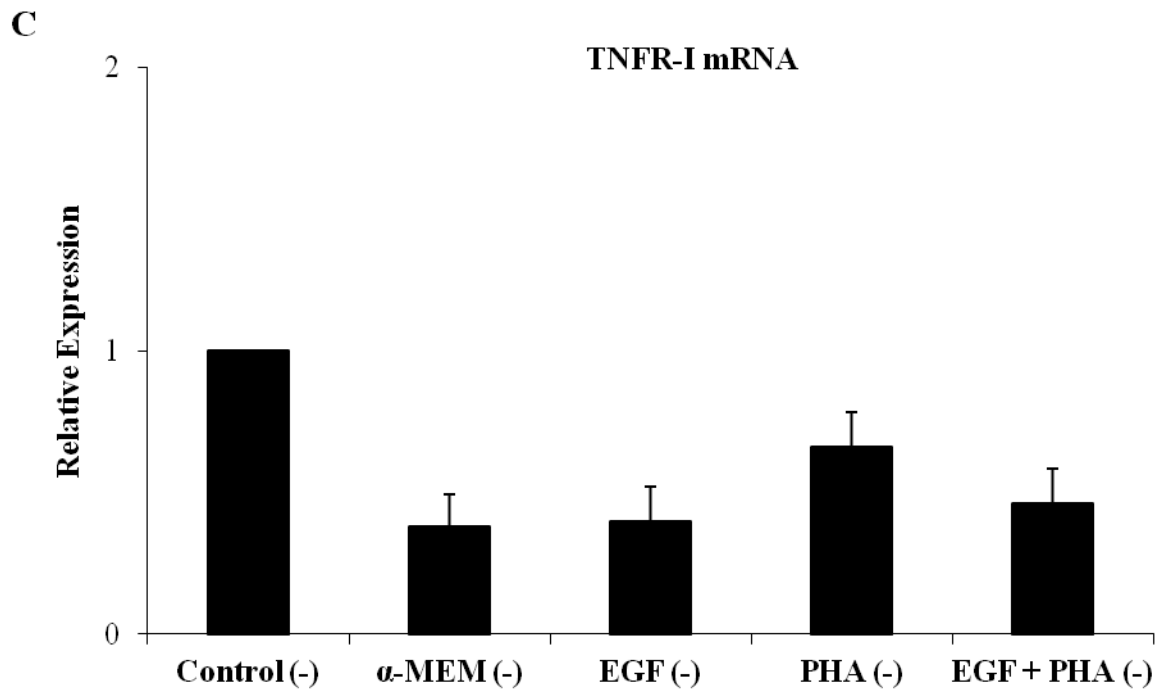


Figure 4. Percentage (mean \pm SEM) of developing follicles in non-cultured tissues and in tissues cultured for 6 days in α -MEM⁺ alone or with EGF, PHA or both, in infected and healthy animals. * Differs significantly from control ($P < 0.05$); A,B Differs significantly between treatments ($P < 0.05$); a,b Differs between healthy animals and affected by CAE ($P < 0.05$).





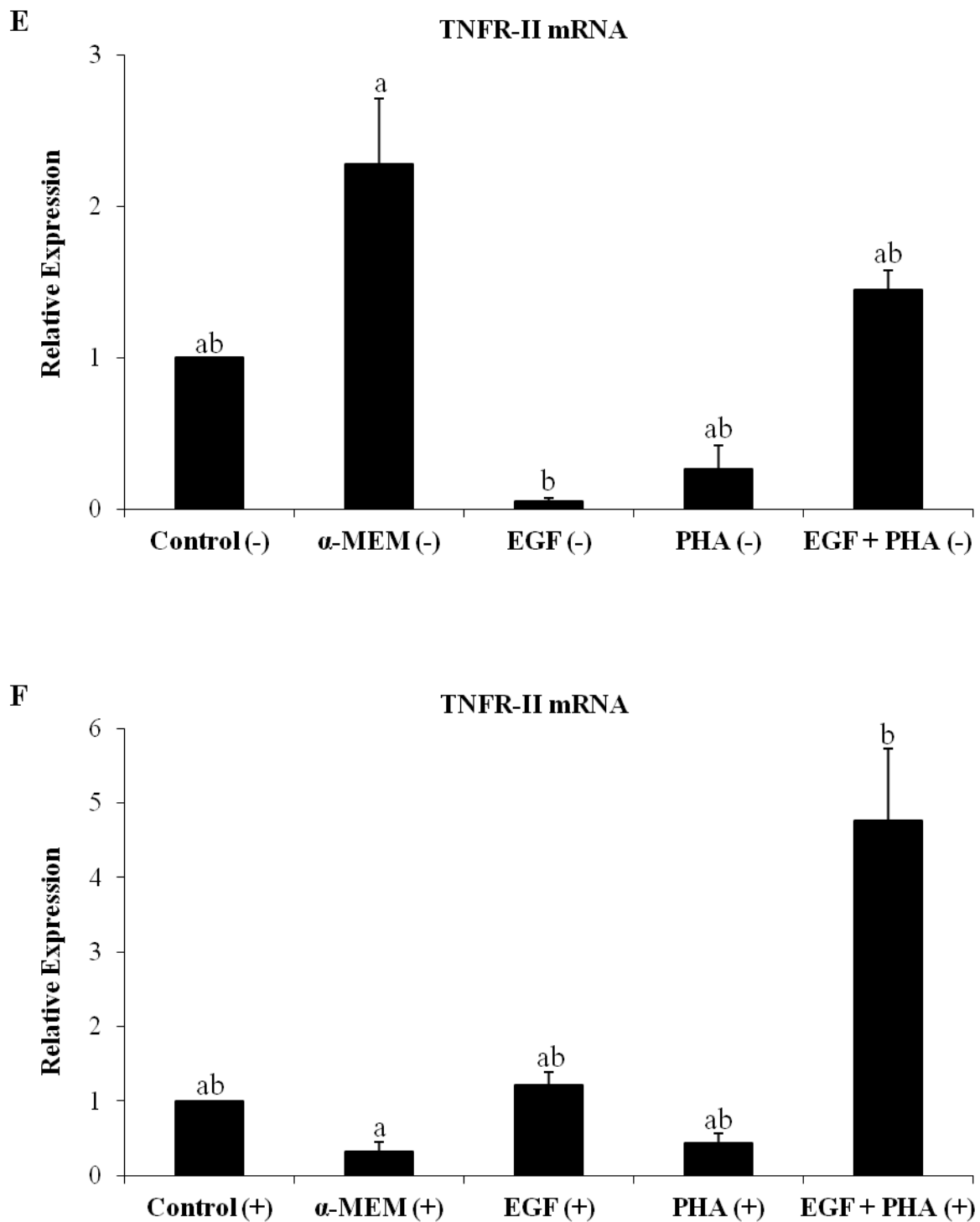


Figure 5. Levels of mRNA expression for TNF- α (A, B), TNFR-I (C, D) and TNFR-II (E, F) in non-cultured tissues and in tissues cultured for 6 days in α -MEM⁺ alone or with EGF, PHA or both, in infected (A, C, E) and healthy (B, D, E) animal. a, b differs between treatments. (-) healthy animals, (+) = infected animals

7. CONCLUSÕES GERAIS

- O vírus da CAE altera os níveis de RNAm para BMP-15 e GDF-9 em folículos ovarianos caprinos, ou seja aumenta a expressão de RNAm de BMP - 15 e GDF - 9 em folículos primordiais e primários mas diminui a expressão de GDF - 9 em folículos secundários.
- Animais positivos para CAEV apresentam maior expressão do RNAm para BMP- 15 em paredes foliculares .
- A CAE, o EGF e a PHA não interferem na transição de folículos primordiais para folículos primordiais *in vitro* durante o período de 6 dias de cultivo.
- A presença de EGF, PHA ou ambos no meio de cultivo promove um aumento nos níveis de RNAm para TNF - α após o cultivo do tecido ovariano de animais saudáveis, mas proporciona uma redução nos transcritos de TNF - α no tecido ovariano cultivado de animais infectados.
- A presença de EGF, PHA ou ambos no meio de cultivo promove um aumento na expressão do RNAm para o TNFR - II durante o cultivo de tecido ovariano de animais infectados, mas não nos animais saudáveis ;

8.PERSPECTIVAS

Os resultados deste trabalho são importantes para a compreensão dos efeitos da CAE durante o desenvolvimento folicular e ovulação, abrindo novas perspectivas para a utilização de material genético de animais de alto valor genético que, por ventura, estejam infectados pelo CAEV. Além disso, os dados dos estudos *in vitro* poderão ser utilizados para aperfeiçoar a elaboração e o fornecimento de meios de cultivo capazes de propiciar ótimas condições para um completo crescimento folicular e preservação da viabilidade celular.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AALTONEN, J.; LAITINEN, M. P.; VUOJOLAINEN, K.; JAATINEN, R.; HORELLI-KUITUNEN, N. Human growth differentiation factor 9 (GDF9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 84, p. 2744-2750, 1999.
- ACKERT, C. L.; GITTENS, J. E.; O'BRIEN, M. J.; EPIG, J. J.; KIDDER, G. M. Intracellular communication via connexin43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse. **Developmental Biology**, v. 233, p. 258-279, 2001.
- ACOSTA, T. J.; YOSHIOKA, S.; KOMIYAMA, J.; LEE, S-H.; GRAZUL-BILSKA, A. T.; SKARZYNSKI, D. J.; OKUDA, K. Effects of storage and passage of bovine luteal endothelial cells on endothelin-1 and prostaglandin F₂ α production. **Journal of Reproduction and Development**, v. 53, n. 3, p. 473-480, 2007.
- ADAMS, D. S.; CRAWFORD, T. B.; BANKS, K. L.; MCGUIRE, T. C.; PERRYMAN, L. E. Immune responses in goats persistently infected with caprine arthritis encephalitis virus. **Infection and Immunity**, v.28, n.2, p.421-427, 1980.
- ADONA, P. R. **Efeito de diferentes inibidores específicos do fator promotor da maturação (MPF) na retenção da meiose em ovócitos bovinos in vitro**. 2002. 68f. Dissertação (Mestrado). Pós Graduação em Ciências Agrárias. Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, RJ.
- ADONA, P.R.; LEAL, C.L.V. Effect of concentration and exposure period to butyrolactone I on meiosis progression in bovine oocytes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 354-359, 2006.
- AL-ANI, F. K. ; VESTWEBER, J. G. E. Caprine arthritis-encephalitis syndrome (CAE): A review. **Veterinary Research Communications [S.I.]**, v. 8, p. 243-253, 1984.
- ALI AL AHMAD, M.Z.; FIENI, F.; MARTIGNAT, L.; CHATAGNON, G.;BARIL, G.; BOUVIER, F.; CHEBLOUNE, Y. Proviral DNA of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) is detected in cumulus oophorus cells but not in oocytes from naturally infected goats. **Theriogenology**, v.64, n.7, p.1656-1666, 2005.
- ALI AL AHMAD, M. Z.; FIENI, F.; PELLERIN, J. L.; GUIGUEN, F.; CHEREL, Y.; CHATAGNON, G.; BOUZAR, A. B.; CHEBLOUNE, Y. Detection of viral genomes of caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) in semen and in genital tract tissues of male goat. **Theriogenology**, v. 69, p. 473-480, 2008a.
- ANDRADE, E. R.; SENEDA, M. M.; ALFIERI, A. A.; OLIVEIRA, J. A.; BRACARENSE, A. P. F. R. 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.
- ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; MOURA SOBRINHO, P. A. Transferência de embriões em cabras naturalmente infectadas pelo lentivírus caprino. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, v. 24, n.5, p. 215-220, 2002.

ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M. G.; PINHEIRO, R. R.; ROCHA, M. A.; MARTINS, A.; SANTOS, D. O. Detecção do DNA pro-viral do lentivírus caprino em sêmen de bodes naturalmente infectados. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, p. 101-106, 1999.

ANDRIOLI, A.; GOUVEIA, A. M.G.; PINHEIRO, R. R. **Seleção de sêmen de reprodutores portadores do vírus da artrite encefalite caprina através da técnica de reação em cadeia da polimerase**. Embrapa Caprinos. (Embrapa-CNPC, Documento, 50). 23p, 2003.

ANDRIOLI-PINHEIRO, A.; SALLES, H. O. ; PINHEIRO, R. R.; MOURA SOBRINHO, P. A.; MARQUES, M. A. J.; MORAES, J. B. Controle da Artrite Encefalite Caprina a Vírus (CAEV) através da transferência de embriões (TE). *In: XV Congresso Panamericano de Ciências Veterinárias*, Campo Grande, PN13- 63, p. 391, 1996.

ANGUITA, B.; JIMENEZ-MACEDO, A.R.; IZQUIERDO, D.; MOGAS, T.; PARAMIO, M.T. Effect of oocyte diameter on meiotic competence, embryo development, p34 (cdc2) expression and MPF activity in prepuberal goat oocytes. **Theriogenology**, v.67, p.526-536, 2007.

ARAÚJO, V. R.; LIMA-VERDE, I. B.; NAME, K. P. O.; BÁO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V. S.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Bone Morphogenetic Protein-6 (BMP-6) induces atresia in goat primordial follicles cultured *in vitro*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n. 9, p.770-776, 2010.

BAERWALD, A. R.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A. Characterization of ovarian follicular wave dynamics in women. **Biology of Reproduction**, v. 3, n. 3, p. 1023-1031, 2003.

BARNETT K, R.; SCHILLING, C.; GREENFELD, C. R.; TOMIC, D.; FLAWS, J. A. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. **Human Reproduction**, v. 13, p. 1-19, 2006.

BARRETA, M.H. ; OLIVEIRA, J.F. ; FERREIRA, R. ; ANTONIAZZI, A.Q.; GASPERIN, B.G.; SANDRI, L.R.; GONÇALVES, P.B. Evidence that the effect of angiotensin II on bovine oocyte nuclear maturation is mediated by prostaglandins E2 and F2 alpha. **Reproduction**. v. 136, n. 6, p. 733-40, 2008.

BEGIN, I.; BHATIA, B.; RAO, K.; KEYSTON, R.; PIERSON, J. T.; NEVEU, N. Pregnancies resulted from goat NT embryos produced by fusing couplets in the presence of lectin. **Reproduction, Fertility and Development**, p. 16-136, 2004.

BLONDIN, P.; SIRARD, M. A. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 41, p.54-62, 1995.

BODENSTEINER, K.J.; CLAY, C.M.; MOELLER, C.L.; SAWER, H.R. Molecular cloning of the ovine growth/differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 381-386, 1999.

BOLAMBA, D.; RUSS, K.D.; HARPE, S.A.; SANDLER, J.; DURRANT, B.S. Effects of epidermal growth factor and hormones on granulosa expansion and nuclear, **Theriogenology**, v. 65, p.1037-1047, 2006.

BOLAND, N. I.; GOSDEN, R. G. Effects of epidermal growth factor on the growth and differentiation of cultured mouse ovarian follicles. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 101, p. 369-374, 1994.

BRÄNNSTRÖM, M.; BONELLO, N.; WANG, L. J.; NORMAN, R. J. Effects of human necrosis factor α (TNF α) on ovulation in the rat ovary. **Reproduction Fertility and Development**, v. 7, n. 1, p. 67-73, 1995.

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

BREVINI-GANDOLFI, T. A. L.; GANDOLFI, F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic componentes and their effects on early development. **Theriogenology**, v. 55, p. 1255-1276, 2001.

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

CAIXETA, E. S., SUTTON Mc-DOWALL, M. L., GILCHRIST, R. B., THOMPSON, C. A. P., MACHADO, M. F., LIMA, P. F., BURATINI, J. Bone morphogenetic protein 15 and fibroblast growth factor 10 enhance cumulus expansion, glucose uptake, and expression of genes in the ovulatory cascade during *in vitro* maturation of bovine cumulus–oocyte complexes. **Reproduction**, v. 146, n. 1, p. 27-3, 2013.

CARPENTER, G. Employment of the epidermal growth factor receptor in growth factor-independent signaling pathways. **Journal of Cell Biology**, v. 146, p. 697-702, 1999.

CAVADA, B. S.; BARBOSA, T.; ARRUDA, S.; GRANGEIRO, T. B.; BARAL-NETO, M. Revisiting *proteus*: do minor changes in lectin structure matter in biological activity? Lessons from and potential biotechnological uses of the Diocleinae subtribe lectins. **Current Protein & Peptide Science**, v. 2, p. 1–13, 2001.

CAVALCANTE, A. R. F.; ANDRIOLI, A.; PINHEIRO, R. R.; SOUZA, C. K.; VERAS, A. K. A.; LOPES, A. T.; SOUSA, D.; SILVA, F. A. P. Detecção do vírus da Artrite Encefalite Caprina por *nested* PCR e *nested* RT-PCR em ovócitos e fluido uterino. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.80, n.4, p. 381-386, 2013.

CELESTINO, J. J. H.; BRUNO, J. B.; LIMA-VERDE I. B.; MATOS, M. H. T.; SARAIVA, M. V. A.; CHAVES, R. N.; MARTINS, F. S.; LIMA, L. F.; NAME, K. P. O.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R.V.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Recombinant Epidermal Growth Factor Maintains Follicular Ultrastructure and Promotes the Transition to Primary Follicles in Caprine Ovarian Tissue Cultured *in vitro*. **Reproductive Science**, v. 16, p. 239-246, 2009.

CELESTINO, J. J. H; LIMA-VERDE, I. B.; BRUNO, J. B.; MATOS, M. H.; CHAVES, R. N.; SARAIVA, M. V.; SILVA, C. M.; FAUSTINO, L. R.; ROSSETTO, R.; LOPES, C. A.; DONATO, M. A.; PEIXOTO, C. A.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Steady-state level of bone morphogenetic protein-15 in goat ovaries and its influence on *in*

in vitro development and survival of preantral follicles. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 338, n. 1-2, p. 1-9, 2011.

CELESTINO, J.J.H.; MATOS, M. H. T.; SARAIVA, M. V. A.; FIGUEIREDO, J. R. Regulation of ovarian folliculogenesis by Kit Ligand and the c-Kit system in mammals. **Animal Reproduction Science**, v.6, n.3, p.431-439, 2009.

.CHANG, H.; BROWN, C.W.; MATZUK, M. M. Genetic Analysis of the Mammalian TGF- β Superfamily. **Endocrine Reviews**, v. 23, p.787 – 823, 2002.

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

CHU, M.X.; LIU, Z.H.; JIAO, C.L.; HE, Y.Q.; FANG, L.; YE, S.C.; CHEN, G.H. WANG, J.Y. Mutations in BMPR-1B and BMP-15 genes are associated with litter size in Small Tailed Han Sheep (*Ovis aires*). **Journal of Animal Science**, v.85, n.3, p.598-603, 2007.

CORK, L. C.; HADLOW, W. J.; CRAWFORD, T. B.; GORHAM, J. R.; PIPER, R. C. Infectious Leukoencephalomyelitis of young goats. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 129, n. 2, p. 134-141, 1974.

CORTVRINDT, R.; SMITZ, J. *In vitro* follicle growth: achievements in mammalian species. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 36, p. 3-9, 2001.

CRAWFORD, T.; ADAMS, D.; CHEEVERS, W. Chronic arthritis in goats caused by a retrovirus. **Science**, v. 207, p.997-999. 1980.

CUNHA, E. V.; COSTA, J. J. N.; ROSSI, R. O. D. S.; SILVA, A. W. B.; PASSOS, J. R. S.; PORTELA, A. M. L. R.; PEREIRA, D. C. S. T.; DONATO, M. A. M.; CAMPLEO, C. C.; SARAIVA, M. V. A.; PEIXOTO, C. A.; SILVA, J. R. V.; SANTOS, R. P. Phytohemagglutinin improves the development and ultrastructure of *in vitro*-cultured goat (*Capra hircus*) preantral follicles. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 46, n. 3, p. 245–252, 2013.

CUTLIP, R. C.; SACKS, J. M.; WEAVER, A. L. Prevalence of antibody to caprine arthristis-encephalitis virus in goats in the United States. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 200, n. 6, p. 802-805, 1992.

CYERT, M. S.; KIRSCHNER, M. W. Regulation of MPF activity *in vitro*. **Cell**, v. 53, p. 185-195, 1988.

DAVIS, G. H. Major genes affecting ovulation rate in sheep. **Genetics Selection Evolution**, v. 37, p. 11-23, 2005.

DAVIS, G. H.; McEWAN, J. C.; FENNESSY, P. F.; DODDS, K. G.; FARQUHAR, P. A. Evidence for the presence of a major gene influencing ovulation rate on the X-chromosome of sheep. **Biology of Reproduction**, v.44, n.4, p.620-624, 1991.

DONG, J. W.; ALBERTINI, D. F.; NISHIMORI, K.; KUMAR, T. R.; LU, N. F.; MATZUK, M. M. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. **Nature**, v. 383, p. 531–535, 1996.

DONNISON, M.; PFEFFER, P.L. Isolation of genes associated with developmentally competent bovine oocytes and quantification of their levels during development. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 23-32, 2004.

DOWNNS, S. M. Factors affecting the resumption of meiotic maturation in mammalian oocytes. **Theriogenology**, v.39, p.65-79, 1993.

DRIANCOURT, M. A.; CAHILL, L. P.; BINDON, B. M. Ovarian follicular populations and preovulatory enlargement in Booroola and control Merino ewes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 73, p. 93-107, 1985.

DUBE, J.L.; WANG, P.; ELVIN, J.; LYONS, K.M.; CELESTE, A.J.; MATZUK, M.M. The bone morphogenetic protein 15 gene is X-linked and expressed in oocytes. **Molecular Endocrinology**, v. 12, p. 1809-1817, 1998.

DUBEUF, J. P.; MORAND-FEHR, P.; RUBINO, R. Situation, changes and future of goat industry around the world. **Small Ruminant Research**, v. 51, 165–173, 2004.

ELVIN, J. A.; CLARK, A. T., WANG, P.; WOLFMAN, N. M.; MATZUK, M. M Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. **Molecular Endocrinology**, v. 13, p. 1035–1048, 1999b.

ELVIN, J. A.; YAN, C.; WANG, P.; NISHIMORI, K.; MATZUK, M. M. Molecular characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor 9-deficient ovary. **Molecular Endocrinology**, v. 13, p. 1018–1034, 1999a.

EPPIG, J. J. Intercommunication between mammalian oocyte and companion somatic cell. **Bioassays**, v. 13, n.11, p. 569-574, 1991.

EPPIG, J. J.; CHESNEL, F.; HIRAO, Y.; O'BRIEN, M. J.; PENDOLA, F. L.; WATANABE, S.; WIGGLESWORTH, K. Oocyte control of granulosa cell development: how and why. **Human Reproduction**, v. 12, p. 127-132, 1997.

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

EPPIG, J. J.; VIVEIROS, M. M.; BIVENS, C. M.; DE LA FUENTE, R. Regulation of mammalian oocyte maturation. *In*: LEUNG, P. C.; ADASHI, E. Y.; **The Ovary**. San Diego: Elsevier, p.113-129. 2004.

ERICKSON, B. H.; REYNOLDS, R. A.; MURPHREE R. L. Late effects of 60 Co gamma radiation on the bovine oocyte as reflected by oocyte survival, follicular development, and reproductive performance. **Radiation Research**, v. 68, p. 132-137, 1976a.

ERICKSON, B. H.; REYNOLDS, R. A.; MURPHREE, R. L. Ovarian characteristics and reproductive performance of the aged cow. **Biology of Reproduction**, v. 15, p. 555-560, 1976b.

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

ERICKSON, G. F.; WILLIAMS, C. J. **Morphology and physiology of the ovary**. Endotext, Chapter 2, 2008.

FABRE, S.; PIERRE, A.; MULSANT, P.; BODIN, L.; DI PASQUALE, E.; PERSANI, L.; MONGET, P.; MONNIAUX, D. Regulation of ovulation rate in mammals: contribution of sheep genetic models. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 4, n. 20, p. 1-12, 2006.

FAGBOHUN, C. F.; DOWNS, S. M. Maturation of the mouse oocyte-cumulus cell complex: stimulation by lectins. **Biology of Reproduction**, v.42, p.413-423, 1990.

FARIN, C.E.; RODRIGUEZ, K.F.; ALEXANDER, J.E.; HOCKNEY, J.E.; HERRICK, J.R.; KENNEDY-STOSKOPF, S. The role of transcription in EGF- and FSH-mediated oocyte maturation *in vitro*. **Animal Reproduction Science**. v. 98, p.97-112, 2007.

FIENI, F.; ROWE, J.; VAN HOOSEAR, K.; BURUCOA, C.; OPPENHEIM, S.; ANDERSON, G.; MURRAY, J.; BONDURANT, R. Presence of caprine arthritis encephalitis virus (CAEV) infected cells in flushing media following oviductal stage embryo collection. **Theriogenology**, v. 57, p.931-940, 2002.

FIGUEIREDO, J. R.; HULSHOF, S.C.; THIRY, M.; VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M.M.; NUSGENS, B.; BECKERS, J.F. Extracellular matrix proteins and basement membrane: their identification in bovine ovaries and significance for the attachment or cultured preantral follicles. **Theriogenology**, v. 5, p. 845-858, 1995.

FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais - MOIFOPA. *In*: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, 2001. p. 227-260.

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

FINDLAY, J. K.; DRUMMOND, A. E.; DYSON, M. L.; BAILLIE, A. J.; ROBERTSON, D. M.; ETHIER, J. F. Recruitment and development of the follicle; the roles of the transforming growth factor-beta superfamily. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 191, p. 35-43, 2002.

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

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

FOULADI NASHTA, A. A.; WADDINGTON, D.; CAMPBELL, K. H. S. Maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest and subsequent development in vitro: a comparative evaluation of antral follicle culture with other methods. **Biology of Reproduction**. v. 59, p. 255-262, 1998.

GALL, L.; CHENE, N., DAHIREL, M.; RUFFINI, S.; BOULESTEIX, C. Expression of epidermal growth factor receptor in the goat cumulus-oocyte complex. **Molecular Reproduction and Development**, v. 67, p. 439-445, 2004.

GALLOWAY, S. M.; MCNATTY, K. P.; CAMBRIDGE, L. M.; LAITINEN, M. P.; JUENGEL, J. L.; JOKIRANTA, T. S.; MCLAREN, R. J.; LUIRO, K.; DODDS, K. G.; MONTGOMERY, G. W.; BEATTIE, A. E.; DAVIS, G. H.; RITVOS, O. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. **Nature Genetics**, v. 25, n. 3, p. 279-83, 2000.

GARNETT, K.; WANG, J.; ROY, S. K. Spatiotemporal expression of EGF receptor messenger RNA and protein in the hamster ovary: follicle stage specific differential modulation by follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, estradiol, and progesterone. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1593-1604, 2002.

GILCHRIST, R. B.; RITTER, L. J.; ARMSTRONG, D.T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 431-446, 2004.

GINTHER, O. J.; WILTBANK, M. C.; FRICKE, P.M.; GIBBONS, J. R.; KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology of Reproduction**, v.55, p.1187-1194, 1996.

GIOMETTI, I. C.; BERTAGNOLLI, A. C.; ORNES, R. C.; DA COSTA, L. F.; CARAMBULA, S. F.; REIS, A. M.; DE OLIVEIRA, J. F.; EMANUELLI, I. P.; GONÇALVES, P. B. Angiotensin II reverses the inhibitory action produced by theca cells on bovine oocyte nuclear maturation. **Theriogenology**, v.63, n.4, p.1014-25. 2005.
GONZALEZ, A. M. **Inmunologia veterinaria**. México: Editorial Diana, 1989. p.497.

GORDON, I. Prenatal development of the bovine ovary. *In*: GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos**. Cambridge: Raven Press, 1994. p. 4349.

GOTARDI, F.P. **Inibição da maturação nuclear pela butirolactona I durante o transporte de oócitos bovinos destinados à produção in vitro de embriões (PIV)**. 2009. 74p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Reprodução Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, Sp.

GOTTSCH, M. L.; VAN KIRK, E. A.; MURDOCH, W. J. Tumour necrosis factor α up-regulates matrix metalloproteinase-2 activity in periovulatory ovine follicles: metamorphic and endocrine implications. **Reproduction Fertility Development**, v. 12, n. 1-2, p. 75-80, 2000.

GOUGEON, A. Dynamics for human follicular growth: morphologic, dynamic, and functional aspects. *In*: LEUNG, P. C. K.; ADASHI, E. Y. **The ovary**. 2. ed. San Diego: Elsevier Academic Press; 2004. p. 25–43.

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

GUERPEL, X.; BRUN, V.; GOUGEON, A. Oocyte bone morphogenetic protein 15, but not growth differentiation factor 9, is increased during gonadotropin-induced follicular development in the immature mouse and is associated with *cumulus oophorus* expansion. **Biology of Reproduction**, v. 75, p. 836–843, 2006.

GUIBAULT, L. A.; DUFOUR, J. J.; THATCHER, W. W.; DROST, M.; HAIBEL, G. K. Ovarian follicular development during early pregnancy in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**. v. 78, p. 127-135, 1986.

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.

HAASE, A. T. The pathogenesis of lentivirus infections. **Nature**, v. 322, p. 130-136, 1986.

HANRAHAN, J. P.; GREGAN, S. M.; MULSANT, P.; MULLEN, M.; DAVIS, G. H.; POWELL, R.; GALLOWAY, S. M. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 900–909, 2004.

HANSEN, K. R.; KNOWLTON, N. S.; THYER, A. C.; CHARLESTON, J. S.; SOULES, M. R.; KLEIN, N. A. A new model of reproductive aging: the decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause. **Human Reproduction**. v. 23, p. 699-708, 2008.

HATOYA, S.; SUGIYAMA, Y.; NISHIDA, H.; OKUNO, T.; TORII, R.; SUGIURA, K.; KIDA, K.; KAWATE, N.; TAMADA, H.; INABA, T. Canine oocyte maturation in culture: Significance of estrogen and EGF receptor gene expression in cumulus cells. **Theriogenology**, v. 71, p. 560-567, 2008.

HAYASHI, M.; MCGEE, E. A.; MIN, G.; KLEIN, C.; ROSE, U. M.; VAN DUIN, M.; HSUEH, A. J. W. Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early follicles. **Endocrinology**, v. 140, p. 1236-1244, 1999.

HENDERSON, K. M.; McNATTY, K. P.; O'KEEFFE, L. E.; LUN, S.; HEATH, D. A.; PRISK, M. D. Differences in gonadotrophin-stimulated cyclic AMP production by granulosa cells from booroola x merino ewes which were homozygous, heterozygous or non-carriers of a fecundity gene influencing their ovulation rate. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 81, p. 395–402, 1987.

HILLIER, S. G. Paracrine support of ovarian stimulation. **Molecular Human Reproduction**, v.15, n.12, p. 843–850, 2009.

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

HIRSHFIELD, A. N. Size–frequency analysis of atresia in cycling rats. **Biology of Reproduction**, v. 38, p. 1181-1188, 1988.

HOLANDA, G. M. L.; ADRIÃO, M.; WISCHRAL, A. O Gene da prolificidade em Ovinos. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, v. 9, n. 2/3, p. 45 - 53, 2006.

HONG, S. B.; UHM, S. J.; LEE, H. Y.; PARK, C. Y.; GUPTA, M. K.; CHUNG, B. H. Developmental ability of bovine embryos nuclear transferred with frozen–thawed or cooled donor cells. **Asian - Australasian Journal of Animal Sciences**, v.18, p. 1242–1248, 2005.

HREINSSON, J. G.; SCOTT, J. E.; RASMUSSEN, C.; SWAHN, M. L.; HSUEH, A. J.; HOVATTA, O. Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 87, p. 316-321, 2002.

HSU, H.; HUANG, J.; SHU, H. B.; BAICHWAL, V.; GOEDDEL, D. V. TNF-dependent recruitment of the protein kinase RIP to the TNF receptor-1 signaling complex. **Immunity**, v.4, n.4, p. 387-96, 1996.

HSU, S. Y.; HSUEH, A. J. Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: An ovarian paradigm. **Physiological Reviews**, v. 80, p. 593-614, 2000.

HSUEH, A. J.; BILLIG, H.; TSAFRIRI, A. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. **Endocrine Reviews**, v.15, p.707–724, 1994.

HUNT, J. S.; PHILLIPS, T. A. Immune privilege and the tumor necrosis factor superfamily. *In: Annual Meeting Biology of Reproduction*. Abstracts. Wisconsin: The Society for the Study of Reproduction (SSR), n. 3, 2000.

HUSSEIN, T. S.; FROILAND, D. A.; AMATO, F.; THOMPSON, J. G.; GILCHRIST, R. B. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. **Journal of Cell Science**, v.118, p.5257-5268, 2005.

HUTT, K. J.; MCLAUGHLI, E. A.; HOLLAND, M. K. KIT/KIT Ligand in mammalian oogenesis and folliculogenesis: Roles in rabbit and murine ovarian follicle activation and oocyte growth. **Biology of Reproduction**, v.75, p.42-433, 2006.

HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 47, p. 23-32, 1997.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal**. v. 38, 2010. Disponível em:<
<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/ppm2010.pdf>>. Acesso em: 22 de ago. 2013.

IRELAND, J. J. Control of follicular growth and development. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 24, p. 39-54, 1987.

JAMNONGJIT, M.; GILL, A.; HAMMES, S. R. Epidermal growth factor receptor signaling is required for normal ovarian steroidogenesis and oocyte maturation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, p.16257-16262, 2005.

JOAG, S. V.; STEPHENS, E. B.; NARAYAN, O. Lentiviroses. *In*: FIELDS, M. D.; KNIPE, D. M. **Fields Virology**, 3. ed. New York: Raven Press, 1996. p. 1977-1996.

JOAG, S. V.; STEPHENS, E. B.; NARAYAN, O. Lentiviroses. *In*: FIELDS, M. D.; KNIPE, D. M. **Fields Virology**, 3. ed. New York: Raven Press, 1996. p. 1977-1996.

JUENGEL, J. L.; HUDSON, N. L.; HEATH, D. A.; SMITH, P.; READER, K. L.; LAWRENCE, S. B.; O'CONNELL, A. R.; LAITINEN, M. P.; CRANFIELD, M.; GROOME, N. P.; RITVOS, O.; McNATTY, K. P. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1777–1789, 2002.

JUENGEL, J. L.; McNATTY, K. P. The role of proteins of the transforming growth factor- β superfamily in the ovarian regulation of follicular development. **Human Reproduction Update**, v. 11, n. 2, p. 144-161, 2005.

JUNEJA, S. C.; BARR, K. J.; ENDERS, G. C.; KIDDER, G. M. Defects in the germ line and gonads of mice lacking Connexin43. **Biology of Reproduction**, v. 60, n. 5, p. 1263-1270, 1999.

KALICH-PHILOSOPH, L.; RONESS, H.; CARMELY, A.; FISHEL-BARTAL, M.; LIGUMSKY, H.; PAGLIN, S.; WOLF, I.; KANETY, H.; SREDNI, B.; MEIROW, D. Cyclophosphamide Triggers Follicle Activation and “Burnout”; AS101 Prevents Follicle Loss and Preserves Fertility. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 185, p. 185, 2013.

KENNEDY, J. F.; PALVA, P. M. G.; CORELLA, M. T. S.; CAVALCANTI, M. S. M.; COELHO, L. C. B. B. Lectins, versatile proteins of recognition: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 26, n. 3, p. 219-230, 1995.

KIM, J. Y. Control of ovarian primordial follicle activation. **Clinical and Experimental Reproductive Medicine**, v.39, n.1, p.10-14, 2012.

KIM, J. Y. Control of ovarian primordial follicle activation. **Clinical and Experimental Reproductive Medicine**, v.39, n.1, p.10-14, 2012.

KISHIMOTO, T. Regulation of Metaphase by a Maturation-Promoting Factor. **Development, Growth & Differentiation**, v. 30, n. 2, p. 105-115, 1988.

KLONISCH, T.; WOLF, P.; HOMBACH-KLONISCH, S.; VOGT, S.; KUECHENHOFF, A.; TETENS, F.; FISCHER, B. Epidermal growth factor-like ligands and erbB genes in the peri-implantation rabbit uterus and blastocyst. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 6, p. 1835-1844, 2001.

KOSAKO, H.; GOTOH, Y.; NISHIDA, E. Requirement for the MAP kinase kinase/MAP kinase cascade in *Xenopus* oocyte maturation. **The EMBO Journal**, v. 13, n. 9, p.2131-2138, 1994.

- LAFKY, J. M.; WILKEN, J. A.; BARON, A. T.; MAIHLE, N. J. Clinical implications of the ErbB/epidermal growth factor (EGF) receptor family and its ligands in ovarian cancer. **Biochimica Biophysica Acta**, v. 1785, p. 232-265, 2008.
- LAMARA, A.; FIENI, F.; MSELLI-LAKHAL, L.; TAINTURIER, D.; CHEBLOUNE, Y. Efficient replication of caprine arthritis-encephalitis virus in goat granulosa cells. **Virus Research**, v. 79, n. 1-2, p. 165-172, 2001.
- LEAVITT, R. D.; FELSTED, R. L.; BACHUR, N. R. Biological and biochemical properties of *Phaseolus vulgaris* isolectinas. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 252, n. 9, p. 2961-2966, 1977.
- LECHNER, F.; MACHADO, J.; BERTONI, G.; SEOW, H. F.; DOBBELAERE, D. A.; PETERHANS, E. Caprine arthritis encephalitis virus dysregulates the expression of cytokines in macrophages. **Journal of Virology**, v. 71, p. 7488-7497, 1997.
- LEE, W. S.; OTSUKA, F.; MOORE, R. K.; SHIMASAKI, S. Effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 994-999, 2001.
- LEITÃO, C. C. F.; BRITO, I. R.; FROTA, I. M. A.; SILVA, J. R. V. Importância dos fatores de crescimento locais na regulação da foliculogênese ovariana em mamíferos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 37, n. 3, p. 215-224, 2009.
- LIENER, I. E. Lectins and protein inhibitors of proteolytic enzymes (an overview). **Proceed. Conbrap**, 1-10, 1990.
- LIMA, I. M. T.; BRITO, I. R.; ROSSETTO, R.; DUARTE, A. B. G.; RODRIGUES, G. Q.; SARAIVA, M. V. A.; COSTA, J. J. N.; DONATO, M. A. M.; PEIXOTO, C. A.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. BMPR-IB and BMPR-II mRNA expression levels in goat ovarian follicles and the *in vitro* effects of BMP-15 on preantral follicle development. **Cell and Tissue Research**, v. 348, p. 225-238, 2012.
- LIS, H.; SHARON, N. Biological properties of lectins. In: *The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine*. **Academic Press**, p. 265-285, 1986.
- LUCCI, C. M.; AMORIM, C. A.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P.; SILVA, J. R.; GONÇALVES, P. B. Effect of the interval of serial sections of ovarian tissue in the tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 56, n. 1, p. 39-49, 1999.
- LUCCI, C. M.; SILVA, J. R. V.; CARVALHO, C. A.; FIGUEIREDO, R.; BÁO, N. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. **Small Ruminant Research**, v. 41, n. 1, p. 61-69, 2001.
- MAGOFFIN, D. A. Ovarian theca cell. **The Int Journal Biochemical & Cell Biology**, v. 37, n.7 p. 1344-1349, 2005.
- MAHESHWARI, A.; FOWLER, P. A. Primordial follicular assembly in human-revisited. **Zygote**, v. 16, n. 4, p. 285-296, 2008.

MARGULIS, S.; ABIR, R.; FELZ, C.; NITKE, S.; KRISSE, H.; FISCH, B. Bone morphogenetic protein 15 expression in human ovaries from fetuses, girls, and women. **Fertility and Sterility**, v. 92, n. 5, p. 1666-1673, 2009.

MARGULIS, S.; ABIR, R.; FELZ, C.; NITKE, S.; KRISSE, H.; FISCH, B. Bone morphogenetic protein 15 expression in human ovaries from fetuses, girls, and women. **Fertility and Sterility**, v. 92, n. 5, p. 1666-1673, 2009.

MARKSTRÖM, E.; SVENSSON, E. C.; SHAO, R.; SVANBERG, B.; BILLIG, H. Survival factors regulating ovarian apoptosis – dependence on follicle differentiation. **Reproduction**, v. 123, p. 23-30, 2002.

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

MARTINS, F.S.; CELESTINO, J. J. H.; SARAIVA, M.V.A.; CHAVES, R.N.; ROSSETTO, R.; SILVA, C.M.G.; LIMA-VERDE, I.B.; LOPES, C.A.P., CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Interaction between growth differentiation factor 9, insulin-like growth factor I and growth hormone on the *in vitro* development and survival of goat preantral follicles. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, n. 8, p. 728-736, 2010.

MATZUK, M. M.; BURNS, K. H.; VIVEIROS, M. M.; EPPIG, J. J. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. **Science**, v. 296, p. 2178–2180, 2002.

McGEE, E. A.; HSUEH, A. J. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. **Endocrine Reviews**, v. 21, n. 2, p. 200–214, 2000.

McNATTY, K. P., MOORE, L. G., HUDSON, N. L., QUIRKE, L. D., LAWRENCE, S. B., READER, K., HANRAHAN, J. P., SMITH, P., GROOME, N. P., LAITINEN, M., RITVOS, O., JUENGEL, J. L. The oocyte and its role in regulating ovulation rate: a new paradigm in reproductive biology. **Reproduction**, v. 128, n. 4, p. 379-386, 2004.

McNATTY, K. P.; FIDLER, A. E.; JUENGEL, J. L.; QUIRKE, L. D.; SMITH, P. R.; HEATH, D. A.; LUNDY, T.; O'CONNELL, A.; TISDALL, D. J. Growth and paracrine factors regulating follicular formation and cellular function. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 163, n. 1-2, p. 11-20, 2000.

McNATTY, K. P.; HEATH, D. A.; LUNDY, T.; FIDLER, A. E.; QUIRKE, L.; O'CONNELL, A.; SMITH, P.; GROOME, N.; TISDALL, D. J. Control of early ovarian follicular development. **Journal of Reproduction and Fertility Supplement**, v. 54, p. 3–16, 1999.

McNATTY, K. P.; HUDSON, N. L.; WHITING, L.; READER, K. L.; LUN, S.; WESTERN, A.; HEATH, D. A.; SMITH, P.; MOORE, L. G.; JUENGEL, J. L. The effects of immunizing

sheep with different BMP-15 or GDF-9 peptide sequences on ovarian follicular activity and ovulation rate. **Biology of Reproduction**, v. 76, p. 552-560, 2007.

McNATTY, K. P.; JUENGEL, J. L.; READER, K. L.; LUN, S.; MYLLYMAA, S.; LAWRENCE, S. B.; WESTERN, A.; MEERASAHIB, M. F.; MOTTERSHEAD, D. G.; GROOME, N. P.; RITVOS, O.; LAITINEN, M. P. Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function. **Reproduction**, v.129, n. 4, p. 473-480, 2005a.

McNATTY, K. P.; JUNGEL, J. L., READER, K. L.; LUN, S.; MYLLYMAA, S.; LAWRENCE, S. B.; WESTERN, A.; MEERASAHIB, M. F.; MOTTERSHEAD, D. G.; GROOME, N. P.; RITVOS, O.; LAITINEN, M. P. Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function in ruminants. **Reproduction**, v. 129, p. 481-487, 1997.

McNATTY, K. P.; JUNGEL, J. L., READER, K. L.; LUN, S.; MYLLYMAA, S.; LAWRENCE, S. B.; WESTERN, A.; MEERASAHIB, M. F.; MOTTERSHEAD, D. G.; GROOME, N. P.; RITVOS, O.; LAITINEN, M. P. Bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 co-operate to regulate granulosa cell function in ruminants. **Reproduction**, v. 129, p. 481-487, 1997.

McNATTY, K. P.; MOORE, L. G.; HUDSON, N. L.; QUIRKE, L. D.; LAWRENCE, S. B.; READER, K.; HANRAHAN, J. P.; SMITH, P.; GROOME, N. P.; LAITINEN, M.; RITVOS, O.; JUENGEL, J. L. The oocyte and its role in regulating ovulation rate: a new paradigm in reproductive biology. **Reproduction**, v. 128, p. 379–386, 2004.

McNATTY, K.P.; GALLOWAY, S. M.; WILSON, T.; SMITH, P.; HUDSON, N. L.; O'CONNELL, A.; BIBBY, A. H.; HEATH, D. A.; DAVIS, G. H.; HANRAHAN, J. P.; JUENGEL, J. L. Physiological effects of major genes affecting ovulation rate in sheep. **Genetics Selection Evolution**. v. 37, p. 25-38, 2005.

MDURVWA, E. G.; OGUNBIYI, P. O.; GAKOU, H. S.; REDDY, P. G. Pathogenic mechanisms of caprine arthritis–encephalitis virus. *Veterinary Research Communications*, v. 18, n. 6, p. 483–490, 1994.

MERLO, B.; IACONO, E.; ZAMBELLI, D.; PRATI, F.; BELLUZZI, S. Effect of EGF on *in vitro* maturation of domestic cat oocytes. **Theriogenology**, v. 63, n. 7, p. 2032-2039, 2005.

MINGOTI, G. Z. **Maturação oocitária associada à esteroidogênese. Papel do soro sanguíneo, albumina sérica e hormônios esteróides.** 2000. 135p. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de São Paulo, São Paulo – Sp.

MISQUITH, S.; RANI, P. G.; SUROLIA, A. Carbohydrate Binding Specificity of the B-cell Maturation Mitogen from *Artocarpus integrifolia* seeds. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 48, p. 30393-30401, 1994.

MODY, R., JOSHI, S., CHANEY, W. Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, 33, n. 1, p. 1-10, 1995.

MOORE, R. K.; SHIMASAKI, S. Molecular biology and physiological role of the oocyte factor, BMP-15. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 234, p. 67-73, 2005.

MORBECK, D. E.; FLOWERS, W. L.; BRITT, J. H. Response of porcine granulosa cells isolated from primary and secondary follicles to FSH, 8-bromo-cAMP and epidermal growth factor *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 99, n. 2, p. 577-584, 1993.

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

MSELLI-LAKHAL, L.; GUIGUEN, F.; FORNAZERO, C.; DU, J.; FAVIER, C.; DURAND, J.; GREZEL, D.; BALLEYDIER, S.; MORNEX, J. F.; CHEBLOUNE, Y. Goat milk epithelial cells are highly permissive to CAEV infection *in vitro*. **Virology**, v. 259, p. 67-73, 1999.

MULSANT, P.; LECERF, F.; FABRE, S.; BODIN, L.; THIMONIER, J.; MONGET, P.; LANNELUC, I.; MONNIAUX, D.; TEYSSIER, J.; ELSEN, J. M. Prolificacy genes in sheep: the French genetic programmes. **Reproduction Supplement**, v. 61, p. 353-359, 2002.

MYERS, R. L. **Immunology – a laboratory manual**. Dubuque, Iowa: WCB, 1995.
NILSSON, E. E.; SKINNER, M. K. Bone morphogenetic protein-4 acts as an ovarian follicle survival factor and promotes primordial follicle development. **Biology of Reproduction**, v. 69, p. 1265-1272, 2003.

NILSSON, E. E.; SKINNER, M. K. Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 3, p. 1018-1024, 2002.

NILSSON, E. E.; STANFIELD, J.; SKINNER, M. K. Interactions between progesterone and tumor necrosis factor-alpha in the regulation of primordial follicle assembly. **Reproduction**, v. 132, n. 6, p. 877-886, 2006.

OFFICE INTERNATIONAL DES EPIZOOTIES – OIE. **Manual of standards for diagnostic tests and vaccines**. World Organization for Animal Health, p. 369-373, 1996.

OKANO, A.; KISHI, H.; TAKAHASHI, H.; TAKAHASHI, M. Tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis in cultured porcine luteal cells. **Journal of Reproduction and Development**, v. 52, n. 2, p. 301-306, 2006.

ORISAKA, M.; ORISAKA, S. J.; JIN-YI, C. J.; WANG, Y.; KOTSUJI, F.; ANDTSANG, B. K. Growth differentiation factor-9 is anti-apoptotic during follicular development from preantral to early antral stage. **Molecular Endocrinology**, v. 20, p. 2456–2468, 2006.

ORSI, N. M.; EKBOTE, U. V.; WALKER, J. J.; GOPICHANDRAN, N. Uterine and serum cytokine arrays in the mouse during estrus. **Animal Reproduction Science**, v. 100, n. 3-4, p. 301-310, 2007.

OTSUKA, F.; SHIMASAKI, S. A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: its role in regulating granulosa cell

mitosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, p. 8060-8065, 2002.

OTSUKA, F.; YAMAMOTO, S.; ERICKSON, G. F.; SHIMASAKI, S. Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 14, p. 11387-11392, 2001.

OTSUKA, F.; YAO, Z.; LEE, T. H.; YAMAMOTO, S.; ERICKSON, G. F.; SHIMASAKI, S. Bone morphogenetic protein-15: identification of target cells and biological functions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 50, p. 39523-39528, 2000.

PARROTT, J. A.; SKINNER, M. K. Kit ligand actions on ovarian stromal cells: effects on theca cell recruitment and steroid production. **Molecular Reproduction and Development**, v. 55, n. 1, p. 55-64, 2000.

PATE, J. L. Involvement of immune cells in regulation of ovarian function. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 49, p. 365-377, 1995.

PAULINI, F.; MELO, E. O. The role of oocyte-secreted factors GDF-9 and BMP-15 in follicular development and oogenesis. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 2, p. 354-361, 2011.

PETERS, H. The development and maturation of the ovary. **Annales de Biologie Animale, Biochimie, Biophysique**, v. 16, n. 3, p. 271-278, 1976.

PICTON, H.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R. The molecular basis of oocyte growth and development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 145, n. 1-2, p. 27-37, 1998.

PINCUS, G.; ENZMANN, E. V. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. I. The activation of ovarian eggs. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 62, n. 5, p. 665-675, 1935.

PORTELA, A.M.L.R.; RIBEIRO, R.P.; COSTA, J.J.N.; ROSSI, R.O.D.S.; PASSOS, J.R.S.; VASCONCELOS, G.L.; DONATO, M.A.M.; PEIXOTO, C.A.; SARAIVA, M.V.A., VAN DEN HURK, R.; SILVA, J.R.V. Effects of different concentrations of concanavalin A and follicle stimulating hormone on goat primordial follicles activation, survival and gene expression. **Small Ruminant Research**, v. 116, n. 2, p.183-191, 2014.

PRANGE-KIEL, J.; KREUTZKAMM, C.; WEHRENBURG, U.; RONE, G. M. Role of tumor necrosis factor in preovulatory follicles in swine. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 3, p. 928-935, 2001.

RANKIN, T. L.; O'BRIEN, M, LEE, E.; WIGGLESWORTH, K.; EPPIG, J.; DEAN, J. Defective zonae pellucidae in Zp2-null mice disrupt folliculogenesis, fertility and development. **Development**, v. 128, n. 7, p. 1119-1126, 2001.

RICARTE, A. R. F. **Avaliação da susceptibilidade de gametas e embriões caprinos ao vírus da artrite encefalite caprina**. 2009. 114 f. Tese (Doutorado). Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, Ce.

- RICARTE, A. R. F. **Caracterização Morfológica e Ultra-Estrutural de Folículos Pré-Antrais de Cabras Naturalmente Infectadas com o Vírus da Artrite Encefalite Caprina**. 2005. 70p. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, Ce.
- RICHARD, F. J.; SIRARD, M-A. Effects of follicular cells on oocyte maturation: Effects of follicular hemisections on bovine maturation. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 16-21, 1996.
- RICHARDS, J. S.; PANGAS, S. A. The ovary: basic biology and clinical implications. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 4, p. 963–972, 2010.
- RIESE, D. J.; STERN, D.F. Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network. **BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 20, n. 1, p. 41-48, 1998.
- RODGERS, R. J.; IRVING-RODGERS, H. F. Formation of the Ovarian Follicular Antrum and Follicular Fluid. **Biology of Reproduction**, v. 82, n. 6, p. 1021-1029, 2010.
- RODRIGUES, G. Q.; SILVA, C. M. G.; FAUSTINO, L. R.; BRUNO, J. B.; MAGALHÃES, D. M.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Bovine serum albumin improves *in vitro* development of caprine preantral follicles. **Animal Reproduction**, v. 7, p. 382-388, 2010.
- ROSSETTO, R.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T.; SARAIVA, M. V. A.; MARTINS, F. S.; FAUSTINO, L. R.; ARAÚJO, V. R.; SILVA, C. M. G.; NAME, K. P. O.; BÁO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R.; BLUME, H. Interaction between ascorbic acid and follicle-stimulating hormone maintains follicular viability after long-term *in vitro* culture of caprine preantral follicles. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 37, p. 112-123, 2009.
- ROSSI, G.; MACCHIARELLI, G.; PALMERINI, M. G.; CANIPARI, R.; CECCONI, S. Meiotic spindle configuration is differentially influenced by FSH and epidermal growth factor during *in vitro* maturation of mouse oocytes. **Human Reproduction** (Oxford, England), v. 21, n. 7, 1765-1770, 2006.
- ROWE, J. D.; EAST, N. E.; THURMOND, M. C.; FRANTI, C. E.; PEDERSEN, N. C. Cohort study of natural transmission and two methods for control of caprine arthritis-encephalitis virus infection in goat on a California dairy. **American Journal of Veterinary Research**, v. 53, n. 12, p. 3386-2395, 1992.
- ROY, S. K.; KOLE, A. R. Ovarian transforming growth factor-beta (TGF-beta) receptors: *in vitro* effects of follicle stimulating hormone, epidermal growth factor and TGF-beta on receptor expression in human preantral follicles. **Molecular Human Reproduction**, v. 4, n. 3, p. 207-214, 1998.
- ROY, S. K.; TREACY, B. J. Isolation and long term culture of human preantral follicles. **Fertility and Sterility**, v. 59, p. 783-790, 1993.
- SAKUMOTO, R.; BERISHA, B.; KAWATE, N.; SCHAMS, D.; OKUDA, K. Tumor necrosis factor-alpha and its receptor in bovine corpus luteum throughout the estrous cycle. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 1, p. 192-199, 2000.

SAKUMOTO, R.; OKUDA, K. Possible actions of tumor necrosis factor- α in ovarian function. **Journal of Reproduction and Development**, v. 50, n. 1, p. 39-46, 2004.

SANDRI, L. R. **Efeito de bloqueadores meióticos na maturação e ultra-estrutura de oócitos e sua consequência na produção de embriões *in vitro***. 2007. 57p. Dissertação (Mestrado). Pós-Graduação em Medicina Veterinária - Fisiopatologia da Reprodução Animal Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) , Santa Maria – Rs.

SANTOS, R. R.; CELESTINO, J. J. H.; LOPES, C. A. P.; MELO, M. A. P.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de animais domésticos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 1, p. 9-15, 2008.

SAUMANDE, J. La folliculogenèse chez les ruminants. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, v. 167, p. 205-218, 1991.

SCARAMUZZI, R. J.; ADAMS, N. R.; BAIRD, D. T.; CAMPBELL, B. K.; DOWNING, J. A.; FINDLAY, J. K.; HENDERSON, K. M.; MARTIN, G. B.; McNATTY, K. P.; MCNEILLY, A. S.; TSONIS, C. G. A model for follicle selection and the determination of ovulation rate in the ewe. **Reproduction Fertility and Development**, v. 5, n. 5, p. 459-78, 1993.

SELL, A. M.; COSTA, C. P. Atividades biológicas das lectinas PHA, WGA, jacalina e artocarpina. **Acta Scientiarum**, v. 22, n. 2, p. 297-303, 2000.

SELL, A. M.; COSTA, C. P. Effects of plant lectins on in vitro fibroblast proliferation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 46, p. 349-454, 2003.

SHARON, N.; LIS, H. Lectins as cell recognition molecules. **Science**, v. 246, n. 4927, p. 227-234, 1989.

SHEN, Y.; MURAMATSU, S. I. ; IKEGUCHI, K.; FUJIMOTO, K. I.; FAN, D. S.; OGAWA, M.; MIZUKAMI, H.; URABE, M.; KUME, A.; NAGATSU, I.; URANO, F.; SUZUKI, T.; ICHINOSE, H.; NAGATSU, T.; MONAHAN, J.; NAKANO, I.; OZAWA, K. Triple transduction with adeno-associated virus vectors expressing tyrosine hydroxylase, aromatic-L-amino-acid decarboxylase, and GTP cyclohydrolase I for gene therapy of Parkinson's disease. **Human Gene Therapy**, v. 11, p.509–1519, 2000.

SHEN, Y.; MURAMATSU, S. I. ; IKEGUCHI, K.; FUJIMOTO, K. I.; FAN, D. S.; OGAWA, M.; MIZUKAMI, H.; URABE, M.; KUME, A.; NAGATSU, I.; URANO, F.; SUZUKI, T.; ICHINOSE, H.; NAGATSU, T.; MONAHAN, J.; NAKANO, I.; OZAWA, K. Triple transduction with adeno-associated virus vectors expressing tyrosine hydroxylase, aromatic-L-amino-acid decarboxylase, and GTP cyclohydrolase I for gene therapy of Parkinson's disease. **Human Gene Therapy**, v. 11, p.509–1519, 2000.

SHIMIZU, T.; JIANG, J-Y.; SASADA, H.; SATO, E. Changes of messenger RNA expression of angiogenic factors and related receptors during follicular development in gilts. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1846-1852, 2002.

SHIMIZU, T.; JIANG, J-Y.; SASADA, H.; SATO, E. Changes of messenger RNA expression of angiogenic factors and related receptors during follicular development in gilts. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1846-1852, 2002.

SIGURDSSON, B. Maedi, a slow progressive pneumonia of sheep: an epizootological and a pathological study. *British Veterinary Journal*, v. 110, p. 255-270, 1954.

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, 2004a.

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

SILVA, C. M. G.; CASTRO, S. V.; FAUSTINO, L. R.; RODRIGUES, G. Q.; BRITO, I. R.; SARAIVA, M. V. A.; ROSSETTO, R.; SILVA, T. F. P.; CAMPELO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Moment of addition of LH to the culture medium improves *in vitro* survival and development of secondary goat pre-antral follicles. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, p. 579-584, 2011b.

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

SILVA, J. B. A. **Vírus da Artrite Encefalite Caprina (CAEV) em folículos pré-antrais de cabras naturalmente infectadas**. 2006. 148f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias - Reprodução e Sanidade Animal, Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, Ce.

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

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

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

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

SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; VAN TOL, H. T. A.; ROELEN, B. A. J, FIGUEIREDO, J. R. Expression of growth differentiation factor 9 (GDF9), bone

morphogenetic protein 15 (BMP15), and BMP receptors in the ovaries of goats. Genetics, Gene Regulation, and Expression. **Molecular Reproduction and Development**, v. 70, p. 1-19, 2004b.

SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; VAN TOL, H. T. A.; ROELEN, B. A. J, FIGUEIREDO, J. R. Expression of growth differentiation factor 9 (GDF9), bone morphogenetic protein 15 (BMP15), and BMP receptors in the ovaries of goats. Genetics, Gene Regulation, and Expression. **Molecular Reproduction and Development**, v. 70, p. 1-19, 2004.

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

SIMON, A. M.; GOODENOUGH, D. A.; LI, E.; PAUL, D. L. Female infertility in mice lacking connexin37. **Nature**, v. 385, p. 525–529, 1997.

SINGH, B.; KENNEDY, T. G.; TEKPETEY, F. R.; ARMSTRONG, D. T. Gene expression and peptide localization for epidermal growth factor receptor and its ligands in porcine luteal cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 113, p. 137-143, 1995a.

SINGH, E. L. The disease control potential of embryos. **Theriogenology**, v. 27, p. 9-20, 1987.

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

SIRARD, M. A.; FIRST, N. L. *In vitro* inhibition of oocyte nuclear maturation in bovine. **Biology of Reproduction**, v. 39, p. 229-234, 1988.

SIRARD, M. A.; FLORMAN, H. M.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; BARNES, F. L.; SIMS, M. L.; FIRST, N. L. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 40, n. 6, p. 1257-63, 1989.

SKARZYNSKI, D. J.; JAROSZEWSKI, J. J.; OKUDA, K. Role of tumor necrosis factor- α and nitric oxide in luteolysis in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 29, n. 2, p. 340-346, 2005.

SOUZA, C. J.; MACDOUGALL, C.; MACDOUGALL, C.; CAMPBELL, B. K.; MCNEILLY, A. S.; BAIRD, D. T. The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 B (BMPRII) gene. **The Journal of Endocrinology**, v. 169, n. 2, p. 1-6, 2001.

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

- SUN, R. Z.; LEI, L.; CHENG, L.; JIN, Z. F.; ZU, S. J.; SHAN, Z. Y.; WANG, Z. D.; ZHANG, J. X.; LIU, Z. H. Expression of GDF-9, BMP-15 and their receptors in mammalian ovary follicles. **Journal of Molecular Histology**, v. 41, p. 325–332, 2010.
- SUTTON, M. L.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Effects of *in vivo* and *in vitro* environments on the metabolism of the cumulus-oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. **Human Reproduction**, v. 9, n. 1, p. 35-48, 2003.
- TEIXEIRA, E.; NAPIMOGA, M.; CARNEIRO, V.; DE OLIVEIRA, T.; NASCIMENTO, K.; NAGANO, C.; SOUZA, J.; HAVT, A.; PINTO, V.; GONÇALVES, R.; FARIAS, W.; SAKER-SAMPAIO, S.; SAMPAIO, A.; CAVADA, B. *In vitro* inhibition of oral streptococci binding to the acquired pellicle by algal lectins. **Journal of Applied Microbiology**, v. 103, p. 1001–1006, 2007.
- TEKPETEY, F. R.; SINGH, B.; BARBE, G.; ARMSTRONG, D. T. Localization of epidermal growth factor (EGF) receptor in the rat corpus luteum, and EGF and transforming growth factor- α stimulation of luteal cell steroidogenesis *in vitro*. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.110, p. 95-102, 1995.
- TERRANOVA, P. F. Potential roles of tumor necrosis factor- α in follicular development, ovulation, and the life span of the corpus luteum. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 14, n. 1, p. 1-15, 1997.
- TESARIK, J., NAGY, Z. P., MENDOZA, C., GRECO, E. Chemically and mechanically induced membrane fusion: nonactivating methods for nuclear transfer in mature human oocytes. **Human Reproduction**, v. 15, p. 1149–1154, 2000.
- TRACEY, D.; KLARESKOG, L.; SASSO, E. H.; SALFELD, J. G.; TAK, P. P. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 117, n. 244-279, 2008.
- TRACEY, D.; KLARESKOG, L.; SASSO, E. H.; SALFELD, J. G.; TAK, P. P. Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 117, n. 244-279, 2008.
- TRAVASSOS, C. E.; BENOIT, C.; VALAS, S.; da SILVA, A. G.; PERRIN, G. Caprine arthritis-encephalitis virus in semen of naturally infected bucks. **Small Ruminant Research**, v.32, n.2, p.101-106, 1999.
- TSAFIRI, A.; BRAW, R.H. Experimental approaches to atresia in mammals. **Oxford Reviews of Reproductive Biology**, v. 6, p. 226-265, 1984.
- VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, p. 1717-1751, 2005.
- VAN WEZEL, I. L.; DHARMARAJAN, A. M.; LAVRANOS, T. C.; RODGERS, R. VAN WEZEL, I. L.; DHARMARAJAN, A. M.; LAVRANOS. T. C.; RODGERS, R. J. Evidence for alternative pathways of granulosa cell death in healthy and slightly atretic bovine antral follicles. **Endocrinology**, v.140, p. 2602-2612, 1999.

VITT, U. A.; MCGEE, E. A.; HAYASHI, M.; HSUEH, A. J. *In vivo* treatment with GDF9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. **Endocrinology**, v.141, p. 3814–3820, 2000.

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

WANG, J.; ROY, S. K. Growth differentiation factor-9 and stem cell factor promote primordial follicle formation in the hamster: modulation by follicle-stimulating hormone. **Biology of Reproduction**, v. 70, p. 577–585, 2004.

WANG, Y. H.; McWILLIAM, S. M.; BARENDSE, W.; KATA, S. R.; WOMACK, J. E.; MOORE, S. S.; LEHNERT, S. A. **Mapping of 12 bovine ribosomal protein genes using a bovine radiation hybrid panel. Animal Genetics**, v. 32, n. 5, p. 269-273, 2001.

WILSON, T.; WU X. Y.; JUENGEL, J. L.; ROSS, I. K.; LUMSDEN, J. M.; LORD, E. A.; DODDS, K. G.; WALLING, G. A.; MCEWAN, J. C.; O'CONNELL, A. R.; MCNATTY, K. P.; MONTGOMERY, G. W. Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein IB receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 4, p.1225-1235, 2001.

WOLFE, D. F.; NUSBAUM, E. E.; LAUERMAN, L. H.; MYSINGER, P. W.; RIDELL, M. G.; PUTMAM, M. R.; SHUMWAY, L. S.; POWE, T. A. Embryo transfer from goats seropositive for caprine arthritis-encephalitis virus. **Theriogenology**, v. 28, p.307-316, 1987.

WRATHALL, A. E. Embryo transfer and disease transmission in livestock a review of recent research. **Theriogenology**, v.43, p. 81-88, 1995.

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

YA-DONG, Y.; MING-XING, C.; YONG-QING, Z.; LI, F.; SU-CHENG, Y.; LI-MIN, W.; QING-KUN, G.; DAI-QIN, H.; ZHAO-XIN, Z.; XI-JUN, W.; ZHAO-XIN, Z. Bone morphogenetic protein receptor IB as a candidate gene for prolificacy in Small Tail Han and Hu ewes. *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology*, v. 2, n.2, p. 125-130, 2005.

YOSHINO, O.; MCMAHON, H. E.; SHARMA, S.; SHIMASAKI, S. A unique preovulatory expression pattern plays a key role in the physiological functions of bmp-15 in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 103, p. 10678–10683, 2006.

ZHANG, P.; LOUHIO, H.; TUURI, T.; SJOBERG, J.; HREINSSON, J.; TELFER, E. E.; HOVATTA, O. *In vitro* effect of cyclic adenosine 3, 5-monophosphate (cAMP) on early human ovarian follicles. **Journal of Assisted Reproduction Genetic**, v. 21, p. 301-306, 2004.

ZHAO, Y.; BURBACH, J. A.; ROBY, K. F.; TERRANOVA, P. F.; BRANNIAN, J. D. Macrophages are the major source of tumor necrosis factor α in the porcine corpus luteum. **Biology of Reproduction**, v. 59, n. 6, p. 1385-1391, 1998.

ZINK, M. C.; YAGER, J.A.; MYERS, J. D. Pathogenesis of caprine arthritis encephalitis virus-Cellular localization of viral transcripts in tissues of infected goats. **American Journal of Pathology**, v.136, n.4, p.843-854, 1990.