



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CAMPUS SOBRAL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

PEDRO ALVES AGUIAR BARROSO

**EFEITOS DA DEXAMETASONA SOBRE O DESENVOLVIMENTO, VIABILIDADE
E ULTRAESTRUTURA DE FOLÍCULOS SECUNDÁRIOS BOVINOS CULTIVADOS
*IN VITRO***

SOBRAL

2019

PEDRO ALVES AGUIAR BARROSO

**EFEITOS DA DEXAMETASONA SOBRE O DESENVOLVIMENTO, VIABILIDADE
E ULTRAESTRUTURA DE FOLÍCULOS SECUNDÁRIOS BOVINOS CULTIVADOS
*IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de Pesquisa: Macromoléculas - Área temática: Fisiologia Reprodutiva.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Viana Silva

SOBRAL

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- B285e Barroso, Pedro Alves Aguiar.
Efeitos da dexametasona sobre o desenvolvimento, viabilidade e ultraestrutura de folículos secundários bovinos cultivados in vitro / Pedro Alves Aguiar Barroso. – 2019.
71 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2019.
Orientação: Prof. Me. José Roberto Viana Silva .
Coorientação: Profa. Dra. Ana Liza Paz Souza Batista.
1. Bovinos. 2. Dexametasona. 3. Cultivo in vitro. 4. Folículos secundários. I. Título.

CDD 660.6

PEDRO ALVES AGUIAR BARROSO

**EFEITOS DA DEXAMETASONA SOBRE O DESENVOLVIMENTO, VIABILIDADE
E ULTRAESTRUTURA DE FOLÍCULOS SECUNDÁRIOS BOVINOS CULTIVADOS
*IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de Pesquisa: Macromoléculas - Área temática: Fisiologia Reprodutiva.

Aprovado em: 27 / 02 / 2019.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dra. Ana Liza Paz Souza Batista
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Anderson Weiny Barbalho Silva
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Gisvane Lopes de Vasconcelos
Centro UniversitárioINTA (UNINTA)

Primeiramente a Deus e suas várias formas de manifestação em minha vida, pois me possibilitou continuar quando tudo parecia não fazer mais sentido.

À minha maravilhosa Mãe, Maria Liduina, que faz jus ao verdadeiro sentido da palavra mãe; pela força e por todas as maneiras de incentivo, pois, sem ela não teria chegado até aqui.

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por influenciar minha vida e me ajudar para que eu tomasse as melhores decisões, para que eu pudesse conseguir continuar os caminhos que escolhi, retirando as pedras e enfrentando os conflitos da caminhada.

Em segundo, minha Mãe, Maria Liduina, instrumento de Deus, que como já afirmei faz jus ao verdadeiro sentido da palavra mãe, pela força e por todas as maneiras de incentivo.

À Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA por ter fornecido a mim uma formação e oportunidades.

A cada professor que compõe o Curso de Ciências Biológicas, pelos ensinamentos, por servirem como fonte de admiração e exemplo profissional.

À Universidade Federal do Ceará – UFC, e ao Laboratório de Cultivo de Células e Tecidos (NUBIS), pelo espaço e oportunidade.

Ao Prof. Dr. José Roberto Viana Silva, pela oportunidade de ingressar no grupo de pesquisa, pela confiança e ensinamentos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de mestrado - Código de Financiamento 001.

À minha família por completo, por acreditarem e me apoiarem nessa caminhada.

A uma pessoa amiga, muito querida e especial, Cleber Henrique, por está ao meu lado diante das dificuldades e pela paciência, pelos empréstimos materiais, por tudo!

Aos meus melhores amigos de Sobral, Anacláudia Primo, Dauana Mesquita, Laninha Furtado, Larissa Lima, Dandara Gomes, Miguel Fernandes, Venância Azevedo e em especial Laís Melo, por me acompanhar na jornada de experimentos, por estarem ao meu lado nos momentos difíceis, tristes, mas também nos momentos oportunos, de distração e de felicidade. Obrigado mesmo!

Aos meus melhores amigos da minha cidade, Teully Viana, Franklin Viana, Glória Ribeiro, Brenda Freire, Marcélia Adna, Alan Viana, Hully Teixeira, Hellen Ribeiro por me ajudarem, pelo apoio, mesmo de longe, pelos momentos felizes em reuniões. Obrigado mesmo!

Pela parceria da Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz-PE, pela ajuda nos experimentos. Enfim, a todos que colaboraram, participaram diretamente ou indiretamente deste trabalho. Muito obrigado!

Aos amigos da vida, colegas de trabalho e equipe do Laboratório de Biotecnologia e

Fisiologia da Reprodução (LABIREP) – UFC. Obrigado pelo aprendizado e ajuda!

RESUMO

O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos de diferentes concentrações da dexametasona sobre o desenvolvimento, viabilidade, formação de antro e integridade morfológica em folículos secundários bovinos cultivados *in vitro* por 18 dias. Para este propósito, os ovários bovinos foram obtidos em abatedouro local, em condições assépticas já padronizadas. No laboratório, os folículos secundários com aproximadamente 150-200µm de diâmetro foram isolados e destinados ao cultivo *in vitro* em gotas de TCM-199⁺ sozinho ou suplementado com diferentes concentrações de dexametasona (1, 10, 100 e 1000ng/mL). Ao final do período de cultivo, os folículos cultivados foram destinados à avaliação da viabilidade com os corantes calceína-AM (viáveis) e etídio homodímero (não viáveis), bem como avaliação dos diâmetros foliculares e formação de antro nos dias 0, 6, 12 e 18. Além disso, antes e após cultivo *in vitro*, os folículos foram fixados para análises histológica e ultraestrutural. Os dados do crescimento folicular foram submetidos ANOVA, seguido do teste T, enquanto para a análise da viabilidade folicular e formação de antro foi utilizado o teste Qui-quadrado ($p < 0,05$). Os folículos cultivados em todos os tratamentos com dexametasona apresentaram crescimento significativo, mas somente aqueles cultivados com 1ng / mL e 1000ng / mL apresentaram crescimento até 12 dias de cultivo, porém, não houve diferença significativa entre os tratamentos. Folículos cultivados mostraram formação de cavidade antral ao final do período de cultivo. Os folículos cultivados na presença de dexametasona apresentaram coloração verde (calceína), indicando viabilidade. A morfologia e a ultraestrutura mostraram que os folículos cultivados com dexametasona tinham a ultraestrutura preservada. No entanto, oócitos de folículos cultivados com 10, 100 ou 1000ng / mL de dexametasona tinham sinais de degeneração. Pode-se concluir que folículos cultivados *in vitro* na presença de dexametasona apresentaram crescimento *in vitro*, bem como manutenção da viabilidade e ultraestrutura folicular.

Palavras-chave: Bovinos, dexametasona, cultivo *in vitro*, folículos secundários.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effects of different concentrations of dexamethasone on development, viability, antrum formation and morphological integrity in bovine secondary follicles grown in vitro for 18 days. For in vitro studies, bovine ovaries were obtained at local slaughterhouse, under aseptic conditions already standardized. In the laboratory, secondary follicles with approximately 150-200µm diameter were isolated and intended for in vitro culture in TCM-199⁺drops alone or supplemented with different concentrations of dexamethasone (1, 10, 100 and 1000ng / mL). At the end of the culture period, cultured follicles were evaluated for viability with calcein-AM (viable) and ethidium homodimer (non-viable) dyes, as well as evaluation of follicular diameters and den formation on days 0, 6, 12 and 18. In addition, before or after in vitro culture, the follicles were fixed for histological and ultrastructural analysis. The follicular growth data were submitted to ANOVA, followed by the T test, while the chi-square test ($p < 0.05$) was used for follicular viability and antrum formation. The follicles cultivated in all treatments with dexamethasone presented significant growth, but only those cultivated with 1ng / mL and 1000ng / mL presented growth up to 12 days of culture. However, there was no significant difference between treatments. Follicles cultured in all treatments showed antral cavity formation at the end of the culture period. The follicles cultured in the presence of dexamethasone showed green coloration (calcein), indicating viability. Morphology and ultrastructure showed that follicles cultured with dexamethasone had the ultrastructure preserved. However, follicle oocytes cultured with 10, 100 or 1000ng / mL dexamethasone had signs of degeneration. It can be concluded that follicles cultured in vitro in the presence of dexamethasone showed in vitro growth, as well as maintenance of viability and follicular ultrastructure.

Keywords: Bovine, dexamethasone, *in vitro* culture, secondary follicles.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Oogênese em mamíferos.	16
FIGURA 2.	Foliculogênese no ovário mamífero.	17
FIGURA 3.	Classificação dos folículos em pré-antrais e antrais de acordo com o estágio de desenvolvimento.	18
FIGURA 4.	Estrutura de comunicação entre células da granulosa eócito, denominada como Projeções Transicionais (TPZs).	21
FIGURA 5.	Dinâmica folicular com duas ondas de desenvolvimento folicular.	23
FIGURA 6.	Esquema demonstrando a dinâmica folicular com três ondas foliculares.	24
FIGURA 7.	Ação do fator promotor da meiose.	25
FIGURA 8.	Ação dos grânulos corticais.	26
FIGURA 9.	Folículos pré-antrais isolados em um (A) sistema bidimensional e (B) <i>in situ</i> .	27
FIGURA 10.	Sistemas de cultivo bidimensional de folículos isolados.	28
FIGURA 11.	Folículo pré-antral isolado inserido em gota de meio de cultivo e sob óleo mineral para o cultivo <i>in vitro</i> bidimensional.	28
FIGURA 12.	Folículo pré-antral cultivado em um sistema de cultivo tridimensional.	29
FIGURA 13.	Sistema de cultivo tridimensional de folículos isolados. (A) Múltiplos folículos encapsulados em matriz, ou (B) folículo encapsulado co-cultivado com células alimentadoras.	29

FIGURA 14. Representação do mecanismo de ação dos glicocorticoides: (A) transativação (B) transrepressão e (C) bloqueio de fatores de transcrição. 32

FIGURA 15. Representação da estrutura química do cortisol (A) e da dexametasona (B). 33

ARTIGO

- FIGURA 1.** Percentages of normal secondary follicles cultured for 18 days in TCM-199+ alone or supplemented with different concentrations of dexamethasone. 49
- FIGURA 2.** Percentages of antrum formation in secondary follicles cultured for 18 days on TCM-199+ alone or supplemented with different concentrations of dexamethasone. 49
- FIGURA 3.** Viability of bovine secondary follicles cultured for 18 days evaluated by light microscopy (100x magnification) after staining with calcein-AM (green) and ethidium homodimer (red). Secondary follicle cultured on TCM-199+ (control) (A, B); Secondary follicle cultured in medium containing DEXA 1ng/mL (C, D); Secondary follicle cultured on medium containing DEXA 10ng/mL (E, F); Secondary follicle cultured on medium containing DEXA 100ng/mL (G, H); Secondary follicle cultured on medium containing DEXA 1000ng/mL (I, J). 50
- FIGURA 4.** Normal uncultivated secondary follicle included in ovarian tissue (A); Isolated normal follicle grown for 18 days in the presence of Dexamethasone (B); Isolated atresic follicle (C). CG, granulosa cells; O, oocyte; Z, zonapellucida and arrows indicate disorganization of granulosa cells. Scale bar represents 100 μ m. 51
- FIGURA 5.** Representative micrographs of bovine secondary follicles cultured for 18 days in the presence of dexamethasone. (A, B) or cultured TCM-199 alone (C, D), or in TCM-199+ supplemented with 1ng / ml (E, F), 10ng / ml (G, H) 100 ng / ml (I,J) and 1000 ng / ml (K,L). N: nucleus; M: mitochondria; V: vacuole; R: endoplasmic reticulum; ZP: zonapellucida; arrow: ZP detachment; and arrowhead: oocyte-granular extensions. 54

LISTA DE TABELAS ARTIGO

TABELA 1. Diameters (mean \pm SEM) of bovine follicles after 0, 6, 12 and 18 days of in vitro culture in TCM - 199 + alone or supplemented with different concentrations of dexamethasone (1, 10, 100 and 1000ng / mL). 48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

11 β HSD 1 e 2	11 β -hidroxiesteroide desidrogenase
AMPc	Monofosfato Cíclico de adenosina
ANOVA	Análise de Variância
Bcl-2	Célula-B de Linfoma 2
BMP-15	Proteína Morfogenética Óssea 15
BSA	Albumina Sérica Bovina
CO ²	Gás Carbônico
DEX	Dexametasona
DMEM	Meio de Eagle Modificado de Dulbecco
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
FGF-1 e 2	Fator de Crescimento Fibroblástico Básico
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GDF-9	Fator de Diferenciação e Crescimento 9
ITS	Insulina, Transferrina, Selênio
KL	Kit-ligante
LH	HormônioLuteinizante
LIF	Fator Inibidor de Leucemia
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MOIFOPA	Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais
NaCl	Cloreto de Sódio
O ₂	Oxigênio
PBS	Phosphatebuffered saline (Tampão fosfato salino)
pH	Potencial Hidrogeniônico
StAR	Proteína Reguladora Aguda da Esteroidogênese
TCM-199	Meio de Cultivo Tecidual 199
TCM-199 ⁺	Meio de Cultivo Tecidual 199 Suplementado
TGF- β	Fatores De Crescimento Transformante Beta
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
α MEM	Meio Essencial Mínimo Alfa

LISTA DE SÍMBOLOS

<	Menor que
%	Porcentagem
μg	Micrograma
μm	Micrometros
g	Gramas
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetros
mM	Milimolar
ng	Nanograma
°C	Grau Celsius
α	Alfa
β	Beta

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	14
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	Oogênese e Foliculogênese em bovinos.....	16
2.1.1	Oogênese.....	16
2.1.2	Foliculogênese.....	17
2.1.3	Crescimento folicular na fase antral.....	21
2.1.4	Maturação oocitário em bovinos.....	24
2.2	Cultivo <i>in vitro</i> de folículos secundários.....	26
2.3.	Glicocorticoides e seus efeitos adversos.....	31
2.3.1	Os Glicocorticoides.....	31
2.3.2	Dexametasona.....	33
2.3.3	Efeito da dexametasona na fisiologia reprodutiva das fêmeas.....	34
2.3.4	Efeito da dexametasona no desenvolvimento folicular <i>in vitro</i>	35
3.	JUSTIFICATIVA.....	37
4.	HIPÓTESES.....	38
5.	OBJETIVOS.....	39
5.1	Objetivo geral.....	39
5.2	Objetivos específicos.....	39
6.	ARTIGO:Effects of dexamethasone on <i>in vitro</i> development of isolated bovine secondary follicles.....	40
7.	CONCLUSÕES GERAIS.....	59
8.	PERSPECTIVAS.....	60
	REFERÊNCIAS	61

1. INTRODUÇÃO

O ovário mamífero apresenta baixa eficiência no que diz respeito à liberação de oócitos maduros, pois dos milhares de folículos presentes ao nascimento, apenas 0,1% alcança a ovulação (HANSEN et al., 2009), fazendo com que o desenvolvimento de um folículo pré-ovulatório a partir de um folículo primordial seja um evento extremamente raro. Assim, o desenvolvimento de biotécnicas reprodutivas como a Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais (MOIFOPA) que visa o estudo e a compreensão da foliculogênese pré-antral através do isolamento e recuperação de folículos ovarianos apresenta grande importância (LIMA; SANTOS, 2010). Essa técnica tem sido utilizada em várias pesquisas, nas mais diversas espécies, como por exemplo, em bovinos (PASSOS et al., 2016; ROSSI et al., 2015; SILVA et al., 2014; SILVA et al., 2017a); caprinos (ARAÚJO et al., 2011); ovinos (LUNARDI et al., 2016) e camundongos (ZHANG et al., 2017), viabilizando a recuperação de um grande número de oócitos a partir de folículos pré-antrais, possibilitando também a adição de diversas substâncias ao meio de cultivo *in vitro* para avaliação a toxicidade e influencia na integridade e no desenvolvimento de folículos pré-antrais ovarianos (GUERREIRO et al., 2016).

A utilização de meios de cultivo apropriados pode auxiliar a manutenção da viabilidade das células durante o cultivo, como exemplo, o meio TCM-199 que tem sido utilizado com sucesso em folículos secundários isolados na espécie bovina (ROSSETTO et al., 2013). Além disso, estes meios podem ser suplementados com substâncias que forneçam energia, proteção contra agentes oxidantes, antibióticos e hormônios que auxiliam no desenvolvimento dos folículos. De forma geral, o meio TCM-199, suplementado, tem permitido o desenvolvimento folicular por 18 dias (PAULINO et al., 2018; CUNHA et al., 2018), mas ainda assim são necessários mais estudos com adição de novas substâncias, visando o cultivo *in vitro* como uma excelente alternativa para se avaliar os efeitos de várias drogas (utilizadas para o tratamento de doenças) sob o desenvolvimento folicular *in vitro* (GUERREIRO et al., 2016; SILVA et al., 2018).

Os sistemas de cultivo *in vitro* também podem ser utilizados para avaliar os efeitos de drogas ou medicamentos sobre o desenvolvimento e viabilidade dos oócitos. Sabe-se que na clínica médica animal, o uso indiscriminado da dexametasona na corticoterapia, como anti-inflamatório sistêmico em bovinos (EGUCHI et al., 2017), traz algumas consequências de ordem reprodutiva como os abortos prematuros, aumento do intervalo entre partos, retenção

placentária (GRUNERT et al., 2005), mortalidade materna e nascimento de bezerros mortos ou extremamente debilitados (MALMA, 1993). O uso da dexametasona também foi responsável por diminuir a frequência e a amplitude do LH, inibindo desta forma o desenvolvimento folicular, diminuição de estradiol e interferência na regressão do corpo lúteo (BROUSSARD et al., 1997). No entanto, ainda não são conhecidos os efeitos da dexametasona sobre o desenvolvimento de folículos pré-antrais bovinos. Desta forma, este estudo pode esclarecer se este glicocorticoides afeta negativamente ou positivamente o desenvolvimento folicular também na fase pré-antral.

Para um maior esclarecimento da importância deste estudo, a revisão de literatura a seguir abordará aspectos relacionados ao desenvolvimento folicular e oocitário *in vivo* e *in vitro*, cultivo *in vitro* de folículos secundários, glicocorticoides e seus efeitos adversos na fisiologia reprodutiva de fêmeas bovinas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Oogênese e Foliculogênese em bovinos

2.2.1. Oogênese

O processo de oogênese, caracterizado pelo o desenvolvimento do oócito em paralelo ao desenvolvimento folicular, culmina com a maturação oocitária através de mudanças nucleares e citoplasmáticas (KARDONG, 2016; VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). A oogênese tem início durante a gestação, na fase embrionária, a partir da proliferação e migração das células germinativas primordiais (CGPs) para as gônadas em desenvolvimento, passando por mudanças na reorganização das organelas que resultam na formação das oogônias (SADEU et al., 2006). Parte dessas oogônias passam por divisões mitóticas, para assegurar a renovação de células germinativas, e em seguida estas células iniciam a primeira meiose para dar origem aos oócitos (MARTINS et al., 2008), formando assim o oócito primário.

Em mamíferos, o oócito primário passa por vários eventos sequenciais até alcançar a fase de metáfase II (BLANCO et al., 2011). O oócito primário, que se encontra em estágio de vesícula germinativa, retoma a meiose por influência de hormônios (FSH e LH) a partir da puberdade, o que promove a quebra da vesícula germinativa e formação do oócito secundário. A segunda meiose se inicia e permanece na metáfase II até que ocorra a fecundação (MOORE; PERSAUD, 1994) (Fig. 1). Após a fecundação, ocorre o término da segunda divisão meiótica e formação do oócito haploide fecundado, o que caracteriza o final da oogênese.

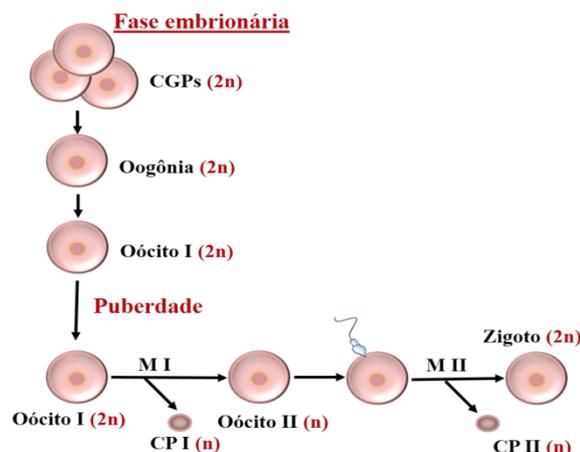


Figura 1. Oogênese em mamíferos. As siglas CPI e CPII representam o corpúsculo polar formado no final de cada meiose. Fonte: Elaborada pelo autor.

2.1.2. Foliculogênese

O processo de desenvolvimento folicular é denominado de foliculogênese (ADONA et al., 2012). Durante a foliculogênese ocorre a proliferação das células da granulosa e crescimento oocitário, promovendo assim o desenvolvimento dos folículos primordiais em direção ao estágio de folículos pré-ovulatórios (Fig. 2).

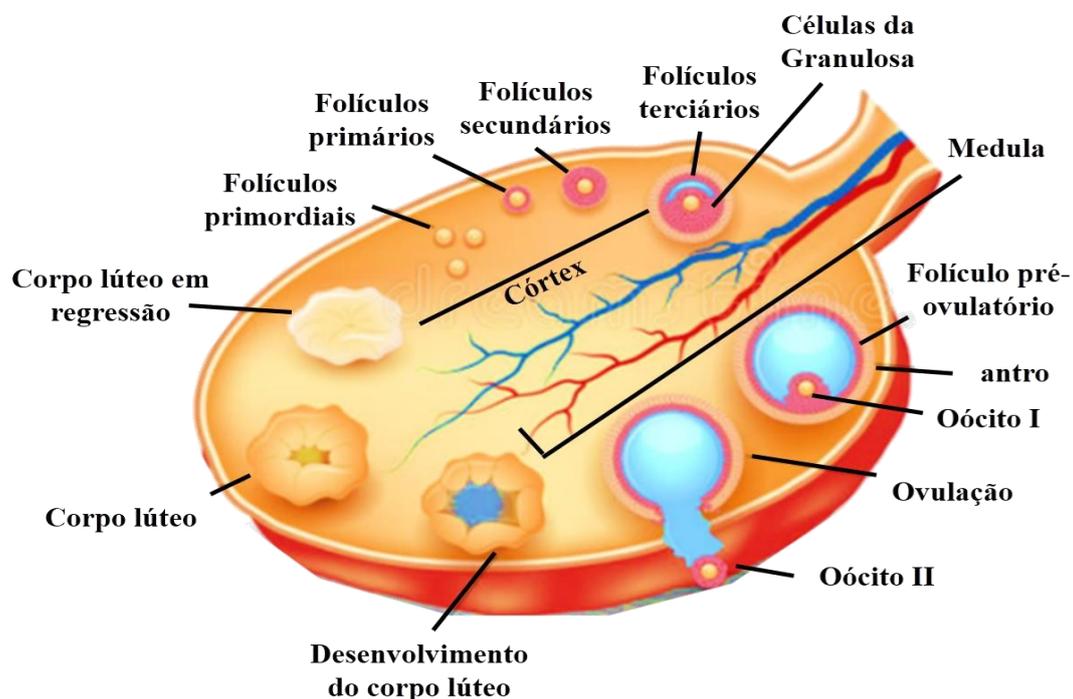


Figura 2. Foliculogênese no ovário mamífero. Fonte: Dreamstime – Banco digital de imagens.

De acordo com as características morfológicas, os folículos ovarianos podem ser classificados em folículos pré-antrais, que inclui os folículos primordiais, primários e secundários, e em folículos antrais, ou seja, os folículos terciários e pré-ovulatórios (ADONA et al., 2012; RODRIGUEZ; FARIN, 2004; BARNETT et al., 2006). A classificação e categoria folicular estão apresentadas na Figura 3.

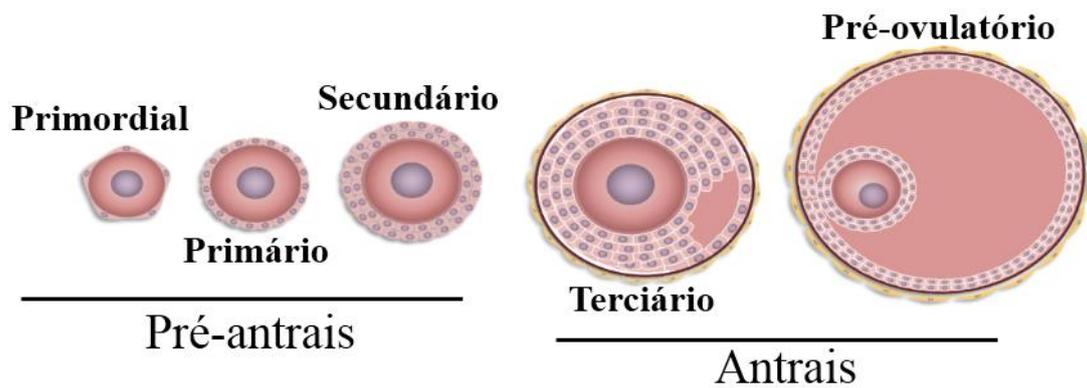


Figura 3. Classificação dos folículos em pré-antrais e antrais de acordo com o estágio de desenvolvimento. Fonte: Adaptado de Figueiredo et al. (2008).

Os folículos primordiais apresentam um oócito circundado por uma camada de células da granulosa de formato pavimentoso, se diferenciando dos folículos primários com uma única camada de células da granulosa, com formato cuboide, que circunda o oócito. (ADONA et al., 2012). Através da análise ultraestrutural foi observado que os folículos primordiais apresentam um oócito esférico ou ovoide em estreito contato e completamente rodeado por células da granulosa de formato achatada, formando zonas de aderência. Estes folículos apresentam ainda, prolongamentos de microvilos no oócito em direção as células da granulosa, organelas aglomeradas ao redor do núcleo oocitário e mitocôndrias evidentes. Já os folículos primários apresentam também oócitos ovóides ligados por endocitose às células da granulosa, com projeções de microvilos, mitocôndrias abundantes, e em algumas áreas princípio de zona pelúcida (BASSO; ESPER, 2002).

A progressão do folículo primário ao estágio de folículo secundário é caracterizada pela formação da segunda camada de células da granulosa e pela formação inicial da zona pelúcida em torno do oócito, que aumenta de tamanho (RODRIGUEZ; FARIN, 2004). A categoria dos folículos secundários tem como características ultraestruturas *in vivo* a formação da zona pelúcida ao redor do oócito em associação aos microvilos, muitas mitocôndrias alongadas e espalhadas, presença de gotículas lipídicas e oócitos com presença de grânulos corticais (BASSO; ESPER, 2002).

O desenvolvimento de folículos secundários está relacionado com a expressão de receptores para hormônios gonadotrópicos, FSH e LH (XU et al., 1995), podendo-se dizer que essa categoria folicular é sensível ao FSH. O LH desencadeia o processo de biossíntese de andrógenos tecais que podem estimular a formação de novos receptores de FSH

nas células da granulosa. Deste modo, o FSH pode amplificar seu efeito sobre os folículos secundários (YOUNG; Mc NELLY, 2010), estimulando a proliferação, diferenciação das células da granulosa e formação do antro (RICHARDS et al., 2002).

O desenvolvimento dos folículos pré-antrais sofre forte influência de fatores de crescimento, de origem parácrina. Essas respostas têm um caráter bidirecional, ações essas vindas do oócito para as células da granulosa, como também das células da granulosa para o oócito (BURATINI JR., 2007). Essa benéfica comunicação se deve as conhecidas projeções transicionais, que auxiliam na troca de substâncias através das junções gap, e que serão mais bem detalhadas mais na frente.

Entre os fatores de crescimento que auxiliam tanto no desenvolvimento de folículos pré-antrais, como no desenvolvimento de oócitos, estão o kit-ligante (KL), o fator de crescimento e diferenciação-9 (GDF-9), e a proteína morfogenética óssea-15 (BMP-15). Entre as funções relacionadas ao kit-ligante, além de estimular o desenvolvimento folicular na fase pré-antral, participa na indução da proliferação das células da granulosa, através da produção de substâncias que estimulam o processo de mitose pelo oócito (OTSUKA; SHIMASAKI, 2002). O GDF-9 já é bem conhecido por influenciar o crescimento de folículos secundários cultivados por 12 dias (VASCONCELOS et al., 2012). No caso de folículos primordiais, a ausência da expressão de GDF-9 pode causar infertilidade, cessando a foliculogênese (DONG et al., 1996), bem como também na manutenção da qualidade estrutural das projeções transicionais (CARABATSOS et al., 1998).

A proteína morfogenética óssea-15 (BMP-15) está fortemente ligada ao controle da foliculogênese. Essa participação se dá com a interação da BMP-15 com o KL, induzindo o início do desenvolvimento folicular, que por sua vez, no decorrer do crescimento do oócito, produz GDF-9 que promove a proliferação das células da granulosa e a modulação do KL (SHIMASAKI et al., 2003). Em um estudo de cultivo *in vitro* de folículos bovinos, a influência da BMP-15 pode ser demonstrada quando folículos cultivados se desenvolveram, obtendo a formação do antro, mantendo a integridade ultraestrutural e viabilidade por 12 dias de cultivo (PASSOS et al., 2013).

Além de fatores de ativação e crescimento que envolve o desenvolvimento folicular e oocitário *in vivo*, o processo de diferenciação e formação do folículo pré-ovulatório é um evento mediado por diversos outros fatores como a expressão de genes reguladores de proliferação (IL-4; KL), diferenciação (FGF-2; TNF α), genes reguladores da sobrevivência (KL; LIF - Fator inibidor de leucemia) e ainda expressão de genes relacionados a maturação folicular (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Essas informações reforçam a ideia de que a

interação folículo-oócito e a interação de substâncias *in vivo* são importantes para a manutenção do desenvolvimento folicular e oocitário, sendo de extrema importância para a aplicação em estudos *in vitro*.

Ainda sobre o desenvolvimento folicular, duas importantes informações devem ser evidenciadas. Primeiro, nos folículos pré-antrais ocorre uma interação entre as células foliculares e oócito com secreção de fatores locais. Já nos folículos antrais, além da interação com fatores locais, há uma dependência de gonadotrofinas (OLIVEIRA; FERREIRA; MINGOTI, 2011), que participam da esteroidogênese, proporcionam a ovulação e a luteinização, além de estimular a proliferação e diferenciação das células da granulosa e formação do antro (RICHARDS et al., 2002).

Essa sincrônica interação entre as células foliculares e oócito representa uma importante comunicação e sinalização existente entre células da granulosa e oócito, através das junções gap (MELLO et al., 2013; SARAIVA et al., 2010). Estas interações são de extrema importância, pois estão envolvidas no desenvolvimento do oócito em todos os seus aspectos (HUGH, 2018). Essa comunicação entre as células foliculares e oócitos se dá pela presença de estruturas conhecidas como projeções transicionais (TPZs) que partem das células da granulosa e se ligam através de projeções citoplasmáticas ao oócito, sendo essas projeções influenciadas por fatores de crescimento (Fig. 4). Em um estudo com camundongos, foi observado que a ausência de GDF-9, além de diminuir a quantidade de projeções transicionais, ocasiona uma mudança estrutural nas mesmas demonstrando assim que a quantidade de projeções presentes é influenciada pelo fator de crescimento GDF-9 produzido pelo oócito (CARABATSOS et al., 1998). Em bovinos, o GDF-9, em condições *in vitro*, já demonstrou proporcionar o crescimento de folículos secundários cultivados por 12 dias (VASCONCELOS et al., 2012), fortalecendo ainda mais a ideia de que os fatores como o GDF-9 influencia as projeções transicionais.

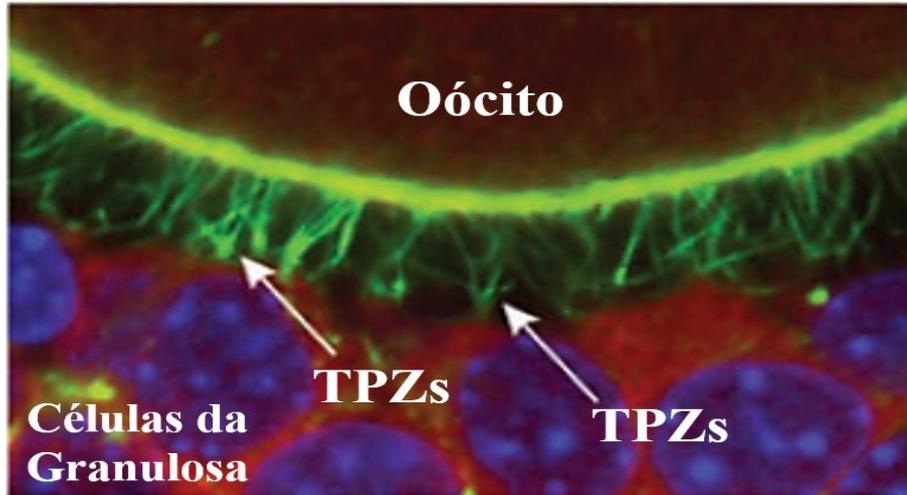


Figura 4. Estrutura de comunicação entre células da granulosa eoócito, denominada de projeções transicionais (TPZs). Fonte: Hugh, (2018).

Considerando a população folicular ovariana, os folículos pré-antrais representam a grande maioria dos folículos presentes no ovário de mamíferos (SILVA et al., 2003). No entanto, apenas de 1 a 2% destes folículos alcançam a ovulação, e os demais sofrem o processo de atresia (BARUSELLI et al., 2007).

Desta forma, o desenvolvimento de pesquisas que envolva a classe de folículos pré-antrais, em especial de folículos secundários, permite a exploração máxima desses folículos que estariam destinados a atresia permitindo assim uma maior aplicabilidade nas biotécnicas reprodutivas. Além disso, é importante estudar a morfologia e classificação folicular, pois possibilita o reconhecimento dos folículos em desenvolvimento ou atresia, visto que as mudanças morfológicas estão associadas a esses eventos (RODGERS; IRVING-RODGERS, 2010).

2.1.3. Crescimento folicular na fase antral

Os folículos terciários ou antrais são caracterizados por apresentarem múltiplas camadas de células da granulosa organizadas, durante seu crescimento ocorre a formação da cavidade antral que se expande paralelamente com a proliferação das células da granulosa (RODGERS; IRVING-RODGERS, 2010). A cavidade antral é preenchida pelo fluido folicular, o qual é composto de água, eletrólitos, proteínas séricas e alta concentração de hormônios esteroides fornecidos pelas células da granulosa (BARNETT et al., 2006). O antra está diretamente ligado a competência meiótica que é adquirida durante a foliculogênese

(SÁNCHEZ; SMITZ, 2012). O folículo terciário, por análise ultraestrutural, apresenta zona pelúcida circundando completamente o oócito com projeções que partem das células da granulosa, passando pela zona pelúcida e atingindo o ooplasma. As organelas se apresentam mais organizadas e uniformes, com mitocôndrias alongadas, aumento de gotículas lipídicas e vesículas (FAIR et al., 1997; HYTTEL et al., 1997).

Durante o desenvolvimento de folículos antrais, especialmente após alcançarem um diâmetro de 3 a 4mm, observa-se a ocorrência de uma a três, ou quatro ondas de desenvolvimento folicular por ciclo estral em bovinos (BARUSELLI et al., 2007). Uma onda folicular é iniciada com um grupo de folículos, com aproximadamente 4 mm, que sob estímulo do FSH são recrutados, crescendo simultaneamente, estendendo-se por dois ou três dias (MIHM; BLEACH, 2003; PETER et al., 2009), sendo que apenas um completará o ciclo (GINTHER et al., 2003). Esse folículo, por sua vez passa a ser dominante em relação aos outros folículos e inibe que um novo grupo de folículos seja recrutado. O folículo dominante inibe a ovulação dos folículos subordinado devido a baixa constância de pulsatilidade do hormônio luteinizante (GINTHER; KNOPF; KASTELIC, 1989; GINTHER et al., 1996).

Detalhadamente, na dinâmica folicular em bovinos, três eventos importantes acontecem e devem ser evidenciados. São eles, o recrutamento, a seleção e a dominância folicular (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Nesse evento inicial, denominado de recrutamento, um grupo de folículos em crescimento são recrutados, a partir de então, continuam a se desenvolver até o início do próximo evento, a seleção. É válido destacar que os folículos bovinos na fase de folículos pré-antrais até antrais iniciais se desenvolvem sem a necessidade de gonadotrofinas. Os folículos se desenvolvem mesmo em níveis baixos de FSH até o momento do recrutamento (FORTUNE et al., 2001).

No segundo evento, a fase de seleção, apenas um folículo é selecionado e passa a ser denominado de folículo dominante, que prosseguirá até o seu completo desenvolvimento (GINTHER et al., 1996). Ressalta-se que durante essa fase ocorre a escolha do folículo que seguirá até a dominância, em contrapartida há uma diminuição em número dos outros folículos que estavam em crescimento (SILVA et al., 2016). Acredita-se que essa diminuição do número de folículos em desenvolvimento é advinda da regulação da secreção de FSH por causa do aumento na produção do hormônio estradiol e inibina pelas células foliculares do folículo em desenvolvimento ou dominante (SILVA et al., 2016). Ocorre então a divergência folicular, os folículos seguem por dois caminhos, um folículo é escolhido para seguir e se tornar o folículo dominante, enquanto os que restaram sofrem atresia, e são denominados de folículos subordinados (GINTHER et al., 1996).

No terceiro evento, na dominância folicular, o folículo que foi recrutado, desenvolve-se e torna-se cada vez mais sensível ao FSH. A redução passiva do FSH se dá pelo aumento do estradiol e da inibina, os menores níveis de FSH atenua o desenvolvimento dos folículos subordinados, porém, se mantém o suficiente para sustentar o desenvolvimento do folículo dominante (ALVES et al., 2002). Essas informações indicam que até haver a dominância, os folículos são independentes de FSH. Já com relação ao LH, essa dependência ocorre após o evento de dominância (FORTUNE et al., 2001). O processo demonstrando a ocorrência de dois eventos e os principais hormônios participantes podem ser vistos na Figura 5 e o processo de dinâmica folicular com até três ondas foliculares, como mencionado inicialmente, pode ser observado na Figura 6.

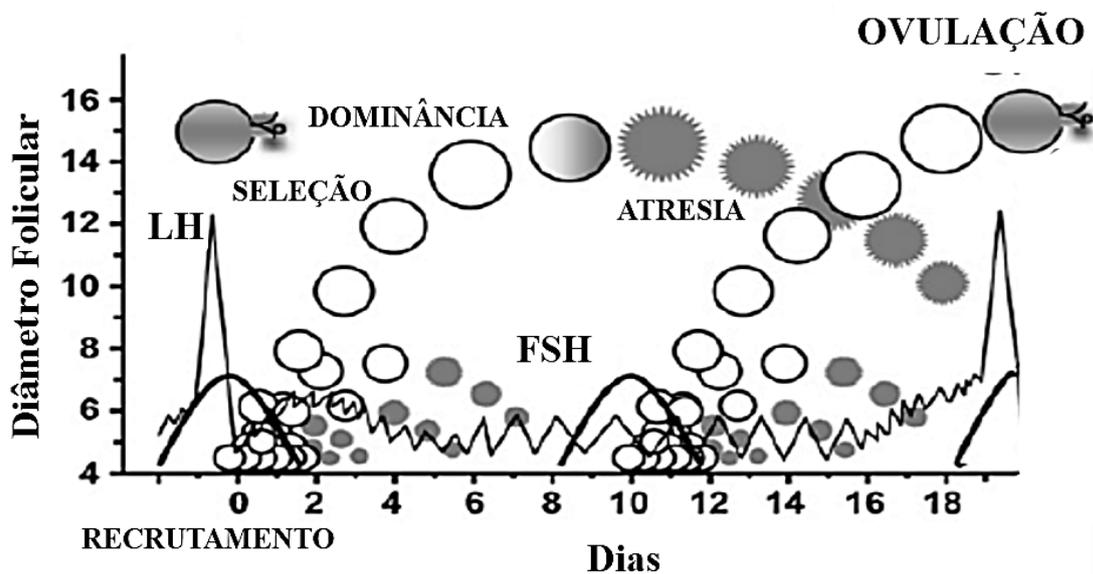


Figura 5. Dinâmica folicular com duas ondas de desenvolvimento folicular. Fonte: Adams et al., (2008).

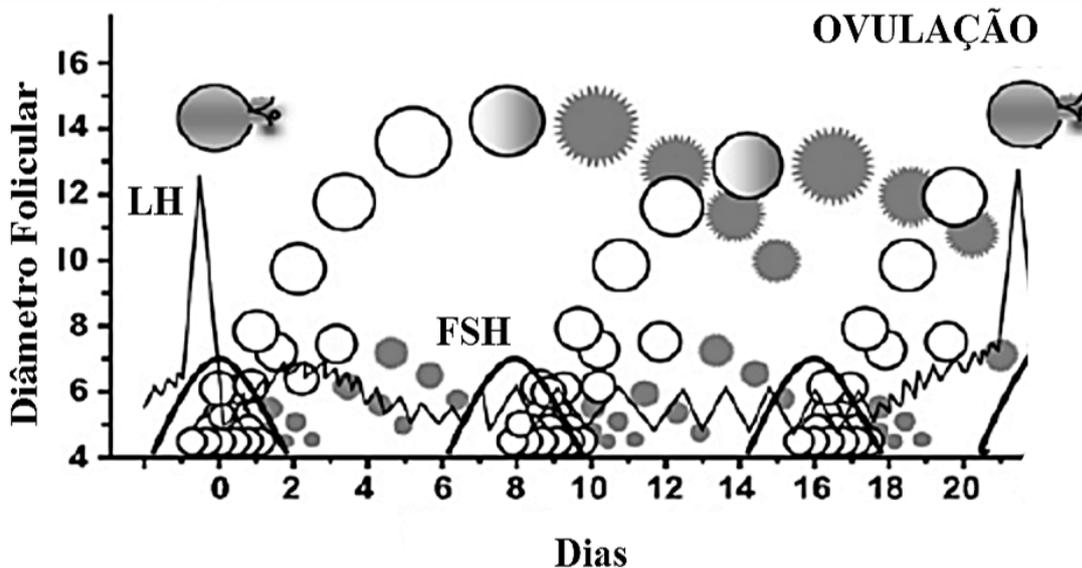


Figura 6. Esquema demonstrando a dinâmica folicular com três ondas foliculares. Fonte: Adams et al., (2008).

2.1.4. Maturação oocitária em bovinos

A maturação oocitária é um evento que ocorre paralelamente e de forma sincronizada com a foliculogênese, visto que são eventos relacionados funcionalmente (SILVA et al, 2016). Os oócitos após iniciarem a primeira meiose, estacionam na prófase I, momento esse de grande importância, pois, é nesse momento que se tornam aptos para uma futura ovulação ou atresia (LONERGAN; FAIR, 2015).

Em mamíferos, especificamente em bovinos, os oócitos já iniciaram a primeira meiose, tendo sua primeira parada da meiose no estágio denominado de diplóteno ou como vesícula germinativa (VG) (RICHARDS, 1980). Esse estágio se torna importante, pois durante esse processo no oócito há constante produção de RNAm e proteínas, além de mitocôndrias que darão suporte ao desenvolvimento embrionário no caso de uma fertilização (SVOBODA; FRANKE; SCHULTZ, 2015).

A maturação oocitária é um processo que envolve dois eventos importantes, a maturação nuclear e a maturação citoplasmática. Os dois eventos ocorrem em conjunto, porém, o completo sucesso da fertilização está mais estreitamente ligado a maturação citoplasmática (ARAÚJO et al., 2014a).

Entre os eventos que ocorrem durante a maturação, a maturação nuclear tem bases moleculares que regem esse evento, dentre eles, a queda dos níveis de AMPc (bloqueador da

meiose) devido ao pico de LH que afasta o oócito das células do cumulus. Isto promove uma perda da comunicação entre esses tipos celulares e impede o fornecimento de AMPc para o oócito, que é produzido pelas células da granulosa (CARABATSOS et al., 2000). Ocorre também a modulação dos níveis de cálcio (Ca^{2+}) pela influência do hormônio gonadotrófico LH, pois, no espaço intracelular há um aumento dos níveis de cálcio (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). A proteína conhecida como fator promotor da meiose (MPF), como o próprio nome sugere, também está diretamente relacionada a quebra da vesícula germinativa e ativação da meiose (Fig. 7). Para a ativação da MPF estão envolvidas cascatas de eventos de fosforilação, como exemplo, de proteínas que estão relacionadas a reorganização do citoesqueleto, que originam o envelope nuclear e na condensação da cromatina (TROUNSON et al., 2001).

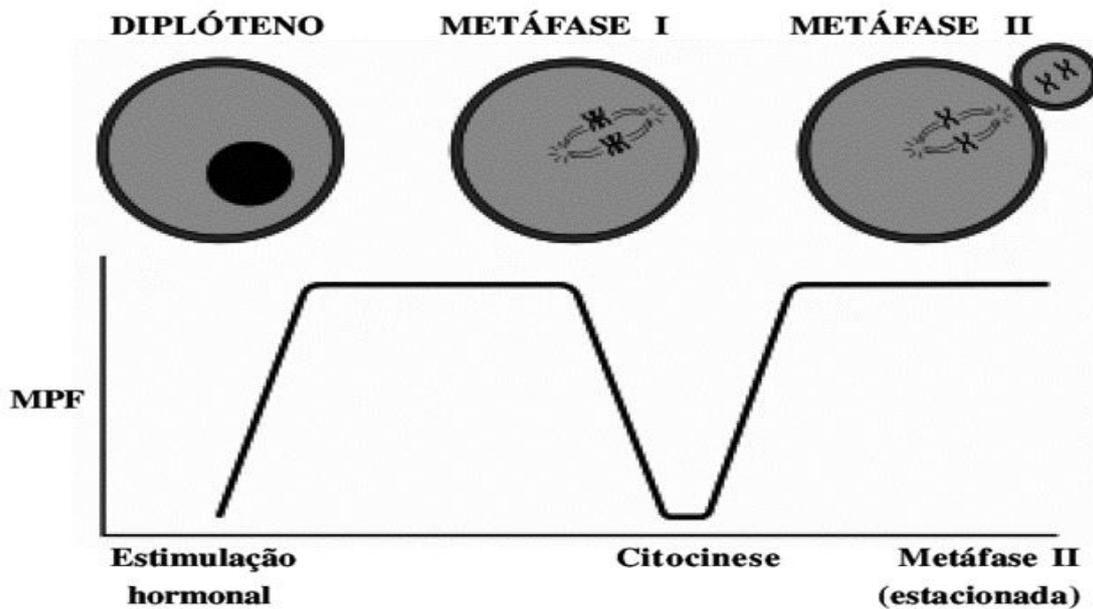


Figura 7. Ação do fator promotor da meiose. Fonte: Adaptado de Araújo et al., (2007).

A maturação bem-sucedida, com um bom desenvolvimento oocitário e conseqüentemente uma fertilização com a obtenção de um embrião saudável, está atribuída a uma maturação citoplasmática eficiente (ARAÚJO et al., 2014a). Nesse evento estão envolvidos a reorganização de organelas, como por exemplo, de mitocôndrias, que marcam a boa qualidade do oócito em bovinos quando se transferem mais para o centro do citoplasma (STOJKOVIC et al., 2001). Sua participação está presente na sua função de

fornecimento de energia, ATP, para os processos que ocorrem no oócito nesse momento (ARAÚJO et al., 2014a).

Outro fator muito importante são os grânulos corticais, pois, sua composição por enzimas, proteases, glicosidases e proteínas estruturais, além da migração desses grânulos para a periferia auxiliam no processo de proteção contra a polispermia (WESSEL et al., 2001). Essas vesículas, através de sua composição, participam ativamente durante a fertilização, impedindo a polispermia através de modificações na zona pelúcida do oócito, fornecendo uma barreira física (Fig. 8).

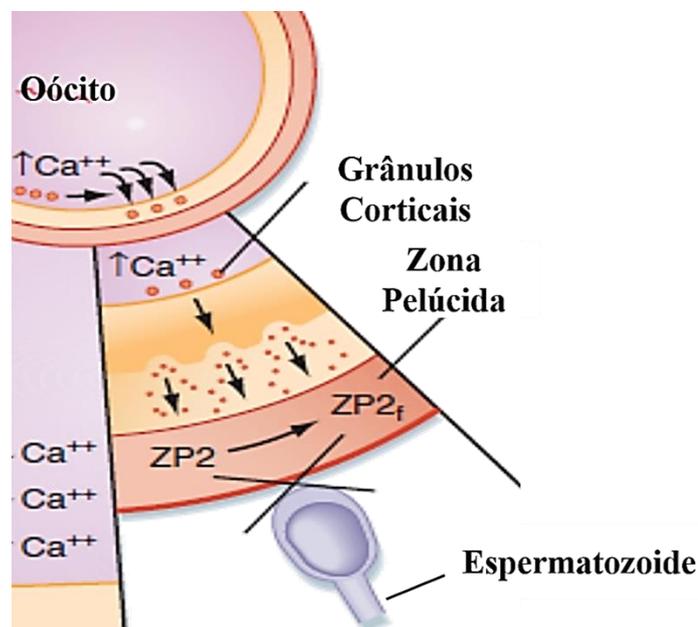


Figura 8. Ação dos grânulos corticais. Fonte: Adaptado de Berne e Levy (2009).

Não menos importante é a produção e estocagem de RNAs e de proteínas que darão o suporte até que o embrião comece sua própria atividade transcricional. Já foi relatado que a maioria dos transcritos é acumulada quando os oócitos se encontram no estágio de vesícula germinativa. Estes transcritos irão coordenar o subsequente desenvolvimento oocitário até a ativação do genoma embrionário. Essa ideia é reforçada pelo fato de que 75% dos genes expressos foram expressos por oócitos imaturos (MAMO et al., 2014).

2.2. Cultivo *in vitro* de folículos secundários

O cultivo de folículos pré-antrais visa promover o desenvolvimento folicular *in vitro*, proporcionando o crescimento e maturação oocitária, ao mesmo tempo em que as células da granulosa se multiplicam e se diferenciam (MAX et al., 2004). No entanto, existem alguns desafios, como a necessidade de um microambiente adaptável as diferentes fases foliculares (GREEN; SHIKANOV, 2016). Os folículos ovarianos podem ser cultivados no interior de um fragmento de córtex ovariano (*in situ*) ou na forma de folículos isolados (Fig. 9). O cultivo destes folículos isolados pode ser em um sistema bidimensional ou tridimensional.

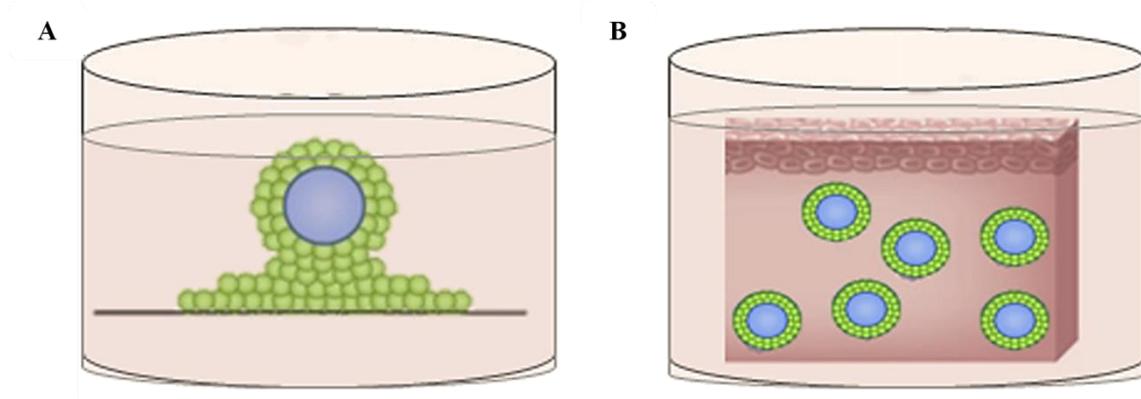


Figura 9. Folículos pré-antrais isolados em um sistema bidimensional (A) e *in situ* em (B).
Fonte: Adaptado de Green e Shikanov (2016).

O cultivo bidimensional pode se apresentar de algumas formas, dentre elas o folículo pode ser colocado em uma superfície, que pode ser uma matriz plástica ou extracelular (gel de colágeno, matrigel, etc.) (Fig. 10). Além disso, no cultivo bidimensional, os folículos pré-antrais isolados podem ser inseridos e cultivados em gotas de meio de cultivo sob em óleo mineral, como demonstrado na Figura 11. No caso de folículos bovinos, já se tem muitos resultados positivos em relação a esse sistema de cultivo (VASCONCELOS et al., 2012; PASSOS et al., 2013; ROSSI et al., 2015; SILVA et al., 2014).

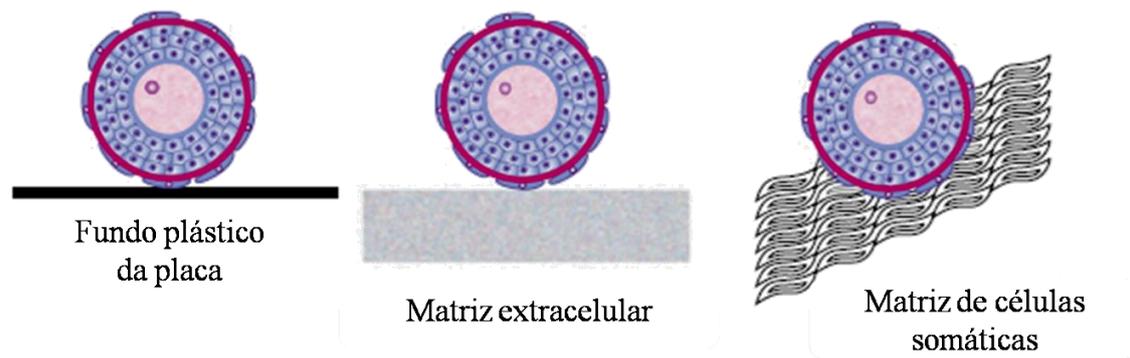


Figura 10. Sistemas de cultivo bidimensional de folículos isolados. Fonte: Adaptado de Araújo et al. (2014b).

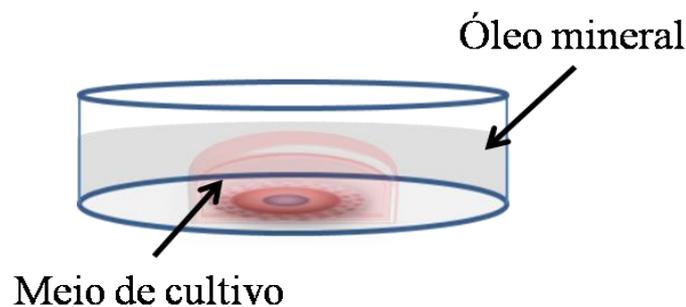


Figura 11. Folículo pré-antral isolado inserido em gota de meio de cultivo e sob óleo mineral para o cultivo *in vitro* bidimensional. Fonte: elaborado pelo autor.

O cultivo tridimensional é caracterizado por utilizar um substrato no qual o folículo é inserido, sendo totalmente circundado, permitindo a manutenção da sua estrutura tridimensional (ROSSETTO et al., 2011). O sistema de cultivo tridimensional pode ser observado na Figura 12. Neste sistema de cultivo, múltiplos folículos podem ser encapsulados na matriz. Outra possibilidade é realizar o co-cultivo de folículos isolados com células alimentadoras (GREEN E SHIKANOV, 2016) (fig. 5).

Esses sistemas de cultivo apresentam vantagens por permitir o acompanhamento individual do folículo e seu desenvolvimento até a etapa antral (PICKTON et al., 2001). No entanto, ao se comparar os sistemas de cultivo de folículos ovarianos bovinos na presença de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), Araújo et al. (2014c) obtiveram uma maior taxa de crescimento folicular e porcentagem de formação de antro no sistema de cultivo bidimensional.



Figura 12. Folículo pré-antral cultivado em um sistema de cultivo tridimensional. Fonte: Adaptado de Desai(2010).

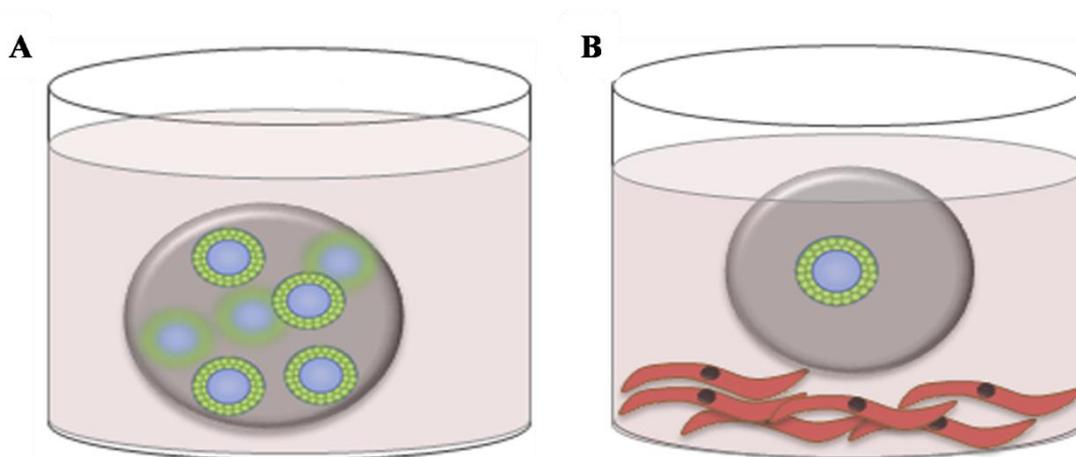


Figura 13. Sistema de cultivo tridimensional de folículos isolados. Múltiplos folículos encapsulados em matriz (A), ou folículo encapsulado co-cultivado com células alimentadoras (B). Fonte: Adaptado de Green e Shikanov (2016).

Os métodos de cultivo podem ser complementares (TELFER et al., 2008), ou seja, primeiramente realiza-se o cultivo *in situ*, para ocorrer a ativação folicular, e em seguida esses folículos são isolados, e cultivados novamente em um sistema de cultivo diferente, ou seja, o cultivo de folículos isolados. Uma interessante aplicação desses métodos e sistemas de cultivo, além de auxiliar nas pesquisas, é sua aplicação após a criopreservação do tecido ovariano (FAUSTINO et al., 2011). Em caso de descongelamento do tecido ovariano, os folículos podem ser isolados, maturados *in vitro*, fertilizados e conseqüentemente a formação e transferência do embrião (GREEN; SHIKANOV, 2016).

Para que o desenvolvimento folicular seja alcançado *in vitro* é necessária a utilização de meios de cultivo, tais como α -MEM (Meio Essencial Mínimo Alfa), DMEM (Meio de Eagle Modificado de Dulbecco) (PHELAN; MAY, 2015), ou o TCM-199 (Meio de Cultivo Tecidual-199) (ROSSETTO et al., 2013). Neste sentido, um bom meio deve conter as substâncias necessárias para o desenvolvimento e crescimento folicular como:

aminoácidos, vitaminas e sais (FIGUEIREDO et al., 2008). Dentre os meios descritos na literatura, o TCM-199 é muito utilizado para cultivo de folículos isolados (PAULINO et al., 2018). Segundo Rossetto et al. (2013), ao se comparar os meios α -MEM, McCoy e TCM-199, concluiu-se que o TCM-199 foi mais eficaz que os demais meios para promover o crescimento folicular, formação do antro, manutenção da morfologia, viabilidade e funcionalidade folicular em folículos secundários isolados de ovários bovinos.

Além dos estudos acerca dos meios de cultivos, muitas pesquisas têm sido realizadas para investigar a importância da suplementação desses meios com substâncias que são fontes de energia, tais como hipoxantina, glutamina, antioxidantes (ácido ascórbico), antibióticos e hormônios (ARAÚJO et al., 2014b). Todas estas substâncias visam dar suporte a sobrevivência e desenvolvimento celular *in vitro*.

Com relação a suplementação dos meios de cultivo com hormônios e fatores de crescimento, Gutierrez et al. (2000) realizou o cultivo *in vitro* de folículos secundários bovinos por 28 dias, sendo o meio de cultivo suplementado com FSH, EGF e IGF-1. Neste estudo, obteve-se desenvolvimento folicular e formação da cavidade antral, tendo sido demonstrado a importância da presença destas substâncias na composição do meio de cultivo. Silva et al. (2017b) demonstrou que a suplementação do meio de cultivo com insulina, FSH e VEGF melhorou a retomada meiótica dos oócitos de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro*. Já em bovinos, a ativina-A (SILVA et al., 2014), o GDF-9 (VASCONCELOS et al., 2012), e a BMP-15 (PASSOS et al., 2013) promoveram o desenvolvimento folicular *in vitro*.

Outros estudos *in vitro* investigaram genes que são expressos durante o desenvolvimento folicular, que somado ao estudo da morfologia, contribui para caracterizar o folículo durante os estágios de desenvolvimento e identificar se está havendo desenvolvimento ou morte celular. Ao se comparar folículos desenvolvidos *in vivo* com aqueles desenvolvidos *in vitro*, Cadoret et al. (2017) demonstraram que folículos ovinos cultivados *in vitro* apresentam uma maior taxa de proliferação e diferenciação de células foliculares, bem como uma maior expressão de genes reguladores de proliferação (CCND2/CDKN1A), de genes reguladores de apoptose (BAX/BCL), e ainda maior expressão de genes relacionados com a maturação folicular (CYP19A1, FSHR, ESR2, INHA, INHBA, INHBB e FST).

Dentre as inúmeras substâncias que podem ser adicionadas ao meio de cultivo com a finalidade de promover um maior desenvolvimento folicular *in vitro* pode-se citar também os glicocorticoides.

2.3. Glicocorticoidese seus efeitos adversos

2.3.1. Os Glicocorticoides

Os Glicocorticoides são hormônios esteroides, formado por 21 átomos de carbono (SOUZA et al., 2010), que remetem ao seu precursor, a molécula de colesterol. A produção deste hormônio depende da presença de enzimas específicas, responsáveis pela conversão do colesterol nos hormônios esteroides (KRAEMER, 2007). Esses hormônios esteroides são produzidos e liberados no córtex adrenal e seus níveis estão sob o controle do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (NECELA; CIDLOWSKI, 2004). Já é conhecido que os glicocorticoides regulam a diferenciação, proliferação, ativação e apoptose celular (SOUZA et al., 2010). Essas funções podem ocorrer através de três diferentes mecanismos de ação.

Inicialmente, os glicocorticoides por ter propriedade lipídica atravessam facilmente a membrana plasmática. No citossol da célula, os glicocorticoides ligam-se ao seu receptor citoplasmático (GR), seguem até núcleo da célula e ligam-se nas regiões promotoras dos genes ou em moléculas chamadas fatores de transcrição. Nessa etapa, o glicocorticoide acoplado ao seu receptor citoplasmático pode atuar por transativação, ocasionando a ativação de genes alvos, ou por transrepressão, ocorrendo o inverso da transativação, a repressão de genes alvos. Por fim, a interação pode ocorrer por contato direto com fatores de transcrição (proteína-proteína), ocasionando uma mudança conformacional nos fatores de transcrição e consequentemente impedindo sua ação, inativando a expressão de genes (RANG et al., 2018; LONGUI, 2007), como representado na Figura 14.

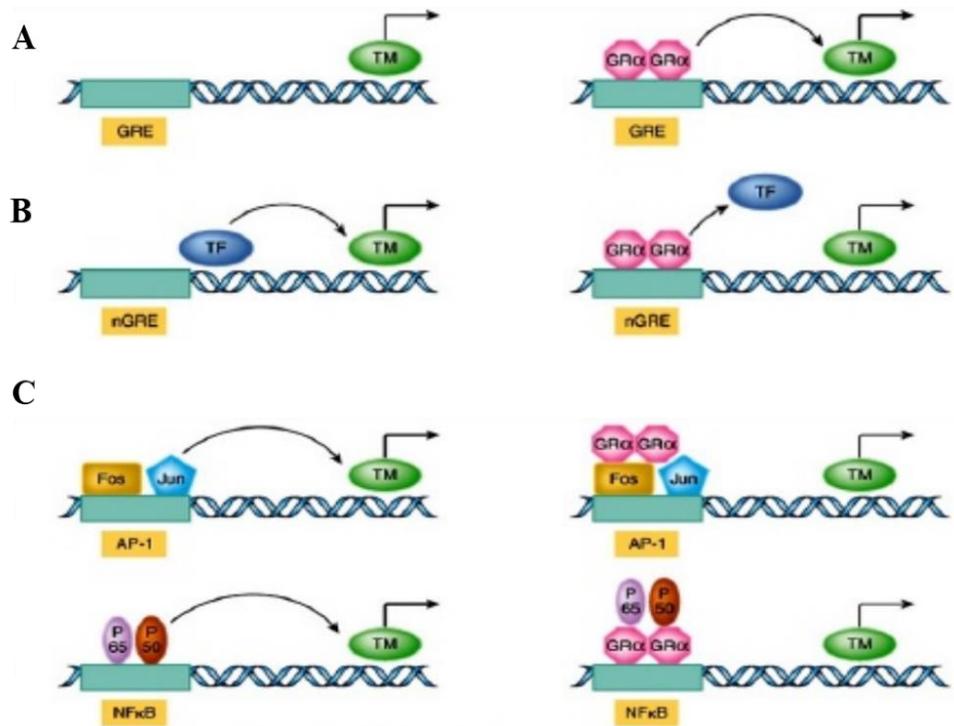


Figura 14. Representação do mecanismo de ação dos glicocorticoides: (A) transativação (B) transrepressão e (C) bloqueio de fatores de transcrição. GRα, Receptor de glicocorticoides; GRE, Região responsiva aos glicocorticoides; nGRE, Região responsiva aos glicocorticoides; TM, Maquinário transcricional; TF, Fatores de transcrição; Fos e Jun, Fator de transcrição da Família Fos e Jun; AP-1, Proteína ativadora-1; P65 e p50, Subunidades do fator nuclear κB; NF-κB, fator nuclear kappa B. Fonte: Rang et al. (2018).

Os glicocorticoides são representados por uma gama de substâncias, dentre estas se destaca o cortisol como principal representante dos glicocorticoides. O cortisol é um hormônio esteroide que influencia no metabolismo da glicose em caso de estresse animal (TORTORA, 2000).

Os produtos de origem sintética são equivalentes aos naturais em relação a sua estrutura química, apresentando, no entanto, atividade farmacológica diferenciada. Os principais produtos sintéticos encontrados no mercado, equivalentes ao cortisol são a hidrocortisona (de ação rápida), a prednisona e a prednisolona (de ação intermediária), a dexametasona e a betametasona (de ação prolongada). A dexametasona, por exemplo, apresenta vinte vezes mais atividade farmacológica que o cortisol (BAVARESCO; BERNARDI; BATTASTINI, 2005). Os glicocorticoides estão entre os fármacos mais utilizados no mundo e são amplamente utilizados desde o tratamento de várias doenças

inflamatórias até no tratamento de doenças imunológicas (DE BOSSCHER et al., 2010). Embora apresente efeitos benéficos, o seu uso pode causar efeitos adversos, como apoptose em células do sistema imune. Por isso, a importância de estudos sobre suas ações metabólicas (TORRES; INSUELA; CARVALHO, 2012), já tendo sido apontado que pode influenciar e ter ação negativa sobre a reprodução (SANTANA et al., 2014; GRUNERT et al., 2005; MALMA, 1993).

Neste sentido, muito são os estudos que esclarecem informações a respeito das ações, indicações, efeitos colaterais e toxicidade dos glicocorticoides de forma geral, porém há pouca informação sobre os seus efeitos na reprodução animal e mais especificamente seus efeitos em folículos ovarianos *in vitro*.

2.3.2. Dexametasona

A dexametasona é um glicocorticoide similar ao cortisol (SANTANA, 2009) (Fig. 15), tendo a capacidade de se comportar como um glicocorticoide natural e demonstrar a mesma eficácia clínica, com papel importante no tratamento de doenças inflamatórias e imunes (CHU et al., 2014; LONGUI, 2007), prescrito tanto para a medicina humana quanto à veterinária.

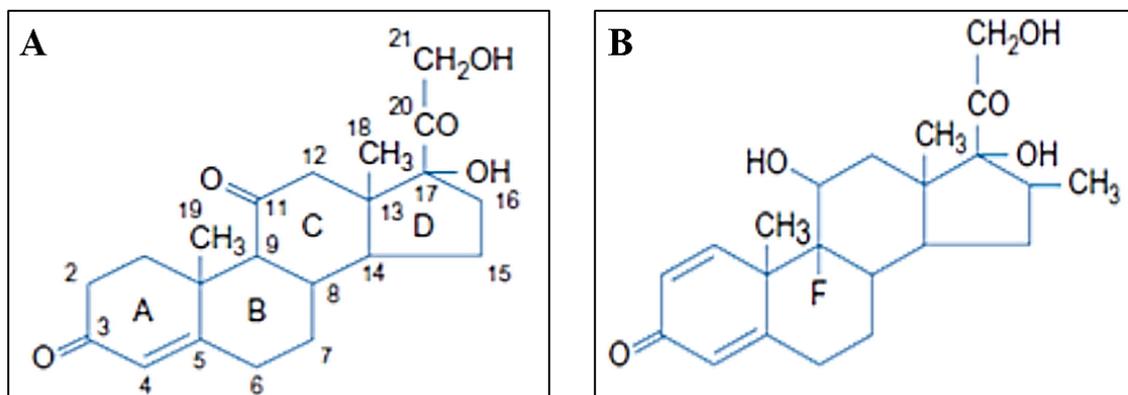


Figura 15. Representação da estrutura química do (A) cortisol e (B) dexametasona. Fonte: Adaptado de Richet al. (2019).

Na medicina veterinária, a dexametasona possui várias indicações clínicas, entre elas a corticoterapia, utilizadas no tratamento de várias doenças inflamatórias (EGUCHI et al., 2017). Em bovinos, estudos demonstram que ocorre uma eosinofilia causada pela administração de dexametasona. Além disso, a dexametasona diminuiu os níveis plasmáticos de progesterona a

partir do 8º dia de administração, bem como, diminuição nos níveis protéicos de VEGFA (fator de crescimento endotelial vascular A). Por outro lado, a dexametasona aumenta os níveis de FGF2 (fator de crescimento fibroblástico básico 2). A partir desses resultados, Kliemet al. (2013) concluíram que a inibição da migração de eosinófilos pela dexametasona não é algo definitivo, mas influencia negativamente na formação inicial do corpo lúteo, ocasionando a queda dos níveis de progesterona.

Em testes com embriões bovinos, objetivou-se avaliar a influência da dexametasona na morfologia, desenvolvimento e apoptose do embrião. Santana et al. (2014) observaram que a dexametasona, apesar de não ter baixado os níveis de apoptose, aumentou a proliferação celular, modulando a cinética do desenvolvimento embrionário, indicando que a dexametasona pode ser um aparato para melhorar a produção *in vitro* de embriões mamíferos.

Após a administração intramuscular de dexametasona em touros, para se avaliar os parâmetros reprodutivos tais como libido, morfologia dos testículos, níveis de testosterona, volume e pH do ejaculado, concentração e morfologia de espermatozoides, não foi observada qualquer alteração significativa, apenas uma pequena alteração negativa dos níveis de testosterona plasmática, mas ainda assim considerada insignificante (WEISS, 2015). Esses resultados podem ser atribuídos ao pouco tempo de uso da dexametasona, pois, como já relatado por Chicaro (2009), os efeitos da dexametasona são influenciados pelo o tempo e concentração, sendo um fator importante, podendo causar ações divergentes e direcionar para efeitos negativos ou positivos.

Em humanos, a dexametasona associada a agentes antineoplásicos é utilizada no tratamento de vários tipos de câncer como tumores e leucemia (BAVARESCO; BERNARDI; BATTASTINI, 2005). Em outro estudo, relacionando dexametasona no cultivo *in vitro* de células de carcinoma epidermoide bucal, segundo resultados de Chicaro (2009), a dexametasona apresentou atividade antiproliferativa dose-tempo dependente.

2.3.3. Efeito da dexametasona na fisiologia reprodutiva das fêmeas

A dexametasona pode ser utilizada para indução de partos, podendo ocasionar abortos prematuros em bovinos, que causa retenção placentária (GRUNERT et al., 2005), mortalidade materna e nascimento de bezerros mortos ou extremamente debilitados (MALMA, 1993). Segundo Santana et al. (2014), devido ao mecanismo de ação dos glicocorticoides, atuando na ativação ou repressão de genes, a dexametasona pode estar relacionada a fertilidade, pois, em um estudo anterior *in vivo*, Tohei e Kogo (1999) comprovaram que ratas tratadas com

dexametasona apresentaram concentrações séricas de FSH elevadas ao mesmo tempo em que os níveis de inibina decresceram. Segundo esses resultados, o aumento do FSH foi devido a inibição que a dexametasona causou sobre a secreção da inibina.

Em bovinos, após a administração de dexametasona, pode-se observar efeitos negativos em hormônios que estão diretamente relacionados à reprodução. Observa-se uma diminuição da frequência e amplitude dos pulsos de LH, o que ocasiona queda nos níveis de estradiol e influenciando o desenvolvimento do folículo ovariano (BROUSSARD et al., 1997). Em outro estudo, Maciel et al. (2001) atribui o fato de que a administração intramuscular diária de dexametasona por um curto período de tempo, (10 dias), foi capaz de influenciar a atividade luteal, mas pouca influência no desenvolvimento folicular. Estes autores também demonstraram que a dexametasona diminuiu as concentrações plasmáticas de estradiol, progesterona e IGF-I e II, conseqüentemente exercendo efeito negativo na função luteal do gado leiteiro, porém, não influenciou nas taxas plasmáticas de gonadotrofina, não causando danos no crescimento do folículo dominante.

Risticet al. (2008) com a finalidade de identificar qual o efeito da dexametasona no ovário de ratas neonatas, administrou dexametasona por via subcutânea no final da gestação e observou que a dexametasona diminuiu o número de folículos primordiais, primários e secundários da prole, e ainda o volume médio dos ovários. No entanto, não houve influência nos processos de atresia e foliculogênese. Diante desses resultados, Risticet al. (2008) ressaltam que animais tratados com dexametasona requerem atenção, pois ao atingir folículos primordiais que são a reserva ovariana e o potencial reprodutivo do indivíduo, pode causar deficiência na fertilidade de fêmeas.

2.3.4. Efeito da dexametasona no desenvolvimento folicular *in vitro*

O uso da dexametasona em folículos pré-ovulatórios de ratos Wistar cultivados *in vitro* foi responsável pela inibição da proteína StAR (proteína reguladora aguda da esteroidogênese) e diminuição da produção de progesterona. Esses efeitos foram dependentes da concentração (10 a 1000ng/mL), ainda, esse estudo evidenciou que a dexametasona e seus efeitos são mediados pelos mesmos receptores dos glicocorticoides (HUANG; LI, 2001). De acordo com Lima et al. (2007), a proteína StAR, quando inibida causa queda dos níveis hormonais, como por exemplo a progesterona, hormônio secretado pelo corpo lúteo que tem função de manter a gravidez. Em estudo recente, com o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais bovinos inclusos em tecido ovariano, a presença de dexametasona na concentração de 10

ng/mL, manteve o percentual de folículos morfologicamente normais ao final de 6 dias de cultivo e ainda contribuiu para a manutenção da integridade ultraestrutural dos folículos ovarianos (SILVA et al., 2017a).

Resultados positivos também foram obtidos em células da granulosa cultivadas na presença de dexametasona, o qual proporcionou um aumento na produção de progesterona, diminuição da apoptose nas células que continham o gene p53 mutante ativado e ainda aumentou os níveis intracelulares de Bcl-2 (SASSON; TAJIMA; AMSTERDAM, 2001) corroborando com YUAN et al. (2014) quando demonstraram que a dexametasona foi responsável pelo processo de regulação de apoptose nas células da granulosa de folículos pré-ovulatórios.

A dexametasona também foi apontada por influenciar a oogênese durante o desenvolvimento fetal em humanos diminuindo a densidade e causando apoptose das células germinativas durante o cultivo *in vitro*. (POULAIN et al., 2012). Em bovinos, o cultivo *in vitro* de COCs, demonstrou que estes apresentam um tipo de proteção contra os efeitos adversos do cortisol por possuir um sistema de regulação de glicocorticoides tanto para o natural (cortisol), como para o sintético, a dexametasona, criando desta forma um ambiente favorável a ovulação, maturação e fertilização (TETSUKA et al., 2016). Segundo Tetsuka et al. (2016), esse sistema de regulação tem como participação a enzima 11 β HSD1 (tipo 1) que ativa a cortisona em cortisol, e a 11 β HSD2 (tipo 2) que inativa o cortisol em cortisona, podendo ocorrer o processo inverso quando necessário, atribuindo esse sistema de ativação e inativação do cortisol como uma forma de proteção dos COCs aos altos níveis de glicocorticoides que podem ser prejudiciais. Esse sistema de ativação e inativação do cortisol também foi encontrado em células foliculares, indicando que essas células também se utilizam desse mecanismo de proteção quando o cortisol se encontra em doses prejudiciais (LÓPEZ et al. 2013).

3. JUSTIFICATIVA

Os glicocorticoides são mediadores hormonais de estresse e sua forma sintética, a dexametasona é amplamente utilizada na clínica como anti-inflamatório e imunossupressor (BARNES; ADCOCK, 1993). Estudos identificaram receptores de glicocorticoides em células ovarianas e que estes receptores podem atuar diretamente no ovário (AMWEG et al., 2015; TETSUKA et al., 1999). Contudo, existem muitas reações adversas na prática clínica, relacionadas a dose e uso prolongado (CHICARO, 2009), como exemplo, abortos prematuros ocasionando retenção placentária, formação do corpo lúteo e desequilíbrio dos hormônios relacionados a reprodução. No entanto, ainda não se sabe se a dexametasona influencia de forma negativa ou positiva a foliculogênese inicial, especialmente a viabilidade de folículos pré-antrais bovinos. Desta forma, a avaliação dos efeitos da dexametasona como um aditivo ao meio de cultivo surge como uma alternativa para a compreensão dos seus efeitos, bem como dos mecanismos envolvidos no controle da foliculogênese. Além disso, o estudo do efeito da dexametasona no cultivo de folículos secundários bovinos é de grande importância, pois é possível avaliar aspectos relacionados ao desenvolvimento folicular, viabilidade, ultraestrutura e morfologia de folículos pré-antrais cultivados. Esses achados podem contribuir para entender os possíveis efeitos do uso prolongado da dexametasona sobre o desenvolvimento folicular *in vitro*.

4. HIPÓTESES

- A dexametasona influencia, de forma dose dependente, o crescimento e viabilidade folículos secundários bovinos no cultivados *in vitro*.

- As maiores concentrações de dexametasona apresentam efeitos adversos sobre o crescimento e viabilidade folículos secundários bovinos no cultivados *in vitro*.

- A dexametasona, em altas concentrações, influencia negativamente a integridade ultraestrutural de folículos secundários cultivados *in vitro*.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo geral

- Avaliar os efeitos da dexametasona sobre a viabilidade, crescimento, formação de antro, e integridade ultraestrutural de folículos secundários bovinos cultivados *in vitro* por 18 dias.

5.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de diferentes concentrações da dexametasona (1, 10, 100 e 1000ng/ml) sobre a viabilidade, crescimento e formação de antro em folículos secundários bovinos cultivados *in vitro* por 18 dias.

- Analisar a influência da dexametasona na manutenção da integridade ultraestrutural e na viabilidade de oócitos e células da granulosa de folículos secundários bovinos após o cultivo *in vitro* de 18 dias.

6. ARTIGO

Effects of dexamethasone on *in vitro* development of isolated bovine secondary follicles

Effects of dexamethasone on *in vitro* development of isolated bovine secondary follicles

P. A. A. Barroso^a; L. R. F. M. Paulino^a; B. R. Silva^a; G.L.Vasconcelos^a; D.S.Gomes^a; M. F. Lima Neto^a; A. W. B. Silva^a; A. L. P. Souza^a; M.A.M.Donato^b; C.A.Peixoto^b; J.R.V. Silva^a.

^aBiotechnology Nucleus of Sobral– NUBIS, Laboratory of Biotechnology and Physiology of Reproduction (LABIREP), Federal University of Ceara, Sobral, CE, Brazil. ^bLaboratory of

Ultrastructure, CPqAM/FIOCRUZ, Federal University of

Pernambuco, Recife-PE, Brazil.

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

Abstract

The objective of this study was to evaluate the effects of different concentrations of dexamethasone on development, viability, antrum formation and morphological integrity in bovine secondary follicles grown *in vitro* for 18 days. For *in vitro* studies, bovine ovaries were obtained at local slaughterhouse, under aseptic conditions already standardized. In the laboratory, secondary follicles with approximately 150-200µm diameter were isolated and intended for *in vitro* culture in TCM-199⁺ drops alone or supplemented with different concentrations of dexamethasone (1, 10, 100 and 1000ng / mL). At the end of the culture period, cultured follicles were evaluated for viability with calcein-AM (viable) and ethidium homodimer (non-viable) dyes, as well as evaluation of follicular diameters and den formation on days 0, 6, 12 and 18. In addition, before or after *in vitro* culture, the follicles were fixed for morphological and ultrastructural analysis. The follicular growth data were submitted to ANOVA, followed by the T test, while the chi-square test ($p < 0.05$) was used for follicular viability and antrum formation. The follicles cultivated in all treatments with dexamethasone presented significant growth until the 6th day, but only those cultivated with 1ng / mL and

1000ng / mL presented growth up to 12 days of culture. However, there was no significant difference between treatments. Follicles cultured in all treatments showed antral cavity formation at the end of the culture period. The follicles cultured in the presence of dexamethasone showed green coloration (calcein), indicating viability. Morphology and ultrastructure showed that follicles cultured with dexamethasone had the ultrastructure preserved. It can be concluded that follicles cultured *in vitro* in the presence of dexamethasone shows continuous *in vitro* growth, as well as maintenance of viability and follicular ultrastructure.

Keywords: Bovine, dexamethasone, *in vitro* culture, secondary follicles.

1. Introduction

Glucocorticoids are steroids produced and released in the adrenal cortex and their levels are under the control of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (NECELA; CIDLOWSKI, 2004). These hormones have various actions throughout the body, many of which have important implications on fertility (MICHAEL; THURSTONE; RAE, 2003). According to Tetsuka et al. (2016), the ovary is among the target of glucocorticoids either naturally or synthetically. Glucocorticoids act directly on the ovaries by inhibiting the production of steroid hormones or causing the induction of cellular apoptosis, and its action depends on the binding to its glucocorticoid receptor (GR). In this way, GR is one of the important mechanisms of regulation, and its expression has already been confirmed in the follicles, corpus luteum and in the epithelium of the ovarian surface of rats and humans (WHIRLEDGE; CIDLOWSKI, 2010). In addition to the presence of GR in the ovaries, glucocorticoids can alter the levels of circulating gonadotrophins and insulin-like growth factor 1 (MATSUWAKI et al., 2006; KRITSCH et al., 2002). Although the involvement of glucocorticoids in ovarian function is notorious, its action on bovine follicle development is still not known.

Dexamethasone is a synthetic glucocorticoid (BAVARESCO; BERNARDI; BATTASTINI, 2005) that it is among the most widely used drugs in the world, presenting efficacy in the treatment of various inflammatory and immunological diseases (DE BOSSCHER; HAEGEMAN; ELEWAUT, 2010). However, the use of glucocorticoids may have adverse effects, such as apoptosis in cells of the immune system (TORRES, INSUELA; CARVALHO, 2012). In this sense, dexamethasone when associated with the treatment of inflammatory processes and can cause premature abortion in cattle and increase in the interval between deliveries, and when used to induce labor, can cause placental retention (GRUNERT et al., 2005). Previous studies confirm that dexamethasone regulates apoptotic activity in the granulosa cells of pre-ovulatory follicles (YUAN et al., 2014; SASSON; TAJIMA; AMSTERDAM, 2001) and that high concentrations of dexamethasone impair the oocyte maturation that occurred in parallel with changes in follicular differentiation in cultured follicles of rats (MARRY; WEMMEL; CORTVRINDT, 2007). In addition, there is a decrease in the number of primordial, primary and secondary follicles caused by the administration of dexamethasone in neonatal rats during gestation and consequent decrease in ovarian volume (RISTIC et al., 2008). In view of these results, for Ristic et al. (2008), animals treated with dexamethasone need attention, because when they reach the primordial follicles, they are the ovarian reserve, which can cause deficiency in the females' fertility. However, the effects of dexamethasone during the development of secondary bovine follicles are not yet known.

The objective of the present study was to evaluate the effect of different concentrations of dexamethasone (1, 10, 100 and 1000 ng/mL) on growth, viability, antrum formation, morphology and ultrastructural integrity of bovine secondary follicles grown *in vitro* for 18 days.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Chemicals

The culture media and other chemicals used in the present study they were bought from Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA) unless otherwise indicated in the text.

2.2. Source of ovaries

The bovine ovaries (n = 20) from adult cows were collected at a local slaughterhouse, washed in 70% ethanol for about 10 seconds and twice in sterile 0.9% saline solution. Subsequently, the ovaries were transported within 1 h to the laboratory in tubes containing 20 mL 0.9% saline solution supplemented with penicillin (100 mg / mL) and streptomycin (100 mg / mL) at 4°C (PAULINO et al., 2018).

2.3. Isolation and *in vitro* culture of preantral follicles

In the laboratory, the ovarian cortex was fragmented (1-2 mm) in TCM-199 medium supplemented with HEPES (0.05 mM/mL), 100 IU/mL penicillin and 10 mg/mL streptomycin. Subsequently the secondary follicles (~0.2 mm) were visualized under a stereomicroscopic microscope (SMZ 645 Nikon, Tokyo, Japan, 40x magnification) and manually dissected from the fragments using 25G needles. Follicles with visible oocytes surrounded by granulosa cells, without antral cavity and intact basement membrane were selected for culture. Follicles with an extruded oocyte and opaque granulosa cells were considered degenerate. After selection, the follicles were individually cultured in drops of medium under mineral oil in petridishes (60 x 15 mm, Corning, USA). The base medium was TCM-199 supplemented with 10µg/mL insulin, 5.5µg/mL transferrin and 5ng/mL selenium (ITS), 3.0mg/mL bovine serum albumin (BSA), 2 mM glutamine, 2 mM hypoxanthine, 50 µg/mL ascorbic acid and 100 ng/mL FSH.

Secondary follicles were randomly distributed into wells containing 100 μ L TCM-199+ alone or supplemented with dexamethasone at concentrations of 1, 10, 100 and 1000 ng/mL for 18 days under temperature conditions of 38.5 °C and 5% CO₂ in air. A partial exchange (60 μ L) of medium was performed every two days. The osmolarity of the medium was measured at each exchange and varied between 260 and 300 mOsm/L.

2.4. Evaluation of the development of *in vitro* cultured follicles

On days 0, 6, 12 and 18, the follicles were considered (1) morphologically normal when they had intact oocytes, with no damage to the basement membrane, (2) degenerated when they had dark or retracted oocytes and (3) extruded follicles when they had rupture of the basement membrane. The antrum formation was determined by the visualization of a translucent cavity between the granulosa cell mass. The follicular diameter (μ m) was calculated only from morphologically normal follicles using two perpendicular measurements from the photographic records for follicular growth augmentation using an inverted microscope with NIS Elements 2.4 software (Nikon, Nikon Instruments Inc., Japan).

2.5. Viability evaluation by fluorescence microscopy

To confirm the morphological analysis, cultured follicles in each treatment (n = 50) were stained with 4mM of calcein-AM and 2mM of ethidium homodimer (Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe, Germany) in a darkroom at 37°C for 15 min. After exposure to fluorescent markers, the follicles were examined under a fluorescence inverted microscopy (Nikon, Eclipse, TS 100, Japan, 40x magnification). Oocytes and granulosa cells were considered viable if the cytoplasm positively stained with calcein-AM (Green) and non-viable if the chromatin scored with ethidium homodimer (red).

2.6. Histological analysis of cultured secondary follicles

Secondary follicles before (bovine ovarian cortex) and after culture *in vitro* were also

fixed for histological analysis. After 18 days of culture, the ovarian follicles were fixed for 24 h at room temperature in 4% paraformaldehyde in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4). After fixation, cultured ovarian follicles and uncultured tissues were dehydrated in graded series of ethanol concentrations, clarified with xylol, and embedded in paraffin (LUNARDI et al., 2015). For each group of treated follicles and fresh control, 5µm sections were mounted on slides and stained with eosin and hematoxylin. The slides were examined under an optical microscope (Nikon, Tokyo, Japan). Follicles cultured *in vitro* were compared to follicles developed *in vivo* and classified individually as morphologically normal follicles when an intact oocyte, an oocyte without a pyknotic nucleus or cytoplasmic retraction, and granulosa cells well organized in two or more layers with no pyknotic nucleus were present. Moreover, atretic follicles were defined as those having a retracted oocyte, pyknotic nucleus, and/or disorganized granulosa cells detached from the basement membrane.

2.7. Ultrastructural characteristics of cultured bovine secondary follicles

After 18 days of culture, the follicles were fixed for ultrastructural analysis. To better examine cell morphology and organization of organelles, transmission electron microscopy (MET) was performed to analyze the ultrastructure of secondary follicles before (day 0 – fresh control) and after 18 days *in vitro* culture. The isolated follicles (n = 6 to 8 per treatment) were fixed in Karnovsky's solution (4% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) for at least 4h at room temperature (approximately 25°C). After fixation, the cultured follicles were embedded in 4% low melting agarose droplets and kept in sodium cacodylate buffer. The specimens were fixed in 1% osmium tetroxide, 0.8% potassium ferricyanide and 5 mM calcium chloride in 0.1 M sodium cacodylate buffer for 1h at room temperature, washed in sodium cacodylate buffer and stained with 5% uranylacetate. The samples were then dehydrated through a gradient of acetone solutions and then embedded in epoxy resin (Epoxy-Embedding Kit, FlukaChemika-BioChemika). Afterwards, semi-thin

sections (2µm) were cut, stained with toluidine blue and analyzed by light microscopy with 400x magnification. Subsequently, ultra-thin sections (70 nm) will be obtained from bovine secondary follicles identified in semi-thin sections. The ultra-thin sections will be counterstained with uranyl acetate and lead citrate and examined under a Morgani-FEI transmission electron microscope. Ultrastructural and histological comparative analysis was performed between the morphology of isolated follicles cultured *in vitro* and *in vivo* developed follicles.

2.8. Statistical analysis

Data were tested for normality by Shapiro–Wilktest, using the Statview 5.0 software (SAS Institute, Inc., Cary, NC). Comparisons between different concentrations of dexamethasone were performed by ANOVA followed by Student’s t-test. Data concerning follicular survival and antrum formation after in-vitro culture in each treatment were compared by Chi-square test, and the results were expressed as percentages. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Effects of dexamethasone on follicular growth, antrum formation and survival

In general, a progressive increase in follicular diameter was observed after the 18-day *in vitro* culture period. Table 1 shows that follicles cultured for 6 days in all treatments had a significant growth, except for follicles culture in presence of 10 or 100ng/mL dexamethasone. Secondary follicles cultured in medium supplemented with 1 or 1000 ng/mL dexamethasone showed significant growth until day 12 of culture, which was similar to those follicles cultured in control medium. When comparisons among treatments was performed, no effect of dexamethasone on follicular growth was observed.

Table 1. Diameters (mean \pm SEM) of bovine secondary follicles after 0, 6, 12 and 18 days of in vitro culture in TCM199⁺ alone or supplemented with different concentrations of dexamethasone (DEXA; 1, 10, 100 and 1000ng / mL).

	D0	D6	D12	D18
TCM	196.3 \pm 5.9 ^a	274.7 \pm 14.8 ^b	293.3 \pm 20.2 ^c	302.9 \pm 23.9 ^c
DEXA 1	202.9 \pm 5.8 ^a	271.7 \pm 13.5 ^b	281.9 \pm 14.7 ^c	291.7 \pm 13.8 ^c
DEXA 10	195.2 \pm 4 ^a	275.3 \pm 11.1 ^b	282.3 \pm 11.3 ^b	277.6 \pm 10.8 ^b
DEXA 100	203.2 \pm 5.2 ^a	280.7 \pm 12.5 ^b	285.7 \pm 13.1 ^b	289.5 \pm 13.9 ^b
DEXA 1000	195.5 \pm 3.5 ^a	263.2 \pm 8.9 ^b	278.8 \pm 10.8 ^c	285.8 \pm 11.8 ^c

^{a,b,c}small letters shows statistical differences among columns, P<0,05.

Moreover, the percentage of normal follicles (figure 1) and antrum formation observed in follicles grown for 18 days (figure 2), in both, there was no statistical difference between the treatments. Figure 3 shows follicles mainly stained with calcein-AM after culture on TCM-199 alone or supplemented with different concentrations of dexamethasone (1, 10, 100 and 1000 ng/mL). Only follicles cultured in medium supplemented with 1 or 10ng /ml dexamethasone had stromal peripheral cells stained with ethidiumhomodimer.

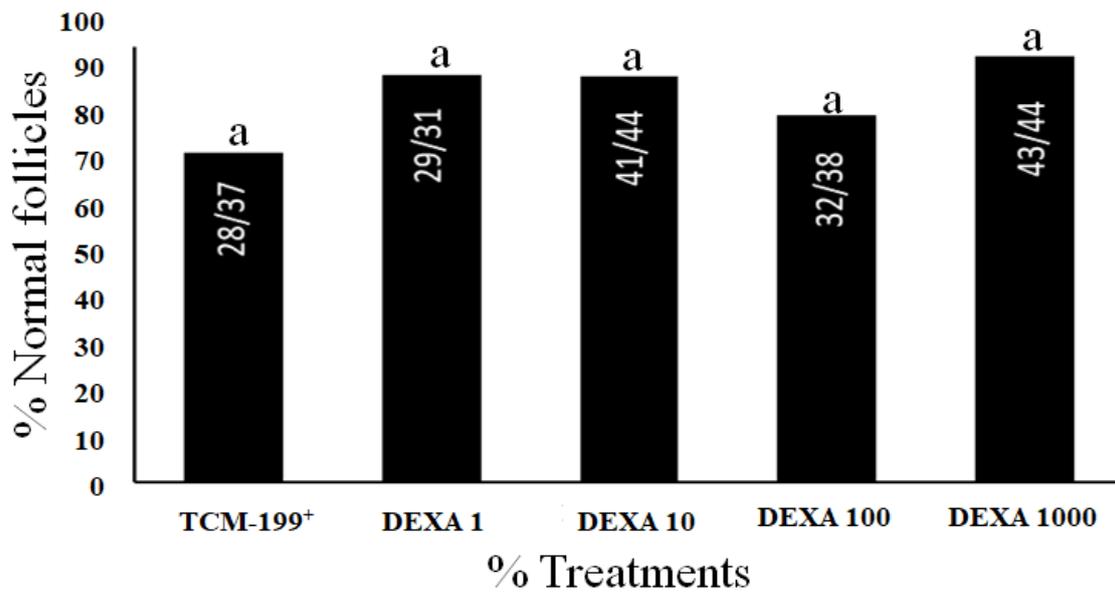


Figure 1. Percentages of normal secondary follicles cultured for 18 days on TCM-199⁺ alone or supplemented with different concentrations of dexamethasone. ^{a,b,c}small letters shows statistical differences among columns, $P < 0,05$.

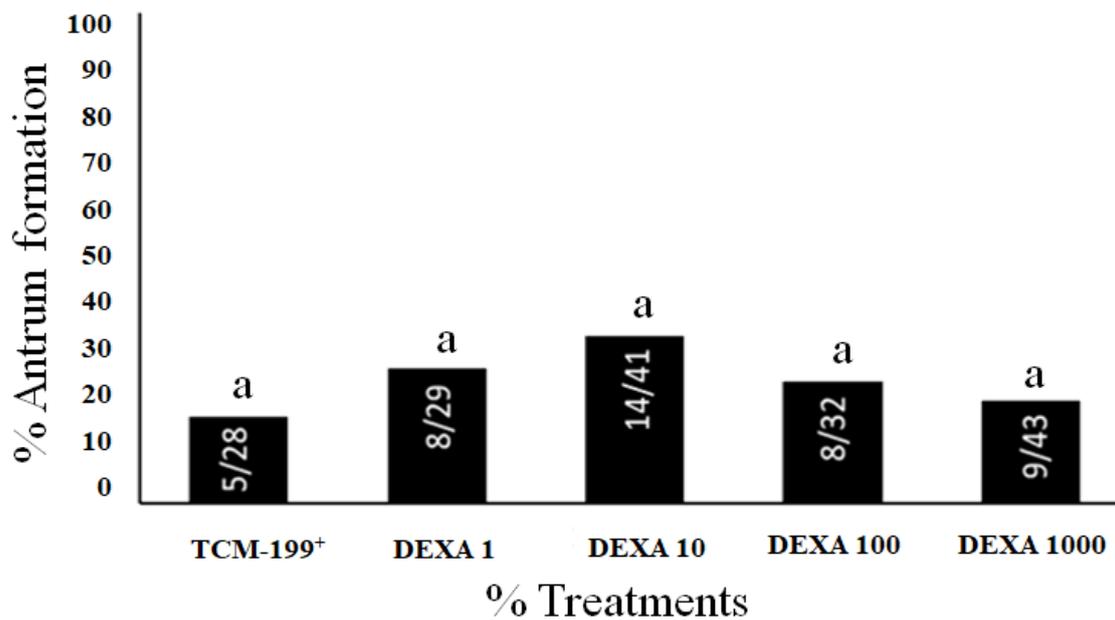


Figure 2. Percentages of antrum formation in secondary follicles cultured for 18 days on TCM-199⁺ alone or supplemented with different concentrations of dexamethasone. ^{a,b,c}small letters shows statistical differences among columns, $P < 0,05$.

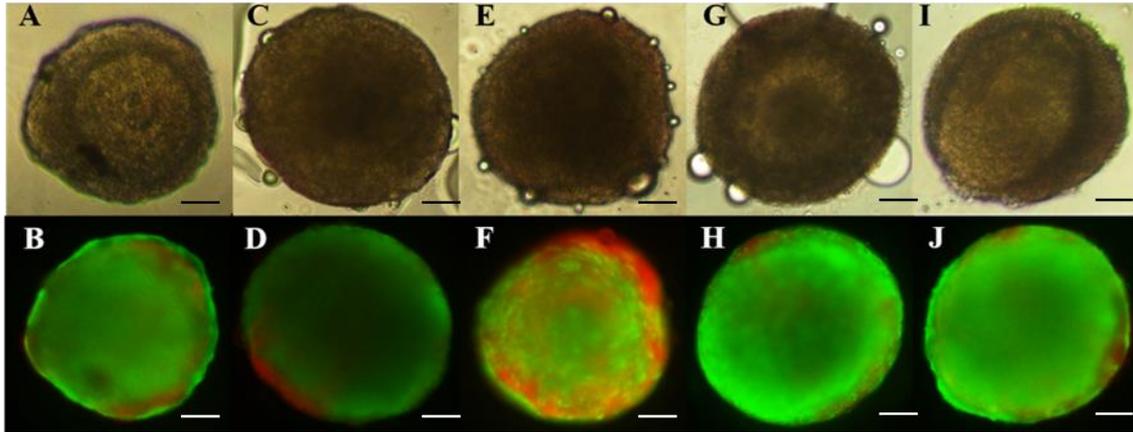


Figure 3. Viability of bovine secondary follicles cultured for 18 days evaluated by light microscopy (100x magnification) after staining with calcein-AM (green) and ethidium homodimer (red). Secondary follicle cultured in TCM-199⁺ alone (control) (A, B); or containing 1ng/mL DEXA (C, D); 10ng/mL DEXA (E, F); 100ng/mL DEXA (G, H) or 1000ng/mL DEXA (I, J). Scale bars represent 100 μ m.

3.2. Morphology of *in vitro* cultured follicles

Figure 4 shows the morphology of normal bovine secondary follicles before mechanical isolation (Figure 4A), as well as after 18 days of culture in the presence of dexamethasone (Figure 4B). The morphology of a degenerated follicle is shown in Figure 4C. Figure 4A shows that, before isolation, secondary follicles have rounded oocyte, visible zona pellucida and well organized follicular cells, without antral cavity. Figure 4B shows a 18-day cultured follicles with normal morphology, i.e., intact oocyte, visible zona pellucida surrounded by the granulosa cells, indicating connections between the follicular cells and the oocyte. In addition, follicular cells were organized, which is different from the morphology of the degenerated follicle shown in Figure 4C. This follicle has poor connection between follicular cells, and low density and disorganization of granulosa cells.

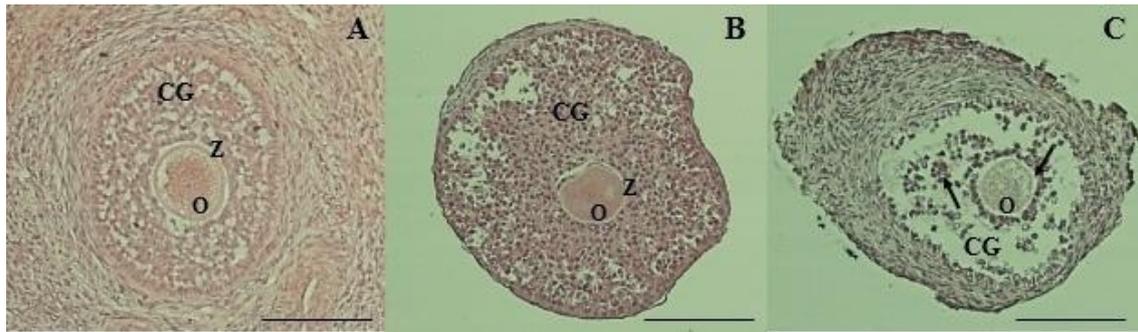


Figure 4. Normal uncultured secondary follicle within ovarian tissue (A), isolated normal follicle after 18 days of culture in the presence of dexamethasone (B), cultured atretic follicle (C). CG, granulosa cells; O, oocyte; Z, zona pellucida and arrows indicate disorganization of granulosa cells. Scale bar represents 100 μ m.

3.3. Ultrastructural analysis of cultured secondary follicles

The normal follicles from fresh control had oocyte and granulosa cells with mitochondria with normal cristae and well-preserved membranes (Fig. 5A and 5B). Sparse vesicles were spread throughout the oocyte cytoplasm and regular cytoplasmic membrane was observed. Oocyte and granulosa cells were well connected (Fig. 5A). On the other hand, the follicles cultured in the control group (TCM-199+) showed some vacuolization in the oocyte and cytoplasm of granulosa cells, detachment of the zona pellucida and decrease of the extensions between oocyte and granulosa cells (Fig. 5C, D). In the oocyte it was also possible to verify organelles with a certain degree of degradation (Fig. 5C). In granulosa cell from control group, mitochondria showed no apparent signs of alteration. After in vitro culture, vacuolization of the cytoplasm and a slight detachment of granulosa cells have been observed (5D). The follicles cultured in the presence of dexamethasone showed oocytes (Fig. 5E) with retraction of the zona pellucida, but it was still possible to observe the oocyte-granulosa prolongations. In addition, in the oocyte cortical region from follicles cultured in the presence of dexamethasone small irregularities were visible. In this treatment we observed a decrease in the number of microvilli, associated with large vacuolated areas (5E, 5G, 5I, 5K). The granulosa cells (Fig. 5F), however, showed the presence of mitochondria and endoplasmic

reticulum, suggesting a high metabolic activity.

Oocytes

Granulosa Cells

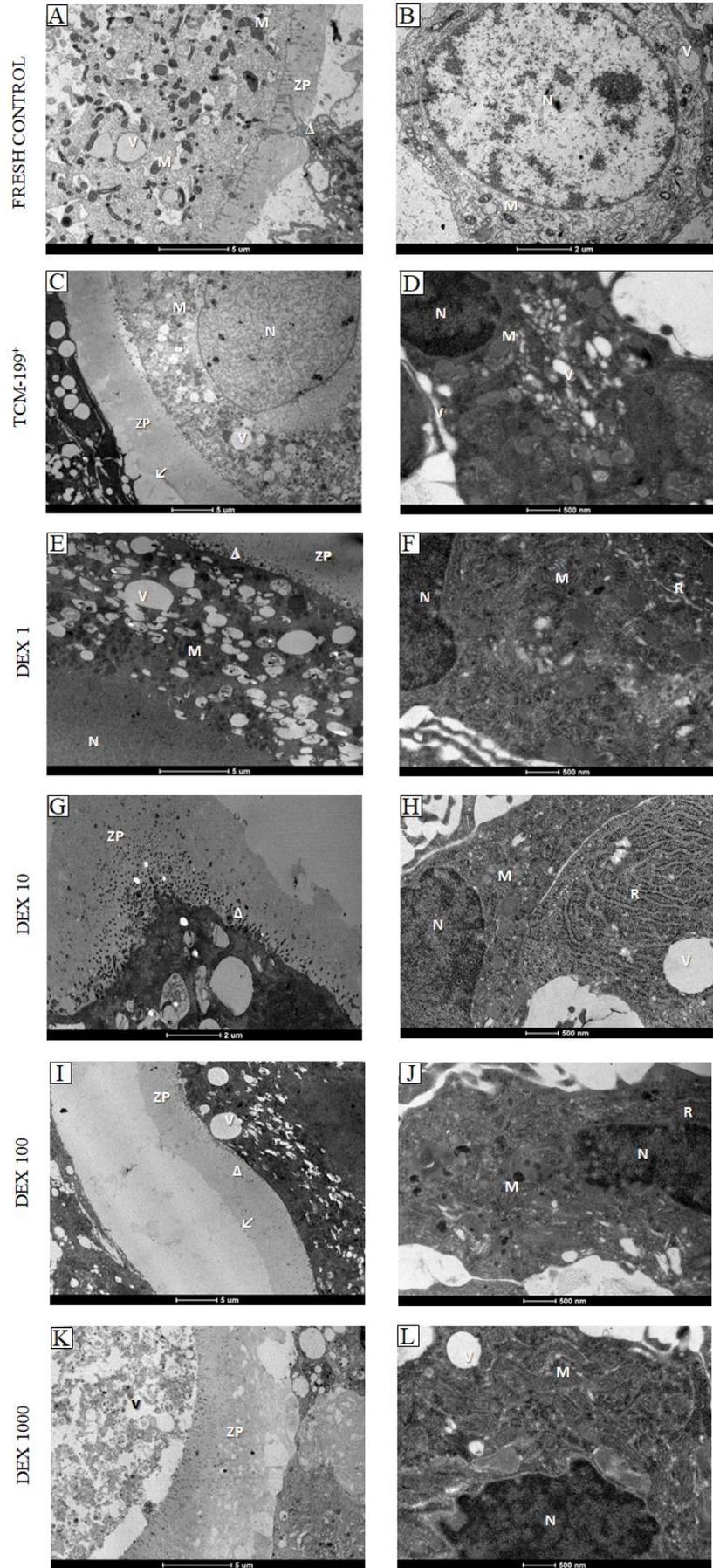


Figure 5. Representative micrographs of bovine secondary follicles in fresh control and cultured follicles for 18 days in the presence or absence of dexamethasone. (A, B) uncultivated follicles; (C, D) follicles grown in the control group (TCM-199); (E, F) 1ng/ml dexamethasone; (G, H) dexamethasone at the concentration of 10ng/ml; (I, J) dexamethasone at the concentration of 100ng/ml; (K, L) dexamethasone at the concentration of 1000ng/ml. N: nucleus; M: mitochondria; V: vacuole; R: endoplasmic reticulum; ZP: zonapellucida; arrow: release of ZP; and arrowhead: oocyte-granular extensions.

4. Discussion

The present study demonstrated that the addition of dexamethasone to the culture medium maintained the morphological, viability and ultrastructural characteristics of the follicles left grown for 18 days. The follicles cultured in the presence of dexamethasone presented preserved communication through oocyte-granulosa prolongations. According to Saraiva et al. (2010), this interaction between the follicular and oocyte cells represents an important communication and signaling between granulosa and oocyte cells through the gap junctions. These transitions occur through structures known as transitional projections (TPZs), which allow bidirectional transport of ions and metabolites that regulate oocyte growth (HUGH, 2018; MELLO et al., 2013). In addition, a large amount of mitochondria with decreased number of crests in the cortical region was observed through the ultrastructural analysis, which reinforces maintenance of oocyte integrity (SUN et al., 2001).

Through the histological analysis, it was possible to observe that the follicles treated with dexamethasone had a zona pellucida around a large part of the oocyte with dense layers of granulosa cells preserved. In fact, the preservation of granulosa cells and their communication between the oocyte is vital both for oocyte development and for its follicular differentiation (SÁNCHEZ; SMITZ, 2012). In a study by HUŁAS-STASIAK (2017) after systemic application of dexamethasone in rats, they found an increase of granulosa cells in secondary follicles thereby increasing the diameter of these follicles. In the present study it was possible to observe a significant increase in follicular diameter only in the treatments at

concentrations of 1ng / mL and 1000ng / mL for up to 12 days of *in vitro* culture. And still maintained viability for 18 days of cultivation, proven by green fluorescent coloration (calcein).

It is necessary to mention that dexamethasone did not negatively influence the growth, viability, antrum formation and ultrastructure of follicles cultured *in vitro*. However, in an *in vivo* study, rats submitted to the subcutaneous administration of dexamethasone in the final period of gestation presented in the offspring of these rats the reduction of primordial, primary and secondary follicles, in addition to the mean volume of ovaries (RISTIC et al., 2008). In the same study, it is shown that the use of dexamethasone in animals affects the primordial follicles that are the ovarian reserve and the reproductive potential of the individual, being able to cause deficiency in the fertility of the females.

Recently, Silva et al. (2017), when evaluating the effect of dexamethasone on ovary follicle culture for six days, reported its efficiency in maintaining the percentage of normal follicles and follicular ultrastructure, but this factor was not efficient in promote follicular activation and development. Possibly, the maintenance of the granulosa cells observed in the transmission electron microscopy has contributed to the formation of the antrum, since the components of the follicular fluid, composed of water, electrolytes, serum proteins and high concentration of steroid hormones are supplied by granulosa (BARNETT et al., 2006). *In vitro*, however, several other factors may induce follicular growth and antrum formation, but without more specific tests it is not possible to confirm which molecules are directly involved with the formation of the antrum (RODGERS; IRVING-RODGERS, 2010). Chicaro (2009) states that the effects of dexamethasone are directly related to the time and concentration of glucocorticoid use, since they influence the direction of the response, being negative or positive. In addition, another factor that is directly related to the effects of glucocorticoids is that follicles and bovine oocytes have a mechanism of regulation of glucocorticoid activity

(LÓPEZ et al., 2013, TETSUKA et al., 2016). Through the enzymes 11β HSD1 and 11β HSD2 the follicles and oocytes are able to activate or inactivate glucocorticoids, respectively. According to Tetsuka et al. (2016), this enzyme system may be a protective mechanism for the cell to the high levels of glucocorticoids, when harmful.

In conclusion, follicles cultured in presence of dexamethasone have normal follicular growth *in vitro* and that this hormone does not affect negatively the viability and ultrastructure of follicle cultured *in vitro* during 18 days.

Financial Support

This research was supported by grants from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES). J.R. V. Silva is an investigator for CNPq. P. A. A. Barroso is the recipient of a MSc scholarship from The Coordination for the Improvement of Higher Level Personnel (CAPES), Brazil.

Statement of Interest

The authors declare that there is no conflict of interest that would prejudice the impartiality of this scientific work.

5. REFERENCES

- BARNETT, K.R.; SCHILLING, C.C.R.; GREENFELD, C.R.; TOMIC, D.; FLAWS, J.A. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. *Human Reproduction*, v.10, p.1-19, 2006.
- BAVARESCO, L.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A. M.O. Glicocorticóides: usos clássicos e emprego no tratamento do câncer. *Infarma*, v.17. n. 7-9. 2005.
- CHICARO, C. F. Análise da expressão da proteína NF-kappaB antes e depois do tratamento com dexametasona e os óleos de copaíba e andiroba em cultura de células de carcinoma epidermóide bucal. 127f. Dissertação (Mestrado em Odontologia). Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- DE BOSSCHER, K.; HAEGEMAN, G.; ELEWAUT, D. Targeting inflammation using selective glucocorticoid receptor. *Current Opinion in Pharmacology*, Oxford, v.10, n. 4, p. 497-504, 2010.
- GRUNERT, E.; BIRGEL, E.H.; VALE, W.G. Patologia e Clínica da Reprodução dos Animais Mamíferos Domésticos. São Paulo: Livraria Varela, p. 541. 2005.
- HUGH, J. C. Regulation of germ cell development by intercellular signaling in the mammalian ovarian follicle. *WIREs Developmental Biology*, v.7, 2018.
- HULAS-STASIAK, M.; DOBROWOLSKI, P.; PAWLIKOWSKA-PAWŁĘGA, B.; TOMASZEWSKA, E.; MUSZYŃSKI, S. The effects of dexamethasone administered during pregnancy on the postpartum spiny mouse ovary. *PlosOne*, v.12, 2017.
- LÓPEZ, M.; AMWEG, A.; STANGAFERRO, M.; ORTEGA, H. Expresión de enzimas relacionadas com el metabolismo de glucocorticoides enteijos ováricos bovinos. *Revista MVZ Córdoba*, v. 18.p. 3379-3386, 2013.
- MATSUWAKI, T.; KAYASUGA, Y.; YAMANOUCHI, K.; NISHIHARA, M. Maintenance of Gonadotropin Secretion by Glucocorticoids under Stress Conditions through the Inhibition of Prostaglandin Synthesis in the Brain. *Endocrinology*, v.147, p.1087–1093, 2006.
- MELLO, R.R.C.; FERREIRA, J.E.; SILVA, A.P.T.B.; MELLO, M.R.B.; PALHANO, H.B. Desenvolvimento folicular inicial em bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.37, n.4, p.328-333, 2013.
- MICHAEL, A. E.; THURSTON, L. M.; RAE, M. T. Glucocorticoid metabolism and reproduction: a tale of two enzymes. *Reproduction*, v.126, p.425–441, 2003.
- MICHAEL, A.E.; THURSTON, L.M.; RAE, M.T. Glucocorticoid metabolism and reproduction: a tale of two enzymes. *Reproduction*, v.126, p.425–41, 2003.
- NECELA, B.M.; CIDLOWSKI, J.A. Mechanisms of Glucocorticoid Receptor Action in Noninflammatory and Inflammatory Cells. *ATS Journals*, vol. 1, p.239–246, 2004.
- PAULINO, LAIS R. F. M.; CUNHA E. V.; SILVA, A. W. B.; SOUZA, G. B.; LOPES, E. P. F.; PEIXOTO, M. A. M.; PEIXOTO, C. A.; BRITO, B. G. M.; VAN DEN HURK. R.; SILVA, J. R. V. Effects of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta on in vitro development of bovine secondary follicles. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 53, p. 997-1005, 2018.

RISTI C, N.; NESTOROVIC, N.; MANOJLOVIC-STOJANOSKI, M.; FILIPOVIC, B.; SOSIC-JURJEVI C, B.; MILOSEVIC, V.; SEKULIC, M. Maternal dexamethasone treatment reduces ovarian follicle number in neonatal rat offspring. *Journal of Microscopy*, v. 232, 2008.

RISTIĆ, N.; NESTOROVIĆ, N.; MANOJLOVIĆ-STOJANOSKI, M.; FILIPOVIĆ, B.; SOSIĆ-JURJEVIĆ, B.; MILOSEVIĆ, V.; SEKULIĆ, M. Maternal dexamethasone treatment reduces ovarian follicle number in neonatal rat offspring. *Journal of Microscopy*, v.232, p. 549–557, 2008.

RODGERS, R.J.; IRVING-RODGERS, H.F. Formation of the ovarian follicular antrum and follicular fluid. *Biology of Reproduction*, v.82, p.1021–1029, 2010.

SÁNCHEZ, F.; SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, p.1896-1912, 2012.

SARAIVA, M.V.A.; MATOS, M.H.T.; FAUSTINO, L.R.; CELESTINO, J.J.H.; SILVA, J.R.V.; FIGUEIREDO, J.R. Pituitary hormones and their role in folliculogenesis. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.34, n.4, p.206-221, 2010.

SASSON, R., TAJIMA, K., AMSTERDAM, A. Glucocorticoids protect against apoptosis induced by serum deprivation, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and p53 activation in immortalized human granulosa cells: involvement of Bcl-2. *Endocrinology*, v.142, p.802–811, 2001.

SILVA, A.W.B.; RIBEIRO, R.P.; MENEZES, V.G.; BARBERINO, R.S.; RENATO, J.R.S.; DAU, A.M.P.; COSTA, J.J.N.; MELO, L.R.F.; BEZERRA, F.T.G.; DONATO, M.A.M.; PEIXOTO, C.A.; MATOS, M.H.T.; GONÇALVES, P.B.D.; VAN DEN HURK, R.; SILVA, J.R.V. Expression of TNF- α system members in bovine ovarian follicles and the effects of TNF- α or dexametasona on preantral follicles survival, development and ultrastructure in vitro. *Animal Reproduction Science*, v. 182, p.56-68, 2017.

SUN QY, WU GM, LAI L, PARK KW, CABOT R, CHEON GHT, DAY BN, PRATHER RS, SCHATTEH, H. Translocation of active mitochondria during pig oocyte maturation, fertilization and early embryo development in vitro. *Reproduction*, v.122, p.155-163, 2001.

TETSUKA, M.; TAKAGI, R.; AMBO, N.; MYAT, T.S.; ZEMPO, Y.; ONUMA, A. Glucocorticoid metabolism in the bovine cumulus–oocyte complex matured in vitro. *Reproduction*, n.151, p.73–82, 2016.

TORRES, R.C.; INSUELA, D.B.R.; CARVALHO, V.F. Mecanismos celulares e moleculares da ação antiinflamatória dos glicocorticóides. *Corpus et Scientia*, v. 8, n. 2, p. 36-51, 2012.

WHIRLEDGE, S.; CIDLOWSKI, J.A. Glucocorticoids, Stress, and Fertility. *Minerva Endocrinol*, v.35, p.109–125, 2010.

YUAN, X.H.; YANG, B.Q.; HU, Y.; FAN, Y.Y.; ZHANG, L.X.; ZHOU, J.C.; WANG, Y.Q.; LU, C.L.; MA, X. Dexamethasone altered steroidogenesis and changed redox status of granulosa cells. *Endocrine*, v. 47, 639–647, 2014

7. CONCLUSÕES GERAIS

- O crescimento e viabilidade de folículos secundários bovinos *in vitro* não é influenciado pela presença de dexametasona no meio de cultivo.

- O cultivo de folículos secundários na presença de dexametasona (1, 10, 100 e 1000 ng/mL) mantém a ultraestrutura do ócito e células da granulosa, além da manutenção da comunicação oócito-granulosa após 18 dias *in vitro*.

8. PESPECTIVAS

As informações obtidas neste trabalho poderão auxiliar na compreensão dos efeitos do glicocorticoide dexametasona no crescimento folicular durante a fase pré-antral, não havendo efeitos deletérios e preservando a viabilidade destas células em um longo período de cultivo, visto que estudos anteriores relacionam efeitos adversos no que se refere a fisiologia da reprodução de bovinos. Estudos adicionais sobre a interação da dexametasona com outras substâncias (hormônios, fatores de crescimento e antioxidantes) em folículos pré-antrais são necessários para uma melhor compreensão da foliculogênese na espécie bovina. Além disso, é necessário a avaliação dos efeitos da Dexametasona sobre a expressão de genes relacionados a crescimento e proliferação no cultivo de folículos em diferentes estágios de desenvolvimento, bem como sobre a maturação oocitária.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, G.P.; JAISWAL, R.; SINGH, J.; MALHI, P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle, *Theriogenology*, v. 69, p. 72–80, 2008.
- ADONA P.R.; MONZANIAB, P.S.; GUEMRA, S.; MIRANDA, M.S.; OHASHI, O.M. Review Article: Oogenesis and folliculo genesis in mammals. UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde, v.15, n.3, p.245-50, 2012.
- ALVES, N. G.; COSTA, E. P.; GUIMARÃES, J. D. Atividade ovariana em fêmeas bovinas da raça holandesa e mestiças Holandês x Zebu, durante dois ciclos estrais normais consecutivos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 31, n. 2, p. 627-634. 2002.
- AMWEG, A. N.; RODRÍGUEZ, F. M.; HUBER, E.; MARELLI, B. E.; SALVETTI, N. R.; REY, F.; ORTEGA, H. H. Role of glucocorticoids in cysticovari and disease: expression of glucocorticoid receptor in the bovine ovary. *Cells Tissues Organs*, v. 201, p. 138–147, 2016.
- ARAÚJO, C. H. M.; ARAÚJO, M. C. P. M.; MARTINS, W. P.; FERRIANI, R. A.; REIS, R. M. Gametogênese: estágio fundamental do desenvolvimento para reprodução humana. *Medicina (Ribeirão Preto)*, v. 40, p. 551-558, 2007.
- ARAÚJO, M. S.; GUASTALI, M. D.; VOLPATO, R.; LANDIM, F. C. Principais mecanismos envolvidos na maturação oocitária em bovinos: da oogênese à maturação in vitro. *Enciclopédia Biosfera*, v.10, n.18; p. 2373, 2014a.
- ARAÚJO, V. R.; CHAVESA, R. N.; DUARTE, A. B. G.; CELESTINO, J. J. H.; SILVA, G. M.; FERNANDES, D. D.; MATOS, M. H. T.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Effect of culture medium replacement protocol on the in vitro development of isolated caprine secondary follicles. *Small Ruminant Research*, v. 95, p. 139–143, 2011.
- ARAÚJO, V. R.; GASTAL, M. O.; WISCHRAL, A.; FIGUEIREDO, J. R.; GASTAL, E. L. In vitro development of bovine secondary follicles in two- and three-dimensional culture systems using vascular endothelial growth factor, insulin-like growth factor-1, and growth hormone, *Theriogenology*, v. 82, p. 1246–1253, 2014c.
- ARAÚJO, V.R.; GASTAL, M.O.; FIGUEIREDO, J.R.; GASTAL, E.L. In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.12, n.78, 2014b.
- BARNES, P. J.; ADCOCK, I. Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Trends in Pharmacological*, v. 14, p. 436-441, 1993.
- BARNETT, K.R.; SCHILLING, C.C.R.; GREENFELD, C.R.; TOMIC, D.; FLAWS, J.A. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. *Human Reproduction*, v.10, p.1-19, 2006.
- BARUSELLI, P.S.; GIMENES, L.U.; SALES, J.N.S. Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.31, n. 2, p.205- 211, 2007.
- BASSO, A. C.; ESPER, C. R. Isolation and ultrastructural characterization of pré-antral follicles in the Nelore breed cows (*Bos taurus indicus*). *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.*, São Paulo, v. 39, n. 6, p. 311-319, 2002.
- BAVARESCO, L.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A. M.O. Glicocorticóides: usos clássicos e emprego no tratamento do câncer. *Infarma*, v.17. n. 7-9. 2005.

- BERNE, R. M.; LEVY, M. N. *Fisiologia*. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.
- BLANCO, M. R., DEMYDA, S., MORENO MILLÁN, M., GENERO, E.; Developmental competence of in vivo and in vitro matured oocytes: A review. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, v.6, n.7, p.155-165, 2011.
- BROUSSARD, J.R.; ROCHA, A.; SIROIS, J.; ROUSSEL, J.D.; THIBODEAUX, J.K.; GODKE, R.A.; HANSEL, W. [1997]. Effects of dexamethasone administration to diestrus cows on systemic progesterone, estrogen and uterine cyclooxygenase production. *Animal Reproduction Science*, v. 47, p. 263-271, 1997.
- BURATINI JR, J. Controle endócrino e local da foliculogênese em bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*.v.31, n.2, p.190-196, 2007.
- CADORET, V.; FRAPSAUCE, C.; JARRIER, P.; MAILLARD, V.; BONNET, A.; LOCATELLI, Y.; ROYÈRE, D.; MONNIAUX, D.; GUÉRIF, F.; MONGET, P. Molecular evidence that follicle development is accelerated in vitro compared to in vivo. *Reproduction*, v. 153, p. 493–508, 2017.
- CARABATSOS, M. J.; SELBITTO, C.; GOODENOUGH, D. A.; ALBERTINI, D. F. Oocyte-granulosa cell heterologous gap junctions are required for the coordination of nuclear and cytoplasmic meiotic competence. *Developmental Biology*, v.226, p.167–79, 2000.
- CARABATSOS, M.J.; ELVIN, J.; MATZUK, M.M.; ALBERTINI, D.F. characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor-9-deficient mice. *Developmental Biol*, v.204, p.204:373–384, 1998.
- CARABATSOS; M. JO.; ELVIN, J.; MATZUK, M. M.; ALBERTINI, D. A. F. Characterization of oocyte and follicle development in growth differentiation factor-9-deficient mice. *Developmental Biology*, v.204, p. 373 – 384, 1998.
- CHICARO, C. F. Análise da expressão da proteína NF-kappaB antes e depois do tratamento com dexametasona e os óleos de copaíba e andiroba em cultura de células de carcinoma epidermóide bucal. 127f. Dissertação (Mestrado em Odontologia). Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- CHU, C.; HSING, C.; SHIEH, J.; CHIEN, C.; HO, C.; WANG, J. The cellular mechanisms of the antiemetic action of dexamethasone and related glucocorticoids against vomiting. *European Journal of Pharmacology*, v.722, p.48–54, 2014.
- CUNHA, E.V; MELO, L.R.F.; SOUSA, G.B.; ARAÚJO, V.R.; VASCONCELOS, G.L.; SILVA, A.W.B.; SILVA, J.R.V. Effect of bone morphogenetic proteins 2 and 4 on survival and development of bovine secondary follicles cultured in vitro, *Theriogenology*, v.110. p.44-51, 2018.
- DESAI, N.; ALEX, A.; ABDELHAFEZ, F.; CALABRO, A.; GOLDFARB, J.; FLEISCHMAN, A.; FALCONE, T. Three-dimensional in vitro follicle growth: overview of culture models, biomaterials, design parameters and future directions, *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 8, 2010.
- DONG, J.; ALBERTINI, D.F.; NISHIMORI, K.; KUMAR, T.R.; LU, N.; MATZUK, M.M. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*, v.383, p.531-535, 1996.
- EGUCHI, G.U.; OLIVEIRA1, G. G.; BABO-TERRA, V. J.; SOUZA, A. I.; BARROS, R.; PALUMBO, M. I. P. Ceratoconjuntivite nodular em um caso de leishmaniose visceral canina: relato de caso. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.69, n.6, p.1480-1484, 2017.

- FAIR, T.; HULSHOF, S. C. J.; HYTTEL, P.; GREVE, T.; BOLAND, M. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. *Anatomy and Embryology*, v. 195, p. 327–336, 1997.
- FAUSTINO, L.R.; SILVA, C.M.G.; ROSSETTO, R.; RODRIGUES, G.Q.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Estado atual e desafios da criopreservação de tecido ovariano em mamíferos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.35, p.3-15, 2011.
- FIGUEIREDO JR, SILVA JRV, RODRIGUES APR. Estado atual da biotécnica de manipulação deócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA). *Ciência Animal*, v. 9, n. 1, p. 11-25, 1999.
- 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: Editora Roca, pp. 303–327, 2008.
- FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; EVANS, A. C. O; TURZILLO, A. M. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biology of Reproduction*, v.65, p.648-654, 2001.
- GINTHER, O.J.; BEG, M. A.; KOT, K; MEIRA, C.; BERGFELT, D.F. Associated and independent comparisons between the two largest follicles preceding follicle deviation in cattle. *Biology of Reproduction*, v.68, p.524-529, 2003.
- GINTHER, O.J.; KNOFF, L.; KASTELIC, J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two and three follicular waves. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.887, p.223-30, 1989.
- 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, n.6, p.1187-1194, 1996.
- GREEN, L. J.; SHIKANOV, A. In vitro culture methods of preantral follicles. *Theriogenology*, v.86, p.229-238, 2016.
- GRUNERT, E.; BIRGEL, E.H.; VALE, W.G. *Patologia e Clínica da Reprodução dos Animais Mamíferos Domésticos*. São Paulo: Livraria Varela, p. 541. 2005.
- GUERREIRO, D. D.; LIMA, L. F.; RODRIGUES, G. Q.; CARVALHO, A. A.; CASTRO, S. V.; CAMPELLO, C. C.; PESSOA, C. O.; GADELHA, C. R. F.; FIGUEIREDO, J. R.; BORDIGNON, V.; RODRIGUES, A. P. R. In situ cultured pré-antral follicles: a useful model to evaluate the effect of anticancer drugs on caprine folliculogenesis. *Microscopy research and technique*, v. 79, p. 773–781, 2016.
- 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.
- Hansen, P.J. Effects of heat stress on mammalian reproduction. *Philosophical Transactions Royal Society B*, v. 364, p. 3341–3350, 2009.
- HUANG, T-J.; LI, P.S. Dexamethasone inhibits luteinizing hormone-induced synthesis of steroidogenic acute regulatory protein in cultured rat preovulatory follicles. *Biology of Reproduction*. v.64, p.163–170, 2001.
- HUGH, J. C. Regulation of germ cell development by intercellular signaling in the mammalian ovarian follicle. *WIREs Developmental Biology*, v.7, 2018.

- HYTTEL, P.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology*, v. 47, p. 23–32, 1997.
- KARDONG, K. V. Sistema Urogenital. In: *Vertebrados Anatomia Comparada Função e Evolucao*, 7 ed., 1172p. Rio de Janeiro: Guanabara, 2016, p. 837-838.
- KLIEM, H.; RODLER, D.; ULBRICH, S. E.; SINOWATZ, F.; BERISHA, B.; HHD MEYER, H. H. D.; SCHAMS, D. Dexamethasone-induced eosinopenia is associated with lower progesterone production in cattle. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 48, p. 137–148, 2013.
- KRAEMER, F. B. Adrenal and cholesterol utilization. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 265-266, p. 42-45, 2007.
- LIMA, F.P.C.; MARQUES JR, A.P.; DOUGLAS, R.H.; HOURI NETO, M. Concentração sérica de progesterona em bezerras da raça nelore e mestiças tratadas com progesterona em veículo de liberação lenta. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.59, n.3, p. 600-604, 2007.
- LIMA, G.L.; SANTOS, É.A.A. Aplicação das biotécnicas de moifopa, transgênese e clonagem na reprodução de caprinos. *Acta. VeterinariaBrasilica*, v.4, p.36-S42, 2010.
- LONERGAN, P.; FAIR, T. Maturation of oocytes in vitro. *Annual Review Animal Bioscience*, v.4. p. 255-68, 2015.
- LONGUI, C.A. Glucocorticoid therapy: minimizing side effects. *Jornal de Pediatria*, v.83, n.5, 2007.
- LUNA, H.; DARBELLO, D.M.; MESNEROVICZ, J.O. Morfometria, células da granulosa e cromatina nuclear de folículos pré-antrais em associação ou não com a vitrificação de tecido ovariano bovino. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias*, v.3, n.4, p.371-375, 2008.
- LUNARDI, F.O.; AGUIAR, F.L.N.; DUARTE, A.B.G.; ARAÚJO, V. R.; LIMA, L. F.; de SÁ, N.A.R.; CORREIA, H.H.V.; DOMINGUES, S.F.S.; CAMPELLO, C.C.; SMITZ J.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Ovine secondary follicles vitrified out the ovarian tissue grow and development in vitro better than thos evitrified in to the ovarian fragments. *Theriogenology*, v. 85, p. 1203-1210, 2016.
- MACIEL, S.M.C.; CHAMBERLAIN, S.; WETTEMANN, R.P.; SPICER, L.J. Dexamethasone influences endocrine and ovarian function in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, v.84, p.1998–2009, 2001.
- MALMA, J. Calving induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, p. 225-238, 1993.
- MAMO, S., CARTER, F., LONERGAN, P., LEAL, C. L. V., NAIB, A. A., MCGETTIGAN, P., MEHTA, J. P., EVANS, A. C. O., FAIR, T.; Sequential analysis of global gene expression profiles in immature and in vitro matured bovine oocytes: potential molecular markers of oocyte maturation. *BMC Genomics*, v. 12, p. 1-14, 2011.
- MARTINS, F. S.; SILVA, J. R. V.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 32, n. 1, p. 36-49, 2008.
- MAX, M., C.; ANDRADE, E. R.; BASSO, A. C.; FIGUEIREDO, J. R.; SENEDA, M. M. Principais aspectos da manipulação de oócitos incluso s em folículos ovarianos pré-antrais. *Rev. Educ. Contin*, v. 7, p. 66-72, 2004.
- MELLO, R.R.C.; FERREIRA, J.E.; SILVA, A.P.T.B.; MELLO, M.R.B.; PALHANO, H.B.

Desenvolvimento folicular inicial em bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.37, n.4, p.328-333, 2013.

MIHM, M.; BLEACH, E.C.L. Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle. *Animal Reproduction Science*, v.78, n.3-4, p.217 - 237, 2003.

MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N. Início do desenvolvimento humano. In: MOORE, K.L., PERSAUD, T.V.N. *Embriologia clínica*. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.13-38. 1994.

NECELA, B.M.; CIDLOWSKI, J.A. Mechanisms of Glucocorticoid Receptor Action in Noninflammatory and Inflammatory Cells. *ATS Journals*, vol. 1, p.239–246, 2004.

OLIVEIRA, M.E.F.; R.M.; FERREIRA, MINGOTI, G.Z. Controle do crescimento e da seleção folicular por fatores locais e sistêmicos na espécie bovina. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, Belo Horizonte, v.35, n.4, p.418-432, 2011.

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 USA*, v.89, p.8060-8065, 2002.

PASSOS, J.R.S.; COSTA, J.J.N.; CUNHA, E.V.; SILVA, A.W.B.; RIBEIRO, R.P.; SOUZA, G.B.; BARROSO, P.A.A.; DAU, A.M.P.; SARAIVA, M.V.A.; GONÇALVES, P.B.D.; VAN DEN HURK, R.; SILVA, J.R.V. Protein and messenger RNA expression of interleukin-1 system members in bovine ovarian follicles and effects of interleukin-1b on primordial follicle activation and survival in vitro. *Domestic Animal Endocrinology*, v.54, p.48–59, 2016.

PASSOS, M.J., VASCONCELOS, G. L.; SILVA, A.W.B.; BRITO, I.R.; SARAIVA, M.V.A.; MAGALHÃES, D.M.; COSTA, J.J.N.; DONATO, M.A.M.; RIBEIRO, R.P.; CUNHA, E.V.; PEIXOTO, C.A.; CAMPELO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R.; VAN DEN HURK, R.; SILVA, J.R.V. Accelerated growth of bovine preantral follicles in vitro after stimulation with both FSH and BMP-15 is accompanied by ultrastructural changes and increased atresia. *Theriogenology*, v.79, p.1269–1277, 2013.

PAULINO, L. R. F. M.; CUNHA, E. V.; SILVA, A. W. B.; SOUZA, G. B.; LOPES, E. P. F.; PEIXOTO, M. A. M.; PEIXOTO, C. A.; BRITO, B. G. M.; VAN DEN HURK, R.; SILVA, J. R. V. Effects of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta on in vitro development of bovine secondary follicles. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 53, p. 997-1005, 2018.

PETER, A.T.; LEVINE, H.; DROST, M.; BERGFELT, D.R. Compilation of classical and contemporary terminology used to describe morphological aspects of ovarian dynamics in cattle. *Theriogenology*, v.71, n.9, p.1343-1357, 2009.

PHELAN, K. AND MAY, K.M. Basic Techniques in Mammalian. *Cell Tissue Culture Current Protocols in Cell Biology*. n. 66, p. 1.1.1-1.1.22, 2015.

PICTON, H. M. Activation of follicle development: the primordial follicle, *Theriogenology*, v. 55, p. 1193-1210, 2001.

POULAIN, M.; FRYDMAN, N.; DUQUENNE, C.; TUMBA-BYN, T. N.; BENACHI, A.; HABERT, R.; ROUILLER-FABRE, V.; LIVERA, G. Dexamethasone Induces Germ Cell Apoptosis in the Human Fetal Ovary. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v.97, p.1890-1897, 2012.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J.; HENDERSON, G.A. hipófise e o córtex da suprarrenal. In: *Farmacologia*. 8º. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p402-406, 768p, 2018.

RICH R.R.; FLEISHER, T.A.; SHEARER, W.T.; SCHROEDER, H.W.; FREW, JR. A.J., WEYAND, C.M. Clinical Immunology: Principles and Practice: In: Glucocorticoids. 5^o. ed. Elsevier, p.1165-1175, 1392 p, 2019.

RICHARDS, J. S. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiological Reviews*, v.60, n.1, p.51-89. 1980.

RICHARDS, J.; RUSSEL, D.; OCHSNER, S.; HSIEH, M.; DOYLE, K.; FALENDER, A.; LO, Y.; SHARMA, S. Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation and luteinization. *Recent Progress in Hormone Research*, v.57, p.195-220, 2002.

RISTIĆ, N.; NESTOROVIĆ, N.; MANOJLOVIĆ-STOJANOSKI, M.; FILIPOVIĆ, B.; SOSIĆ-JURJEVIĆ, B.; MILOSEVIĆ, V.; SEKULIĆ, M. Maternal dexamethasone treatment reduces ovarian follicle number in neonatal rat offspring. *Journal of Microscopy*, v.232, p. 549–557, 2008.

RODGERS, R. J.; IRVING-RODGERS, H. F. Morphological classification of bovine ovarian follicles. *Reproduction*. v. 139. p. 309–318. 2010.

RODRIGUEZ, K.F; FARIN, C.E. Gene transcription and regulation of oocyte maturation. *Reproduction, Fertility and Development*, v.16, p.55-67, 2004.

ROSSETTO, R.; LIMA, I. M. T., SARAIVA, M. V. A.; LIMA-VERDE, I. B.; SALES, E. T.; FIGUEIREDO, J. R. Avanços no isolamento e sistemas de cultivo de folículos pré-antrais, *Acta Veterinaria Brasilica*, v.5, n.1, p.15-23, 2011.

ROSSETTO, R.; SARAIVA, M. V.; DOS SANTOS, R. R.; DA SILVA, C. M.; FAUSTINO, L. R.; CHAVES, R. N.; BRITO, I. R.; RODRIGUES, G. Q.; LIMA, I. M.; DONATO, M. A.; PEIXOTO, C. A.; DE FIGUEIREDO, J. R. Effect of medium composition on the in vitro culture of bovine pre-antral follicles: morphology and viability do not guarantee functionality. *Zygote*, v.21, p.125–128, 2013.

ROSSI, R. O. D. S.; PORTELA, A. M. L. R.; PASSOS, J. R. S.; CUNHA, E. V.; SILVA, A.W. B.; COSTA, J. J. N.; SARAIVA, M. V. A.; DONATO, M. A. M.; PEIXOTO, C. A.; VAN DEN HURK, R.; SILVA, J. R. V. Effects of BMP-4 and FSH on growth, morphology and mRNA expression of oocyte-secreted factors in cultured bovine secondary follicles. *Animal Reproduction*, v.12, n.4, p.910-919, 2015

SADEU, J.C; CORTVRINDT, R; RON-EL, R; KASTERTEIN, E; SMITZ, J. Morphological and ultrastructural evaluation of cultured froze-thawed human fetal ovarian tissue. *Fertility and Sterility*, v. 85, n. 1, p. 1130-1141, 2006.

SÁNCHEZ, F.; SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1822, p.1896-1912, 2012.

SANTANA, P. P. B.; Apoptose em embriões bovinos maturados e cultivados in vitro com dexametasona. 65f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina). Faculdade de Biomedicina da Universidade Federal do Pará, Belém, 2009.

SANTANA, P.P.B.; CARVALHO, C.M.F.; COSTA, N.N.; SILVA, T.V.G.; RAMOS, P.C.A.; CORDEIRO, M.S.; SANTOS, S.S.D.; KHAYAT, A.S.; OHASHI, O.M.; MIRANDA, M.S. Effect of dexamethasone on development of in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology*, v.82, p.10-16, 2014.

SANTOS, J.T.; SILVA-SANTOS, K.C.; ANDRADE, E.R.; LISBOA, L.A.; SCHNEIDER, C.L.; CIQUINI, A.; FERREIRA, R.; JUNIOR, J.E.N.; SENEDA, M.M. Efeito do tipo de

fixador e tempo de fixação na morfologia de folículos pré-antrais ovarianos bovinos. *Semina: Ciências Agrárias*, v.33, n.1, p.297-304, 2012.

SARAIVA, M.V.A.; MATOS, M.H.T.; FAUSTINO, L.R.; CELESTINO, J.J.H.; SILVA, J.R.V.; FIGUEIREDO, J.R. Pituitary hormones and their role in folliculogenesis. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.34, n.4, p.206-221, 2010.

SASSON, R., TAJIMA, K., AMSTERDAM, A. Glucocorticoids protect against apoptosis induced by serum deprivation, cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and p53 activation in immortalized human granulosa cells: involvement of Bcl-2. *Endocrinology*, v.142, p.802-811, 2001.

SHIMASAKI, S.; MOORE, R. K.; ERICKSON, G. F.; OTSUKA, F. The role of bone morphogenetic proteins in ovarian function. *Reproduction*, v. 61, p.323-337, 2003.

SILVA, A.W.B.; BEZERRA, F.T.G.; COSTA, J.J.N.; ROSSI, R.O.D.S.; PASSOS, M.J.; VASCONCELOS, G.L.; ROSSETTO, R.; DONATO, M.A.M.; MAGALHÃES-PADILHA, D.M.; CAMPELLO, C.C.; SARAIVA, M.V.A.; FIGUEIREDO, J.R.; PEIXOTO, C.A.; VAN DEN HURK, R.; SILVA, J.R.V. Differential effects of activin-A and FSH on growth, viability and messenger RNA expression in cultured bovine preantral follicles. *Livestock Science*. v. 160, p. 199-207, 2014.

SILVA, A.W.B.; RIBEIRO, R.P.; MENEZES, V.G.; BARBERINO, R.S.; RENATO, J.R.S.; DAU, A.M.P.; COSTA, J.J.N.; MELO, L.R.F.; BEZERRA, F.T.G.; DONATO, M.A.M.; PEIXOTO, C.A.; MATOS, M.H.T.; GONÇALVES, P.B.D.; VAN DEN HURK, R.; SILVA, J.R.V. Expression of TNF- α system members in bovine ovarian follicles and the effects of TNF- α or dexametasona on preantral follicles survival, development and ultrastructure in vitro. *Animal Reproduction Science*, v. 182, p.56-68, 2017a.

SILVA, B.R.; MASIDE, C.; VIEIRA, L.A.; J. CADENAS, B.G; ALVES, A.C.A; FERREIRA, F.L.N.; AGUIAR, A.L.C.; SILVA, J.R.; FIGUEIREDO, SILVA, J.R.V. Dose-dependent effects of frutalin on in vitro maturation and fertilization of pig oocytes. *Animal Reproduction Science*, v. 192, p. 216-222, 2018.

SILVA, G. M.; BRITO, I. R.; SALES, A. D.; AGUIAR, F. L. N.; DUARTE, A. B. G.; ARAÚJO, V. R.; VIEIRA, L. A.; MAGALHÃES-PADILHA, D. M.; LIMA, L. F.; ALVES, B. G.; SILVEIRA, L. B. R.; LO TURCO, E. G.; RODRIGUES, A. P.; CAMPELLO, C. C.; WHEELER, M. B.; FIGUEIREDO, J. R. In vitro growth and maturation of isolated caprine preantral follicles: Influence of insulin and FSH concentration, culture dish, co-culture, and oocyte size on meiotic resumption. *Theriogenology*, v. 90, p. 32-41, 2017b.

SILVA, J.R.V.; VAN DEN HURK R.; FIGUEIREDO J.R. Ovarian follicle development in vitro and oocyte competence: advances and challenges for farm animals. *Domestic Animal Endocrinology*, v.55, p.23-135, 2016.

SILVA, J.R.V; BRASIL, A.F; SANTOS, R.R.; COSTA, S.H.F; RODRIGUES, A.P.R.; FERREIRA, M.A.L.; MACHADO, V.P.; FIGUEIREDO, J.R. Degeneration rate of goat primordial follicles maintained in TCM 199 or PBS at different temperatures and incubation times. *Ciência Rural*, v.33, p.913-919, 2003.

Souza, M. C.; Assemany, F. S.; Lima, A. T. C.; Souza, R. F. Glicocorticoides e osteoporose – artigo de revisão. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, v. 9, p. 57-64, 2010.

STOJKOVIC, M.; MACHADO, A.; SOTOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONÇALVES, P. B.; WOLF, E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation, correlation with

- morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. *Biology of Reproduction*, v. 64, p. 904-909, 2001.
- SVOBODA, P.; FRANKE, V.; SCHULTZ, R. M. Sculpting the transcriptome during the oocyte-to-embryo transition in mouse. *Current Topics in Developmental Biology*, v. 113, p. 305–349, 2015.
- TELFER, E. E.; MCLAUGHLIN, M.; DING, C.; THONG, K. J. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. *Human Reproduction*, v. 23, p. 1151-1158, 2008.
- TETSUKA, M.; TAKAGI, R.; AMBO, N.; MYAT, T.S.; ZEMPO, Y.; ONUMA, A. Glucocorticoid metabolism in the bovine cumulus–oocyte complex matured in vitro. *Reproduction*, n.151, p.73–82, 2016.
- TETSUKA.M.; MILNE, M.; SIMPSON, G. E.; HILLIER, S. G. Expression of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase, glucocorticoid receptor and mineralocorticoid receptor genes in rat ovary. *Biology of Reproduction*, v. 60, p. 330–335, 1999.
- TOHEI, A.; KOGO, H. Dexamethasone increases follicle-stimulating hormone secretion via suppression of inhibin in rats. *Journal of Pharmacology*, v.386, p.69–74, 1999.
- TORRES, R.C.; INSUELA, D.B.R.; CARVALHO, V.F. Mecanismos celulares e moleculares da ação anti-inflamatória dos glicocorticóides. *Corpus et Scientia*, v. 8, n. 2, p. 36-51, 2012.
- TORTORA, G.J. *Corpo Humano: fundamentos de anatomia e fisiologia*. 4^o. ed. Porto Alegre: Artmed Editora; 2000.
- TROUNSON, A.; ANDERIESZ, C.; JONES, G. Maturation of human oocytes in vitro and their developmental competence. *Reproduction*, v. 121, p. 51–75, 2001.
- VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of ovarian follicle and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, v.63, p.1717-1751, 2005.
- VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of ovarian follicles and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*, v.63, p.1717–1751, 2005.
- VASCONCELOS, G. L.; SARAIVA, M. V. A; COSTA, J. J. N.; PASSOS, M. J.; SILVA, A. W. B.; ROSSI R. O. D. S.; PORTELA, A. M. L. R.; DUARTE, A. B. G. MAGALHÃES-PADILHA, D. M.; CAMPELO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R.; VAN DEN HURKB, R.; SILVA, J. R. V. Effects of growth differentiation factor-9 and FSH on in vitro development, viability and mRNA expression in bovine preantralfollicles. *Reproduction, Fertility and Development*, n. 25, v. 8, p. 1194-1203, 2012.
- WEISS, R. R.; TREML, T. E.; ABREU, A. C. M. R.; BERTOL, M. A. F.; KOZICKI, L. E.; BERSTEIN, T. G.; KOCH, M. O. Efeito da dexametasona na fertilidade do touro. *Archives of Veterinary Science*, v.20, n.3, p.91-98, 2015.
- WESSEL, G. M.; BROOKS, J. M.; GREEN, E.; HALEY, S.; VORONINA, E.; WONG, J.; ZAYDFUDIM, V.; CONNER, S. The biology of cortical granules. *International Review of Cytology*, v. 209, p. 117-206, 2001.
- XU, Z.; GAVERIK, H.A.; SMITH, G.W.; SMITH, M.F.; HAMILTON, S.A.; YOUNGQUIST, R. S. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. *Biology of Reproduction*,

v.53, p.951-957, 1995.

YOUNG, J.M.; MCNEILLY, A.S. Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction*, v.140, p.489-504, 2010.

YUAN, X.H.; YANG, B.Q.; HU, Y.; FAN, Y.Y.; ZHANG, L.X.; ZHOU, J.C.; WANG, Y.Q.; LU, C.L.; MA, X. Dexamethasone altered steroidogenesis and changed redox status of granulosa cells. *Endocrine*, v. 47, 639–647, 2014.

ZHANG, T.; CHEN, Y.; YANG, Y.; WANGZ.; PAN, QI.; XU, SICHONG.; SUN, ZUYUE. The potentiality of two-dimensional preantral follicle culture as an in vitro model in predicting premature ovarian failure. *Experimental and Toxicologic Pathology*, v.69, p.477-484, 2017.

GUERREIRO, D.D.; DE LIMA, L.F.; RODRIGUES, G.Q.; ADELINA. de ANDRADE CARVALHO,¹ SIMONE VIEIRA CASTRO,¹ CLAUDIA CABRAL CAMPOLLO, DO Ó PESSOA, C.; GADELHA, C.R.F.; DE FIGUEIREDO, J.R.; BORDIGNON, V.; RODRIGUES, A.P.R. In situ cultured preantral follicles is a useful model to evaluate the effect of anticancer drugs on caprine folliculogenesis. *Microscopy Research and Technique* v.79, p.773–781, 2016.

DE BOSSCHER, K.; HAEGEMAN, G.; ELEWAUT, D. Targeting inflammation using selective glucocorticoid receptor. *Current Opinion in Pharmacology*, Oxford, v.10, n. 4, p. 497-504, 2010.

LÓPEZ, M.; AMWEG, A.; STANGAFERRO, M.; ORTEGA, H. Expresión de enzimas relacionadas con el metabolismo de glucocorticoides en tejidos ováricos bovinos. *Revista MVZ Córdoba*, v. 18. p. 3379-3386, 2013.