



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

**ANTONIA MOEMIA LÚCIA RODRIGUES PORTELA**

**EFEITO DA LECTINA CONCANAVALINA A (Con A) SOBRE A ATIVAÇÃO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRIMORDIAIS CAPRINOS**

**SOBRAL**

**2013**

ANTONIA MOEMIA LÚCIA RODRIGUES PORTELA

EFEITO DA LECTINA CONCANAVALINA A (Con A) SOBRE A ATIVAÇÃO *IN VITRO*  
DE FOLÍCULOS PRIMORDIAIS CAPRINOS

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

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Viana Silva

SOBRAL

2013

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

---

P876e Portela, Antonia Moemia Lúcia Rodrigues.  
Efeito da lectina concanavalina A (con A) sobre a ativação *in vitro* de folículos primordiais caprinos. / Antonia Moemia Lúcia Rodrigues Portela. – 2013.  
90 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2013.  
Área de Concentração: Macromoléculas.  
Orientação: Prof. Dr. José Roberto Viana Silva.

1. FSH - Hormônio Foliculoestimulante. 2. Concanavalina. I. Título.

ANTONIA MOEMIA LÚCIA RODRIGUES PORTELA

EFEITO DA LECTINA CONCANAVALINA A (Con A) SOBRE A ATIVAÇÃO *IN VITRO*  
DE FOLÍCULOS PRIMORDIAIS CAPRINOS

Aprovada em: 24/04/2013.

BANCA EXAMINADORA

---

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

---

Profa. Dra. Isabel Bezerra Lima-Verde  
( Universidade Tiradentes-UNIT)

---

Profa. Dra. Fátima Révia Granja Lima  
(Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA)

Aos meus pais e minhas  
irmãs por serem tão presentes  
nessa minha caminhada, por  
me apoiarem sempre, por  
acreditar em mim.

Dedico

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me dado força, por fazer surgir dentro de mim uma vontade de vencer, e foi essa vontade, que fez com que eu não desistisse dos meus objetivos diante dos obstáculos. Acredito que ele é minha força maior e sempre estar comigo e que faz prevalecer na minha vida o que me faz bem.

Aos meus pais, Manuel Raimundo Portela e Maria Lia Neta Portela, pela educação, por me ensinarem a ser uma pessoa correta, por sempre ter dado oportunidade para que eu estudasse e buscasse concretizar meus objetivos, por inúmeras vezes abrirem mão dos seus propósitos para proporcionar os meus, pelas inúmeras dificuldades vencidas e pela fé que eles depositaram, de que um dia irei conseguir o que sempre desejei. Amo vocês dois imensamente, as pessoas mais importantes da minha vida!

As minhas queridas irmãs e irmão, Luana Rodrigues, Eronallda Rodrigues e Fábio Portela, porque eles foram essenciais nessa minha caminhada, sempre me ajudaram de alguma forma, por entenderem e dar valor ao que eu faço, por acreditarem que eu iria conseguir e sempre estarem dispostas a me apoiar. Amo demais e sem vocês eu não teria conseguido.

A toda a minha família, as minhas primas (o), minhas tias (o), meus avós e em especial as minhas madrinhas Franciauria Rodrigues, Vânia Macêdo, Tânia Alves e ao padrinho De Assis Macêdo por terem em algum momento, feito parte da minha caminhada.

Ao João Paulo Matos Pessoa, companheirismo, pelo incentivo, por ser paciente, por ser bom comigo, por acreditar em mim, por querer sempre encontrar uma forma de me ajudar e me dá força, e o principal, foi você que me ensinou ser uma pessoa mais forte e isso foi um grande aprendizado. Amo muito você! Que bom que você faz parte da minha vida!

Ao Nilton Matos Pessoa por ter me ajudado quando precisei pela força e por sempre me dizer palavras de incentivo e me proporcionar momentos de descontração.

As pessoas maravilhosas que conheci nessa fase da minha vida, os amigos Sávio, Netinho, Ângelo, Emanuela Rebouças, Larisse Alves, por ótimos momentos juntos e engraçados.

Agradeço ao Prof. Dr. José Roberto Viana Silva, meu orientador: pessoa que eu admiro imensamente, por sua competência, inteligência e força de vontade, por sempre saber como resolver os problemas, pelos ensinamentos, paciência e por ter me dado a oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa. Você é uma pessoa que terei como exemplo para minha

vida profissional e como eu sempre falo, que se algum dia eu conseguir chegar a realizar metade do que você alcançou profissionalmente, serei muito feliz e realizada na minha profissão. Obrigada por tudo de bom que você me proporcionou.

A querida Dra. Viviane Saraiva, pela imensa força e ajuda, por transmitir otimismo, por reconhecer o meu esforço, pelo incentivo e por acreditar em mim, porque isso foi fundamental para que seguisse em frente em busca do meu objetivo. Vivi você se tornou muito importante para mim e tenho um imenso carinho por você. Adoro muito você.

A minha amiga Jordânia Marques, por ter feito parte da minha caminhada desde a faculdade, pelas inúmeras vezes que ouviu meus desabafos, que me apoiou nas horas mais difíceis, que me entendia e me aconselhava quando precisava. Nunca vou esquecer todo nosso percurso pra chegar até aqui, porque juntas fizemos uma dupla forte e que não desanimou diante dos obstáculos (e que não foram poucos) e és muito especial na minha vida e com quem eu sei que posso contar sempre.

Ao Clayrtiano Alves, pela paciência de me aturar todos os dias na casa dele, estudando até tarde com a Jordânia e pelos momentos de descontração. E ao meu afilhado mais lindo desse mundo, João Arthur.

A minha amiga Juliane Passos, porque sempre fez com que eu acreditasse que eu era capaz de conseguir, superar, por me fazer ser uma pessoa mais confiante, por ser uma pessoa guerreira e forte. Amiga, você é alguém com quem posso contar quando preciso e é muito importante para mim. Obrigada por tudo. Amo demais.

A minha amiga linda Gisvani Lopes, por revigorar meu otimismo, pela ajuda essencial que tens me dado, pelos momentos de descontração, por fazer me sentir melhor nos momentos de desânimo, por estar presente em vários momentos que precisei de você. Te amo muito.

Ao meu amigo Jackson Costa, por inúmeras vezes que me ajudou quando precisei, pelos conselhos, por sempre me apoiar e me fazer acreditar que tudo no final ia dar certo. Eu admiro muito seu esforço, e sei que quando eu precisar, você sempre estará apto a me oferecer ajuda. Amo demais. Obrigada por tudo e por fazer parte da minha vida, sem seu apoio tudo teria sido mais difícil, nunca vou esquecer o que fizeste por mim.

A Regislane Ribeiro, minha companheira de luta, aprendemos juntas a nos ajudar, a compartilhar as dificuldades e resolvê-las. Obrigada pelo otimismo transmitido e por ter me

ajudado muito nessa fase. Obrigada Lane pela amigona que tens demonstrado ser. Adoro muito você.

À equipe do grupo de pesquisa em Biotecnologia da Reprodução e Cultura de Células e Tecidos (UFC), Anderson Weiny, Taiã Gomes, Tânia Lopes, Glaucinete Borges, Katianne Freitas, Renato Passos, Rafael Pereira. Agradeço por ter tido o suporte de vocês nos meus experimentos, pela torcida e pelos momentos de descontração; vocês são pessoas importantes pra mim e me sinto muito bem na companhia de vocês! Adoro vocês! Obrigada a todos.

Aos meus amigos Rodrigo Rossi e Ellen de Vasconcelos, que com ajuda deles se tornou mais fácil superar as dificuldades, sempre que precisei eles me ajudaram, me apoiaram, acreditaram que eu iria conseguir, e juntos tivemos muitos momentos de risos e isso me faz muito bem. Vocês são muito especiais, pessoas que eu adoro muito.

As minhas lindíssimas Amélia Araújo, Danielle Val e Ângela Magalhães simplesmente sei que vocês são pessoas com quem posso contar sempre que precisar e querem me ver bem. Amo vocês.

Aos meus queridos amigos Ana Paula Mesquita e Rony Barroso, por serem sinceros comigo, companheiros e pelo apoio incondicional, pessoas que posso contar sempre. Meu amor por vocês é imenso. Obrigada por fazerem parte da minha vida, porque fica mais alegre quando vocês estão!

Ao prof. Dr. Rodrigo Maranguape, por ser uma pessoa de imensa inteligência, divertido, humilde, pelas inúmeras vezes que se disponibilizou a ajudar sem colocar nenhum obstáculo. Ele é um exemplo de profissional, porque além de competente, é muito acessível. Obrigada por tudo.

Aos integrantes do Núcleo de Biotecnologia de Sobral, Agradeço ao João Garcia, pelos ensinamentos e por sempre se dispor a ajudar! Agradeço a Auxiliadora pelo apoio técnico e a todos do NUBIS, como Áurea, Naiane, Raulzito, Tatiana, Aurilene, Jedson, Mônica, Vitória, Cleane, entre outros. Meus sinceros agradecimentos!

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



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

Agradeço também a todos os funcionários da UFC, em especial ao Alcione, Sr. Almino, Edilda Ponte, Cris Fontenele, Gade e Diná pelo carinho que tem por todos nós.

Agradeço a todos que não foram aqui mencionados, mas que direta ou indiretamente me ajudaram durante a realização deste trabalho. Os meus mais sinceros agradecimentos.

A todos, muito obrigada!

“Você tem que encontrar algo que você ame o suficiente para ser capaz de aceitar riscos, pular sobre os obstáculos e avançar sobre os muros que serão sempre colocados na sua frente. Se você não tem este tipo de sentimento por aquilo que está fazendo, você irá parar no primeiro grande obstáculo”.

(George Lucas)

## RESUMO

Os objetivos deste estudo foram avaliar o efeito de diferentes concentrações de Concanavalina A (Con A) e do FSH sobre a ativação, sobrevivência e crescimento *in vitro* de folículos primordiais caprinos, bem como investigar os efeitos da Con A e do FSH sobre a expressão de RNAm para PCNA, KL, c-Kit, BMP-15 e GDF-9. Para isto, fragmentos de córtex ovariano foram cultivados *in vitro* por 1 ou 6 dias em  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> suplementado com 0, 5, 10, 20 ou 40  $\mu$ g/mL da lectina Con A (experimento 1). No final do período de cultivo, os fragmentos de córtex ovariano foram fixados para histologia clássica. Em seguida, avaliou-se a percentagem de folículos primordiais ou em desenvolvimento. Após a determinação da concentração de Con A mais eficiente (10  $\mu$ g/mL), os fragmentos do córtex ovariano foram cultivados *in situ* por 6 dias em  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> sozinho ou suplementado com 50 ng/mL de FSH, 10  $\mu$ g/mL de Con A ou ambos (experimento 2). Os tecidos provenientes do controle não cultivado ou após cultivo nos diferentes tratamentos foram fixados para histologia clássica ou armazenados a -80°C para avaliar o perfil de expressão de RNAs mensageiros para PCNA, KL, c-Kit, BMP-15 e GDF-9. Os resultados do experimento 1 demonstraram que após 6 dias de cultivo, a percentagem de folículos em desenvolvimento foi significativamente maior nos fragmentos cultivados com  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> suplementado com 10 e 40  $\mu$ g/mL de Con A, quando comparado aos demais tratamentos (P <0,05). No experimento 2, a presença de FSH, Con A ou ambos promoveram uma redução na percentagem de folículos primordiais e aumento de folículos em desenvolvimento em relação ao meio controle ( $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>). Após 6 dias de cultivo, a presença de FSH promoveu um aumento nos níveis de RNAm para PCNA, mas este efeito foi bloqueado pela Con A. Por outro lado, a Con A aumentou os níveis de RNAm para c-kit em comparação ao controle não cultivado, mas Con-A ou ambos Con A e FSH reduziram os níveis de RNAm para KL. Além disso, uma redução dos RNAm para BMP-15 foi observado em folículos cultivados no meio controle, mas a presença de FSH inibiu esta redução. Além disso, a Con A promoveu um aumento nos níveis de RNAm para GDF-9 após cultivo *in vitro*. Em conclusão, a Con A sozinha ou em combinação com FSH promovem a ativação de folículos primordiais caprinos após 6 dias de cultivo *in vitro* e regulam a expressão de RNAm para PCNA, KL, c-Kit, BMP-15 e GDF-9.

Palavras-chave: Concanavalina A, FSH, cultivo *in vitro*, folículos primordiais, caprinos

## ABSTRACT

The aim of this study were to evaluate the effect of different concentrations of Concanavalin A (Con A) and FSH on activation, and survival in vitro growth of goat primordial follicles, as well as investigating the effects of Con A and FSH on the expression of mRNA for PCNA, KL, c-Kit, BMP-15 and GDF-9. For this, ovarian cortex fragments were in vitro cultured for 1 to 6 days in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> supplemented with 0, 5, 10, 20 or 40  $\mu$ g/mL of Con A lectin (experiment 1). At the end of the growing period, the fragments of ovarian cortex were fixed for histology. Next, we evaluated the percentage of primordial follicles or under development. After determination of the concentration of Con A more efficient (10  $\mu$ g/mL), fragments of ovarian cortex were cultured in situ for 6 days in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> alone or supplemented with 50 ng/mL of FSH, 10  $\mu$ g/mL of Con A or both (experiment 2). Tissues from the control uncultured or after culture in different treatments were fixed for histology or stored at -80°C to assess the expression profile of mRNA for PCNA, KL, c-Kit, BMP-15 and GDF-9. The results of Experiment 1 demonstrated that after 6 days of culture, the percentage of developing follicles was significantly higher in samples cultured with  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> supplemented with 10 and 40  $\mu$ g/mL Con A, when compared to the other treatments (P <0.05). In experiment 2, the presence of FSH, or both Con A promoted a reduction in the percentage of primordial follicles and increase developing follicles compared to control medium ( $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>). After 6 days of culture, the presence of FSH promoted an increase in mRNA levels for PCNA, but this effect was blocked by Con A. Moreover, the Con A increased mRNA levels for c-KIT compared to the control not grown, but Con A or Con A and FSH both reduced the levels of mRNA for KL. Furthermore, a reduction of BMP-15 mRNA was observed in follicles cultured in control medium, but the presence of FSH inhibited this reduction. Furthermore, Con A promoted an increase in levels of GDF-9 mRNA after in vitro culture. In conclusion, the Con A alone or in combination with FSH promote activation of primordial follicles goat after 6 days of in vitro culture and regulate the expression of mRNA for PCNA, KL, c-Kit, BMP-15 and GDF-9.

Keywords: concanavalin A, FSH, in vitro culture, primordial follicles, goats

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 - Migração de células germinativas primordiais (PGC) e proliferação oogonial, a entrada para a meiose e as fases de prófase meiótica 1 (MP1), a formação de ninho e discriminação, foliculogênese, a apoptose de células germinativas e os números de células germinativas em certas fase.....	23
Figura 2 - Caracterização morfológica da foliculogênese.....	24
Figura 3 - Via de sinalização PI3K, mostrando as moléculas que mantêm a dormência dos folículos primordiais incluindo PTEN, FOXO3, p27 e o complexo TSC1/TSC2, e as que mantêm a sobrevivência de folículos primordiais, incluindo PI3K, PDK1, mTORC1, S6K1 e rpS6.....	27
Figura 4 - União das subunidades da PCNA com a braçadeira deslizante que está ligada com a DNA polimerase.....	28
Figura 5- Desenho esquemático do desenvolvimento folicular, mostrando a transição de folículos pré-antrais para antrais (folículo de <i>Graaf</i> ) evidenciando o antro folicular, bem como os componentes presentes no fluido que preenche esta cavidade.....	30
Figura 6 - Diferenciação das células da granulosa em células do cúmulus.....	31

### ARTIGO

Figure 1. Histological section of non-cultured ovarian tissue after staining with periodic acid-Schiff-haematoxylin, showing a normal primordial follicle ( <i>a</i> ) and a degenerated primordial follicle ( <i>b</i> ). O, oocyte; on, oocyte nucleus; G, granulosa cells. (Original magnification $\times 400$ )......	60
Figure 2. Percentage (mean $\pm$ SEM) of viability follicular in fresh control (non-cultured), culture control and after culture for days 1 or 6 in the absence or presence of different concentrations of lectin Con A [5, 10, 20 and 40].....	60
Figure 3. Percentage (mean $\pm$ SEM) of primordial follicles in fresh control (non-cultured), culture control and after culture for days 1 or 6 in the absence or presence of different concentrations of lectin Con A [5, 10, 20 and 40]. *Differs significantly from control non-cultured follicles ( $P < 0.05$ ); a,b Differs significantly among concentrations.....	61
Figure 4. Percentage (mean $\pm$ SEM) in development follicles in fresh control (non-cultured), culture control (MEM <sup>+</sup> ) and after culture for days 1 or 6 in the absence or	

presence of different concentrations of lectin Con A [5, 10, 20 and 40 µg/mL].* Differs significantly from control non-cultured follicles ( $P < 0.05$ ); a, b differs significantly between 1 and 6 days of culture ( $P < 0.05$ ); A, B differs significantly among treatment with MEM, 10 and 20µg/mL in 6 day of culture ( $P < 0.05$ ).....	61
Figure 5. Percentage (mean ± SEM) of viability follicular in fresh control (non-cultured), culture control and after culture for days 6 in 10µg/mL in a medium containing Concanavalin A lectin alone and / or with FSH. *Differs significantly from control non-cultured follicles ( $P < 0.05$ ).....	62
Figure 6. Percentage (mean ± SEM) of primordial follicles in fresh control (non-cultured), culture control and after culture for days 6 in the 10µg/mL in a medium containing Concanavalin A lectin alone and / or with 50ng/mL of FSH. *Differs significantly from control non-cultured follicles ( $P < 0.05$ ); # Differs significantly from MEM <sup>+</sup> in each 6 day of culture ( $P < 0.05$ ).....	63
Figure 7. Percentage (mean ± SEM) in development follicles in fresh control (non-cultured), culture control (MEM <sup>+</sup> ) and after culture for days 6 in the 10µg/mL in a medium containing Concanavalin A lectin alone and / or with 50ng/mL of FSH.* Differs significantly from control non-cultured follicles ( $P < 0.05$ ); # Differs significantly from MEM <sup>+</sup> in each 6 day of culture ( $P < 0.05$ ).....	63
Figure 8. Levels of mRNA expression for in PCNA (A), c-kit (B), KL (C), BMP-15 (D) and GDF-9 (E) in uncultured control tissue (day 0) and in tissue cultured for 6 days in MEM <sup>+</sup> or medium containing FSH, Concanavalin A (Con A) or both.....	64

Tabela 1 -	<b>Table 1.</b> Primer pairs used in real-time PCR.....	58
Tabela 2 -	<b>Table 2.</b> Efficiency of the primers used in real time PCR.....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt	Proteína kinase
AMH	Hormônio Anti-Mülleriano
AMHII	Receptor para o Hormônio Anti-Mülleriano
As	Anti-senso
ATP	Adenosina trifosfato
Bax	do inglês BCL-2 associated protein X
Bcl <sub>2</sub>	do inglês B-cell lymphoma 2
BMP	Proteína Morfogenética Óssea
BMP-2	Proteína Morfogenética Óssea 2
BMP-3b	Proteína Morfogenética Óssea 3b
BMP-4	Proteína Morfogenética Óssea 4
BMP-6	Proteína Morfogenética Óssea 6
BMP-7	Proteína Morfogenética Óssea 7
BMP-8b	Proteína Morfogenética Óssea 8b
BMP-15	Proteína Morfogenética Óssea 15
BSA	Albumina sérica bovina
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
CG	Célula da granulosa
CGPs	Células germinativas primordiais
c-Kit	Receptor para Kit ligand
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico



Con A	do inglês Concanavalin A
CT	Cycle Threshold
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DNase	Desoxirribonuclease
DTT	Dithiothreitol
E2	Estradiol
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
FOXO3	Fator de Transcrição Forkhead 3
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GDF-9	Fator de Crescimento e Diferenciação – 9
H	Hora
IGF-1	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina – 1
ITS	Insulina, transferrina e selênio
K <sup>+</sup>	Potássio
KL	Kit ligand
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LH	Hormônio luteinizante
MEM	Meio Essencial Mínimo
MG	Miligrama
MOIFOPA	Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais
Min	Minuto
mTORC1	Complexo 1 do Alvo da Rapamicina em mamíferos
Na <sup>+</sup>	Sódio

Ng	Nanograma
NGF	Fator de crescimento neural
NUBIS	Núcleo de Biotecnologia de Sobral
P4	Progesterona
PCNA	Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
PDK1	Quinase dependente de fosfoinositídeos-1
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PIP2	Fosfatidilinositol,4,5-disfosfato
PIP3	Fosfatidilinositol 3,4,5-trisfosfato
PTEN	Homólogo da fosfatase e tensina deletado no cromossomo 10
p27	Inibidor de kinase dependente de ciclina
R-FSH	Receptor para o hormônio folículo estimulante
R-LH	Receptor para o hormônio lutenizante
RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensageiro
RNAse	Ribonuclease
RNAseout	Inibidor de Ribonuclease
rpS6	Proteína Ribossomal S6
S	Senso
S6K1	Proteína ribossomal p70 ligada a quinase S61
Sec	Segundo

SEM	Média do erro padrão
TSC1	Proteína 1 de Esclerose Tuberosa
TSC2	Proteína 2 de Esclerose Tuberosa
U	Unidade
UBQ	Ubiquitina
ZP	Zona pelúcida
$\alpha$ -MEM <sup>+</sup>	$\alpha$ -Meio Essencial Mínimo suplementado
$\mu$ g	Micrograma
$\mu$ L	Microlitro
$\mu$ m	Micrômetro
$\mu$ M	Micromolar

## LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
~	Aproximadamente
$\pm$ SD	Mais ou menos o desvio padrão
°C	Graus Celsius
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
MnCl <sub>2</sub>	Cloreto de manganês
P < 0.05	Probabilidade de erro menor do que 5%
P > 0.05	Probabilidade de erro maior do que 5%

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	20
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	22
2.1	Ovário mamífero.....	22
2.2	Formação dos oócitos e dos folículos primordiais.....	22
2.3	Dormência e ativação dos folículos primordiais.....	24
2.4	Desenvolvimento dos folículos primários, secundários e formação de antro...	27
2.5	Crescimento folicular na fase antral (terciário e pré-ovulatório).....	30
2.6	Atresia folicular.....	32
2.7	Importância do FSH para a foliculogênese.....	33
2.8	Lectina Concanavalina A (Con A).....	34
3	HIPÓTESES CIENTÍFICAS.....	36
4	JUSTIFICATIVA.....	37
5	OBJETIVOS.....	38
5.1	Objetivos gerais.....	38
5.2	Objetivos específicos.....	38
6	ARTIGO I: EFFECTS OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF CONCAVALIN A AND FOLLICLE STIMULATING HORMONE ON GOAT PRIMORDIAL FOLLICLES ACTIVATION, SURVIVAL AND GENE EXPRESSION.....	39
7	CONCLUSÕES.....	66
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67

## 1 INTRODUÇÃO

No Brasil, o efetivo de caprinos em 2010 foi estimado em cerca de 9,3 milhões de animais. A região nordeste do país mantém o maior efetivo de caprinos, com mais de 90% do total nacional. O estado do Ceará é detentor de 11% do rebanho (IBGE, 2010), sendo esta, uma espécie de elevada importância comercial, uma vez que é utilizada para muitos propósitos, tais como produção de carne, leite e pele. Visando aumentar a eficiência da caprinocultura, nas últimas décadas, várias pesquisas com ênfase nas biotécnicas de reprodução assistida têm sido realizadas com o intuito de aumentar o potencial reprodutivo e a produtividade dos rebanhos. Desta forma, o conhecimento da fisiologia ovariana poderá contribuir para otimizar a eficiência de várias biotecnologias que visam aumentar o potencial reprodutivo de animais de alto padrão genético, contribuindo para um aumento na produtividade animal.

A foliculogênese é iniciada na vida intra-uterina com a formação dos folículos primordiais e, ao nascimento, os ovários das fêmeas mamíferas contêm milhares de oócitos imaturos inclusos em folículos pré-antrais (primordiais, primários e secundários), que constituem o estoque de folículos ovarianos que será utilizado durante a vida reprodutiva das fêmeas. Estes folículos representam uma fonte potencial de oócitos fertilizáveis, mas poucos conseguem desenvolver-se até o estágio de folículo pré-ovulatório, visto que a grande maioria sofrerá atresia (MARKSTRÖM *et al.*, 2002). Assim, a utilização e o desenvolvimento de biotécnicas da reprodução animal são condições indispensáveis para o aumento da eficiência produtiva dos rebanhos (FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

A ativação dos folículos primordiais quiescentes resulta no crescimento do oócito e na transição de folículos primordiais para os estágios posteriores (HILLIER, 2009). A comunicação parácrina que ocorre entre as células somáticas circundantes e o oócito é responsável pela ativação folicular. Entre os fatores envolvidos nesse processo podemos destacar o kit ligand (LIU, 2006), o fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF-9) e a proteína morfogenética óssea 15 (BMP-15) (EPPIG *et al.*, 1997b; CHANG *et al.*, 2002; DUBE *et al.*, 1998). O hormônio folículo estimulante (FSH) também parece ser essencial para o crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais (WU *et al.*, 2007), pois estimula a ativação e o crescimento de folículos primordiais nas espécies caprina (MATOS *et al.*, 2007b) e suína (Wu *et al.*, 2007). Além disso, alguns estudos têm indicado que a adição de lectinas mitogênicas de origem vegetal ao cultivo *in vitro* de oócitos induziu a retomada da meiose em camundongas, indicando uma possível ação dessas moléculas durante a foliculogênese (CYERT e

KIRSCHNER, 1988; KISHIMOTO, 1988). Desta forma, a avaliação do efeito da lectina Concanavalina A e do FSH durante a ativação e o crescimento folicular torna-se relevante para uma melhor compreensão dos diversos fatores implicados na foliculogênese inicial e no processo de atresia. Dentre as biotécnicas utilizadas para a compreensão do efeito dos fatores que regulam a ativação dos folículos primordiais quiescentes, destaca-se a manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA), que consiste no isolamento e cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais (FOPAs), visando promover a ativação, o crescimento e a maturação folicular *in vitro* (FIGUEIREDO *et al.*, 2008), prevenindo-se, assim, a ocorrência da atresia. Tal biotécnica vem sendo aprimorada nos últimos anos e consiste em uma das principais ferramentas utilizadas atualmente para a elucidação da foliculogênese inicial.

Para o maior esclarecimento da importância deste trabalho a revisão de literatura a seguir abordará aspectos relacionados com a ativação, o desenvolvimento e a atresia folicular, com ênfase na utilização da lectina Concanavalina A e do FSH no cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Ovário mamífero

O ovário mamífero contém o estoque de células de oócitos que será utilizado durante a vida reprodutiva e também atua em vários aspectos do desenvolvimento da fêmea, bem como nos processos fisiológicos (EDSON *et al.*, 2009). O ovário é um órgão complexo e que é determinante para a fertilidade feminina (MAHESHWARI e FOWLER, 2008; TINGEN *et al.*, 2009). Desta forma, as principais funções do ovário são: a geração de oócitos competentes e a secreção de hormônios esteroides. Estas funções são essenciais para o desenvolvimento do trato reprodutivo feminino, bem como para a fecundação e o desenvolvimento da gestação.

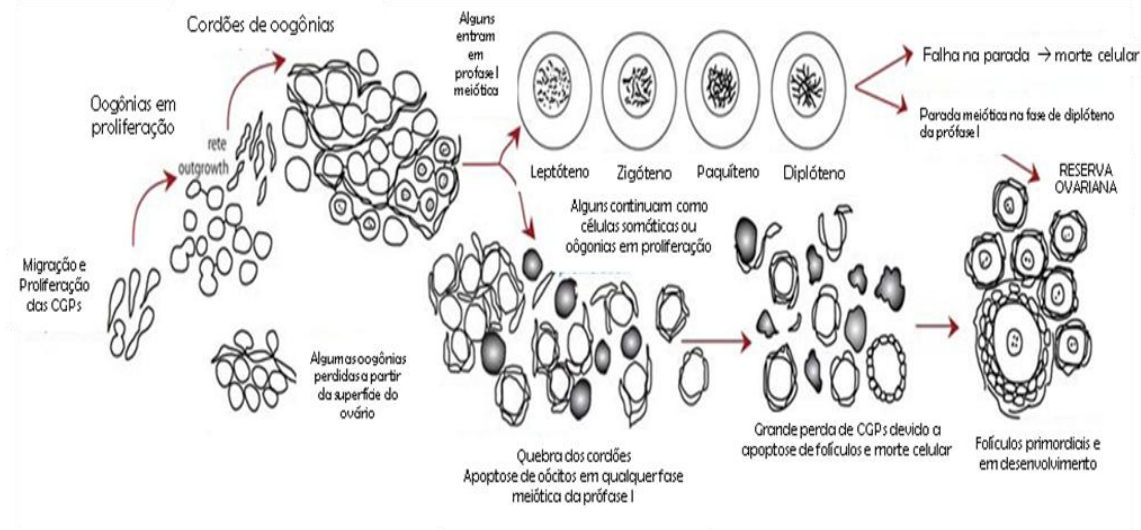
### 2.2 Formação dos oócitos e dos folículos primordiais

Os folículos ovarianos representam a unidade básica do ovário mamífero e cada folículo contém um oócito que é circundado por células somáticas, chamadas de células da granulosa (McGEE e HSUEH, 2000). A foliculogênese, que envolve a formação, o crescimento e a maturação folicular, é um processo complexo, que é regulada por vários tipos celulares que interagem para prover condições necessárias para o desenvolvimento de oócitos competentes, bem como para a secreção de níveis adequados de esteroides para a ocorrência dos ciclos reprodutivos (KNIGHT e GLISTER, 2006).

O início da foliculogênese ocorre ainda na fase fetal, com a diferenciação das células germinativas primordiais (CGPs) a partir do epiblasto. As BMP-4 e BMP-8b produzidas no ectoderma extra-embriônico, são necessárias para induzir a diferenciação e formação das CGPs a partir do epiblasto proximal adjacente. Em estudos com camundongos, foi demonstrado que a retirada ou inativação da BMP-2, expressa no endoderma extra-embriônico, causa redução significativa no número de CGPs (YING e ZHAO, 2001). Após a formação das CGPs, ocorre o início do processo de migração destas células do saco vitelínico até a crista gonadal, essa etapa é controlada por diversos fatores, tais como o KL, que atua regulando a migração, proliferação e/ou sobrevivência celular (GU *et al.*, 2009). As CGPs utilizam movimentos ameboides e movem-se entre as células mesenquimais até colonizarem as cristas gonadais (SOTO-SUAZO e ZORN, 2005), onde contribuirão para a formação do futuro ovário (Figura 1).



Figura 1. Migração de células germinativas primordiais (PGC) e proliferação oogonial, a entrada para a meiose e as fases de prófase meiótica 1 (MP1), a formação de ninho e discriminação, foliculogênese, a apoptose de células germinativas e os números de células germinativas em certas fases.



Fonte: Adaptado de Hartshorne *et al.*, 2009.

Após a chegada das CGPs no ovário, ocorre a diferenciação em oogônias, que darão origem ao oócito primário, o qual se encontra no estágio de prófase I da meiose, permanecendo nesse estágio até que o animal atinja a puberdade (FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

Os folículos primordiais possuem um oócito na fase diplótano da meiose I, com diâmetro em torno de 30 a 60µm que são circundados por células da pré-granulosa que se diferenciam a partir do epitélio superficial ovariano ou dos túbulos mesonéfricos. Os primeiros folículos primordiais em caprinos foram verificados aos 62 dias de gestação, período muito próximo àquele observado em fetos ovinos (em torno de 66 dias de gestação) (BEZERRA *et al.*, 1998, RÜSSE, 1983). BEZERRA *et al.*, (1998) relataram que os folículos de transição, primários e secundários foram observados aos 73 dias de gestação, sendo este um indicativo de que alguns folículos primordiais são ativados na vida fetal, antes mesmo de entrar em quiescência, conforme descrito em bovinos e ovinos (RÜSSE, 1983).

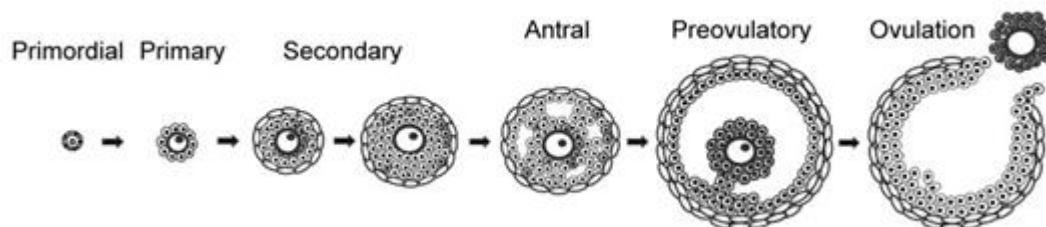
Para uma melhor compreensão do processo de formação desses folículos primordiais, tem sido realizados estudos transcriptômicos em diversas espécies (ovelhas: MANDON-PÉPIN, 2003; camundongas: SMALL, 2005; YOON, 2006; ratas: KEZELE, 2005; primatas não humanos: ARRAZTOA, 2005 e em humanos adultos: SERAFICA, 2005; ASSOU, 2006; ZHANG, 2007) que demonstraram o envolvimento de uma grande diversidade de genes na organização desses folículos (EDSON, 2009). Dentre esses genes estão fatores de transcrição, enzimas envolvidas na meiose e o fator de crescimento neural (NGF). Cada folículo

primordial formado pode seguir caminhos distintos, tais como permanecer quiescentes durante o período reprodutivo ou iniciar o crescimento, podendo crescer até o estágio de folículo ovulatório ou morrer por atresia. No entanto, os folículos primordiais também podem sofrer atresia, ainda no estágio de dormência, contribuindo assim para o envelhecimento reprodutivo da fêmea (McGEE e HSUEH, 2000; HANSEN, 2008).

### 2.3 Dormência e ativação dos folículos primordiais

Para manter uma longa vida reprodutiva é necessário que a maioria dos folículos primordiais permaneça no estado de quiescência, para que posteriormente possam ser utilizados (HIRSHFIELD, 1991; McGEE e HSUEH, 2000). Desta forma, para que ocorra a formação de um ócito maduro, os folículos primordiais são recrutados a partir da reserva dos folículos dormentes, os quais entram no *pool* de folículos em crescimento, também denominado de ativação folicular (McGEE e HSUEH, 2000). A figura 2 ilustra os folículos primordiais e as várias categorias de folículos em desenvolvimento.

Figura 2. Caracterização morfológica da foliculogênese



Fonte: adaptado de EDSON *et al.*, 2009.

WANDJI *et al.*, (1996) demonstraram que a maioria dos folículos primordiais é mantida no estado de quiescência, ou seja, eles são assim caracterizados por não haver mudança de estágio, e isto se dá sob a ação constante de fatores inibitórios. Por outro lado, a ativação desses folículos pode ocorrer devido a uma diminuição desses fatores inibitórios ou aumento dos fatores que estimulam esse crescimento. Isto mostra que a longa sobrevivência dos folículos primordiais é mantida através de constantes sinais (REDDY, 2009) e que a elevação ou redução na disponibilidade desses sinais de sobrevivência para os folículos

primordiais pode determinar a manutenção da viabilidade ou morte destes folículos que se encontram no estágio de dormência.

Recentemente foram demonstrados que vários fatores controlam a sobrevivência e a atresia dos folículos primordiais, entre esses fatores está a BMP-15. Estudos *in vitro* em roedores demonstraram que a BMP-15 promove a proliferação de células da granulosa e é capaz de estimular a transição de folículos primordiais para primários (OTSUKA *et al.*, 2000; FORTUNE, 2003). Por outro lado, *in vivo*, foi demonstrado que ovelhas mutantes, ou seja, baixa produção para BMP-15 são inférteis, pois o desenvolvimento folicular não prossegue além do estágio de folículos primários (DONG *et al.*, 1996; GALLOWAY *et al.*, 2000).

O GDF-9 é outro membro da superfamília fator de crescimento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), que promove a transição de folículos primordiais para primários (McNATTY *et al.*, 1999; GOUGEON e BUSSO, 2000; PAULINI e MELO, 2011). Através de estudos genéticos, foi demonstrado em camundongos que os folículos primordiais não prosseguiram o desenvolvimento para o estágio primário na ausência de GDF-9 (DONG *et al.*, 1996). O GDF-9 também promove a sobrevivência e progressão de desenvolvimento folicular em estágio de folículos secundários em humanos (HREINSSON *et al.*, 2002). A presença de GDF-9 em folículos primários caprinos (SILVA *et al.*, 2004) sugere que GDF-9 está envolvido em eventos de sinalização, sendo importante no desenvolvimento de folículos pré-antrais nesta espécie.

Além disso, estudos em roedores demonstraram que o receptor de tirosina quinase (c-kit) e o KL estão envolvidos na ativação de folículos primordiais (SKINNER, 2005; REDDY, 2005). O KL é produzido nas células da granulosa (HUTT *et al.*, 2006b) e o c-Kit está presente em oócitos (MONIRUZZAMAN *et al.*, 2007a). No entanto, esse processo de ativação envolvendo o KL em algumas espécies, como camundongas (JOHN *et al.*, 2009; DRIANCOURT *et al.*, 2000), porcas (MONIRUZZAMAN *et al.*, 2007) e coelhas (HUTT *et al.*, 2006b) pode não ser necessário para que ocorra a ativação. O KL é um fator de sobrevivência para as células germinativas primordiais e também atua na proliferação das CGs (OTSUKA *et al.*, 2002).

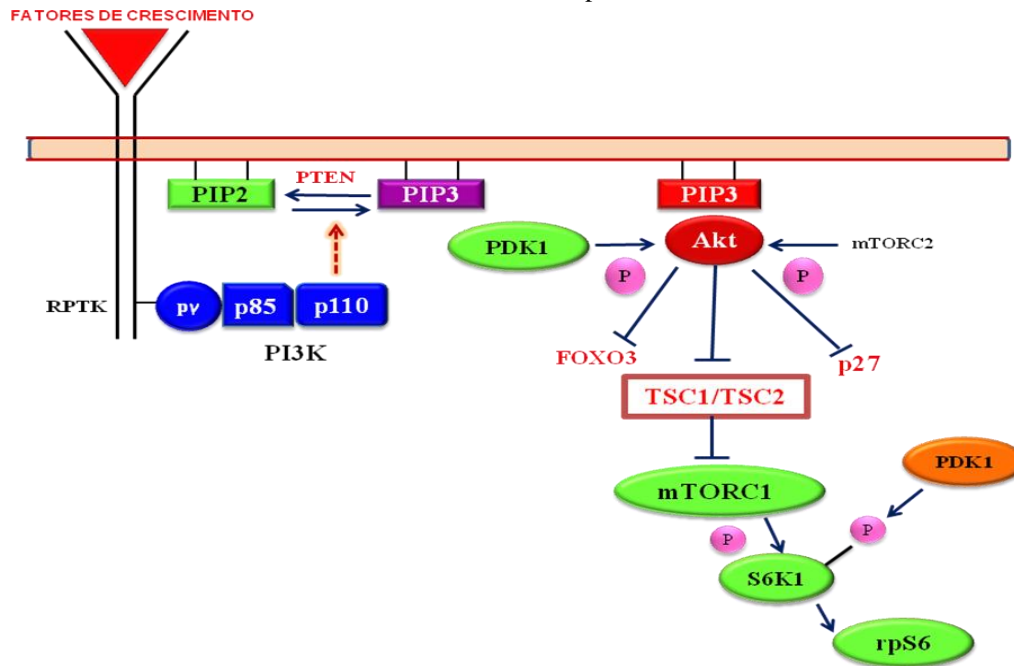
O hormônio Anti-Mülleriano (AMH) é membro da superfamília TGF- $\beta$  e juntamente com o seu receptor AMHII são expressos por células da granulosa de folículos em desenvolvimento (BAARENDS *et al.*, 1995; DURLINGER *et al.*, 2002; HIROBE *et al.*, 1992; TAKAHASHI *et al.*, 1986; VIGIER *et al.*, 1984; WEENEN *et al.*, 2004). O AMH inibe o crescimento de folículos primordiais e funciona de maneira direta ou indireta como repressor no recrutamento dos folículos primordiais (EDSON, 2009).

Além do estímulo exógeno, diversos mensageiros intracelulares estão envolvidos no mecanismo de dormência, sobrevivência e controle do início do desenvolvimento dos folículos primordiais. Dentre estes fatores, podemos citar o PTEN (Homólogo da fosfatase e tensina deletado no cromossomo 10), que é considerado regulador negativo da via PI3K (Fosfatidilinositol-3-quinase) e atua no oócito como supressor da ativação folicular (Figura 3). Recentemente pesquisas mostraram que a via de sinalização PI3K/PTEN, regula tanto a dormência como a sobrevivência de folículos primordiais (JOHN *et al.*, 2008; REDDY *et al.*, 2008; REDDY *et al.*, 2009). Essa sinalização mediada por PI3K converte-se em Fosfatidilinositol-dependente quinase-1 (PDK1). A PDK1 ativa a proteína kinase B (Akt) e é responsável por regular uma cascata de eventos nos oócitos que irão promover a regulação da sobrevivência dos folículos primordiais. A sinalização de PDK1 em oócitos é indispensável por manter a sobrevivência de folículos primordiais, os quais se tornam essenciais para determinar a duração da fertilidade feminina (REDDY *et al.*, 2009). Desta forma, tem sido demonstrado a importância da sinalização PTEN/PI3K, que é determinante para a sobrevivência, o desenvolvimento ou morte dos folículos primordiais (ADHIKARI *et al.*, 2010).

Outro fator envolvido nos mecanismos moleculares, é o mTORC1 (complexo 1 do alvo da rapamicina em mamíferos) que é uma serina treonina quinase, que funciona regulando o crescimento e a proliferação celular, visto que são responsivos a fatores de crescimento e nutrientes (SARBASSOV *et al.*, 2005; WULLSCHLEGER *et al.*, 2006; GUERTIN *et al.*, 2007). Em humanos, a atividade de mTORC1, é regulada negativamente por um complexo heterodimérico, que consiste de duas moléculas de proteínas. TSC1 (Hamartina) e TSC2 (Tuberina), estas proteínas são os produtos de dois distintos genes supressores de tumor, TSC1 e TSC2 (Complexo de Esclerose Tuberosa). A sinalização de TSC/mTORC1 em oócitos regula o desenvolvimento de folículos primordiais (Figura 3). ADHIKARI *et al.*, (2010) deletaram o gene TSC1 em oócitos de folículos primordiais e de folículos em desenvolvimento em camundongos. Esta deleção do TSC1 induziu a ativação total de todos os folículos primordiais durante a puberdade, causando o esgotamento folicular no início da idade adulta, levando a falência ovariana prematura (FOP). Diante disso, o complexo TSC1–TSC2 em oócitos de camundongas é indispensável para manter os folículos primordiais quiescentes. Estes resultados também demonstraram que TSC e PTEN são responsáveis por manter a dormência dos folículos, pois ambos suprimem a atividade da Proteína ribossomal

p70 ligada a quinase S61 (S6K1). Desta forma, ocorre uma colaboração entre TSC e PTEN sendo essencial para manter a quiescência dos folículos primordiais.

Figura 3. Via de sinalização PI3K, mostrando as moléculas que mantêm a dormência dos folículos primordiais incluindo PTEN, FOXO3, p27 e o complexo TSC1/TSC2, e as que mantêm a sobrevivência de folículos primordiais, incluindo PI3K, PDK1, mTORC1, S6K1 e rpS6.



Fonte: Adaptado de REDDY *et al.*, 2009a.

## 2.4 Desenvolvimento de folículos primários, secundários e formação de antro

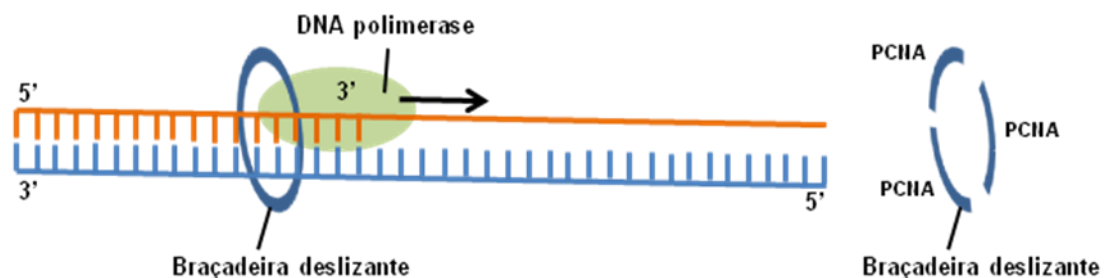
A transição de folículos primordiais para o estágio de folículos primários se dá pela diferenciação de uma camada de células da granulosa de forma pavimentosa para formato cuboide, as quais circundam o oócito imaturo em estágio de vesícula germinativa. Este processo ocorre através de uma rede de comunicação que se dá entre o oócito e as células somáticas (células da granulosa e da teca), além de componentes da matriz extracelular e fatores de crescimento que agem de maneira autócrina e parácrina, que são responsáveis pelo início da transição e crescimento dos folículos (OKTAY *et al.*, 1997; EPPIG, 2001; SKINNER, 2005).

A regulação da diferenciação das células da granulosa durante a transição de folículos primordiais para primário requer a atividade de diferentes hormônios e fatores de crescimento. Já foi demonstrada a presença de receptores específicos para as gonadotrofinas FSH e LH nas células da granulosa de folículos primários. No entanto, apesar de parecerem responsivos a esses hormônios, o desenvolvimento desses folículos é independente de gonadotrofinas, (RICHARDS e MIDGLEY, 1976; OKTAY *et al.*, 1997). Além disso, alguns

fatores de crescimento parecem ter papel essencial na regulação da diferenciação folicular, como o fator de crescimento epidermal (EGF) (VLODAVSKY *et al.*, 1978; WANDJI *et al.*, 1992) que é um agente mitogênico das células foliculares em suínos e humanos (GOSPDAROWICZ *et al.*, 1979). Além disso, o fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) (ADASHI, 1998) é responsável por promover a diferenciação das células da granulosa em suínos, estimular a síntese de DNA e aumentar a capacidade de sobrevivência e crescimento dos folículos (BARANAO *et al.*, 1984).

Com a contínua proliferação das células da granulosa, ocorre a formação do folículo secundário, caracterizado pela presença de duas ou mais camadas de células da granulosa de morfologia cúbica ao redor do oócito. Durante esta fase, ocorre uma intensa atividade mitótica nas células da granulosa, que é regulada por inúmeros fatores, dentre os quais pode-se destacar o Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA), uma proteína nuclear que atua como co-fator para a DNA polimerase e se expressa diferentemente de acordo com o ciclo celular. A sua taxa de síntese é diretamente proporcional à taxa de proliferação celular. Essa proteína constitui-se em um marcador de células em proliferação, sendo expressa durante a replicação do DNA, no início da fase G1, com expressão máxima na fase S e declínio na fase G2 (GAN *et al.*, 1995; WANDJI *et al.*, 1996), sendo assim, um marcador operacional de proliferação celular marcando células tanto em proliferação como células em reparo (BACCHI e GOWN, 1993). O PCNA vai atuar quando três subunidades dessa proteína se ligam a braçadeira deslizante que está ligada a DNA polimerase durante a replicação do DNA (Figura 4).

Figura 4. União das subunidades da PCNA com a braçadeira deslizante que está ligada com a DNA polimerase.



Fonte: Adaptada de De ROBERTIS, 2006.

Dentre os fatores locais responsáveis pelo desenvolvimento de folículos primários para secundários, a Ativina A demonstrou a capacidade de promover o crescimento de folículos pré-antrais e a proliferação de CGs em ratos e camundongos através de sinais

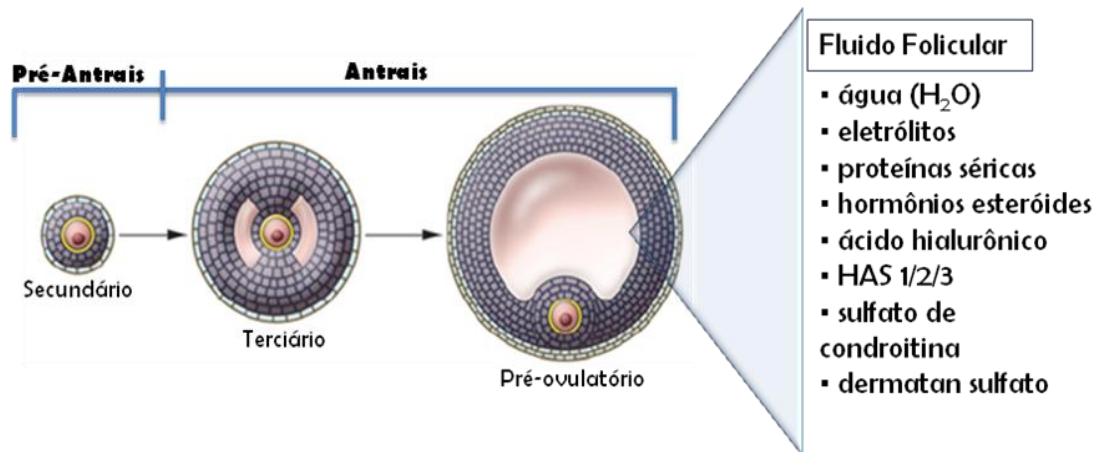
autócrinos e parácrinos (SMITZ *et al.*, 1998; LIU *et al.*, 1999; OKTAY *et al.*, 2000; ZHAO *et al.*, 2001; OKTEM e OKTAY, 2007a). O GDF-9, que promove o crescimento de folículos primários e secundários em humanos e roedores, e tem um importante papel no início do crescimento e progressão folicular (HAYASHI *et al.*, 1999; HREINSSON *et al.*, 2002; NILSSON *et al.*, 2002; WANG e ROY, 2004). Além disso, o GDF-9 também exerce função no crescimento do oócito em folículos primordiais caprinos *in vitro* e a proliferação e diferenciação de CGs (SAHA *et al.*, 2000; SILVA *et al.*, 2004a; WANG *et al.*, 2007).

O EGF é também conhecido como um fator de sobrevivência *in vivo* e *in vitro* (MARKSTRÖM *et al.*, 2002). Alguns autores demonstraram que baixas concentrações de EGF promoveu uma inibição da apoptose de células da granulosa, ou a redução dos níveis de atresia folicular em suínos, bovinos e caprinos (GUTIERREZ *et al.*, 2000; MAO *et al.*, 2004, ZHOU e ZHANG, 2005). O TGF- $\beta$  é outro fator capaz de promover a proliferação de CGs, e o crescimento de folículos pré-antrais em roedores (LIU *et al.*, 1999).

O estágio de folículos secundários é iniciado com o desenvolvimento de uma segunda camada de CGs, esse processo continua e várias camadas de células se organizam ao redor do oócito, até o momento em que se desenvolve uma cavidade antral e o folículo atinge diâmetro de aproximadamente 250 $\mu$ m. FORTUNE e EPPIG (1979) demonstraram uma distinta camada de células da teca em folículos de roedores no estágio de folículos primários e de secundário iniciais, mas não foi observado em ovinos, bovinos e em primatas até o estágio de folículos secundários (GOUGEON, 1996; BRAW-TAL e YOSSEFI, 1997; LUNDY *et al.*, 1999). As células da teca se diferenciam a partir de precursores presentes no estroma ovariano (Van den HURK, 1997). Durante o crescimento folicular ocorre aumento do volume oocitário, aumento de organelas, bem como a modificação e redistribuição das organelas já existentes (PICTON *et al.*, 1998).

Após a formação de uma cavidade repleta de líquido denominada antro, os folículos são classificados como terciários ou antrais e posteriormente como pré-ovulatórios (BARNETT *et al.*, 2006) (Figura 5). Tanto a multiplicação das CGs como a expansão do antro folicular são importantes e dependem estímulos de hormônios ou fatores de crescimento. A formação do fluido folicular se inicia com a vascularização das células da teca, o que possibilita o acúmulo do fluido mesmo durante o crescimento folicular (IRVING-RODGERS *et al.*, 2006).

Figura 5. Desenho esquemático do desenvolvimento folicular, mostrando a transição de folículos pré-antrais para antrais (folículo de *Graaf*) evidenciando o antro folicular, bem como os componentes presentes no fluido que preenche esta cavidade.



Fonte: Adaptado de Richards e Pangas, 2010.

## 2.5 Crescimento folicular na fase antral (terciário e pré-ovulatório)

Os folículos antrais iniciais possuem receptores para FSH (FSH-R) nas células da granulosa, mas ainda são relativamente independentes de gonadotrofinas durante o período inicial de crescimento. A partir de então os folículos aumentam de tamanho na presença ou ausência de concentrações de FSH e LH. Durante o crescimento, é observada a expressão de enzimas relacionadas com a biossíntese de esteroides nas células da teca, enquanto que nas células da granulosa não é detectada a expressão de aromatase. Isto pode indicar que a progesterona e os andrógenos e não os estrógenos são os principais hormônios esteroides formados no início da formação dos folículos antrais (Van den HURK e ZHAO, 2005).

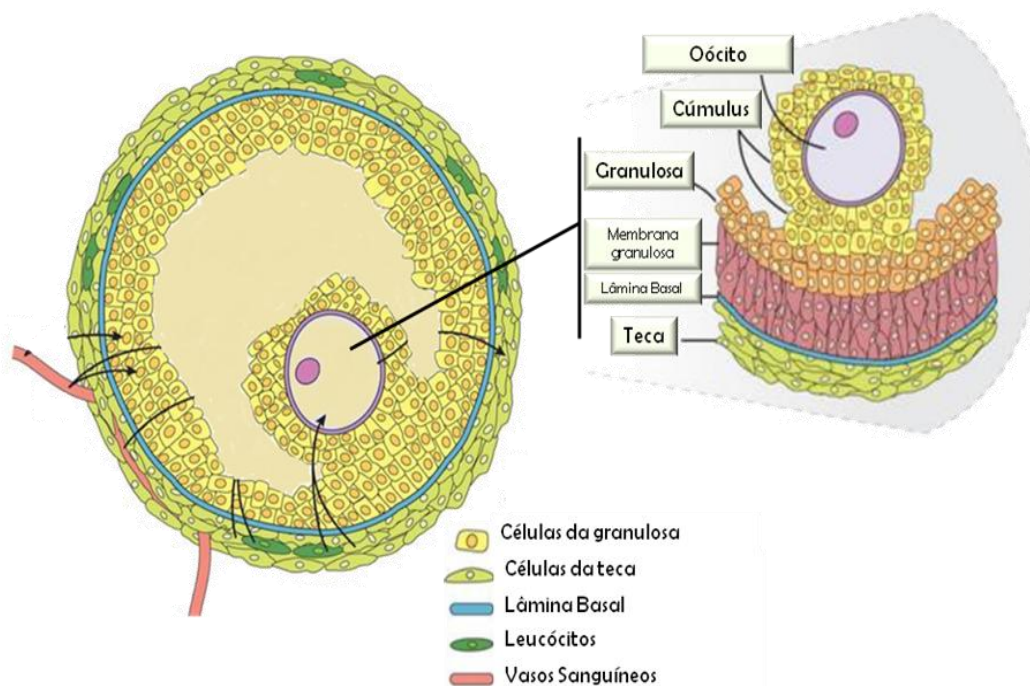
Durante o período de seleção dos folículos antrais, ocorre uma modulação das atividades esteroidogênicas, e os folículos passam a ser responsivos às gonadotrofinas. Isto é requerido para sensibilizar alguns folículos para um maior crescimento que é seguido pela diferenciação de um folículo dominante. Algumas evidências sugerem que estes eventos ocorrem por meio do controle de fatores autócrinos e parácrinos, tais como os derivados das células da granulosa, como a Ativina e a Proteína Morfogénica Óssea-6 (BMP-6), bem como os derivados do oócito (GDF-9, BMP-15 e BMP-6) e das células da teca (BMP-2, -3b, -4 e -7), os quais exibem diferentes padrões de expressão (OKTEM e URMAN, 2010). As



BMPs 4 e 7 proporcionam a sinalização do FSH de forma que resulte na produção de Estradiol (E2), por outro lado, inibem a síntese de Progesterona (P4), agindo como inibidores da luteinização (SHIMASAKI *et al.*, 1999).

O FSH e o LH são gonadotrofinas que coordenam o desenvolvimento e ovulação dos folículos antrais. Através da atuação do FSH nos folículos antrais desencadeia-se a formação e manutenção da sobrevivência destes folículos. Também foram identificados grandes números de outros fatores que podem exercer funções importantes durante os estágios finais da foliculogênese (EDSON *et al.*, 2009). Com o contínuo desenvolvimento folicular, o folículo pré-ovulatório pode ser caracterizado por um oócito circundado por células da granulosa especializadas que são denominadas células do cumulus (Figura 6). As células da granulosa de folículos pré-ovulatórios param de se multiplicar em resposta ao LH e iniciam o programa final de diferenciação. A ovulação do oócito e células do cumulus ocorrem em resposta ao pico pré-ovulatório de LH. Em todas as espécies, a formação de folículos pré-ovulatórios ocorre geralmente a partir da puberdade (DRIANCOURT, 2001).

Figura 6. Diferenciação das células da granulosa em células do cúmulus.



Fonte: Adaptado de Williams e Erickson, 2012.

## 2.6 Atresia Folicular

Como pôde-se observar, a foliculogênese é um processo longo e complexo que envolve a participação de vários hormônios e fatores de crescimento e isto faz com que a grande maioria dos folículos ovarianos sofram atresia em algum estágio do desenvolvimento. O processo de atresia pode ocorrer por via degenerativa e/ou apoptótica (FIGUEIREDO *et al.*, 2008). A via degenerativa da atresia é iniciada quando ocorre uma redução da oxigenação celular durante a isquemia resultando na diminuição da produção de ATP, afetando diretamente o funcionamento da bomba de sódio ( $\text{Na}^+$ ) e potássio ( $\text{K}^+$ ) presente na membrana celular. Logo após, ocorre o acúmulo intracelular de íons  $\text{Na}^+$  e íons cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), com conseqüente aumento do volume de água intracelular, ocorrendo a agregação da cromatina, vacuolização citoplasmática, perda da integridade da membrana plasmática e conseqüente ruptura celular (BARROS *et al.*, 2001; BERRIDGE *et al.*, 2000; SAVILL, 1995; WYLLIE, 1994). Além da isquemia, outros fatores que podem levar a degeneração são os estímulos tóxicos e imunológicos. Com a evolução da degeneração, a morte celular é identificada histologicamente como necrose (PADANILAM *et al.*, 2003; BARROS *et al.*, 2001). Durante a necrose, ocorre a fragmentação celular e liberação de conteúdos lisossômico e granular para o espaço extracelular, seguido da inflamação (MAJNO and JORIS, 1995). Assim, a morfologia da célula necrótica é diferente da célula apoptótica clássica, com alterações tanto no citoplasma como no núcleo.

A apoptose pode ser reconhecida por suas características morfológicas muito marcantes e coordenadas. De modo geral, a apoptose é um fenômeno bastante rápido, onde ocorre a retração da célula, o que causa perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas. Desta forma, as organelas celulares mantêm a sua morfologia, com exceção, em alguns casos, das mitocôndrias, que podem apresentar ruptura da membrana externa. A cromatina sofre condensação e se concentra junto à membrana nuclear, que se mantém intacta (GRIVICICH *et al.*, 2007).

Na maioria dos casos, tanto a sobrevivência como a apoptose dos folículos ovarianos resulta de um balanço entre a expressão de fatores anti-apoptóticos e pró-apoptóticos. Entre estes fatores podemos citar as proteínas Bcl-2 e Bax, que são responsáveis por desenvolver um papel crítico nesse processo. Em camundongos deficientes para Bcl-2, ocorre a diminuição no número de folículos presentes após o nascimento (RATTS *et al.*, 1995), favorecendo a sobrevivência e crescimento. No entanto, a deficiência da proteína Bax leva ao

prolongamento do tempo de vida ovariano (PEREZ *et al.*, 1999). Desta forma, o aumento da expressão de Bax acelera a morte celular (OLTVAI *et al.*, 1993).

A nível molecular, a progressão de apoptose pode ser dividida em três fases: de iniciação, execução e terminação. A fase de iniciação pode ser promovida por fatores extrínsecos, tais como as citocinas (por exemplo, o Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$ , o Fas ligand), proteínas virais e ainda pela retirada dos fatores de crescimento. Por outro lado, a morte celular pode também ser induzida por fatores intrínsecos, o qual inclui o estresse oxidativo, irradiação ou a ativação de genes supressores de tumor, dentre eles a p53. Além disso, cada via pode envolver uma ou mais caspases, tais como as caspases 8 e 9 (MORITA & TILLY, 1999; JOHNSON & BRIDGHAM, 2002). Já a fase de execução, é caracterizada por mudanças na membrana celular, fragmentação nuclear, condensação da cromatina e degradação do DNA. Portanto esta fase é considerada irreversível e ocorre por meio da ativação das caspases 3, 6 e 7. Em seguida, ocorre a fase de terminação que consiste na fagocitose dos corpos apoptóticos fragmentados por um processo não inflamatório. Assim, apoptose e a necrose frequentemente ocorrem simultaneamente em grande variedade de condições patológicas, bem como em células durante o cultivo, as quais são expostas as diferentes atividades fisiológicas, traumas físicos ou até mesmo a toxinas e produtos químicos (MARTIN *et al.*, 2001).

## **2.7 Importância do FSH para a foliculogênese**

Os estágios iniciais da foliculogênese ocorrem independentemente de hormônios gonadotróficos. No entanto, os folículos se tornam responsivos a estes hormônios no início do desenvolvimento da fase antral e passam então a depender do FSH (ROCHE, 1996). A dependência de FSH é observada após a diferenciação das células da granulosa em subtipos como células do cumulus e murais, até a formação do antro (RICHARDS, 2001). O FSH é essencial para o crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais suínos (WU *et al.*, 2007), e contribui também para a manutenção da integridade morfológica de folículos caprinos cultivados *in vitro* (MATOS *et al.*, 2007a). Além disso, o FSH é capaz de estimular a ativação de folículos primordiais caprinos e o crescimento dos folículos ativados. MATOS *et al.*, 2007b; MATOS *et al.*, 2007a demonstraram que 50 ng/mL de FSH foram suficiente para promover a ativação dos folículos primordiais e auxiliar no crescimento folicular durante o cultivo do tecido cortical ovariano caprino. Além disso, o FSH pode ser identificado como regulador da apoptose nas células da granulosa (CHUN *et al.*, 1996). Desta forma, o FSH é o

principal hormônio reprodutivo em mamíferos, sendo necessário tanto para o desenvolvimento gonadal, como para a liberação de gametas durante a fase de fertilidade da fêmea (CHAPPEL and HOWLES, 1991; SIMONI and NIESCHLAG, 1995). No ovário, FSH atua se ligando a superfamília de receptores acoplados à proteína G, que estão localizados exclusivamente nas células da granulosa (GUDERMANN *et al.*, 1995), onde é iniciada a sua expressão em folículos primários (MÉDURI *et al.*, 2002).

SARAIVA *et al.*, (2010) identificaram por mudanças nos níveis de expressão de RNAm para o FSH-R em folículos caprinos, indicando que a expressão dos receptores aumenta com o desenvolvimento folicular *in vivo*. O FSH é importante para a regulação de quase todos os fatores de crescimento envolvidos com a sobrevivência folicular (MARKSTRÖM *et al.*, 2002). Portanto, as interações que ocorrem entre os diferentes tipos celulares são importantes para o controle da diferenciação e proliferação das células da granulosa e para permitir o crescimento e maturação do oócito. Nos estágios finais da foliculogênese, as comunicações intercelulares entre o oócito e células da granulosa ocorrem através da via de sinalização parácrina, ocorrendo a troca de pequenas moléculas reguladoras através das junções *gap*. O oócito secreta fatores parácrinos solúveis que atuam nas células da granulosa vizinhas, as quais por sua vez, regulam o desenvolvimento do oócito em uma comunicação bidirecional (GILCHRIST *et al.*, 2004). Sob a influência do LH e FSH, as células da teca produzem andrógenos que são utilizados pelas células da granulosa para síntese dos estrogênios, sendo um evento importante para proteger os folículos dominantes contra a atresia (GILCHRIST *et al.*, 2004). Além da importância de hormônios e fatores de crescimento, alguns trabalhos demonstraram que outras substâncias, como as lectinas, podem influenciar o crescimento e maturação oocitária (FAGBOHUN and DOWN, 1990).

## **2.8 Lectina Concanavalina A (Con A)**

As lectinas ou hemaglutininas são proteínas de origem não-imune, estruturalmente heterogêneas, capazes de se ligar de maneira reversível a carboidratos (CAVADA *et al.*, 2001). As lectinas de origem vegetal são as mais estudadas, especialmente aquelas da família *Leguminosae*, constituindo assim um grande grupo de proteínas com estruturas similares, apresentando carboidratos específicos e distintos entre si. Dentre as lectinas das leguminosas destaca-se a Concanavalina A (Con A), isolada a partir de sementes de *Canavalia ensiformis* (família *Leguminosae*, tribo *Phaseoleae*, subtribo *Diocleinae*). A Con A foi a primeira lectina isolada (WANG, 1974), sequenciada (DEREWENDA, 1989; GOMES *et al.*, 1999) e a ter sua

estrutura tridimensional determinada por cristalografia de raios-x (BARRAL-NETTO *et al.*, 1992; RODRIGUES FILHO *et al.*, 1992).

A lectina Con A apresenta especificidade para resíduos de carboidratos de D-glucose, D-manose e derivados que são encontrados na região central de todas as ligações de asparagina (N-ligação) (TEIXEIRA *et al.*, 2001). Os resíduos de aminoácidos da Con A que estão envolvidos no sítio de ligação a carboidratos são especificados como Tyr12, Asn14, Leu99, Tyr100, Asp208 e Arg228. Muitas lectinas podem ser designadas mitogênicas ou não mitogênicas com base em suas habilidades em estimular a proliferação de linfócitos (GOLDSTEIN & HAYES, 1978; LIS & SHARON, 1981; SHARON, 1983). As lectinas mitogênicas, possuem a capacidade de induzir a proliferação celular, e dentre elas inclui-se a lectina Con A.

Estudos mostraram que a Con A tem maior afinidade pela parte interna da zona pelúcida (ZP), que é uma membrana produzida pelo oócito em ovúlos de hamster, camundongos e ratos (NICHOLSON *et al.*, 1975). Além disso, a Con A já foi identificada em células da granulosa e no citoplasma do oócito em suínos (TALEVI *et al.*, 1997). O papel da Con A durante a maturação de oócitos já foi investigado e observou-se que essa lectina estimula a maturação de oócitos e a expansão do cúmulus em folículos isolados a partir de ovários de camundongas (FAGBOHUN & DOWNS, 1990).

As lectinas já foram utilizadas para a caracterização da zona pelúcida em hamsters, camundongos e suínos (NICHOLSON *et al.*, 1975). Já foi também realizada a distribuição de padrões da lectina em oócitos de mamíferos (SHALGI *et al.*, 1991) e verificou-se a distribuição e a disponibilidade de resíduos de açúcares específicos na zona pelúcida de oócitos humanos. Com base em um ensaio de competição de açúcar, MORI *et al.*, (1989) sugeriram que a presença de resíduos de D-manose sobre a zona pelúcida seria importante na fertilização humana. As lectinas de leguminosas já foram utilizadas para inibir a adesão entre espermatozóides e oócitos (OIKAWA *et al.*, 1973).

Outros estudos demonstraram que a Con A reconhece os oligossacarídeos dos receptores de insulina e do fator de crescimento epidermal (EGF). Assim, foi relatado que a ligação da Con A com estes receptores pode desencadear uma ação celular similar àquela que ocorre em resposta ao EGF e a insulina (CARPENTER and COHEN, 1977; PRIME and TOH, 1980). Desta forma, a ação de Con A e outras lectinas em células do complexo cumulus-oócito pode ocorrer a partir da ligação de receptores para fatores de crescimento.

### 3 HIPÓTESES CIENTÍFICAS

Conforme mostrado na revisão de literatura, a folículo-gênese é um processo complexo regulado por diferentes hormônios e fatores de crescimento. Diante do exposto, foram formuladas as seguintes hipóteses científicas:

- 1) O efeito da lectina Con A na ativação, desenvolvimento e crescimento de folículos inclusos no tecido ovariano caprino é dependente da concentração utilizada.
- 2) O FSH interage com a Con A e estimula a ativação, sobrevivência e crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos inclusos em fragmentos de tecido ovariano.
- 3) A Con A e o FSH influenciam a expressão de RNAm para Kit ligand, c-kit, BMP-15, GDF-9 e PCNA durante a ativação e crescimento de folículos primordiais caprinos *in vitro*.

#### 4 JUSTIFICATIVA

O estudo do efeito da lectina Con A e do FSH, associado ao cultivo *in situ* de ovários caprinos justifica-se pelo fato do baixo rendimento do ovário mamífero no que concerne à produção e liberação de oócitos viáveis para a fecundação. Apesar da enorme população oocitária presente em ovários de mamíferos, uma pequena proporção, cerca de 0,1%, será naturalmente ovulada (MARKSTRÖM *et al.*, 2002). Desta forma, é importante de se compreender os mecanismos responsáveis pelo funcionamento da fisiologia ovariana, no que concerne à prevenção da atresia folicular.

Sabendo-se da importância e do valor econômico que a espécie caprina representa em especial para o Nordeste brasileiro, é extremamente importante o desenvolvimento de um sistema de cultivo capaz de ativar esses folículos quiescentes, seguido do desenvolvimento *in vitro*. Sendo assim, para compreender o crescimento dos folículos em diferentes categorias, o desenvolvimento de um sistema de cultivo eficiente poderá contribuir para a propagação de biotécnicas reprodutivas para uma melhor compreensão sobre os fatores que regulam a foliculogênese na fase pré-antral, necessários para a sobrevivência, a ativação e o início do crescimento folicular.

Até o momento sabe-se que a ativação, o crescimento e o desenvolvimento folicular são regulados por hormônios, fatores de crescimento e outras substâncias que irão agir de forma autócrina ou parácrina, sendo que os mecanismos reguladores desses processos são pouco conhecidos, especialmente em animais de produção, como os caprinos. O Hormônio Folículo Estimulante (FSH) é capaz de influenciar todos os estágios de desenvolvimento folicular, além de regular a ação de diferentes fatores de crescimento. O estudo do efeito de outras substâncias durante a ativação folicular é de grande importância, pois já existem relatos que a Con A promove a maturação oocitária e a expansão das células do cumulus em camundongas (FAGBOHUN and DOWNS 1990). Além disso, o efeito da ação da Con A associada com o FSH durante a ativação de folículos primordiais não havia sido testados no cultivo *in situ* de fragmentos de córtex de ovários caprinos.

## **5 OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivos gerais**

- 1) Avaliar o efeito de diferentes concentrações de Con A sobre a ativação e viabilidade de folículos primordiais durante 6 dias de cultivo de tecido ovariano caprinos.
- 2) Avaliar o efeito da interação entre FSH e Con A sobre a ativação e viabilidade de folículos primordiais caprinos *in vitro*.

### **5.2 Objetivos específicos**

- 1) Analisar morfológica e ultraestruturalmente os folículos pré-antrais caprinos inclusos em tecido ovariano cultivados *in vitro* por 6 dias na presença de Con A e FSH
- 2) Verificar o efeito de Con A, na presença ou ausência de FSH, sobre a expressão dos RNAs mensageiros para o Kit Ligand (KL), c-Kit, Proteína Morfogenética Óssea-15 (BMP-15), Fator de Crescimento e Diferenciação-9 (GDF-9) e PCNA.



**6 ARTIGO**

**Efeitos de diferentes concentrações de Concanavalina A e do Hormônio Folículo Estimulante na ativação, sobrevivência e expressão gênica de folículos primordiais caprinos**

**(Effects of different concentrations of Concanavalin A and follicle stimulating hormone on goat primordial follicles activation, survival and gene expression)**

Submetido para publicação na **Revista SMALL RUMINANT RESEARCH.**

**Effects of different concentrations of Concanavalin A and follicle stimulating hormone on goat primordial follicles activation, survival and gene expression**

Portela, A.M.L.R.<sup>A</sup>; Ribeiro, R.P.<sup>A</sup>; Costa, J.J.N.<sup>A</sup>; Rossi, R.O.D.S.<sup>A</sup>; Passos, J.R.S.<sup>A</sup>;  
Vasconcelos, G. L.<sup>A</sup>, Donato, M.A.M.<sup>B</sup>; Peixoto, C.A.<sup>B</sup>; Saraiva, M.V.A.<sup>A</sup>; Van den Hurk,  
R.<sup>C</sup>; Silva, J. R. V.<sup>A</sup>

<sup>A</sup>Biotechnology Nucleus of Sobral – NUBIS, Federal University of Ceara, CEP 62.042-280, Sobral, CE, Brazil. <sup>B</sup>Laboratory of Ultrastructure, CPqAM/Fiocruz, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil <sup>C</sup>Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, PO Box 80.163, Utrecht, The Netherlands.

Corresponding address (J. R. V. Silva): Biotechnology Nucleus of Sobral – NUBIS, Federal University of Ceara, Av. Comandante Maurocelio Rocha Ponte 100, CEP 62.041-040, Sobral, CE, Brazil. Phone/Fax: +55 88 36132603 [jrvsilva@ufc.br]

**Abstract**

This study aims to investigate the effects of Concanavalin A (Con A) and Follicle Stimulating Hormone (FSH) on the survival and activation of primordial follicles, and gene expression in cultured goat ovarian tissue. Ovarian tissues were cultured for 1 or 6 days in medium supplemented with different concentration of Con A (0, 5, 10, 20 and 40 µg/mL – experiment 1). Non-cultured (control) and cultured ovarian fragments were processed for histological evaluation. After choosing the best concentration of Con A (10 µg/mL), ovarian tissues were cultured for 6 days in medium supplemented with Con A (10 µg/mL), FSH (50 ng/mL) or both. Non-cultured (control) and cultured ovarian fragments were processed for histology, or stored to evaluate the expression of the mRNA's for PCNA, c-kit, KL, GDF-9 and BMP-15 by PCR in real time. The results showed that after 6 days of culture, the presence of Con A

(10 or 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) or FSH was effective in maintaining the percentage of normal follicles and in promoting primordial follicle activation. After culture, FSH increased the expression of PCNA mRNA, but this effect was blocked by Con A. Con A increased the levels of c-KIT mRNA in relation to uncultured control, but Con-A or both Con A and FSH reduced the levels of KL mRNA. In addition, a reduction of BMP-15 mRNA expression was found in follicles cultured in control medium, but not in media containing FSH. Furthermore, follicles cultured in presence of Con A had higher levels of GDF-9 mRNA than those cultured in control medium. In conclusion, Con A and FSH regulate gene expression and are able to improve goat primordial follicles activation in ovarian cortical tissue that was cultured for 6 days.

**Keywords:** Con A, FSH, ovary, primordial follicles, goat

## 1. Introduction

Several studies have demonstrated that activation of primordial follicle and initiation of folliculogenesis is a complex process regulated by endocrine and intra-ovarian factors (for reviews, see Gougeon, 1996; Fortune, 2003; Van den Hurk and Zhao, 2005). During the onset of follicular growth, the flattened pre-granulosa cells of primordial follicles become cuboidal, start to proliferate, and the enclosed oocyte begins to grow. Granulosa cell proliferation is associated with expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), which is a valuable marker to evaluate cell proliferation because it is universally expressed throughout the G1/S-phase interface and reaches a plateau during G2 (Xiong et al., 1992). PCNA was shown to be correlated with follicular growth in different animal species (goat: Silva et al 2004 a,b; human: Oktay et al., 1998, 2000, cow: Wandji et al., 1996; Fricke et al., 1997, sheep: Lundy et al., 1999).

The involvement of gonadotrophins FSH and LH (Saraiva et al., 2008) and local growth factors, like GDF-9 (Martins et al., 2008), KL/c-Kit (Lima et al., 2011) and BMP-15 (Celestino et al., 2011) on goat primordial follicle activation *in vitro* has been extensively studied in the last decade. KL, GDF-9 and BMP-15 have an important role during the earliest stages of folliculogenesis, since knockout mice for KL or its receptor (c-Kit) do not form primordial follicles and the follicular development is interrupted at the primary follicle stage in mice knockout for GDF-9 (Dong *et al.*, 1996) or in sheep containing mutations for BMP-15 (Galloway et al., 2000).

Despite the activation of primordial follicles have been studied in the last decade, the results obtained are still limited, making it important to study the effects of new chemical substances, like the lectin concanavalin A (ConA). Con A is a lectin which is isolated from *Canavalia ensiformis* (Jack Bean) and exists as a homotetramer at physiological pH with molecular mass of 102.5 kDa (Agrawal *et al.*, 1968). Each monomer consists of  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  and carbohydrate-binding sites and has a mannose/glucose-binding specificity. The carbohydrate binding activity of Con A induces different cellular responses through the binding of glycoproteins or glycolipids on the plasma membrane of different cell types. Con A has long been known as a mitogen to stimulate the polyclonal proliferation of T-lymphocytes (Boldt et al., 1979). Fagbohun and Downs (1990) additionally. Shown that Con-A have profound effects on *in vitro* cultured mouse oocyte-cumulus cell complexes, (demonstrating that Con A modifies the maturational state of both the oocyte and cumulus cells, by its ability to induce germinal vesicle break-down in oocytes that had artificially been kept in meiotic arrest. These data suggest that lectins may stimulate a signal or metabolic pathway common for both mitogenesis and maturation of the oocyte-cumulus cell complex (Fagbohun and Downs, 1990). The action of Con A on the oocyte and granulosa cells, at least in part, may be due to its binding to receptors for growth factors and/or to other stimulatory

ligands (Channing and Ledwitz-Rigby 1975; Chang et al., 1977). Despite knowing that a variety of important physiological processes in germ cells are potentially mediated by surface glycoconjugates, the effects of Con A, either alone or associated with FSH, on goat primordial follicles activation, viability and gene expression was still not evaluated.

Thus, the aim of the present study was to evaluate the effect of different concentrations of Con A on the *in vitro* activation, survival and development of primordial follicles, and to investigate the interaction of Con A and FSH on follicular growth and expression of mRNA GDF-9, BMP-15, KL, c-kit and PCNA in cultured ovarian cortical tissue.

## **2. Materials and Methods**

The culture media, Con A and other chemicals used in the present study were purchased from Sigma (St. Louis, Mo., USA), unless mentioned otherwise.

### **2.1. Experiment 1: Effect of different concentration of Con A on activation and survival of goat primordial follicles**

Ovaries (n=12) from adult mixed-breed goats (*Capra hircus*) were collected from a local slaughterhouse. Immediately postmortem, the ovaries were washed in 70% alcohol for 10 sec following two times in 0.9% sterile saline supplemented with 100µg/mL penicillin and 100µg/mL streptomycin. The pairs of ovaries were transported within 1 h to the laboratory in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> at 4°C (Chaves *et al.*, 2008).

From the same ovarian pair, 18 slices (3mm x 3mm x 1mm) were cut using a scissor and a scalpel under sterile conditions. The tissue pieces were then either directly fixed for histology (fresh control) or placed in culture for 1 or 6 days.

Ovarian cortical tissues were transferred to 24-well culture dishes containing 700  $\mu\text{L}$  of culture media. The basic culture medium consisted of  $\alpha\text{-MEM}^+$  (pH 7.2-7.4) supplemented with ITS (10  $\mu\text{g/ml}$  insulin, 5.5  $\mu\text{g/ml}$  transferrin, and 5ng/ml selenium), 0.23 mM pyruvate, 2 mM glutamine, 2 mM hypoxanthine, 1.25mg/ml of bovine serum albumin (BSA), calcium chloride and manganese chloride. To test the optimal concentration of con A, different concentrations (0, 5, 10, 20 or 40  $\mu\text{g/mL}$ ) of this lectin were added to the culture medium. Culture was performed at 39°C in 5%  $\text{CO}_2$  in a humidified incubator for 1 or 6 days. On days 2 and 4, the medium was replaced with fresh medium.

After one or six days of culture, the pieces of ovarian tissue were fixed in 4% paraformaldehyde for 12 h and then dehydrated with increasing concentrations of ethanol. After paraffin embedding (Synth, São Paulo, Brazil), the caprine tissues pieces were cut into 7  $\mu\text{m}$  sections, and every section was mounted on glass slides and stained by periodic acid Schiff–hematoxylin. Follicle stage and survival were assessed microscopically on serial sections. Coded, anonymized slides were examined on a microscope (Nikon, Tokyo, Japan) under 400x magnification.

The developmental stages of follicles have been previously defined (Hulshof et al., 1994). Primordial follicles consist of an oocyte surrounded by one layer of flattened or a mixture of flattened and cuboidal granulosa cells, while developing follicles consisted of primary (one layer of cuboidal granulosa cells) and secondary follicles (two or more layers of cuboidal granulosa cells around the oocyte). These follicles were still individually classified as histologically normal when an intact oocyte was present and surrounded by granulosa cells, which were well organized into one or more layers and no pyknotic nucleus was present. Atretic follicles were defined as follicles with a retracted oocyte, pyknotic nucleus, and/or disorganized granulosa cells detached from the basement membrane. To evaluate follicular

activation, the percentage of healthy primordial and developing follicles were calculated before (fresh control) and after culture in each medium.

The percentages of primordial and developing follicles, and morphologically normal follicles after 1 or 6 days of culture in medium supplemented with different concentration of Con-A were compared by chi-square test (Graphpad Instat). The differences were considered significant when  $P < 0.05$ .

## **2.2. Experiment 2: Influence of Con A and FSH on follicular growth and ultrastructural integrity, and gene expression in cultured cortical tissue**

Ovaries (N=16) from adult mixed-breed goats were collected as described in experiment 1. *In vitro* culture was performed in 24-well culture dishes containing 700  $\mu$ L of culture media. Culture was performed for 6 days, at 39°C in 5% CO<sub>2</sub> in a humidified incubator. The basic culture medium consisted of MEM (pH 7.2-7.4) supplemented with ITS (10  $\mu$ g/ml insulin, 5.5  $\mu$ g/ml transferrin, and 5 ng/ml selenium), 0.23 mM pyruvate, 2 mM glutamine, 2 mM hypoxanthine, 1.25 mg/ml of bovine serum albumin (MEM+), in presence of Concanavalin A lectin at 10  $\mu$ g/mL and/or 50 ng/mL FSH. On days 2 and 4, the medium was replaced with fresh medium. At the end of the culture, fragments from each treatment were fixed for routine histological studies. In addition, fragments were stored at -70°C for extraction of total RNA and quantification of mRNA by PCR in real time.

After six days of culture, the pieces of ovarian tissue were fixed in 4% paraformaldehyde and processed for routine histological examination as described in experiment 1. The percentages of primordial and developing follicles were determined as described previously.

To evaluate the effects of Con A, FSH and their combination on expression of mRNA for BMP-15, GDF-9, Kit Ligand, c-KIT and PCNA in 6-days cultured ovarian tissue,

per test medium, three fragments of this tissues were collected and then stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until extraction of total RNA.

Total RNA extraction was performed using Trizol purification kit (Invitrogen, São Paulo, Brazil). According to the manufacturer's instructions, 800  $\mu\text{L}$  of Trizol solution was added to each frozen samples and the lysate was aspirated through a 20-gauge needle before centrifugation at  $10,000 \times g$  for 3 min at room temperature. Thereafter, all lysates were diluted 1:1 with 70% ethanol and subjected to a mini-column. After binding of the RNA to the column, DNA digestion was performed using RNase-free DNase (340 Kunitz units/mL) for 15 min at room temperature. After washing the column three times, the RNA was eluted with 30  $\mu\text{L}$  RNase-free water.

Prior to reverse transcription, the eluted RNA samples were incubated for 5 min at  $70^{\circ}\text{C}$ , and chilled on ice. Reverse transcription was then performed in a total volume of 20  $\mu\text{L}$ , which was comprised of 10  $\mu\text{L}$  of sample RNA, 4  $\mu\text{L}$  5X reverse transcriptase buffer (Invitrogen, São Paulo, Brazil), 8 units RNaseout, 150 units Superscript III reverse transcriptase, 0.036 U random *primers* (Invitrogen, São Paulo, Brazil), 10 mM DTT, and 0.5 mM of each dNTP. The mixture was incubated for 1 h at  $42^{\circ}\text{C}$ , for 5 min at  $80^{\circ}\text{C}$ , and then stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . Negative controls were prepared under the same conditions, but without the inclusion of the reverse transcriptase.

Quantification of mRNA was performed using SYBR Green. PCR reactions were composed of 1  $\mu\text{L}$  cDNA as a template in 7.5  $\mu\text{L}$  of SYBR Green Master Mix (PE Applied Biosystems, Foster City, CA), 5.5  $\mu\text{L}$  of ultra-pure water, and 0.5  $\mu\text{M}$  of each primer. The primers were designed to perform amplification of mRNA for BMP-15, GDF-9, Kit Ligand, c-kit, PCNA and housekeeping gene ubiquitin (UBQ) and  $\beta$ -Actin (Table 1). The efficiency amplification for all genes was verified according to Pfaffl (2001). The thermal cycling profile for the first round of PCR was: initial denaturation and activation of the polymerase



for 10 min at 95°C, followed by 50 cycles of 15 sec at 95°C, 30 sec at 58°C, and 30 sec at 60°C. The final extension was for 10 min at 72°C. All reactions were performed in a real time PCR Mastercycler (Eppendorf, Germany). The delta-delta-CT method was used to normalise the data of mRNA expression (Livak and Schmittgen 2001).

The percentages of primordial and developing follicles as well as those of morphologically normal, after 6 days of culture were compared by chi-square test. Levels of mRNA for PCNA, BMP-15, GDF-9, KL and c-Kit in *in situ* culture were analysed by using the non-parametric Kruskal–Wallis test ( $P < 0.05$ ). Data were expressed as mean  $\pm$  sem. The differences were considered significant when  $P < 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. Experiment 1: Effect of different concentrations of Con A on activation and survival of goat primordial follicles

Histological analysis showed that normal (Figure 1A ) and degenerated (Figure 1B) follicles were found in non-cultured and cultured ovarian cortical tissue. Degenerated follicles had a shrunken oocyte, with pyknotic nucleus or disorganised granulosa cells. A total of 2.129 follicles was counted to evaluate follicular morphology and activation. Figure 2 shows the percentage of morphologically normal preantral follicles after 1 or 6 days of culture in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> alone or in this medium supplemented with Con A (5, 10, 20 e 40  $\mu$ g/mL). After 1 and 6 days of ovarian cortical tissue culture, all treatments reduced the percentage of normal follicles present in these tissues, when compared to those in uncultured control tissues ( $P < 0.05$ ), but no significant differences were observed among treatments. However, a significant decrease in the percentage of normal follicles was observed with the increase of culture period from 1 to 6 days.

When compared to fresh non-cultured control tissues, additional significant ( $P < 0.05$ ) reductions in the percentage of primordial follicles (Figure 3) and increases of developing follicles (Figure 4) were observed in tissues that were 1 or 6 days cultured in medium supplemented with different concentrations of Con A (5, 10, 20 and 40  $\mu\text{g/mL}$ ). Moreover, when compared to other treatments, including the control medium (MEM+), after six days of culture, significant reductions in the percentage of primordial follicles (Figure 3) and increases of developing follicles (Figure 4) were observed in ovarian tissues that were cultured in presence of 10 or 40  $\mu\text{g/mL}$  of Con A,. With progress of the culture period from day 1 to day 6, all treatments also decreased the percentage of primordial follicles (Figure 3) and increased those of developing follicles (Figure 4,  $P < 0.05$ ) in ovarian tissues.

### **3.2. Experiment 2: Influence of Con A and FSH on follicular growth, ultrastructure and gene expression in cultured cortical tissue**

In total, 1.456 follicles were counted to evaluate follicular morphology and activation in this experiment. Compared to uncultured control ( $P < 0.05$ ), a significant reduction in the percentage of morphological normal follicles was observed in 6-days cultured ovarian tissue, while the presence of FSH, Con A or both in the culture medium did not increase the percentage of normal follicles (Figure 5).

Compared to non-cultured control ovarian tissues, all 6-days cultured tissues significantly ( $P < 0.05$ ) reduced the percentage of primordial follicles (Figure 6) and increased that of developing follicles (Figure 7) . Furthermore, compared with ovarian tissue cultured in control medium ( $\alpha$ -MEM) the presence of FSH, Con A or both promoted a decrease in the percentage of primordial follicles (Figure 5) and an increase in developing follicles (Figure 7). No synergistic interaction between FSH and Con A was observed ( $P < 0.05$ ).

Efficiency values obtained for qRT-PCR amplification of five genes in ovarian cortical tissue fragments are shown in Table 2. The data indicate that amplification efficiency was near the theoretical optimum level. After 6 days of culture, an increase of PCNA mRNA expression was demonstrated in tissues cultured in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> supplemented with FSH compared to those cultured in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> supplemented with both Con A and FSH (Figure 8A) ( $P < 0.05$ ). Furthermore, addition of both FSH and Con A to the culture medium resulted in an increase of mRNA c-KIT expression in cultured ovarian fragments compared to tissues cultured in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> supplemented with Con A only (Figure 8B). Compared to uncultured control fresh ovarian tissue, a reduction in the mRNA levels of KL was observed in tissues that were cultured in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> supplemented with Con-A or both Con A and FSH (Figure 8C). BMP-15 mRNA expression in ovarian tissue fragments cultured in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> was reduced compared to that in uncultured control fresh tissue ( $P < 0.05$ ), but not to that in fragments that were cultured in presence of FSH, Con-A or both (Figure 8D). Moreover, the levels of GDF-9 mRNA in ovarian fragments that were cultured in Con A containing medium were significantly ( $P < 0.05$ ) higher than those in tissues cultured in medium with FSH (Figure 8E).

#### 4. Discussion

The present study demonstrated that culture media containing 10 or 40  $\mu\text{g/mL}$  of Con A, or FSH with or without Con A stimulate the activation of primordial follicles and contribute in the maintenance of follicular morphological integrity in *in vitro* cultured goat ovarian tissue. The positive effect of Con A may be due to its protective effect on granulosa cell apoptosis and its induction of granulosa cell proliferation. For, previous studies demonstrated the presence of Con A binding sites in porcine granulosa cells (Lee and Ryan, 1979) and lectins have the ability to bind carbohydrates and improve cell to cell adhesion

(Sharma, et al, 1996; Yagi, et al., 1995). Thereby, Con A may have recognized and mediated adhesion between carbohydrates present in the granulosa cells and in the oocyte they enclosed. Communication between the oocyte and their compassing granulosa cells during preantral and early antral follicle stages is necessary to ensure the survival of the oocyte and its subsequent developmental competence (Albertini et al., 2001; Fatehi et al., 2002). The interaction between the granulosa cells and the oocyte during follicular development not only benefits the oocyte, but also the granulosa cells, since the oocytes regulate granulosa cell functions and inhibiting apoptosis in the layers of cells immediately around the oocyte (Hussein et al., 2005). Apart from their effect on oocyte survival and developmental competence, mitogenic lectins, like Con A, have found to stimulate both oocyte maturation and cumulus expansion in isolated mouse oocyte-cumulus cell complexes (Fagbohun and Downs, 1990).

Addition of Con A and/or FSH to the culture medium reduced the percentage of primordial follicles and concomitantly increased the percentage of developing follicles within cultured ovarian cortical tissue. As far as we know there are no data published about the effects of Con A on *in vitro* ovarian follicle development. Studies, demonstrated that FSH is essential for the *in vitro* growth of pig preantral follicles (Wu et al., 2007). In goats, FSH appeared important for the maintenance of the morphological integrity of follicles, the activation of primordial follicles and the growth of activated follicles in *in situ* cultured ovarian tissue (Matos et al., 2007a; 2007b). In the current studies, no synergistic effects of FSH and Con A on follicles were observed. Binding of Con A to receptors of growth factors and hormones, like FSH, may explain the absence of such a positive interaction between the lectin and FSH.

The presence of Con A in culture medium stimulated the expression of GDF-9 mRNA in *in vitro* cultured ovarian cortical tissue. Maybe Con A acts indirectly on goat primordial

follicles present in this tissue, because Martins et al. (2008) previously demonstrated a positive effect of GDF-9 on the survival and development of goat primordial follicles. In cultured ovarian tissue, the medium components Con A and FSH reduced the levels of KL mRNA, but increased those of c-kit. *In vivo* and *in vitro* studies have shown that the functions of the KL/c-kit system in the ovary include the establishment of primordial germ cells (PGC), primordial follicle activation, oocyte survival and growth, granulosa cell proliferation, theca cell recruitment, maintenance of meiotic competence and ovarian steroidogenesis regulation (Otsuka and Shimasaki, 2002; Jin et al., 2005; Hutt *et al.*, 2006a; Thomas *et al.*, 2008; Celestino et al., 2010). The currently observed disturbed balance between c-kit and KL in Con A and FSH treated ovarian tissue fragments may dramatically influence normal follicular development, but it is unclear whether the disbalance between KL and its receptor has favourable or unfavourable consequences for this process.

In cultured ovarian tissues, the expression of PCNA was stimulated by addition of FSH to culture medium, while presence of Con A in this medium blocked the stimulatory effects of FSH. Various studies have shown that FSH regulates the expression of growth factors, that are essential for the activation of follicle development and subsequent follicle growth (Joyce *et al.* 1999; Thomas *et al.* 2005). FSH also directly acts on the regulation of follicular development, its actions being mediated by specific receptors on the surface of granulosa cells (Minj *et al.* 2008). It is furthermore known that lectins, like Con A, exhibit binding affinity for glycoproteins (Pandian *et al.*, 1975). Because FSH is a glycoprotein, formed from two subunits (alpha and beta), and its receptor is a glycoprotein transmembrane receptor (Kumar and Matzuk, 2000), they can have been blocked by their binding to Con A. This blockage may explain the presently observed absence of FSH-stimulated PCNA expression in ovarian tissue in presence of Con A.

In cultured ovarian tissues, BMP-15 mRNA levels were kept at control levels, when FSH, Con A or both compounds were added to culture medium. Previously, we detected mRNAs for BMP-15 and their associated receptors in primordial, primary and secondary follicles and in the oocytes and granulosa cells of antral follicles (Silva et al., 2005). Furthermore, it was found that FSH regulates the expression of BMP-15 in murine follicles (Joyce *et al.*, 1999, Thomas *et al.*, 2005). Both these compounds are involved in the activation of primordial follicles (Silva et al., 2006). FSH can also modulate the levels of BMP-15 and GDF-9 in growing follicles (Thomas et al., 2005), and the latter two growth factors appeared essential for primordial and primary follicle development in mice (Dong et al., 1996) and sheep (Galloway et al., 2000).

In conclusion, 10 or 40 µg/mL Con A and FSH are effective in primordial follicle activation and in promoting primordial follicle activation in 6-days cultured goat ovarian cortical slices. Moreover, culture with Con A and/or FSH alters the levels of mRNA for genes that are important for activation of primordial follicles. This suggests that Con A has an important role in the development of goat preantral follicles.

## 5. Acknowledgement

This study was supported by CNPq (grant no. 477025/2009-9).

## 6. References

- Agrawal, B.B.; Goldstein, I.J., 1968. Protein-carbohydrate interaction. XV. The role of bivalent cations in concanavalin A-polysaccharide interaction. **Can J Biochem.** 46, 1147–1150.
- Albertini, D., Combelles, C., Benecchi, E., Carabatsos, M., 2001. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reprod** 121, 647-653.

Boldt, D.H.; Macdermott, R.P.; Jorolan, E.P., 1979. Interaction of plant lectins with purified human lymphocyte populations: Binding characteristics and kinetics of proliferation. **J Immunol**; 114, 1532–1536.

Celestino, J.J.H., Bruno, J.B., Lima-Verde, I.B., Matos, M.H.T., Saraiva, M.V.A., Chaves, R.N., Martins, F.S., Almeida, A.P., Cunha, R.M.S., Lima, L.F., Name, K.O., Campello, C.C., Silva, J.R.V., B ao, S.N., Figueiredo, J.R., 2010. Steady state level of kit ligand mRNA in goat ovaries and the role of kit ligand in preantral follicle survival and growth in vitro. **Mol Reprod Dev**, 77, 231–240.

Celestino, J.J.H., Lima-Verde, I.B., Bruno, J. B., Matos, M.H.T., Chaves, R.N., Saraiva, M.V.A., Silva, C.M.G., Faustino, L.R., Rossetto, R., Lopes, C.A.P., Donato, M.A.M., Peixoto, C.A., Campello, C.C., Silva, J.R.V., Figueiredo, J.R., 2011 Steady-state level of bone morphogenetic protein-15 in goat ovaries and its influence on in vitro development and survival of preantral follicles. *Mol. and Cell. Endocrinol.* 338, 1-9.

Chang, C.H., Beer, M., MarzilliL.,G., 1977. Osmium labeled polynucleotides. Their action of osmium tetroxide with deoxyribonucleic acid and synthetic polynucleotides in the presence of tertiary nitrogen donor ligands. **Biochemistry** 16, 33—38.

Channing, C.P., Ledwitz-Rigby, F., 1975. Methods for assessing hormone-mediated differentiation of ovarian cells in culture and in short term incubations. **Methods Enzymol.** 39, 183-230.

Chaves, R. N.; Martins, F. S.; Saraiva, M. V.; Celestino, J. J.; LOPES, C. A.; Correia, J. C.; Verde, I. B.; Matos, M. H.; Ba' o, S. N.; Name, K. P.; Campello, C. C.; Silva, J. R.; AND Figueiredo, J. R., 2008. Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured *in vitro*. **Reprod. Fertil. Dev**, 20,640–647.

Dong, J., Albertini, D.F., Nishimori, K., Kumar, T. R., Lu, N., Andmatzuk, M. M., 1996. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. **Nature**, 383, 531–535.

Fagbohun, C.F., Downs, Stephen M., 1990. Maturation of the Mouse Oocyte-Cumulus Cell Complex: Stimulation by Lectins. *Biol. Reprod.* 42, 413-423.

Fatehi, A.N., Zeinstra, E.C., Kooij, R.V., Colenbrander, B. and Bevers, M.M., 2002. Effect of cumulus cell removal of in vitro matured bovine oocytes prior to in vitro fertilization on subsequent cleavage rate. *Theriogenology* 57, 1347-1355.

Fortune, J.E., 2003. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Animal Reprod. Science*, 78, 135–163.

Fricke, P.M.; Al-Hassan, M.J., Roberts, A.J., 1997. Effects of gonadotropin treatment on size, number and cell proliferation of antral follicles in cows. *Dom. Anim. Endocrinol.*, 14, 171-180.

Galloway, S.M., McNatty, K.P., Cambridge, L.M., Laitinen, M.P., Juengel, J.L., Jokiranta, T.S., McLaren, R.J., Luro, K., Dodds, K.G., Montgomery, G.W., Beattie, A.E., Davis, G.H., Ritvos, O., 2000 Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet.* 25, 279–283.

Gougeon, A. , 1996. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocr Rev.* 17, 2, 121–155.

Hulshof C.J., Figueiredo J.R., Beckers J.F., Bevers M.M. & Van Den Hurk R. 1994. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. *Vet. Quart.* 16:78-80.

Hussein, M.R., 2005. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Human Reproduction Update*, 11, 162–178.

Hutt, K.J., McLaughlin, E.A., Holland, M.K. 2006a., KL and KIT have diverse roles during mammalian oogenesis. *Mol Hum Reprod*, 12, 61–69.

Jin, X.C.S., Han, F.Q., Yu, P., Wei, Z.Y., Hu, Y.X., Liu., 2005. Anti-apoptotic action of stem cell factor on oocytes in primordial follicles and its signal transduction. *Mol. Reprod.* 70, 82–90.



Kumar, T.R., Matzuk, M.M., Totowa, N.J., 2000. Gene knockout models to study the hypothalamus-pituitary-gonadal axis. Gene engineering and molecular models in Endocrinology. **The Human Press**.

Lee, C.Y., Ryan, R.J., 1979. The Porcine Ovarian Follicle. V. Binding of Concanavalin A to Granulosa Cells during Follicle Maturation. **Biol of Reprod**, 21, 973-977.

Lima, I.M.T, Brito, I.R., Rodrigues, G.Q., Silva, C.M.G., Magalhães-Padilha, D.M., Lima, L.F., Celestino, J.J.H., Campello, C.C., Silva, J.R.V., Figueiredo, J.R., Rodrigues, A.P.R., 2011. Presence of c-kit mRNA in goat ovaries and improvement of in vitro preantral follicle survival and development with kit ligand. **Mol Cell Endocrinol**, 345, 38–47.

Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* **25**, 402–408.

Martins, F. S.; Celestino, J. J.; Saraiva, M. V. A.; Matos, M. H. T.; Bruno, J. B. B.; Rocha-Junior, C. M.; Lima-Verde, I. B.; Lucci, C. M.; Bão, S. N.; Figueiredo, J. R. , 2008. Growth and differentiation factor-9 stimulates activation of goat primordial follicles *in vitro* and their progression to secondary follicles. **Reprod, Fertil Dev**. 20, 8, 916–924.

Matos, M.H.T., Lima-Verde, I. B. Luque, M.C.A., Maia JR.J.E., Silva, J.R.V., Celestino, J.J.H., Martins, F.S., Bão, S.N., Lucci, C.M., Figueiredo, J.R., 2007b. Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability in vitro. *Zygote*. 15, 173–182.

Matos, M.H.T., Lima-Verde, I. B.; Luque, M.C.A., Maia, JR.J.E., Silva, J.R.V., Celestino, J.J.H., Martins, F.S., Bão, S.N., Lucci, C.M., Figueiredo, J.R. 2007a. Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability in vitro. *Zygote*. 15, 173–182.

Minj, A., Mondal, S., Tiwari, A.K., Sharma, B., Varshney, V.P., 2008. Molecular characterization of follicle stimulating hormone receptor (FSHR) gene in the Indian river buffalo (*Bubalus bubalis*). . **General and Comparative Endocrinology**. 158, 147–153.

- Oktay, K.; Karlikaya, G.; Akman, O.; Ojakian, G. K.; Oktay, M. , 2000. Interaction of extracellular matrix and activin-A in the initiation of follicle growth in the mouse ovary. **Biol Reprod.** 63, 2,457–461.
- Oktay, K.; Newton, H.; Mullan, J.; Gosdem, R. G., 1998. Development of human primordial follicles to antral stages in SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone. **Hum Reprod.** 13,15, 1133–1138.
- Otsuka, F.; Shimasaki, S. , 2002. A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: its role in regulating granulosa cell mitosis. **Proc Natl Acad Sci USA.** 99, 8060- 8065.
- Pandian, M.R., Bahi, O.M.P., Segal, S.J., 1975. Labeling of LH/hCG receptors in rat ovaries. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** 64, 1199-1205.
- Saraiva, M.V.A., Celestino, J.J.H., Chaves, R.N., Martins, F.S., Bruno, J.B., Lima-Verde, I. B., Matos, M.H.T., Silva, A.G.M., Porfirio, E.P., Bao, S.N., Campello, C.C., Silva, J.R.V., Figueiredo, J.R., 2008. Influence of different concentrations of LH and FSH on in vitro caprine primordial ovarian follicle development. **Small. Rum. Res.** 87–95.
- Sharma, V., Vijayan, M., Surolia, A., 1996. Imparting exquisite specificity to peanut agglutinin for the tumor-associated Thomsen-Friedenreich antigen by redesign of its combining site. **J. Biol. Chem.** 271, 21209-21213.
- Thomas, F. H.; Ismail, R. S.; Jiang, J-Y.; Vanderhyden, B. C., 2008. Kit Ligand 2 promotes murine oocyte growth in vitro. **Biol Reprod.** 78, 167–175.
- Thomas, F.H.; Ethier, J. F.; Shimasaki, S.; Vanderhyden, B. C. , 2005. Follicle-stimulating hormone regulates oocyte growth by modulation of expression of oocyte and granulosa cell factors. **Endocrinol.** 146, 941–949.
- Van den Hurk, R., Zhao, J., 2005. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, 63, 1717-1751.

Wandji, S.A., Srsen, V., Voss, A.K.; Eppig, J.J., Fortune J.E., 1996. Initiation in vitro of growth of bovine primordial follicles. *Biol. of Reprod.*, 55, 942–948.

Wu, J., Xu, B., Wang, W., 2007. Effects of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone on the developmental competence of porcine preantral follicle oocytes grown in vitro. *J. Assist. Reprod. Genet.*, 24, 419–424.

Xiong, Y., Zhang, H., Beach, D., 1992. D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell*, 71, 505–514.

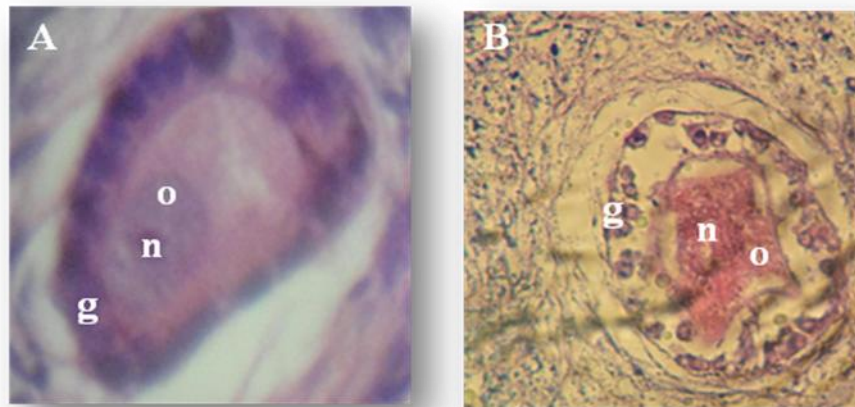
Yagi, M., Campos-Neto, A., Gollahon, K., 1995. Morphological and Biochemical changes in a hematopoietic cell line induced by jacalin, a lectin derived from *Artocarpus Integrifolia*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 209, 263-270.

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

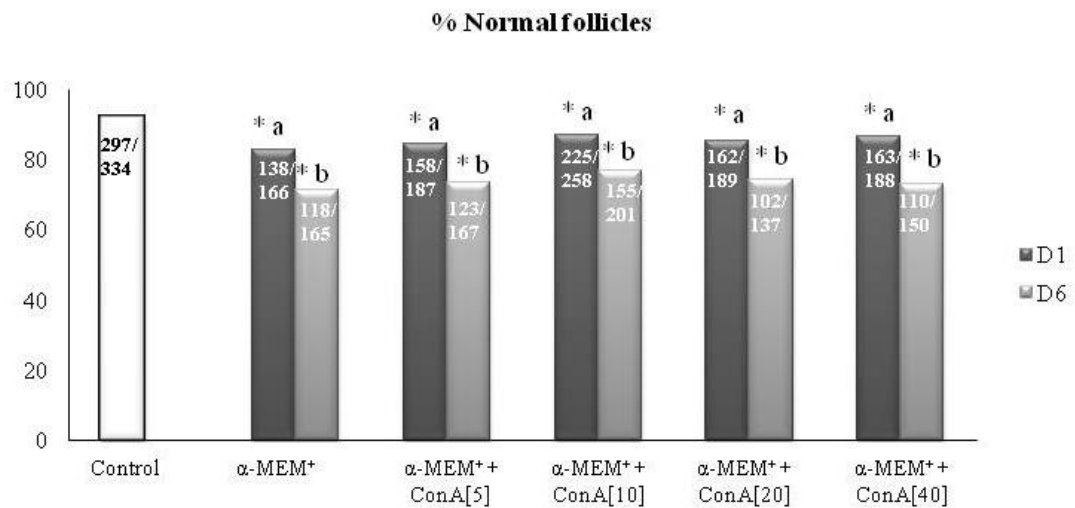
Target gene	Primer sequence (5'→3')	Sense (s), anti-sense (As)	Position	GenBank accession no.
UBQ	GAAGATGGCCGCACTCTTCTGAT	S	607-631	GI: 57163956
	ATCCTGGATCTTGGCCTTCACGTT	As	756-780	
β-Actin	ACCACTGGCATTGTCATGGACTCT	S	187-211	GI:28628620
	TCCTTGATGTCACGGACGATTTCC	As	386-410	
PCNA	TGCCGAGATCTCAGTCACAT	S	566-586	GI:77735938
	TATGGCAACAGCTTCCTCCT	As	695-715	
GDF-9	ACAACACTGTTTCGGCTCTTCACCC	S	332 – 356	GI:51702523
	CCACAACAGTAACACGATCCAGGTT	As	426-451	
BMP-15	AAGTGGACACCCTAGGGAAA	S	237-257	GI: 8925958
	TTGGTATGCTACCCGGTTTGGT	AS	362-384	
KL	AGCGAGATGGTGGAACAACACTGTCA	S	211-235	GI: 16580734
	GTTCTTCCATGCACTCCACAAGGT	AS		
c-KIT	AGTTTCCCAGGAACAGGCTGAGTT	S	1751–1775	GI:633053
	CGTTCTGTAAATGGGCGCTTGGT	AS	1904–1928	

**Table 2.** Efficiency of the primers used in real time PCR.

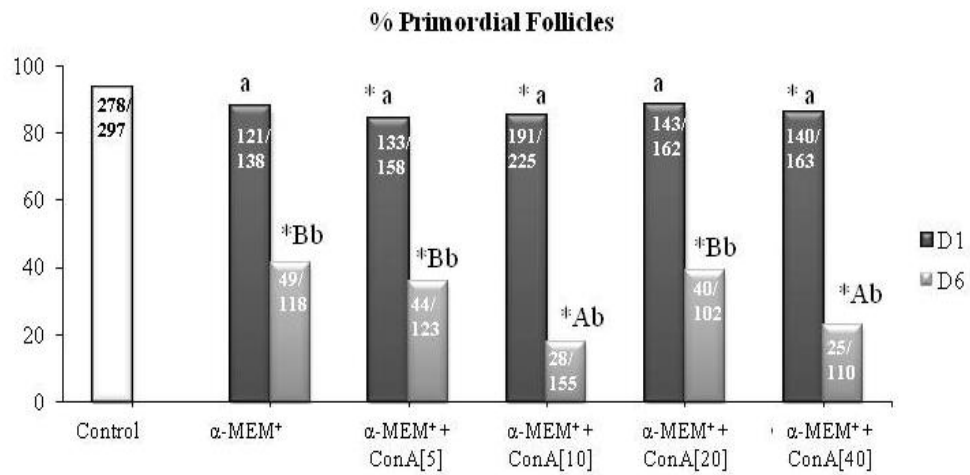
Target gene	Efficiency
UBQ	1,02
$\beta$ -Actin	1,08
PCNA	1,02
GDF-9	1,02
BMP-15	1,00
KL	1,04
c-KIT	1,01



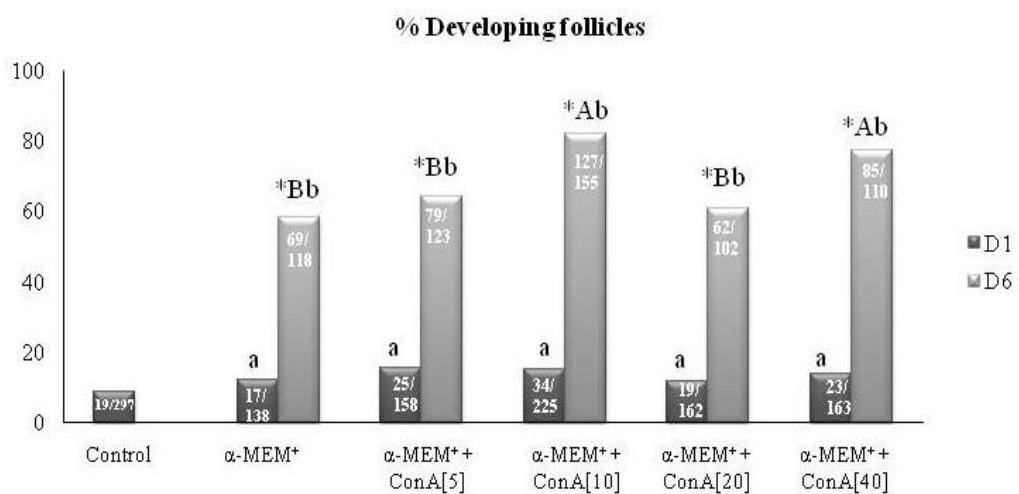
**Figure 1.** Histological section of non-cultured ovarian tissue after staining with periodic acid-Schiff–haematoxylin, showing a normal primordial follicle (A) and a degenerated primordial follicle (B). o: oocyte; n: nucleus; g, granulosa cells. (Original magnification  $\times 400$ ).



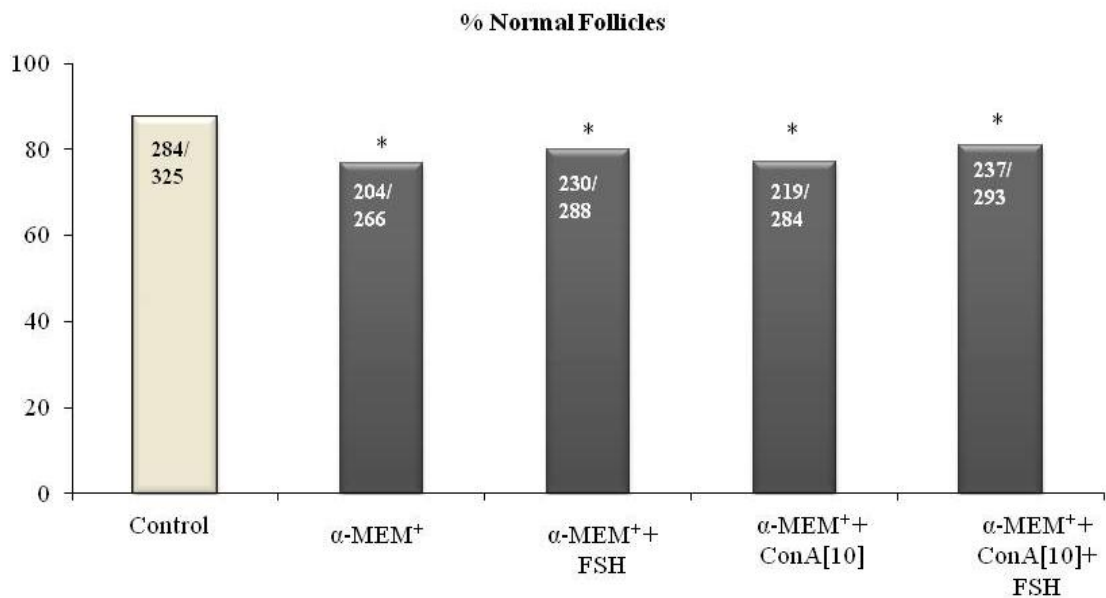
**Figure 2.** Percentage (mean  $\pm$  SEM) of viability follicular in fresh control (non-cultured), culture control and after culture for days 1 or 6 in the absence or presence of different concentrations of lectin Con A [5, 10, 20 and 40]. \* differs significantly from control fresh follicles ( $P < 0.05$ ); a, b differs significantly between 1 and 6 days of culture ( $P < 0.05$ ).



**Figure 3.** Percentage (mean  $\pm$  SEM) of primordial follicles in fresh control (non-cultured), culture control and after culture for days 1 or 6 in the absence or presence of different concentrations of lectin Con A [5, 10, 20 and 40]. \*Differs significantly from control non-cultured follicles ( $P < 0.05$ ); a, b differs significantly between 1 and 6 days of culture ( $P < 0.05$ ); A, B differs significantly among treatment with MEM, 10 and 20  $\mu\text{g/mL}$  in 6 day of culture ( $P < 0.05$ ).

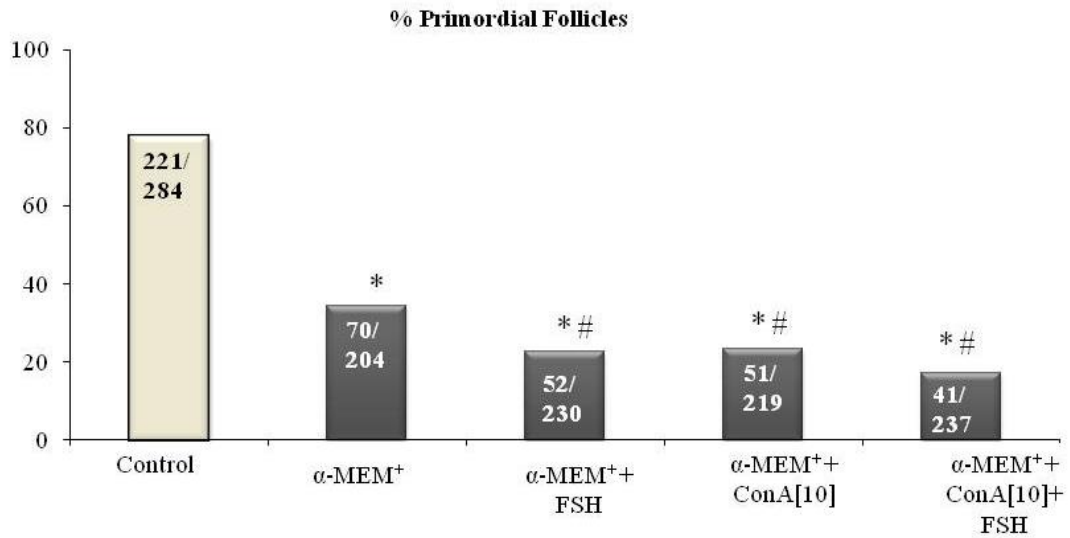


**Figure 4.** Percentage (mean  $\pm$  SEM) in development follicles in fresh control (non-cultured), culture control (MEM<sup>+</sup>) and after culture for days 1 or 6 in the absence or presence of different concentrations of lectin Con A [5, 10, 20 and 40  $\mu$ g/mL].\* Differs significantly from control non-cultured follicles ( $P < 0.05$ ); a, b differs significantly between 1 and 6 days of culture ( $P < 0.05$ ); A, B differs significantly among treatment with MEM, 10 and 20 $\mu$ g/mL in 6 day of culture ( $P < 0.05$ ).

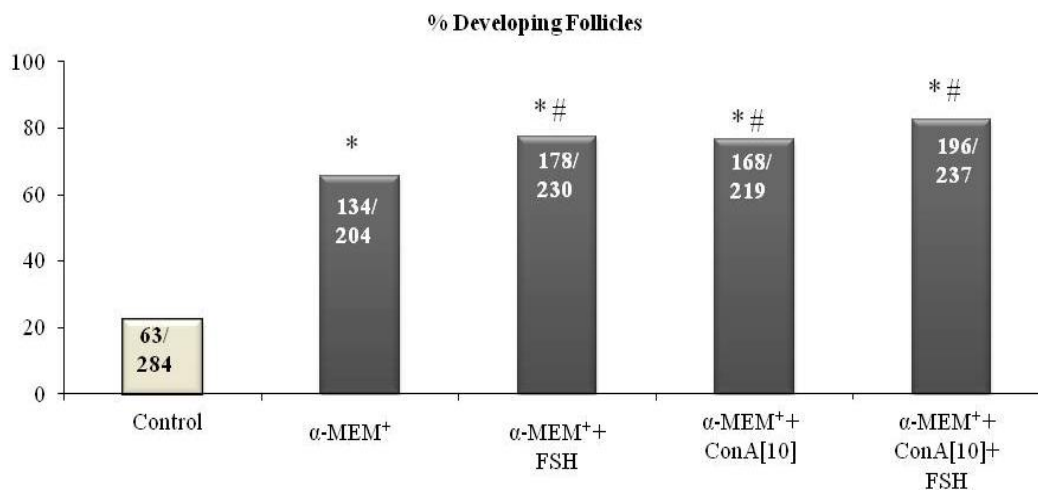


**Figure 5.** Percentage (mean  $\pm$  SEM) of viability follicular in fresh control (non-cultured), culture control and after culture for days 6 in 10 $\mu$ g/mL in a medium containing Concanavalin A lectin alone and / or with FSH. \*Differs significantly from control non-cultured follicles ( $P < 0.05$ ).



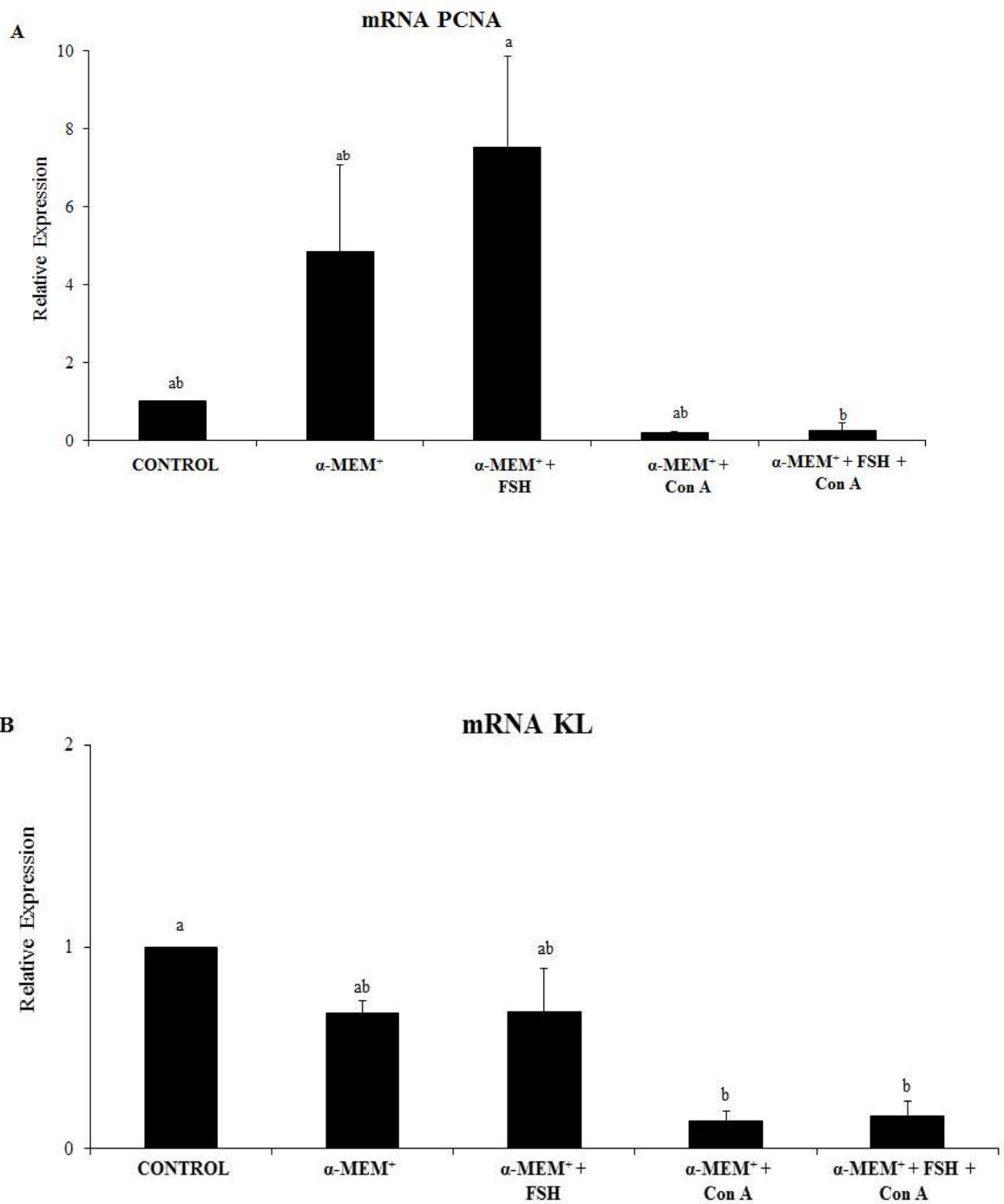


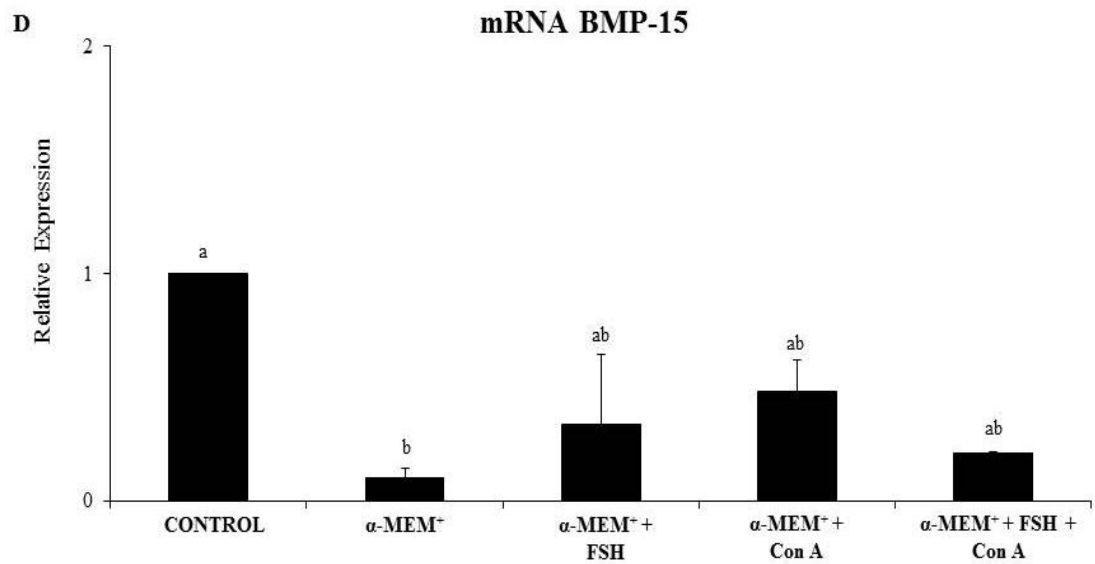
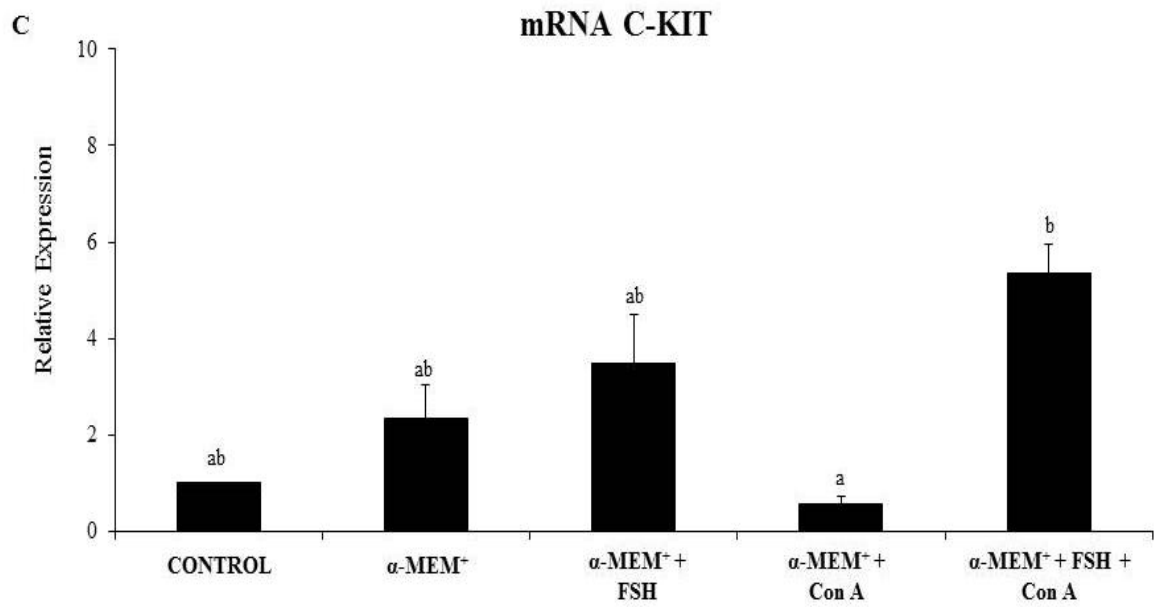
**Figure 6.** Percentage (mean  $\pm$  SEM) of primordial follicles in fresh control (non-cultured), culture control and after culture for days 6 in the 10 $\mu$ g/mL in a medium containing Concanavalin A lectin alone and / or with 50ng/mL of FSH. \*Differs significantly from control non-cultured follicles ( $P < 0.05$ ); # Differs significantly from MEM<sup>+</sup> in each culture treatment with different concentrations of CON A ( $P < 0.05$ ).

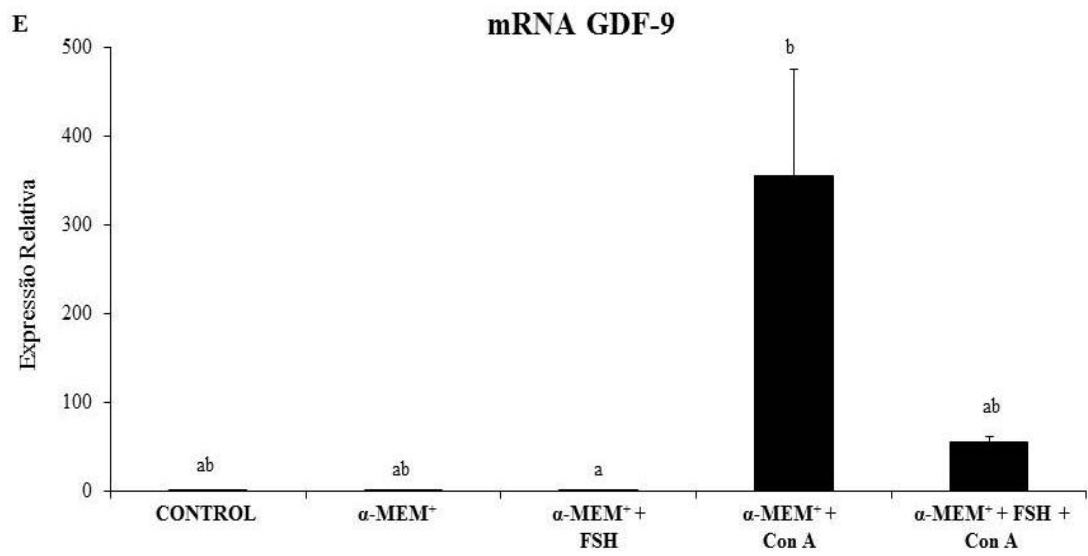


**Figure 7.** Percentage (mean  $\pm$  SEM) in development follicles in fresh control (non-cultured), culture control (MEM<sup>+</sup>) and after culture for days 6 in the 10 $\mu$ g/mL in a medium containing

Concanavalin A lectin alone and / or with 50ng/mL of FSH.\* Differs significantly from control non-cultured follicles ( $P < 0.05$ ); # Differs significantly from MEM<sup>+</sup> in each 6 day of culture ( $P < 0.05$ ).







**Figure 8.** Levels of mRNA expression for in PCNA (A), c-KIT (B), KL (C), BMP-15 (D) and GDF-9 (E) in uncultured control tissue (day 0) and in tissue cultured for 6 days in MEM<sup>+</sup> or medium containing FSH, Concanavalin A (Con A) or both.

## 7 CONCLUSÕES GERAIS

A lectina Con A, nas concentrações de 10 ou 40 µg/mL promove a ativação e o desenvolvimento de folículos primordiais e auxilia na manutenção da viabilidade folicular durante o cultivo *in situ* por 6 dias. A associação de Con A (10 µg/mL) e FSH (50 ng/mL) é capaz de promover a ativação e o desenvolvimento de folículos primordiais para os estágios de folículos primários e secundários. Além disso, A lectina Con A (10 µg/mL), sozinha ou associada ao FSH (50 ng/mL), durante o cultivo *in situ* altera a expressão de genes associados à formação e ativação folicular e proliferação celular, tais como, o GDF-9, c-KIT, KL e BMP-15. Portanto, foi observado que a suplementação com FSH ao meio de cultivo promoveu um aumento significativo da expressão do PCNA, e que a adição da Con A promoveu um bloqueio do efeito estimulatório do FSH reduzindo de forma significativa a expressão do PCNA. Já o cultivo por 6 dias em MEM sozinho induziu a redução significativa da expressão da BMP15, comparado ao controle fresco. A suplementação do meio com a lectina ConA sozinha ou em associação com o FSH reduziu a expressão do RNAm para o KL comparado ao controle fresco. Com relação a expressão do c-KIT ocorreu um aumento significativo nos níveis de RNAm no tratamento com FSH+CONA comparado a lectina sozinha. No meio suplementado com a lectina CONA a expressão do GDF9 foi significativamente maior do que o tratamento com FSH.

## 8 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos nesta pesquisa evidenciaram informações valiosas, sobre o efeito da Lectina Concanavalina A (Con A) e do FSH sobre a expressão do RNAm para PCNA, BMP-15, GDF-9, KL e c-Kit, que estão envolvidos na proliferação celular, ativação e crescimento de folículos pré-antrais.

Estudos adicionais poderão ser desenvolvidos, afim de melhor esclarecer o papel destas substâncias e suas interações sobre o desenvolvimento de folículos primordiais. Estes estudos contribuirão para a elucidação dos mecanismos que regulam o desenvolvimento folicular *in vitro*. Em adição, a utilização da Con A e do FSH sozinhos ou em combinação com outras substâncias (fatores e/ou hormônios) para o desenvolvimento de outros meios sequenciais, pode ser uma alternativa de sucesso na busca por melhores resultados de ativação de folículos primordiais.

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADASHI, E. Y. The IGF family and folliculogenesis. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 39, n. 1-2, p. 13–19, 1998.

AGRAWAL, B. B.; GOLDSTEIN, I. J. Protein-carbohydrate interaction. XV. The role of bivalent cations in concanavalin A-polysaccharide interaction. **Can J Biochem**; v. 46, p. 1147– 1150, 1968.

ALBERTINI, D.; COMBELLES, C.; BENECCHI, E.; CARABATSOS, M. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**, v. 121, p. 647-653, 2001.

ARRAZTOA, J. A.; ZHOU, J.; MARCU, D.; CHENG, C.; BONNER, R.; CHENM.; XIANG, C.; BROWNSTEIN, M.; MAISEY, K.; IMARAI, M.; BONDY, C. Identification of genes expressed in primate primordial oocytes. **Human Reproduction**, v. 20, n. 2, p. 476–483, 2005.

ASSOU, S.; ANAHOR, Y. T.; PANTESCO, V.; LE CARROUR, T.; PELLESTOR, F.; KLEIN, B.; REYFTMANN, L.; DECHAUD, H.; DE VOS, J.; HAMAMAH, S. The human cumulus–oocyte complex gene-expression profile. **Human Reproduction**, v. 21, n. 7, p. 1705–1719, 2006.

BAARENDS, W. M.; UILENBROEK, J. T.; KRAMER, P.; HOOGERBRUGGE, J. W.; VAN LEEUWEN, E. C.; THEMME, A. P.; GROOTEGOED, J. A. Anti-Müllerian hormone and anti-Müllerian hormone type II receptor messenger ribonucleic acid expression in rat ovaries during postnatal development, the estrous cycle and gonadotropin-induced follicle growth. **Endocrinology**, v. 136, n. 11, p. 4951-4962, 1995.

BACCHI, C. E.; GOWN A. M. Detection of cell proliferation in tissue sections. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 26, p. 677-687, 1993.

- BARANAO, J. L. S.; HANNOND, J. M. Comparative effects of insulin and insulin-like growth factors on DNA synthesis and differentiation of porcine granulosa cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 124, n. 2, p. 484–490, 1984.
- BARNETT, K. R.; SCHILLING, C.; GREENFELD, C. R.; TOMIC, D.; FLAWS, J. A. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 5, p. 537-55, 2006.
- BARRAL-NETTO, M. Human lymphocyte stimulation by legume lectins from the Dioclea tribe. **Immunology Investment**, v. 21, p. 297-303, 1992.
- BARROS, L. F.; HERMOSILLA, T.; CASTRO, J. Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, n. 3, p. 401–409, 2001.
- BERRIDGE, M. J.; LIPP, P.; BOOTMAN, M. D. The versatility and universality of calcium signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 1, n. 1, p. 11–21, 2000.
- BEZERRA, M. B.; RONDINA, D.; LIMA, A. K. F.; OLIVEIRA, L. C.; CECCHI, R., LUCCI, C. M.; GIORGETTI, A.; FIGUEIREDO, J. R. Aspectos quantitativos e qualitativos da foliculogênese pré-natal na espécie caprina. **Ciência Animal**, v.8, p. 47-56, 1998.
- BOLDT, D. H.; MACDERMOTT, R. P.; JOROLAN, E. P. Interaction of plant lectins with purified human lymphocyte populations: Binding characteristics and kinetics of proliferation. **J Immunol**. v.114, n. 1532–1536, 1979.
- BRAW-TAL, R.; YOSSEFI, S. Studies in vivo and in vitro on the initiation of follicle growth in the bovine ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v 109, p. 165–171, 1997.
- CARPENTER, G.; COHEN, S. Influence of lectins on the binding of I<sup>125</sup>I-labelled EGF to human fibroblasts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 79, p. 545 - 552, 1977.



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

CELESTINO, J. J. H.; BRUNO, J. B.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T.; SARAIVA, M. V. A.; CHAVES, R. N.; MARTINS, F. S.; ALMEIDA, A. P.; CUNHA, R. M. S.; LIMA, L. F.; NAME, K. O.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Steady state level of kit ligand mRNA in goat ovaries and the role of kit ligand in preantral follicle survival and growth in vitro. **Molecular Reproduction Development**, v. 77, P. 231–240, 2010.

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

CHANG, C. H.; BEER, M.; MARZILLIL.; G. Osmium labeled polynucleotides. Their action of osmium tetroxide with deoxyribonucleic acid and synthetic polynucleotides in the presence of tertiary nitrogen donor ligands. **Biochemistry**, v. 16, p. 33—38, 1977.

CHANG, H.; BROWN, C. W.; MATZUK, M. M. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor- $\beta$  superfamily. **Endocrine Reviews**, v. 23, p. 787-823, 2002.

CHANNING, C. P.; LEDWITZ-RIGBY, F. Methods for assessing hormone-mediated differentiation of ovarian cells in culture and in short term incubations. **Methods Enzymol.**, v. 39, p. 183-230, 1975.

CHAPPEL, S. C.; HOWLES, C. Reevaluation of the roles of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the ovulatory process. **Human Reproduction**, v. 6, issue 9, p. 1206–1212, 1991.

CHAVES, R. N.; MARTINS, F. S.; SARAIVA, M. V.; CELESTINO, J. J.; LOPES, C. A.; CORREIA, J. C.; VERDE, I. B.; MATOS, M. H.; BA'O, S. N.; NAME, K. P.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R.; AND FIGUEIREDO, J. R. Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured *in vitro*.

**Reprod. Fertil. Dev**, v. 20, p. 640–647, 2008.

CHUN, S. Y.; EISENHAUER, K. M.; MINAMI, S.; BILLIG, H.; PERLAS, E.; HSUEH, A. J. Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. **Endocrinology**, v. 137, n. 4, p. 1447–1456. 1996.

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

DE ROBERTIS, E. M. F.; HIB, J. **Bases da Biologia celular e molecular**. 4<sup>a</sup> ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan , p. 369, 2006.

DEREWENDA, Z.; YARIV, J.; HELLIWELL, J. R.; KALB, A. J.; DODSON, E. J.; PAPIZ, M. Z.; WAN, T.; CAMPBELL, J. The structure of the saccharide-binding site of Concanavalin A. **The EMBO Journal**, v. 8, issue 8, p. 2189–2193, 1989.

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

DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1211–1239, 2001.

DRIANCOURT, M. A.; REYNAUD, K.; CORTVRINDT, R.; SMITZ, J. Roles of KIT and KIT LIGAND in ovarian function. **Journals of Reproduction and Fertility**, v. 5, p. 143–152, 2000.

DUBE, J. L.; WANG, P.; ELVIN, J.; LYONS, K. M.; CELESTE, A. J.; MATZUK, M. The Bone Morphogenetic Protein 15 Gene Is X-linked and Expressed In Oocytes. **Molecular Endocrinology**, v. 12, p. 1809–1817, 1998.

DURLINGER, A. L.; VISSER, J. A.; THEMMEN, A. P. Regulation of ovarian function: the role of Anti-Müllerian hormone. **Reproduction**, v. 124, n. 5, p. 601–609, 2002.

EDSON, M. A.; NAGARAJA, A. K.; MATZUK, M. M. The Mammalian Ovary from Genesis to Revelation. **Endocrine Reviews**, v. 30, n. 6, p. 624–712, 2009.

EPPIG, J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**, v. 122, issue 6, p. 829–838, 2001.

EPPIG, J. J.; CHESNEL, F.; HIRAO, Y.; O'BRIEN, M. J.; PENDOLA, F. L.; WATANABE, S.; AND WIGGLESWORTH, K. Oocyte control of granulosa cell development: how and why **Human Reproduction 12 National Supplement Journal of the British Fertility Society** v. 2, p.127–132, 1997b.

FAGBOHUN, C. F.; DOWNS, S. M. Maturation of the Mouse Oocyte-Cumulus Cell Complex: Stimulation by Lectins. **Biology of Reproduction**, v. 42, n. 3, p. 413-423, 1990.

FATEHI, A. N., ZEINSTRA, E. C., KOOIJ, R. V., COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M. Effect of cumulus cell removal of in vitro matured bovine oocytes prior to in vitro fertilization on subsequent cleavage rate. **Theriogenology**, v. 57, p. 1347-1355, 2002.

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

FORTUNE, J. E.; EPPIG, J. J. Effects of gonadotropins on steroid secretion by infantile and juvenile mouse ovaries in vitro. **Endocrinology**, v.105, n. 3, p. 760–768, 1979.

FRICKE, P. M.; AL-HASSAN, M. J.; ROBERTS, A. J. Effects of gonadotropin treatment on size, number and cell proliferation of antral follicles in cows. **Dom. Anim. Endocrinol.**, v. 14, p. 171-180, 1997.

GALLOWAY, S. M.; MCNATTY, K. P.; CAMBRIDGE, L. M.; LAITINEN, M. P.; JUENGEL, J. L.; JOKIRANTA, T. S.; MCLAREN, R. J.; LUIRO, K.; DODDS, K. G.; MONTGOMERY, G. W.; BEATTIE, A. E.; DAVIS, G. H.; RITVOS, O. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. **Nature Genetics**, v. 25, issue 3, p. 279–283, 2000.

GAN, L.; MAO, C. A.; WIKRAMANAYAKE, A.; ANGERER, L. M.; ANGERER, R. C.; KLEIN, W. H. An orthodenticle-related protein from *Strongylocentrotus purpuratus*. *Developmental Biology*, v. 167, p. 517-528, 1995.

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

GOLDSTEIN, I. J.; HAYES, C. E. The lectins: carbohydrate-binding proteins of plants and animals. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, v. 35, p. 127-340, 1978.

GOMES, J. C.; FERREIRA, R. R.; CAVADA, B. S.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. Histamine release induced by glucose (mannose)-specific lectins isolated from Brazilian beans. Comparison with Concanavalin A. *Agents and Actions*, v. 41, issue 3-4, p. 132-135, 1999.

GOSPDAROWICZ, D.; BIALECKI, H. Fibroblast and epidermal growth factors are mitogenic agents for cultured granulosa cells of rodent, porcine and human origin. **Endocrinology**, v. 104, issue 3, p. 757–764, 1979.

GOUGEON, A. Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. **Endocrine Reviews**, v. 17, n. 2, p. 121–155, 1996.

GOUGEON, A.; BUSSO, D. Morphologic and functional determinants of primordial and primary follicles in the monkey ovary. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 163, n. 1-2, p. 33–42, 2000.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA A. B. Morte Celular por Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335- 343, 2007.

GU, Y.; RUNYAN, C.; SHOEMAKER, A.; SURANI, A.; WYLIE, C. Steel factor controls primordial germ cell survival and motility from the time of their specification in the allantois, and provides a continuous niche throughout their migration. **Development**, v. 136, n. 8, p. 1295–1303, 2009.

GUDERMANN, T.; NÜRNBERG, B.; SCHULTZ, G. Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. I. G-protein-coupled receptors: structure and function. **Journal of Molecular Medicine**, v. 73, p. 51–63, 1995.

GUERTIN, D. A.; SABATINI, D. M. Defining the role of mTOR in cancer. **Cancer Cell**, v. 12, 9–22, 2007.

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, issue 5, p. 1322– 1328, 2000.

HANSEN, K. R.; KNOWLTON, N. S.; THYER, A. C.; CHARLESTON, J. S.; SOULES, M. R.; KLEIN, N. A. A new model of reproductive aging: the decline in ovarian non-growing follicle number from birth to menopause. **Human Reproduction**, v. 23, n. 3, p. 699–708, 2008.

HAYASHI, M.; MCGEE, E. A.; MIN, G.; KLEIN, C.; ROSE, U. M.; VAN, DUIN. M.; HSUEH, A. J. Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. **Endocrinology**, v. 140, n. 3, p. 1236–1244, 1999.

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

HIROBE, S.; HE, W. W.; LEE, M. M.; DONAHOE, P. K. Müllerian inhibiting substance messenger ribonucleic acid expression in granulosa and Sertoli cells coincides with their mitotic activity. **Endocrinology**, v. 131, n. 2, p. 854–862, 1992.

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

HREINSSON, J. G.; SCOTT, J. E.; RASMUSSEN, C.; SWAHN, M. L.; HSUEH, A. J.; HOVATTA, O. Growth differentiation factor-9 promotes the growth, development, and survival of human ovarian follicles in organ culture. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 87, n. 1, p. 316–321, 2002.

HUSSEIN, M. R. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. **Human Reproduction Update**, v.11, n. 2, p. 162–178, 2005.

HUTT, K. J.; MCLAUGHLIN, E. A.; HOLLAND, M. K. KIT/KIT ligand in mammalian oogenesis and folliculogenesis: roles in rabbit and murine ovarian follicle activation and oocyte growth. **Biology of Reproduction**, v. 75, n. 3, p. 421–433, 2006b.

HUTT, K. J.; MCLAUGHLIN, E. A.; HOLLAND, M. K. KL and KIT have diverse roles during mammalian oogenesis. **Mol Hum Reprod**, v. 12, p. 61–69, 2006a.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>.

IRVING-RODGERS, H. F.; CATANZARITI, K. D.; ASPDEN, W. J.; D'OCCHIO, M. J.; RODGERS, R. J. Remodeling of extracellular matrix at ovulation of the bovine ovarian follicle. **Molecular, Reproduction and Development**, v. 73, p. 1292–1302, 2006.

JIN, X. C. S.; HAN, F. Q.; YU, P.; WEI, Z. Y.; HU, Y. X.; LIU. Anti-apoptotic action of stem cell factor on oocytes in primordial follicles and its signal transduction. **Mol Reprod**, v. 70 p. 82–90, 2005.

JOHN, G. B.; GALLARDO, T. D.; SHIRLEY, L. J.; CASTRILLON, D. H. Foxo3 is a PI3K-dependent molecular switch controlling the initiation of oocyte growth. **Developmental Biology**, v. 321, n. 1, p. 197–204, 2008.

JOHN, G. B.; SHIDLER, M. J.; BESMER, P.; CASTRILLON, D. H. Kit signaling via PI3K promotes ovarian follicle maturation but is dispensable for primordial follicle activation. **Developmental Biology**, v. 331, n. 2, p. 292–299, 2009.

JOHNSON, A. L.; BRIDGHAM, J. T. Caspase-mediated apoptosis in the vertebrate ovary. **Reproduction**, v. 124, issue 1, p. 19–27, 2002.

JOYCE, I. M.; PENDOLA, F. L.; WIGGLESWORTH, K.; EPPIG, J. J. Oocyte regulation of kit ligand expression in mouse ovarian follicles. **Developmental Biology**, v. 214, p.342-353,1999.

KEZELE, P. R.; AGUE, J. M.; NILSSON, E.; SKINNER, M. K. Alterations in the ovarian transcriptome during primordial follicle assembly and development. **Biology of Reproduction**, v. 72, n. 1, p. 241–255, 2005.

KISHIMOTO, T. Regulation of metaphase by a maturation promoting factor. **Development, Growth Differentiation**, v. 30, p. 105-115, 1988.

KNIGHT, P. G.; GLISTER, C. TGF- $\beta$  superfamily members and ovarian follicle development. **Reproduction**, v. 132, n. 2, p. 191–206, 2006.

KUMAR, T. R.; MATZUK, M. M.; TOTOWA, N. J. Gene knockout models to study the hypothalamus-pituitary-gonadal axis. In: Shupnik MA (Ed.). Gene engineering and molecular models in Endocrinology. **The Human Press**, 2000.

LEE, C. Y.; RYAN, R. J. The Porcine Ovarian Follicle. V. Binding of Concanavalin A to Granulosa Cells during Follicle Maturation. **Biology Of Reproduction**, v. 21, p. 973-977, 1979.

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

**Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 345, p. 38–47, 2011.

LIS, H.; SHARON, N. Lectins in higher plants. In: Marcus, The biochemistry of plants a comprehensive treatise. Proteins and nucleic acids. **New York, Academic Press**, v. 6, p. 371 - 344, 1981.

LIU, K. Stem cell factor (SCF)-Kit mediated phosphatidylinositol 3 (PI3) kinase signaling during mammalian oocyte growth and early follicular development. **Frontiers in Bioscience**, v. 11, p. 126–135, 2006.

LIU, X.; ANDOH, K.; ABE, Y.; KOBAYASHI, J.; YAMADA, K.; MIZUNUMA, H.; IBUKI, Y. A Comparative Study on Transforming Growth Factor- $\beta$  and Activin A for Preantral Follicles from Adult, Immature, and Diethylstilbestrol-Primed Immature Mice **Endocrinology**, v. 140, n. 6, p. 2480–2485, 1999.

LUNDY, T.; SMITH, P.; O'CONNELL, A.; HUDSON, N. L.; MCNATTY, K. P. Populations of granulosa cells in small follicles of the sheep ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 115, n. 2, p. 251–262, 1999.

MAHESHWARI, A.; FOWLER, P. A. Primordial follicular assembly in humans – revisited. **Zygote**, v.16, n. 4, p.285–296, 2008.

MAJNO, G.; JORIS, I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. **American Journal of Pathology**, v. 146, n. 1, p. 3–15, 1995.

MANDON-PÉPIN, B.; OUSTRY-VAIMAN, A.; VIGIER, B.; PIUMI, F.; CRIBIU, E.; COTINOT, C. Expression profiles and chromosomal localization of genes controlling meiosis and follicular development in the sheep ovary. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 3, p. 985–995, 2003.



MAO, J.; SMITH, M. F.; RUCKER, E. B.; WU, G. M.; McCAULEY, T. C.; CANTLEY, J. T. C.; PRATHER, R. S.; DIDION, B. A.; DAY, B. N. Effect of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on porcine preantral follicular growth, antrum formation, and stimulation of granulosa cell proliferation and suppression of apoptosis *in vitro*. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 1967-1975, 2004.

MARKSTRÖM, E.; SVENSSON, E. C. H.; SHAO, R.; SVANBERG, B.; BILLIG, H. Survival factors regulating ovarian apoptosis – dependence on follicle differentiation. **Reproduction**, v. 123, issue 1, p. 23–30, 2002.

MARTIN, L. J. Neuronal cell death in nervous system development, disease, and injury (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 7, n. 5, p. 455–478, 2001.

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

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

MATOS, M. H. T.; LIMA-VERDE, I. B.; BRUNO, J. B.; LOPES, C. A. P.; MARTINS, F. S.; SANTOS, K. D. B.; ROCHA, R. M. P.; SILVA, J. R. V.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. Follicle stimulating hormone and fibroblast growth factor-2 interact and promote goat primordial follicle development *in vitro*. **Reproduction Fertility and Development**, v. 19, n. 5, p. 677–684, 2007a.

MATOS, M. H. T.; LIMA-VERDE, I. B.; LUQUE, M. C. A.; MAIA JR, J. E.; SILVA, J. R. V.; CELESTINO, J. J. H.; MARTINS, F. S.; BÁO, S. N.; LUCCI, C. M.; FIGUEIREDO, J.

R. Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability *in vitro*. **Zygote**, v. 15, p. n. 3, 173–182, 2007b.

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

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

MÉDURI, G., CHARNAUX, N., DRIANCOURT, M.-A., Combettes, L., Granet, P., Vannier, B., Loosfelt, H.; Migrom, E. Follicle-stimulating hormone receptors in oocytes? *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. v. 87, p. 2266-2276, 2002.

MINJ, A.; MONDAL, S.; TIWARI, A. K.; SHARMA, B.; VARSHNEY, V. P. Molecular characterization of follicle stimulating hormone receptor (FSHR) gene in the Indian river buffalo (*Bubalus bubalis*). **General and Comparative Endocrinology**, v. 158, p. 147–153, 2008.

MONIRUZZAMAN, M.; MIYANO, T. KIT-KIT ligand in the growth of porcine oocytes in primordial follicles. **Journal of Reproduction and Development**, v. 53, n. 6, p. 1273–1281, 2007a.

MONIRUZZAMAN, M.; SAKAMAKI, K.; AKAZAWA, Y.; MIYANO, T. Oocyte growth and follicular development in KIT-deficient Fas-knockout mice. **Reproduction**, v. 133, n. 1, p. 117–125, 2007b.

MORITA, Y.; PEREZ, G. I.; MARAVEI, D. V.; TILLY, K. I.; TILLY, J. L. Targeted expression of Bcl-2 in mouse oocytes inhibits ovarian follicle atresia and prevents spontaneous and chemotherapy-induced oocyte apoptosis *in vitro*. **Molecular Endocrinology**, v. 13, p. 841–850, 1999.

NICHOLSON, G. L.; YANAGIMACHI, R.; YANAGIMACHI, H. Ultrastructural localization of lectin-binding sites on the zonae pellucidae and plasma membranes of mammalian eggs. **Journal cellular Biology**, v. 66, p 263-274, 1975.

NILSSON, E.; KEZEL, P.; SKINNER, M. K. Leukemia inhibiting factor (LIF) promotes primordial to primary follicle transition in rat ovaries. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 188, issue 1-2, p. 65-73, 2002.

OIKAWA, T.; YANAGIMACHI, R.; NICOLSON, G. L. Wheat Germ agglutinin blocks Mammalian Fertilization. **Nature**, v. 241, p. 256—259, 1973.

OKTAY, K.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R. G. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 82, n. 11, p. 3748–3751, 1997.

OKTAY, K.; KARLIKAYA, G.; AKMAN, O.; OJAKIAN, G. K.; OKTAY, M. Interaction of extracellular matrix and activin-A in the initiation of follicle growth in the mouse ovary. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 2, p. 457–461, 2000.

OKTAY, K.; NEWTON, H.; MULLAN, J.; GOSDEM, R. G. Development of human primordial follicles to antral stages in SCID/hpg mice stimulated with follicle stimulating hormone. **Human of Reproduction**, v.13, n. 15, p. 1133–1138, 1998.

OKTEM, O.; OKTAY, K. Quantitative assessment of the impact of chemotherapy on ovarian follicle reserve and stromal function. **Cancer**, v. 110, n. 10, p. 2222–2229, 2007a.

OKTEM, O.; URMAN, B. Understanding follicle growth *in vivo*. **Human Reproduction**, v. 25, p. 2944–2954, 2010.

OLTVAI, Z. N.; MILLIMAN, C. L.; KORSMEYER, S. J. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a concerned homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. **Cell**, v. 74, n. 4, p. 609–619, 1993.

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

OTSUKA, F.; SHIMASAKI, S. A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand, p. its role in regulating granulosa cell mitosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 12, p. 8060-8065, 2002.

PADANILAM, B. J. Cell death induced by acute renal injury: a perspective on the contributions of apoptosis and necrosis. **American Journal Physiology of Renal**, v. 284, n. 4, p. 608-627, 2003.

PANDIAN, M. R.; BAHU, O. M. P.; SEGAL, S. J. Labeling of LH/hCG receptors in rat ovaries. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 64, p. 1199-1205, 1975.

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

PEREZ, G. I.; ROBLES, R.; KNUDSON, C. M.; FLAWS, J. A.; KORSMEYER, S. J.; TILLY, J. L. Prolongation of ovarian lifespan into advanced chronological age by bax deficiency. **Nature Genetics**, v. 21, n. 2, p. 200-203, 1999.

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

PRIME, S. S.; TOH, B. H. Co-capping of insulin, epidermal growth factor and Concanavalin A surface receptors with each other and with cytoplasmic actin. **Cytobios**, v. 28, n. 15, p. 1-60, 1980.

RATTS, V. S.; FLAWS, J. A.; KOLP, R.; SORENSON, C. M.; TILLY, J. L. Ablation of bcl-2 gene expression decreases the numbers of oocytes and primordial follicles established in the post-natal female mouse gonad. **Endocrinology**, v. 136, n. 8, p. 3665–3668, 1995.

REDDY, P.; ADHIKARI, D.; ZHENG, W.; LIANG, S.; HÄMÄLÄINEN, T.; TOHONEN, V.; OGAWA, W.; NODA, T.; VOLAREVIC, S.; HUHTANIEMI, I.; LIU, K. PDK1 signaling in oocytes controls reproductive aging and lifespan by manipulating the survival of primordial follicles. **Human Molecular Genetics**, v. 18, n. 15, p. 2813–2824, 2009a.

REDDY, P.; LIU, L.; ADHIKARI, D.; JAGARLAMUDI, K.; RAJAREDDY, S.; SHEN, Y.; DU, C.; TANG, W.; HAMALAINEN, T.; PENG, S. L. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. **Science**, v. 319, n. 5863, p. 611–613, 2008.

REDDY, P.; SHEN, L.; REN, C.; BOMAN, K.; LUNDIN, E.; OTTANDER, U.; LINDGREN, P.; LIU, Y. X.; SUN, Q. Y.; LIU, K. Activation of Akt (PKB) and suppression of FKHL1 in mouse and rat oocytes by stem cell factor during follicular activation and development. **Developmental Biology**, v. 281, n. 2, p. 160–170, 2005.

RICHARDS, J. S. Perspective: the ovarian follicle – A perspective in 2001. **Endocrinology**, v. 142, n. 6, p. 2184–2193, 2001.

RICHARDS, J. S.; MIDGLEY, AR Jr. Protein hormone action: a key to understanding ovarian follicular and luteal cell development. **Biology of Reproduction**, v. 14, n. 1, p. 82–94, 1976.

RICHARDS, J. S.; PANGAS, S. A. The ovary: basic biology and clinical implications. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, p. 963–972, 2010.

ROCHE, J. F. Control and regulation of folliculogenesis—a symposium in perspective. **Reviews of Reproduction**, v. 1, p. 19–27, 1996.

- RODRIGUES FILHO, E. J. B.; FERNANDES VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. D. Isolation of secoisolariciresinol diesters from stems of *Simaba cuneata*. **Phytochemistry**, v. 31, p. 2115-2116, 1992.
- RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca Anatomica**, v. 24, p. 77-92, 1983.
- SAHA, S.; SHIMIZU, M.; GESHI, M.; IZAIKE, Y. In vitro culture of bovine preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 63, n. 1-2, p. 27-39, 2000.
- SARAIVA, M. V. A.; CELESTINO, J. J. H.; ARAÚJO, V. R.; CHAVES, R. N.; ALMEIDA, A. P.; LIMA-VERDE, I. B.; DUARTE, A. B. G.; SILVA, G. M.; MARTINS, F. S.; BRUNO, J. B.; MATOS, M. H. T.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Expression of follicle-stimulating hormone receptor (FSH-R) in goat ovarian follicles and the impact of sequential culture medium on in vitro development of caprine preantral follicles. **Zygote**, v. 19, p. 205-214, 2010.
- SARAIVA, M. V. A.; CELESTINO, J. J. H.; CHAVES, R. N.; MARTINS, F. S.; BRUNO, LIMA, J. B.; VERDE, I. B.; MATOS, M. H. T.; SILVA, A. G. M.; PORFIRIO, E. P.; BÁO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Influence of different concentrations of LH and FSH on in vitro caprine primordial ovarian follicle development. **Small Ruminant Research** p. 87-95, 2008.
- SARBASSOV, D. D.; GUERTIN, D. A.; ALI, S. M.; SABATINI, D. M. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. **Science**, v. 307, n. 5712, p. 1098-1101, 2005.
- SAVILL, J. Apoptosis and renal injury. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 4, n. 3: 263-269, 1995.
- SERAFICA, M. D.; GOTO, T.; TROUNSON, A. O. Transcripts from a human primordial follicle cDNA library. **Human Reproduction**, v. 20, n. 8, p. 2074-2091, 2005.

- SHALGI, R.; MAYMON, R.; BAR-SHIRA, B.; AMIHAL, D.; SKUTELSKY, E. Distribution of lectin receptors sites in the zona pellucida of follicular and ovulated rat oocytes. **Molecular, Reproduction and Development**, v. 29, p. 365–372, 1991.
- SHARMA, V.; VIJAYAN, M.; SUROLIA, A. Imparting exquisite specificity to peanut agglutinin for the tumor-associated Thomsen-Friedenreich antigen by redesign of its combining site. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 21209-21213, 1996.
- SHARON, N. Lectin receptors as lymphocyte surface markers. **Advances in Immunology**, v. 34, p. 213-298, 1983.
- SHIMASAKI, S.; ZACHOW, R. J.; LI, D.; KIM, H.; IEMURA, S.; UENO, N.; SAMPA, T. H. K.; CHANG, R. J.; ERICKSON, G. F. A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 13, p. 7282–7287, 1999.
- SILVA, J. R. V.; THARASANIT, T.; TAVERNE, M. A. M.; VAN DER WEIJDEN, G. C.; SANTOS, R. R.; FIGUEIREDO, J. R.; VAN DEN HURK, R. The activin-follistatin system and *in vitro* early follicle development in goats. **Journal of Endocrinology**, v. 189, p. 113–125, 2006.
- SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK R.; COSTA, S. H. F.; ANDRADE, E. R.; NUNES, A. P. A.; FERREIRA, F. V. A.; LÔBO, R. N. B.; FIGUEIREDO, J. R. Survival and growth of goat primordial follicles after *in vitro* culture of ovarian cortical slices in media containing coconut water. **Animal Reproduction Science**, v.81, p.273-286, 2004a.
- SIMONI, M.; NIESCHLAG, E. FSH in therapy: physiological basis, new preparations and clinical use. **Reproductive Medicine Review**, v. 4, n. 3, p. 163–177, 1995.
- SKINNER, M. K. Regulation of primordial follicle assembly and development. **Human Reproduction Update**, v. 11, n. 5, p. 461–471, 2005.

SMALL, C. L.; SHIMA, J. E.; UZUMCU, M.; SKINNER, M. K.; GRISWOLD, M. D. Profiling gene expression during the differentiation and development of the murine embryonic gonad. **Biology of Reproduction**, v.72, n. 2, p. 492–501, 2005.

SMITZ, J.; CORTVRINDT, R.; HU, Y.; VANDERSTICHELE, H. Effects of recombinant activin A on in vitro culture of mouse preantral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v. 50, n. 3, p. 294–304, 1998.

SOTO-SUAZO, M.; ZORN, T. M. Primordial germ cells migration: morphological and molecular aspects. **Animal Reproduction**, v. 3, n. 3, p. 147-160, 2005.

TAKAHASHI, M.; HAYASHI, M.; MANGANARO, T. F.; DONAHOE, P. K. The ontogeny of mullerian inhibiting substance in granulosa cells of the bovine ovarian follicle. **Biology of Reproduction**, v. 35, n. 2, p. 447–453, 1986.

TALEVI, R.; GUALTIERI, R.; TARTAGLIONE, G.; FORTUNATO, A. Heterogeneity of the zona pellucida carbohydrate distribution in human oocytes failing to fertilize *in vitro*. **Human Reproduction**, v. 12, n. 12, p. 2773–2780, 1997.

TEIXEIRA, M. M.; ALMEIDA, I. C.; GAZZINELLI, R. T. Introduction: innate recognition of bacteria and protozoan parasites. **Microbes and Infection**, v. 4, p. 883–886, 2001.

THOMAS, F. H.; ISMAIL, R. S.; JIANG, J-Y.; VANDERHYDEN, B. C. Kit Ligand 2 promotes murine oocyte growth in vitro. **Biol Reprod**, v. 78, p. 167–175, 2008.

THOMAS, F.H.; ETHIER, J. F.; SHIMASAKI, S.; VANDERHYDEN, B. C. Follicle-stimulating hormone regulates oocyte growth by modulation of expression of oocyte and granulosa cell factors. **Endocrinology**, v. 146, p. 941–949, 2005.

TINGEN, C.; KIM, A.; WOODRUFF, T. K. The primordial pool of follicles and nest breakdown in mammalian ovaries. **Molecular Human Reproduction**, v. 15, issue 12, p. 795–803, 2009.



Van den Hurk, R.; BEVERS, M. M.; BECKERS, J. F. In vivo and in vitro development of preantral follicles. **Theriogenology**, v. 47, n. 1, p. 73–82, 1997.

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

VIGIER, B.; PICARD, J. Y.; TRAN, D.; LEGEAI, L.; JOSSO, N. Production of anti-Müllerian hormone: another homology between Sertoli and granulosa cells. **Endocrinology**, v. 114, n. 4, p. 1315-1320, 1984.

VLODAVSKY, I.; BROWN, K. D.; GOSPODAROWICZ, D. A comparison of the binding of epidermal growth factor to cultured granulosa and luteal cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 253, n. 10, p. 3744–3750, 1978.

WANDJI, S. A.; PELLETIER, G.; SIRARD, M. A. Ontogeny and cellular localization of 125I-labeled basic fibroblast growth factor and 125I-labeled epidermal growth factor binding sites in ovaries from bovine fetuses and neonatal calves. **Biology of Reproduction**, v. 47, n. 5, p. 807–813, 1992.

WANDJI, S. A.; SRSEN, V.; VOSS, A. K.; EPPIG, J. J.; FORTUNE JE. Initiation in vitro of growth of bovine primordial follicles. **Biology of Reproduction**, v. 55, n. 5, p. 942–948, 1996.

WANG, J. C. Interactions between twisted DNAs and enzymes: The effects of superhelical turns. **Journal of Molecular Biology**, v. 87, issue 4, p. 797-816, 1974.

WANG, J.; ROY, S. K. Growth differentiation factor-9 and stem cell factor promote primordial follicle formation in the hamster: modulation by follicle-stimulating hormone. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 3, p. 577–585, 2004.

WANG, Y., LI, J.; WANG, C. Y.; KWOK, A. H. Y.; LEUNG, F. C. Epidermal growth factor (EGF) receptor ligands in the chicken ovary. I. Evidence for heparin-binding EGF-like growth

factor (HBEGF) as a potential oocyte-derived signal to control granulosa cell proliferation and HB-EGF and kit ligand expression. **Endocrinology**, v. 148, n. 7, p. 3426–3440, 2007.

WEENEN, C.; LAVEN, J. S.; von BERGH, A. R.; CRANFIELD, M.; GROOME, N. P.; VISSER, J. A.; KRAMER, P.; FAUSER, B. C.; THEMME, A. P. Anti-Müllerian hormone expression pattern in the human ovary: potential implications for initial and cyclic follicle recruitment. **Molecular Human Reproduction**, v. 10, n. 2, p. 77-83, 2004.

WU, J.; XU, B.; WANG, W. Effects of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone on the developmental competence of porcine preantral follicle oocytes grown in vitro. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 24, n. 9, p. 419–424, 2007.

WULLSCHLEGER, S.; LOEWITH, R.; HALL, M. N. TOR signaling in growth and metabolism. **Cell**, v. 124, n. 2, p. 471–484, 2006.

WYLLIE, A. H. Death from inside out: an overview **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 345, n. 1313, p. 237–241, 1994.

XIONG, Y.; ZHANG, H.; BEACH, D. D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. **Cell**, v. 71, p. 505–514, 1992.

YING, Y.; Q. I, X.; ZHAO, G. Q. Induction of primordial germ cells from murine epiblasts by synergistic action of BMP4 and BMP8B signaling pathways. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 14, p. 7858–7862, 2001.

YOON, S. J.; KIM, K. H.; CHUNG, H. M.; CHOI, D. H.; LEE, W. S.; CHA, K. Y.; LEE, K. A. Gene expression profiling of early follicular development in primordial, primary, and secondary follicles. **Fertility and Sterility**, v. 85, n. 1, p. 193–203, 2006.

ZHANG, P.; KERKELA, E.; SKOTTMAN, H.; LEVKOV, L.; KIVINEN, K.; LAHESMAA, R.; HOVATTA, O.; KERE J. Distinct sets of developmentally regulated genes that are expressed by human oocytes and human embryonic stem cells. **Fertility and Sterility**, v. 87, n. 3, p. 677–690, 2007.

ZHAO, J.; TAVERNE, M. A.; Van der WEIJDEN, G. C.; BEVERS, M. M.; Van den HURK, R. Effect of activin A on in vitro development of rat preantral follicles and localization of activin A and activin receptor II. **Biology of Reproduction**, v. 65, n. 3, p. 967-977, 2001.

ZHOU, H.; ZHANG, Y.; Regulation of in vitro growth of preantral follicles by growth factors in goats. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 28, issue 3, p. 235-242, 2005.