

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

CINTIA CAMURÇA FERNANDES LEITÃO

EFEITO DO FSH, ATIVINA-A E GDF-9 SOBRE O DESENVOLVIMENTO *IN VITRO*
DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS

SOBRAL - CEARÁ

2011

CINTIA CAMURÇA FERNANDES LEITÃO

**EFEITO DO FSH, ATIVINA-A E GDF-9 SOBRE O DESENVOLVIMENTO *IN VITRO*
DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS**

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

Área de concentração: Macromoléculas

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Viana Silva.

SOBRAL - CEARÁ

2011

CINTIA CAMURÇA FERNANDES LEITÃO

EFEITO DO FSH, ATIVINA-A E GDF-9 SOBRE O DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração em Macromoléculas.

Aprovada em ____/____/____.

Conceito obtido: _____

BANCA EXAMINADORA

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

Prof^ª. Dr^ª. Maria Helena Tavares de Matos
(Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF)

Prof. Dr. Fabricio Sousa Martins
(Universidade Estadual do Ceará – UECE)

*Aos meus pais Edmar e Socorro,
Ao meu esposo Guedes Neto,
por tudo que representam em minha vida.
Com amor, dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, primeiramente, por sempre iluminar os meus caminhos, dando a mim serenidade e força para seguir em frente, sem nunca desistir dos meus objetivos. Senhor, obrigada por, mesmo na minha ausência em orações durante esses dois anos de Mestrado, ter permanecido sempre aqui, ao meu lado e depositado em mim todas as suas bênçãos. Tudo aquilo que conquistei até aqui é meu por direito divino!

Aos meus amados pais, Antônio Edmar Leitão e Maria do Socorro Leitão, que por muito me amarem, renunciaram aos seus próprios sonhos para que os meus fossem realizados. Obrigada por cada momento de dedicação e amor na minha educação, pela confiança em todos os momentos, pelo exemplo que vocês são em minha vida, e principalmente por me darem a convicção de que caráter e educação são as maiores heranças que se pode deixar para um filho. Acredito que esse momento significa algo a mais para vocês do que para qualquer outra pessoa. Amo muito vocês!

Ao meu esposo, José Guedes Neto. Existem dias na vida em que somos agraciados por Deus com algo ou alguém muito especial. Meu amor, o dia em que te conheci foi um desses... *“Não sei se o mundo é bom, mas o meu mundo ficou melhor quando você chegou, e perguntou: Eu tenho lugar pra mim?...”* Você foi a única pessoa que provocou tantas mudanças maravilhosas em tão pouco tempo! Obrigada pelo seu constante apoio em todos os momentos da minha vida, pela paciência com minha ausência durante esta caminhada e pelas palavras de conforto nos momentos de desânimo. Sem isto, nada faria sentido. Te amo muito e pode contar sempre comigo!

Aos meus irmãos, Renan Camurça e Sâmia Camurça, pelo nosso amor, que é o elo que nos une, fazendo com que palavras sejam inúteis para sabermos que sempre nos apoiaremos em todas as decisões de nossas vidas. Amo vocês!

Aos meus sobrinhos lindos, Leandro Freitas e Maria Clara Freitas, que, mesmo sem terem a consciência, me incentivaram, na busca de sempre ser um exemplo para eles. A tia ama vocês!

Aos meus cunhados Aleandro Freitas e Anna Cecília Bezerra, pela amizade e principalmente pela lealdade com a minha família.

Agradeço a toda minha família, especialmente aos meus avós Isáias Fernandes e Maria do Carmo Camurça, minha segunda mãe, pelo amor incondicional, pelas doces recordações da infância e pelos grandes ensinamentos eternizados. Um carinho especial à tia Ana Lourdes Camurça (Aninha) pelo grande e maior exemplo de amor e dedicação à pesquisa, que, com toda certeza, me impulsionou para a concretização de mais esta importante etapa, o Mestrado. Obrigada tia por ter contribuído sobremaneira na minha escolha pela área da pesquisa.

À família do meu esposo, em especial à minha cunhada e irmã Eneida Porcina Colácio, pela amizade e bons momentos compartilhados. Um agradecimento especial aos meus sogros, Maria das Graças Holanda Guedes e José Guedes Filho (*in memoriam*), por terem me acolhido como uma filha em sua família e fazer sentir que sempre terei seu apoio. Meu sogrinho querido, obrigada pelo carinho dedicado a mim durante o breve período que convivemos juntos. Ainda havia muito a ensinar...

Ao Prof. Dr. José Roberto Viana Silva, meu orientador, pela acolhida, pelos grandes ensinamentos gerados e pela coragem de ousar trabalhar com novas idéias. Muito obrigada por ter acreditado em mim, me possibilitado conhecer a pesquisa e me ensinar a ser aluna de iniciação científica, seguir o caminho e hoje me tornar Mestre.

Agradeço aos meus amigos, Anderson Weiny, Gisvani Lopes e Juliane Passos, companheiros inseparáveis desde a primeira formação do nosso grupo de pesquisa. Obrigada pela amizade, pelas boas risadas e momentos de descontração. Vocês, com certeza, tornaram meus dias de trabalho mais agradáveis, contribuição inigualável para que eu superasse os momentos de obstáculos.

Ao amigo Jackson Costa, companheiro, inteligente, com um coração imenso e sempre disposto a ajudar. Obrigada pelas incansáveis ajudas na RT-PCR em tempo real e nas “várias” repetições das minhas estatísticas. Sem sua agradável companhia, o trabalho teria sido muito mais árduo e sem nenhuma graça!

À amiga Emanuela Rebouças, pelas longas conversas, pela amizade e pela gostosa risada que sempre me anima. Enfim, pelos momentos especiais desde a época da graduação, que jamais serão esquecidos.

À equipe do grupo de pesquisa de Reprodução e Cultura de Células (UFC), Rodrigo Rossi, Glaucinete Borges, Katianne Freitas, Regislane Ribeiro, Moemia Portela, Renato Passos e Diego Tavares pela parceria de trabalho e, principalmente, por me proporcionarem a virtude do trabalho em equipe.

Aos integrantes do Laboratório de Manipulação de Oócitos e folículos pré-antrais (LAMOFOPA – UECE), principalmente ao Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo, por viabilizarem toda a etapa de cultivo folicular *in vitro*. Em especial, agradeço à Márcia Viviane Alves Saraiva e Ivina Rocha Brito, pelo acolhimento e todo suporte oferecido.

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

Ao Núcleo de Biotecnologia de Sobral (NUBIS), pela disponibilidade de equipamentos e todo o apoio técnico necessários à realização de minha pós-graduação.

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

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGB) da UFC, pela capacitação profissional que me concederam.

Agradeço também a todos os funcionários da UFC, pelo carinho com que cuidam da Universidade, contribuindo para o sucesso do Curso de Mestrado.

Aos integrantes da Banca Examinadora, Dra. Maria Helena Tavares de Matos, Dr. Fabricio Sousa Martins, Dr. Rodrigo Maranguape Silva da Cunha, por terem gentilmente

aceito o convite para participar da banca da defesa desta dissertação e pela disposição em contribuir no engrandecimento deste trabalho.

Agradeço, enfim, a todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a efetivação deste sonho.

A todos, muito obrigada!

*“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar.
É melhor tentar, ainda que em vão que sentar-se, fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em casa me esconder.
Prefiro ser feliz embora louco, que em conformidade viver.”*

Martin Luther King

RESUMO

O objetivo deste estudo foi investigar os níveis de RNA mensageiro (RNAm) para ativina-A em folículos pré-antrais e antrais caprinos e os efeitos do hormônio folículo estimulante (FSH), ativina-A e fator de crescimento e diferenciação - 9 (GDF-9) sobre o crescimento e a expressão de RNAm para ativina-A, GDF-9, proteína morfogenética óssea (BMP) -2, -4, -6, -7, -15 e receptor de FSH (R-FSH) em folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro*. Inicialmente, folículos primordiais, primários e secundários, bem como complexos cumulus-oócito (COCs) e células da granulosa mural/teca de pequenos e grandes folículos antrais foram isoladas mecanicamente a partir de ovários de cabra e a expressão de RNAm para ativina-A foi avaliada por PCR em tempo real. Para os estudos *in vitro*, folículos secundários caprinos foram isolados e cultivados por 6 dias na presença de FSH sozinho (50 ng/mL) ou em combinação com ativina-A (100 ng/mL) ou GDF-9 (200 ng/mL). Isoladamente ou em combinação com FSH, a influência de ativina-A na expressão de ativina-A e R-FSH, e o efeito do GDF-9 sobre os níveis de RNAm para GDF-9, R-FSH e BMP -2, -4, -6, -7 e -15 em folículos secundários após 6 dias de cultivo foram testados. Para isso, após a extração do RNA total e síntese do cDNA, os níveis de RNAm para ativina-A, GDF-9, R-FSH e BMP -2, -4, -6, -7 e -15 foram quantificados por PCR em tempo real. Os resultados mostraram que folículos secundários apresentavam níveis menores de RNAm para ativina-A comparado aos folículos primários ($p < 0,05$). Não houve diferença nos níveis de RNAm para ativina-A entre folículos primordial e primário ou secundário ($p > 0,05$). Aliado a isso, não houve diferença entre COCs de pequenos e grandes folículos antrais ($p > 0,05$). Além disso, as células da granulosa e da teca de grandes folículos antrais apresentaram maiores níveis de RNAm para ativina-A do que de pequenos folículos antrais ($p < 0,05$). Quando comparamos a expressão do RNAm para ativina-A entre COCs de pequenos e grandes folículos antrais e suas células da granulosa e da teca, nenhuma diferença nos níveis de expressão foi observada ($p > 0,05$). Após o cultivo *in vitro* de folículos secundários, a presença de FSH sozinho ou associado com ativina-A ou GDF-9 aumentou a sobrevivência, crescimento folicular e formação de antro ($p < 0,05$). O FSH também aumentou o RNAm para ativina-A, enquanto os folículos cultivados com ativina-A apresentaram níveis aumentados de RNAm para R-FSH ($p < 0,05$). Além disso, o GDF-9 diminuiu a expressão de RNAm para BMP -2 e -15 ($p < 0,05$), mas não teve efeito sobre a expressão de BMP -4, -6 e -7 ($p > 0,05$). Em conclusão, durante a transição de folículo primário para secundário há uma diminuição do RNAm para ativina-A, enquanto ocorre um aumento da expressão deste fator durante o crescimento de folículos antrais. FSH, ativina-A e GDF-9 estimulam o crescimento de folículos secundários caprinos após 6 dias de cultivo. Após cultivo folicular, FSH controla a expressão de ativina-A e a expressão do R-FSH é regulada por ativina-A. Ainda, GDF-9 reduz a expressão do RNAm para BMP -2 e -15.

Palavras-chave: ativina-A, BMPs, caprinos, *in vitro*, folículos, FSH, GDF-9, RNAm

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the levels of messenger RNA (mRNA) for activin-A on goat preantral and antral follicles and the effects of follicle stimulating hormone (FSH), activin-A and growth and differentiation factor - 9 (GDF-9) on growth and mRNA expression for activin-A, GDF-9, bone morphogenetic protein (BMP) -2, -4, -6, -7, -15 and FSH receptor (FSH-R) in goat preantral follicles cultured *in vitro*. Initially, primordial, primary and secondary follicles, as well as cumulus-oocyte complexes (COCs) and mural granulosa/theca cells of small and large antral follicles were isolated mechanically from goat ovaries and the expression of mRNA for activin-A was evaluated by real-time PCR. For *in vitro* studies, goat secondary follicles were isolated and cultured for 6 days in the presence of FSH alone (50 ng/mL) or in combination with activin-A (100 ng/mL) or GDF-9 (200 ng/mL). Alone or in combination with FSH, the influence of activin-A on expression of activin-A and FSH-R, and the effect of GDF-9 on the levels of mRNA for GDF-9, FSH-R and BMP -2, -4, -6, -7 and -15 in secondary follicles after 6 days of culture were tested. For this, after extraction of total RNA and cDNA synthesis, the levels of mRNA for activin-A, GDF-9, FSH-R and BMP -2, -4, -6, -7 and -15 were quantified by real time PCR. The results showed that secondary follicles had lower levels of mRNA for activin-A, than compared to primary follicles ($p < 0.05$). There was no difference in levels of mRNA for activin-A between primordial and primary or secondary ($p > 0.05$). Allied to this, there was no difference between COCs of small and large antral follicles ($p > 0.05$). Moreover, granulosa and theca cells of large antral follicles showed higher levels of mRNA for activin-A than in small antral follicles ($p < 0.05$). When comparing mRNA expression for activin-A between COCs from small and large antral follicles and their granulosa and theca cells, no difference in expression levels was observed ($p > 0.05$). After *in vitro* culture of secondary follicles, the presence of FSH either alone or associated with activin-A or GDF-9 increased survival, follicular growth and antrum formation ($p < 0.05$). The FSH increased mRNA for activin-A, while the follicles cultured with activin-A showed increased levels of mRNA for FSH-R ($p < 0.05$). In addition, GDF-9 decreased mRNA expression for BMP -2 and -15 ($p < 0.05$), but had no effect on expression of BMP -4, -6, and -7 ($p > 0.05$). In conclusion, during the transition from primary to secondary follicles there is a reduction of mRNA for activin-A, whereas there is an increased expression of this factor during the growth of antral follicles. FSH, activin-A and GDF-9 stimulate growth of goat secondary follicles after 6-day culture. After follicle culture FSH controls the expression of activin-A, and the expression of FSH-R is regulated by activin-A. Furthermore, GDF-9 reduces the mRNA expression for BMP-2 and -15.

Keywords: activin-A, BMPs, goats, *in vitro*, follicles, FSH, GDF-9, mRNA

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

- FIGURA 1 Representação esquemática do ovário mamífero.....22
- FIGURA 2 Sistemas de cultivo folicular *in vitro*: 2D e 3D. A) Cultivo bidimensional com folículos isolados cultivados sobre o substrato. B) Cultivo tridimensional com folículos isolados cultivados inclusos no substrato33
- FIGURA 3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR): (A) A fita dupla do DNA-alvo sofre aquecimento a 92 a 95°C. (B) O DNA é desnaturado (separação das fitas). (C) Hibridização DNA-DNA de cada primer com as sequências complementares no DNA. (D) A enzima Taq - DNA polimerase realiza a extensão a partir de cada terminal 3' dos primers. (E) Formação de uma nova cópia de DNA.....36
- FIGURA 4 Reação da PCR com SYBRGreen: (A) O DNA dupla fita é separado; (B) DNA desnaturado; (C) Síntese do DNA pela enzima Taq-DNA polimerase; (D) A cor de fluorescência (SYBR) encontra-se inativa; (E) Ligação do fluoróforo entre a fita dupla de DNA que, com a excitação da luz emitida pelo sistema óptico do termociclador, emite uma fluorescência verde e um aumento da fluorescência é observado em tempo real.....38

ARTIGO I

- FIGURA 1 - FIGURE 1 Expression of activin-A mRNA in goat ovarian follicles (means \pm SD). A) primordial, primary and secondary follicles, B) COCs from small and large antral follicles, C) granulosa/theca cells (GT) from small and large antral follicles, D) COCs and GT from small antral follicles, and E) COCs and GT from large antral follicles66
- FIGURA 2 - FIGURE 2 Levels of mRNA for activin-A in goat secondary follicles after culture in MEM alone or supplemented with FSH, activin-A or both.68
- FIGURA 3 - FIGURE 3 Levels of mRNA for FSH-R in goat secondary follicles after culture in MEM alone or supplemented with FSH, activin-A or both.....68

ARTIGO II

- FIGURA 1 - FIGURE 1 Levels of mRNA for GDF-9 on goat secondary follicles after culture in MEM and MEM supplemented with FSH, GDF-9 or both.....87
- FIGURA 2 - FIGURE 2 Levels of mRNA for FSH-R on goat secondary follicles after culture in MEM and MEM supplemented with FSH, GDF-9 or both87
- FIGURA 3 - FIGURE 3 Levels of mRNA for (A) BMP-2, (B) BMP-4, (C) BMP-6, (D) BMP-7 and (E) BMP-15 on goat secondary follicles after culture in MEM and MEM supplemented with FSH, GDF-9 or both88

LISTA DE TABELAS

ARTIGO I

1. Primer pairs used in real-time PCR for quantification of activin-A in fresh and 6-days cultured caprine pre-antral follicles.....64
2. Follicular diameter and antrum formation after culture of secondary follicles in MEM supplemented with FSH, activin-A or both65

ARTIGO II

1. Primer pairs used in real-time PCR for quantification of GDF-9, FSH-R and BMPs in 6-days cultured caprine preantral follicles85
2. Follicular diameter and antrum formation before and after 6-days culture of secondary follicles in MEM and MEM supplemented with FSH, GDF-9 or both86

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ActRIIA	Activin Receptors Type II A
ActRIIB	Activin Receptors Type II B
ActRIB	Activin Receptors Type I B
ALK-4	Activin Receptor-like Kinase Type 4
as	Anti-senso
BMP	Proteína Morfogenética Óssea
BSA	Albumina Sérica Bovina
°C	Graus Celsius
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CGs	Células da granulosa
COCs	Complexos cumulus-oócitos
CO ₂	Dióxido de carbono
CT	Cycle threshold
Cyp26b1	Citocromo P450 26b1
dATP	Deoxyadenosine triphosphate
dCTP	Deoxycytosine triphosphate
dGTP	Deoxyguanine triphosphate
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Desoxirribonuclease
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Fosfatado
dTTP	Deoxythymidine triphosphate
DTT	Dithiothreitol
ER α	Estrogen receptor α
ER β	Estrogen receptor β
FOPA	Folículo ovariano pré-antral

FSH	Hormônio folículo estimulante
g	Gramas
GDF-9	Fator de Crescimento e Diferenciação – 9
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
GT	Células da granulosa/teca
h	Hora
HEPES	Ácido N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-2'-Etanossulfônico
I-SMAD	Mensageiro intracelular inibitório
ITS	Insulina, transferrina e selênio
IU	Unidade Internacional
KL	Kit-ligante
LH	Hormônio luteinizante
log10	Logaritmo de base 10
MEM	Meio Essencial Mínimo
MG	Miligrama
MgCl ²	Cloreto de magnésio
min	Minuto
mL	Mililitros
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MOIFOPA	Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanograma
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
p<0.05	Probabilidade de erro menor do que 5%
p>0.05	Probabilidade de erro maior do que 5%

R-FSH	Receptor para o hormônio folículo estimulante
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
RNA blot	RNA Blotting
RNase	Ribonuclease
RNaseout	Recombinant Ribonuclease Inhibitor
RT-PCR	Transcriptase reversa da reação em cadeia da polimerase
s	Senso
sec	Segundo
SEM	Erro padrão
SMAD	Mensageiro intracelular
TGF- β	Superfamília de fatores de crescimento transformante beta
UBQ	Ubiquitina
ZP	Zona pelúcida
α -MEM	Meio Essencial Mínimo – α
μ g	Micrograma
μ l	Microlitro
μ m	Micrômetro
μ M	Micromolar
\pm SD	Mais ou menos o desvio padrão
%	Porcentagem
~	Aproximadamente

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1. Ovário mamífero.....	20
2.2. Oogênese e foliculogênese.....	20
2.2.1. Folículos primordiais.....	22
2.2.2. Folículos primários.....	23
2.2.3. Folículos secundários.....	23
2.2.4. Folículos antrais.....	24
2.3. População folicular e atresia.....	26
2.4. Hormônio Folículo Estimulante (FSH).....	27
2.5. Ativina-A.....	28
2.6. Fator de Crescimento e Diferenciação-9 (GDF-9).....	30
2.7. Isolamento e cultivo de folículos pré-antrais.....	32
2.8. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	35
2.8.1. PCR em tempo real.....	37
3. HIPÓTESES.....	40
4. JUSTIFICATIVA.....	41
5. OBJETIVOS.....	42
6. ARTIGO I: Levels of mRNA for activin-A in goat ovarian follicles and effect of activin-A and FSH on secondary follicle growth.....	43
7. ARTIGO II: Effects of GDF-9 and FSH in the development of caprine preantral follicles and levels of mRNA for GDF-9, FSH-R and BMPs after <i>in vitro</i> culture.....	69
8. CONCLUSÕES GERAIS.....	90
9. PERSPECTIVAS.....	91
REFERÊNCIAS.....	92

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a caprinocultura vem assumindo importante papel no agronegócio brasileiro deixando de ser uma atividade de subsistência e passando a ter maior destaque como atividade de grande importância econômica, principalmente para a região semi-árida do Nordeste brasileiro. Considerando que o ovário mamífero contém milhares de oócitos inclusos em folículos pré-antrais, a obtenção de oócitos somente a partir de folículos antrais limita o número de nascimentos, assim como a exploração do material genético de animais de elevado potencial econômico (EPPIG e O'BRIEN, 1998; CECCONI *et al.*, 1999).

As biotécnicas associadas à reprodução têm apresentado um crescimento extraordinário, tanto no contexto molecular quanto nos aspectos aplicados. Dentre essas biotecnologias, pode-se destacar a Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais (MOIFOPA), a qual vem sendo bastante explorada por sua potencialidade em aproveitar a abundância oocitária presente no ovário. Através desta técnica, folículos secundários (~ 200 µm) isolados do microambiente ovariano podem ser cultivados *in vitro* até atingirem a fase antral (DUARTE *et al.*, 2010; MAGALHÃES *et al.*, 2010b).

Durante os estágios iniciais da foliculogênese, fatores de crescimento localmente produzidos atuam como importantes reguladores na manutenção da viabilidade e do crescimento folicular (FORTUNE, 2003). Dentre estes fatores de crescimento, podemos incluir as ativinas (McLAUGHLIN *et al.*, 2010) e o GDF-9 (SADEU e SMITZ, 2008), membros da superfamília de fatores de crescimento transformante- β (TGF- β). Por outro lado, gonadotrofinas, como o FSH, também têm sido descritas por promoverem o crescimento e desenvolvimento de folículos em estágios iniciais (GUTIERREZ *et al.*, 2000), evidenciando que durante a transição dos folículos primordiais para primários, e seu posterior crescimento *in vitro* ocorrem influências estágio-específicas de reguladores intra-ovarianos e fatores endócrinos. Com isso, o efeito de vários hormônios e fatores de crescimento têm sido avaliados em sistemas *in vitro* e, recentemente, a maturação de oócitos e produção de embriões *in vitro* foi alcançada em caprinos (MAGALHÃES *et al.*, 2010a; SARAIVA *et al.*, 2010b).

Apesar do sucesso desses estudos, a maturação e fertilização *in vitro* de oócitos oriundos de folículos pré-antrais isolados e cultivados *in vitro* ainda apresenta baixíssima eficiência, com uma pequena taxa de produção de embriões. Neste contexto, o desenvolvimento de um sistema de cultivo que garanta a manutenção da sobrevivência, bem

como, o crescimento folicular *in vitro* é um ponto crucial para a aplicação em larga escala da técnica MOIFOPA. Para alcançar este objetivo, a avaliação do efeito de fatores de crescimento, como ativina-A e GDF-9, e gonadotrofinas durante o crescimento folicular torna-se relevante para uma melhor compreensão dos diversos fatores implicados na foliculogênese inicial e no processo de atresia. Aliado ao cultivo *in vitro*, a obtenção do padrão de expressão temporal dos genes espécie-específicos em cada fase do desenvolvimento folicular, através de técnicas como a PCR em tempo real, contribuirá para o estabelecimento de um meio de cultivo ideal.

Para um maior esclarecimento da importância deste trabalho, a revisão de literatura a seguir abordará aspectos relacionados ao ovário mamífero, oogênese e foliculogênese, atresia folicular, utilização de FSH, ativina-A e GDF-9 no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, técnicas de isolamento e cultivo *in vitro* de folículos ovarianos e PCR em tempo real.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Ovário mamífero

O ovário mamífero é o órgão principal do sistema reprodutivo das fêmeas, o qual é composto por uma região cortical e uma medular, sendo circundado por um epitélio superficial conhecido como epitélio germinativo que repousa sobre uma membrana basal. Logo abaixo, observa-se a túnica albugínea e o estroma ovariano. No córtex ovariano de animais cíclicos podem ser encontrados folículos ovarianos quiescentes, em desenvolvimento ou em atresia, corpos lúteos, corpos albicans e corpos hemorrágicos (MURDOCH, 1996). No córtex, também são encontrados colágenos dos tipos I e III, fibroblastos, vasos sanguíneos, linfáticos e terminações nervosas (HAFEZ, 1995). A região medular é responsável pela nutrição e sustentação do ovário. Ela consiste de tecido conjuntivo, nervos e sistemas vasculares (SMITH *et al.*, 1994) que atingem o ovário pelo hilo (HAFEZ, 1995) (Figura 1).

O ovário exerce duas funções fisiológicas importantes, sendo responsável pela: 1) diferenciação e liberação do oócito maduro para posterior fecundação; 2) síntese de hormônios e diversos peptídeos que são essenciais para o desenvolvimento folicular, ciclicidade e manutenção da gestação (BARNETT *et al.*, 2006). Essa dupla função é um processo interdependente, complementar e necessário para o sucesso da reprodução (PINEDA, 1989). Desta forma, a produção de oócitos ou gametas femininos se dá pela interação de dois fenômenos que ocorrem no ovário, isto é, a oogênese e a foliculogênese (SAUMANDE, 1981).

2.2. Oogênese e foliculogênese

A oogênese, processo de formação dos oócitos, ocorre ainda na vida fetal a partir das células germinativas primordiais (CGPs) derivadas do endoderma do saco vitelínico do embrião. Quando o cromossomo sexual presente nas células germinativas primordiais é o cromossomo X, estas se diferenciam em oogônias (PICTON *et al.*, 1998). Inicialmente, observa-se intensa proliferação celular e redistribuição das organelas citoplasmáticas das CGPs, com a migração destas células, por movimentos amebóides, até a crista genital, onde colonizam uma região que dará origem a gônada primitiva (ADAMS *et al.*, 2008). Dois tipos

de células germinativas com funções diferentes resultam de sucessivas divisões mitóticas. Um tipo permanece em intérfase e divide-se periodicamente, originando novas CGPs que, por sua vez, se diferenciarão em oogônias. O outro tipo celular inicia, imediatamente, outra divisão mitótica e dá origem às oogônias (HIRSHFIELD, 1991). As oogônias diplóides derivadas das CGPs sofrem uma série de divisões mitóticas. Então, ocorre a replicação do DNA e estas células entram em meiose para formação do oócito primário. Durante a fase inicial da primeira meiose, a oogônia é extremamente vulnerável devido à necessidade de grande quantidade de proteínas reparadoras de DNA e vários outros fatores de alinhamento e recombinação do material genético (PICTON *et al.*, 1998). Devido a essa fragilidade, um grande número de oogônias não entram em meiose, sendo eliminadas por apoptose (ALBAMONTE *et al.*, 2008). Nesse estágio, o oócito formado sofre o primeiro bloqueio da meiose, também denominado estágio de dictióteno ou de vesícula germinativa, permanecendo na fase de Prófase I até o indivíduo atingir a maturidade sexual (PICTON, 2001; VAN DEN HURK *et al.*, 2000). O reinício da meiose pelo oócito *in vivo* é iniciado pelo pico ovulatório de LH na puberdade, permitindo que este sofra duas divisões reducionais e se torne uma célula haplóide. Após o pico de LH, ocorre a dissolução da membrana nuclear e condensação da cromatina em um processo denominado de rompimento da vesícula germinativa. A maturação nuclear passa pelos estágios de metáfase I, anáfase I, telófase I e progride até a metáfase II, onde ocorre o segundo bloqueio da meiose (GORDON, 1994). O oócito permanece neste estágio até ser fecundado pelo espermatozóide, quando então, completa a meiose, formando o oócito haplóide fecundado (MOORE e PERSAUD, 1994).

O início da meiose no oócito coincide com o início da formação dos folículos primordiais e, conseqüentemente, do processo de foliculogênese. A foliculogênese é o processo de crescimento dos folículos ovarianos caracterizado por alterações morfológicas acompanhado por um desenvolvimento funcional. Este começa com o recrutamento de folículos primordiais e termina com a ovulação ou morte por atresia (HUSSEIN, 2005).

O folículo é a unidade fundamental do ovário de mamíferos, apresentando duas funções importantes: assegurar a nutrição, o crescimento e a maturação do oócito de forma a permitir a ovulação, bem como produzir hormônios como o estrógeno, e peptídeos como inibina A e B, ativina e folistatina (CORTVRINDT e SMITZ, 2001; ADASHI, 1994). O folículo ovariano é formado por vários tipos celulares, sendo composto por um oócito circundado por células da granulosa e da teca. Durante a foliculogênese, a morfologia folicular é alterada, uma vez que o oócito cresce e as células circundantes se multiplicam e diferenciam (BRISTOL-GOULD e WOODRUFF, 2006).

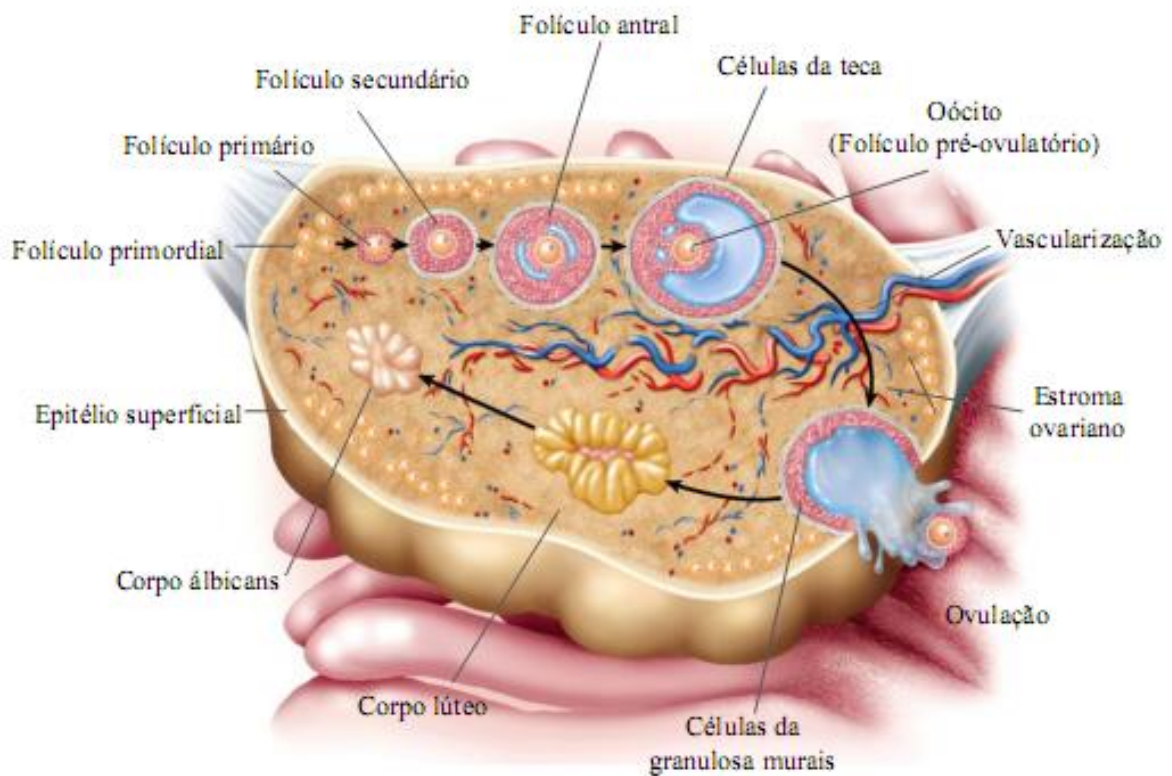


Figura 1. Representação esquemática do ovário mamífero.

Os folículos dividem-se basicamente em duas categorias, ou seja, os folículos pré-antrais (primordiais, primários e secundários), que possuem um oócito circundado por uma ou mais camadas de células somáticas, sem a formação do antro. Já os folículos antrais são caracterizados pela presença de uma área preenchida por fluido folicular, em que, a partir de então, passam a ser classificados como terciários e pré-ovulatórios. Os folículos pré-antrais representam cerca de 90 a 95% de toda a população folicular (FIGUEIREDO *et al.*, 2008). Na fase antral, a maioria dos folículos sofrem atresia, enquanto alguns deles continuam o crescimento e atingem o estágio pré-ovulatório sob um estímulo cíclico de gonadotrofinas, que ocorre após a puberdade (McGEE e HSUEH, 2000).

2.2.1. Folículos primordiais

Os folículos primordiais são os menores folículos do ovário, tendo um diâmetro médio de 33 μm e são observados a partir do 62º dia de desenvolvimento fetal em caprinos (BEZERRA *et al.*, 1998). O número de folículos primordiais ao nascimento em ovários nesta espécie tem sido estimado em 35.000 (LUCCI *et al.*, 1999). Esses folículos são constituídos

por um oócito central quiescente, imaturo e circundado por uma camada de células da pré-granulosa de morfologia pavimentosa. Estas células podem ter duas origens, ou seja, de células dos ductos mesonéfricos que migraram até o ovário ou de células do epitélio superficial do ovário (SILVA, 2005; PICTON, 2001; HEYWOOD *et al.*, 2002). Nesta fase inicial da foliculogênese, os oócitos que não são circundados por células da pré-granulosa, entram em processo de atresia. Os folículos primordiais permanecem quiescentes até seu recrutamento para o grupo de folículos em crescimento (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005). O primeiro sinal do início do crescimento de folículos primordiais, processo conhecido como ativação folicular, é a retomada da proliferação das células da granulosa, com a mudança na morfologia dessas células, de pavimentosa para cúbica, bem como o crescimento oocitário, o que pode acontecer dias, meses ou anos após a sua formação (HIRSHFIELD, 1991).

2.2.2. Folículos primários

A evolução do crescimento dos folículos primordiais está relacionada ao aumento do diâmetro do oócito, bem como a proliferação das células da granulosa (FIGUEIREDO *et al.*, 1994). A atividade de proliferação das células da granulosa resulta na formação de uma camada de células cuboidais ao redor de um oócito central que caracterizam o folículo primário (GOUGEON e BUSSO, 2000). Os folículos primários são observados em ovários de cabras no 71º dia de desenvolvimento fetal (BEZERRA *et al.*, 1998). Nesses folículos, as proteínas que irão formar a zona pelúcida (ZP) já começam a ser sintetizadas e esta estrutura aparece primeiramente ao redor do oócito de folículo primário, como ilhas de material fibrilar situadas em espaços entre as células da granulosa adjacentes e a superfície do oócito (LEE, 2000).

2.2.3. Folículos secundários

Quando os folículos atingem um estágio com mais de duas camadas de células da granulosa cuboidais é, então, denominado secundário. Nesta fase, a zona pelúcida é claramente identificada ao redor do oócito, enquanto fibras de tecido conjuntivo se posicionam paralelamente à membrana basal para formar a camada tecal (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005; PARROT e SKINNER, 1999). As células da teca interna, que se originam a

partir de precursores presente no estroma ovariano, se organizam ao redor dos folículos quando estes apresentam quatro ou mais camadas de células da granulosa (LUCCI *et al.*, 2001). Estas células são endócrinas e desempenham uma função importante na fertilidade, pois sintetizam hormônios esteróides (MAGOFFIN, 2005).

Os folículos secundários são observados em ovários de fetos caprinos aos 80 dias de gestação (BEZERRA *et al.*, 1998). Nesta categoria folicular, com o aumento do metabolismo do oócito, há um acréscimo no número de junções do tipo *gap* entre oócito e células da granulosa, que atuam na comunicação bidirecional, na transferência de nutrientes, metabólitos, fatores de estimulação e/ou inibição da meiose, além de fatores de crescimento, neurotrofinas e hormônios (FORTUNE, 2003; SENEDA e BORDIGNON, 2007). Neste sentido, os sistemas de manipulação *in vitro* de folículos pré-antrais devem manter intactas as comunicações entre as células foliculares e o oócito, no sentido de preservar sua integridade estrutural. Em folículos secundários, ocorre também aumento da vascularização, possibilitando a atuação das gonadotrofinas em oócito e células da granulosa. Em folículos secundários com várias camadas de células da granulosa, as células da teca aumentam o número de receptores de LH e iniciam a síntese de andrógenos, que são convertidos em estrógenos pela enzima aromatase. Neste estágio, observa-se um aumento no número de receptores de FSH nas células da granulosa, amplificando a ação desta gonadotrofina (BUCCIONE *et al.*, 1990; SENEDA e BORDIGNON, 2007).

2.2.4. Folículos antrais

Após o aumento do número de camada de células da granulosa que envolvem o oócito, ocorre a formação de uma cavidade repleta de líquido folicular, entre as camadas de células da granulosa, denominada antro. A partir deste estágio, os folículos passam a ser denominados terciários ou antrais. O fluido folicular torna-se importante em mecanismos de regulação e modulação de substâncias provenientes das células foliculares e da comunicação endócrina que o folículo começa a estabelecer. Durante o desenvolvimento folicular, a produção de fluido antral é intensificada pelo aumento da vascularização folicular e permeabilidade dos vasos sanguíneos, os quais estão fortemente relacionados com o aumento do folículo antral (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005).

Nesse estágio, o oócito aumenta progressivamente o diâmetro e prepara-se para adquirir competência para concluir sua divisão meiótica e, em seguida, para ser fertilizado

(SENEDA e BORDIGNON, 2007). Nos folículos antrais, as células da teca sofrem alterações morfológicas e funcionais e, aquelas células localizadas próximas da membrana basal são denominadas teca interna, enquanto que as localizadas periféricamente são classificadas como teca externa. Já as células da granulosa são diferenciadas em células do *cumulus* (mais próximas ao oócito) e células murais.

O desenvolvimento dos folículos antrais é caracterizado por uma fase de crescimento, recrutamento, seleção e dominância (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005), sendo a formação de folículos pré-ovulatórios um pré-requisito para a ovulação e formação do corpo lúteo, bem como para a manutenção da fertilidade (DRUMMOND, 2006). Portanto, a taxa de ovulação espécie-específica é determinada por mecanismos fisiológicos de seleção dos folículos em crescimento. Em espécies monovulatórias, apenas um folículo é selecionado dentre os recrutados para continuar a crescer e diferenciar-se em folículo ovulatório, enquanto os demais têm como destino a atresia. O folículo selecionado é conhecido como folículo dominante, capaz de bloquear o crescimento e induzir a atresia, pela secreção de estradiol e inibina, dos demais folículos, denominados subordinados (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005).

O desenvolvimento folicular ocorre em um padrão de ondas de crescimento e cada onda é caracterizada pela emergência de um folículo dominante, entre todos que estão em crescimento. Uma a quatro ondas de crescimento e desenvolvimento folicular ocorrem durante um único ciclo estral em ruminantes, e os folículos pré-ovulatórios são derivados da última onda, sendo o processo, diretamente dependente das gonadotrofinas FSH e LH; e, indiretamente, de estrógenos e peptídeos secretados pelo ovário (DISKIN *et al.*, 2002).

Durante o recrutamento inicial, fatores intra-ovarianos e/ou outros fatores desconhecidos estimulam alguns folículos primordiais para iniciar o crescimento, enquanto que o restante dos folículos permanecem em repouso por meses ou anos (McGEE e HSUEH, 2000). A formação do folículo dominante é um processo que envolve o crescimento, proliferação celular e citodiferenciação (SUH *et al.*, 2002).

No último estágio do desenvolvimento folicular, o folículo pré-ovulatório é caracterizado por um oócito circundado por células da granulosa especializadas que são denominadas de células do *cumulus*. As células da granulosa de folículos pré-ovulatórios param de se multiplicar em resposta ao hormônio luteinizante (LH) e iniciam o programa final de diferenciação. A ovulação do oócito e das células do *cumulus* ocorre em resposta ao pico de LH. Em todas as espécies, a formação de folículos pré-ovulatórios ocorre geralmente a partir da puberdade (DRIANCOURT, 2001). Além das gonadotrofinas, peptídeos sintetizados

localmente desempenham papel chave na regulação da fase antral, tanto por meio de mecanismos parácrinos como endócrinos (FORTUNE, 2003).

2.3. População folicular e atresia

A população folicular presente no ovário é bastante heterogênea e localiza-se no córtex ovariano. Na espécie caprina, o número de folículos pré-antrais é de aproximadamente 35.000 folículos por ovário (LUCCI et al., 1999). Todavia, apesar da grande população folicular presente no ovário mamífero, a quase totalidade dos folículos, ou seja, 99,9% não atingem a ovulação, pois morrem por um processo natural denominado atresia, fazendo com que o desenvolvimento de um folículo pré-ovulatório a partir de um folículo primordial seja um evento biológico extremamente raro (FIGUEIREDO et al., 2008).

Na atresia, os folículos ovarianos passam por mudanças degenerativas durante as quais sua integridade é perdida. A maior parte dos oócitos é perdida em estágios diversos de crescimento, bem como em estágios diversos do ciclo ovariano. Tais perdas ocorrem mais frequentemente em estágios avançados do crescimento folicular. A atresia está associada a uma série de mudanças morfológicas e bioquímicas, que variam de acordo com o estágio do crescimento folicular e também com a espécie animal (CUNNINGHAM, 2004). Portanto, a atresia pode ocorrer por via degenerativa (necrose) e/ou apoptótica. A via degenerativa é causada por isquemia, que resulta em algumas alterações na permeabilidade da membrana celular e conseqüente degeneração. Já a via apoptótica, ocorre quando os fatores parácrinos ou endócrinos não são apropriados para suportar o crescimento folicular e/ou diferenciação das células da granulosa (SILVA *et al.*, 2002).

Neste contexto, entende-se que o crescimento do folículo e desenvolvimento até a fase antral requer um complexo de sinalização bidirecional entre o oócito e as células somáticas vizinhas, envolvendo citocinas específicas, fatores de crescimento e gonadotrofinas hipofisárias (ADASHI, 1994; VAN DEN HURK e ZHAO, 2005; DRUMMOND, 2006). Dentre os vários peptídeos que controlam a atresia folicular, demonstrou-se que o FSH é capaz de inibir a apoptose em folículos pré-antrais cultivados *in vitro* (camundongas: BAKER e SPEARS, 1997; mulheres: ROY e TREACY, 1993). Da mesma forma, o GDF-9 protege as células da granulosa de folículos pré-antrais contra a apoptose (ORISAKA *et al.*, 2006). Além disso, após cultivo de curta-duração, a ativina-A reduziu o número de folículos em

desenvolvimento atresicos e esses efeitos não foram neutralizados quando a folistatina foi adicionada ao meio de cultivo (SILVA *et al.*, 2006).

2.4. Hormônio Folículo Estimulante (FSH)

O FSH é um hormônio chave no controle do desenvolvimento folicular na fase antral, estimulando a emergência das ondas foliculares, sendo o seu declínio associado com a seleção de um folículo dominante o qual se desenvolverá e passará a ser dependente de LH. Com isso, os folículos são considerados dependentes de FSH até a ocorrência da dominância, após o que eles se tornam dependentes de LH (FORTUNE *et al.*, 2001). No entanto, o papel das gonadotrofinas no controle do desenvolvimento folicular pré-antral é controverso, uma vez que os folículos pré-antrais e antrais iniciais possuem RNAm para receptores de FSH nas células da granulosa, mas são relativamente independentes de gonadotrofinas durante seu período de crescimento inicial, aumentando em tamanho na ausência ou presença de baixas concentrações de FSH e LH (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005). Por outro lado, receptores de FSH (R-FSH) podem ser detectados em folículos primários e secundários (bovinos: WANDJI *et al.*, 1992, caprinos: SARAIVA *et al.*, 2010a) e a estimulação do desenvolvimento folicular pré-antral pode ser alcançada pela adição de FSH ao meio de cultivo, demonstrando que esta fase é responsiva à este hormônio.

O controle da liberação de FSH é feito por inibina e estrógenos que atuam diretamente na hipófise anterior (ROCHE, 1996). O mecanismo de ação das gonadotrofinas nas suas células-alvo ocorre através de receptores específicos na superfície celular. O FSH atua nas células da granulosa e o LH possui receptores nas células da granulosa, células da teca e, ainda, no corpo lúteo.

Em bovinos, durante cultivo de pequenos folículos pré-antrais (30-70 μm), o FSH promoveu um aumento do diâmetro folicular (HULSHOF *et al.*, 1995). A adição de FSH no meio de cultivo promoveu a inibição de apoptose e a formação de antro em grandes folículos secundários isolados suínos (MAO *et al.*, 2002). Após seis dias de cultivo na presença de FSH, folículos primários e secundários (60-179 μm), isolados enzimaticamente de ovários de fetos bovinos, aumentaram o diâmetro, a sobrevivência folicular, bem como a secreção de progesterona e estradiol (WANDJI *et al.*, 1996). Aliado a isso, a ativação e o crescimento de folículos pré-antrais caprinos foram observados após adição de FSH ao meio de cultivo *in vitro* (MATOS *et al.*, 2007). Por outro lado, estudos têm mostrado que o sucesso desses

sistemas de cultivo *in vitro* na presença de FSH é influenciado por fatores, como a origem desta gonadotrofina (MAGALHÃES *et al.*, 2009) e o cultivo em meio sequencial (SERAFIM *et al.*, 2010).

Diferentemente do estágio pré-antral, o desenvolvimento folicular antral é criticamente dependente do suporte das gonadotrofinas. Embora pelo menos 80% dos oócitos bovinos coletados de folículos antrais sofram maturação nuclear espontaneamente em cultivo, são adicionadas gonadotrofinas ao meio de maturação (CALDER *et al.*, 2003). O FSH é adicionado para induzir maturação citoplasmática, expansão do *cumulus* e assim melhorar a eficiência do processo de maturação, mediando a produção de fatores pelas células somáticas que circundam o oócito (GILCHRIST *et al.*, 2004; SIRARD *et al.*, 2007).

2.5. Ativina-A

A superfamília TGF- β é composta por algumas proteínas com potentes ações reguladoras intra-ovarianas. Dentre esses peptídios, podemos incluir as ativinas, que foram primeiramente identificadas como proteínas gonadais que estimulam a síntese e secreção do FSH pela hipófise anterior em um ciclo clássico de *feedback* (KATAYAMA *et al.*, 1990).

As ativinas são glicoproteínas diméricas que são compostas de duas subunidades β de inibina, A ou B, e existem como homo ou heterodímeros. Assim, existem três isoformas de ativina: A, AB e B, em que ativina A é a isoforma predominante (McLAUGHLIN *et al.*, 2010). A inibina é o antagonista funcional da ativina, o qual consiste em um heterodímero de uma única subunidade α com qualquer uma das duas subunidades β compartilhadas para formar inibina A ($\alpha\beta A$) ou inibina B ($\alpha\beta B$) (KRETSER e ROBERTSON, 1989). Assim, ativina e inibina são estruturalmente relacionadas e, além disso, compartilham uma via de sinalização em comum. Desta forma, a inibina antagoniza a ação de ativina por competição pelas subunidades β ou pela ligação com receptores de ativina tipo II (MATHEWS e VALE, 1991). Um co-receptor, β -glycan, é o mediador desta última ação (BERNARD *et al.*, 2001; LEWIS *et al.*, 2000).

A transdução de sinal de ativina-A é mediada por um complexo de receptores tipo I e tipo II serina/treonina quinases/proteína Smad. Após a ligação do ligante, o receptor do tipo II fosforila o receptor do tipo I em múltiplos resíduos de serina e treonina. Dois receptores do tipo II foram identificados por se ligarem à ativina-A com alta afinidade e especificidade, conhecidos como ActRIIA e ActRIIB. O receptor de ativina IB (ALK4) interage com os

receptores do tipo II ativados para a transdução de sinais de ativina-A (KIPP *et al.*, 2007). Para transmitir os sinais intracelulares, os receptores do tipo I fosforilam proteínas efetoras (Smads 2 e 3). Uma vez ativadas, as SMADs 2 e 3 associam-se com co-SMADs (SMAD 4), formando um complexo que é translocado para o núcleo, onde participam ligando-se ao DNA e recrutando co-fatores transcricionais. A SMAD 7, por sua vez, pode ser encontrada tanto no citosol quanto no núcleo e foi identificada como uma SMAD inibitória (I-SMAD), uma vez que se liga diretamente a receptores do tipo I, impedindo, assim, a sua interação com as SMADs 2 e 3 e, portanto, bloqueando esta via de sinalização (ETHIER e FINDLAY, 2001; MASSAGUE e CHEN, 2000; HELDIN *et al.*, 1997).

As proteínas para os receptores de ativina dos tipos A e B já foram demonstradas em folículos pré-antrais de bovinos (HULSHOF *et al.*, 1997) e suínos (VAN DEN HURK e VAN DE PAVERT, 2001). Em ovários de cabra, tanto o RNAm como a proteína para os receptores de ativina foram demonstrados em todas as fases foliculares (SILVA *et al.*, 2004d). Por outro lado, as SMADs 2 e 3 têm sido demonstradas em ovários pós-natal de mamíferos (DRUMMOND *et al.*, 2003; BILLIAR *et al.*, 2004). O RNAm para ativina-A em folículos pré-antrais de suínos foi demonstrado por hibridização *in situ* (VAN DEN HURK e VAN DE PAVERT, 2001). Em caprinos, o RNAm para a subunidade β A de inibina foi demonstrado em folículos primordiais, primários, secundários e antrais (SILVA *et al.*, 2004d). A subunidade β A de inibina da ativina é expressa pelas células germinativas imediatamente antes da formação de folículos primordiais, mas não pelo oócito de folículos primordiais (MARTINS DA SILVA *et al.*, 2004). A proteína ativina-A foi detectada em oócitos e células da granulosa de folículos pré-antrais de ovinos (McNATTY *et al.*, 1999), suínos (VAN DEN HURK e VAN DE PAVERT, 2001) e ratos (ZHAO *et al.*, 2001). Em bovinos, a proteína ativina-A foi detectada em oócitos e células da granulosa de folículos pré-antrais (HULSHOF *et al.*, 1997) e antrais (SILVA *et al.*, 2003).

Durante o cultivo *in vitro*, a ativina-A promoveu a proliferação de células da granulosa isoladas de folículos pré-antral e antral inicial em ovários de ratas (MIRO e HILLIER, 1996). Estudos com bovinos relataram que ativina-A suportou o crescimento de folículos primários e secundários (HULSHOF *et al.*, 1997). Nesta mesma espécie, no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais na presença de ativina ocorreu a proliferação de células somáticas, formação da cavidade antral e manutenção da morfologia do oócito normal (McLAUGHLIN *et al.*, 2010). Quando testada em folículos primordiais e primários de cabra, a ativina-A estimulou a ativação, crescimento e aumentou a percentagem de folículos saudáveis (SILVA *et al.*, 2006). Por outro lado, em camundongos mutantes deficientes em receptores de ativina do tipo II B, o

desenvolvimento folicular foi retido no estágio antral inicial, sugerindo um importante papel de ativina na promoção da proliferação/diferenciação em células da granulosa (MATZUK *et al.*, 1996). Este fator de crescimento ainda atua na regulação do receptor de FSH, expressão de aromatase FSH-induzida e diminuição da produção de andrógenos por células da teca (KNIGHT e GLISTER, 2006). A ativina também regula a esteroidogênese ovariana em primatas (ALAK *et al.*, 1998) e a expressão de genes para receptor de estrógeno (ER α e ER β) em ovários de ratas (KIPP *et al.*, 2007).

Os efeitos intra-ovarianos de ativina-A também incluem a promoção da maturação meiótica de oócitos em roedores (SADATSUKI *et al.*, 1993), primatas (ALAK *et al.*, 1996) e humanos (ALAK *et al.*, 1998) e o desenvolvimento de oócitos competentes em bovinos (SILVA e KNIGHT, 1998). Além disso, ativina-A reduz a luteinização de células da granulosa luteinizadas humanas envolvidas na formação luteal e esses efeitos são opostos aos da gonadotrofina coriônica humana (MYERS *et al.*, 2008).

2.6. Fator de Crescimento e Diferenciação – 9 (GDF-9)

Os sinais parácrinos do oócito desempenham um papel ativo na coordenação da proliferação e diferenciação das células da granulosa ao seu redor (GILCHRIST *et al.*, 2004). Neste sentido, dentre os vários peptídeos derivados do oócito que controlam o crescimento de folículos pré-antrais mamíferos, inclui-se o fator de crescimento e diferenciação – 9 (GDF-9), membro da superfamília TGF- β (VITT e HSUEH, 2002).

A ação inibitória (esteroidogênese) versus estimulatória (proliferação celular) do GDF-9 é mediada por um complexo intracelular de receptores serina/treonina quinase dos tipos I e II. Estudos utilizando células da granulosa indicaram que GDF-9 interage com o receptor de BMP do tipo II (BMPII), seguido pela ativação específica do receptor de ativina do tipo I ligado à quinase 5 (ALK 5), e posterior fosforilação das proteínas SMADs 2 e 3 caracterizada pela estimulação do promotor CAGA (CHANG *et al.*, 2002; MAZERBOURG *et al.*, 2004; SUDO *et al.*, 2004).

Em roedores, o RNAm e a proteína ALK 5 e as proteínas SMAD 2/3 são expressas no oócito, células da granulosa e células da teca de folículos pré-antrais e antrais (JUNEJA *et al.*, 1996), indicando que GDF-9 interage com células foliculares em todos os estágios de desenvolvimento do folículo ovariano. Já a expressão do RNAm para o receptor de BMP do tipo II foi observada somente nas células da granulosa (ERICKSON e SHIMASAKI, 2003).

A expressão do RNAm para GDF-9 foi demonstrada no oócito de folículos em diversas espécies (roedores: HAYASHI *et al.*, 1999; ovinos: JUENGEL *et al.*, 2002; bovinos: PENNETIER *et al.*, 2004; caprinos: SILVA *et al.*, 2004c). O GDF-9 pode ser secretado por células da granulosa de bovinos (SPICER *et al.*, 2008), caprinos (SILVA *et al.*, 2004c) e primatas (DUFFY, 2003). A expressão oócito-específica da proteína GDF-9 foi relatada em camundongo (McGRATH *et al.*, 1995), humano (AALTONEN *et al.*, 1999; SADEU e SMITZ, 2008) e rato (JAATINEN *et al.*, 1999). Além disso, a expressão da proteína GDF-9 *in vitro* ocorre após 2 dias de cultivo de ovários fetais de hamster (WANG e ROY, 2004).

Em sistemas de cultivo *in vitro*, o GDF-9 promove funções celulares específicas, como o crescimento do oócito, proliferação de células da granulosa e diferenciação das células da teca (SADEU e SMITZ, 2008). O GDF-9 endógeno exerce um papel essencial na diferenciação de células somáticas em células da pré-granulosa, controlando a formação de folículos primordiais (WANG e ROY, 2006). Em modelos de camundongos knockout, a falta do gene GDF-9 funcional causa infertilidade através do bloqueio da foliculogênese no estágio de folículos primários, ausência de formação de células da teca e defeitos na competência meiótica do oócito, indicando que esse fator está associado com o desenvolvimento folicular inicial (DONG *et al.*, 1996). Em humanos, o GDF-9 estimula a manutenção da viabilidade folicular e a proliferação de células da granulosa (HREINSSON *et al.*, 2002). Já em bovinos, o GDF-9 estimula a proliferação de células da granulosa (SPICER *et al.*, 2006) e de células da teca (SPICER *et al.*, 2008). Aliado a isso, o GDF-9 promove a sobrevivência, bem como a progressão de folículos primordiais humanos para o estágio de folículos secundários após cultivo de curta duração (HREINSSON *et al.*, 2002). No que se refere à espécie caprina, o GDF-9 mantém a sobrevivência de folículos pré-antrais e promove a ativação de folículos primordiais. Além disso, o GDF-9 estimula a transição de folículos primários para secundários, mantendo a integridade ultraestrutural dos folículos (MARTINS *et al.*, 2008).

O GDF-9 desempenha um importante papel na foliculogênese antral, participando no processo de expansão do *cumulus* em camundongos (DRAGOVIC *et al.*, 2005). Da mesma forma, o GDF-9 está envolvido no desenvolvimento do fenótipo normal de células do *cumulus* (GILCHRIST *et al.*, 2006; YEO *et al.*, 2008). Em bovinos, este fator atua regulando a esteroidogênese através da inibição da produção de estradiol e progesterona em células da granulosa, inibição de progesterona e androstenediona em células da teca e diminuição dos níveis de RNAm para o receptor de LH (R-LH) (SPICER *et al.*, 2006, 2008). Além disso, o GDF-9 atua no desenvolvimento de folículos pré-ovulatórios (JUENGEL *et al.*, 2002) por meio da supressão da apoptose das células da granulosa, controlando a atresia do folículo

ovariano (ORISAKA *et al.*, 2006). A imunização a curto prazo contra o peptídeo GDF-9 resultou em um aumento da taxa de ovulação, sem aparentes efeitos negativos sobre a fertilização de oócitos liberados, a capacidade de oócitos fertilizados submetidos a um desenvolvimento fetal normal, ou sobre a capacidade de ovelhas imunizadas em manter a gestação (JUENGEL *et al.*, 2004).

2.7. Isolamento e cultivo de folículos pré-antrais

Para a aplicação da biotécnica de manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais (MOIFOPA), é importante definir a melhor metodologia de isolamento dos folículos de forma a se obter o maior número, com a melhor viabilidade possível, para então se proceder as técnicas de crescimento e cultivo *in vitro* (TELFER, 1996). Neste sentido, os métodos de isolamento mecânico, digestão proteolítica pelo uso de enzimas ou isolamento mecânico em combinação com dissociação enzimática parcial têm sido muito utilizados para isolar um grande número de folículos primários e/ou secundários intactos de ovários de diferentes espécies para posterior cultivo *in vitro* (cabras: LUCCI *et al.*, 1999; ovelhas: CECCONI *et al.*, 1999; vacas: FIGUEIREDO *et al.*, 1995; ratas: ZHAO, 2000; camundongas: LENIE *et al.*, 2004; PESTY *et al.*, 2007).

Nos procedimentos mecânicos, a fragmentação da estrutura do estroma ovariano pode ser feita através de diferentes instrumentos para promover o isolamento de folículos pré-antrais. Um dos métodos consiste de uma fragmentação do tecido ovariano, utilizando o *tissue chopper*, seguido de repetidas pipetagens com pipetas pasteur de 1000 μm e 500 μm . Com este procedimento mecânico, folículos primordiais, primários e secundários podem ser isolados. O método mecânico utilizando o *tissue chopper* para o isolamento de folículos pré-antrais tem proporcionado a recuperação de um grande número de folículos com baixa porcentagem de oócitos desnudos, graças à preservação da membrana basal (FIGUEIREDO *et al.*, 1993; GOSDEN e TELFER, 1987). Outro procedimento mecânico que tem sido utilizado é a técnica de microdissecação, que permite o isolamento de grandes folículos pré-antrais ($\sim 200\mu\text{m}$) do estroma ovariano com o auxílio de agulhas. Esta técnica possibilita a manutenção da integridade das camadas tecais presentes em grandes folículos pré-antrais (TELFER, 1998). A separação mecânica entre o folículo intacto e o estroma adjacente tende a ser um método mais barato, porém, geralmente com o rendimento menor de folículos isolados em comparação ao método enzimático (FIGUEIREDO *et al.*, 1993; HULSHOF *et al.*, 1994;

LUCCI *et al.*, 1999; AMORIM *et al.*, 2000b). Desta forma, o isolamento de folículos pré-antrais do microambiente ovariano utilizando métodos mecânicos têm sido comumente aplicado em várias espécies (bovinos: ITOH *et al.*, 2002; caprinos: ARUNAKUMARI *et al.*, 2007; ovinos: AMORIM *et al.*, 2000a).

Neste sentido, a aplicação de sistemas *in vitro* utilizando estes folículos isolados têm sido possível, o que permite o monitoramento diário do crescimento, bem como a análise do efeito de hormônios e fatores de crescimento sobre cada categoria folicular (ABIR *et al.*, 2001). Os sistemas de cultivo adotados apresentam variações como em termos do tipo de contato do folículo com o substrato, podendo ser divididos em: (i) cultivos em que é feita a internalização do folículo no substrato (sistema tridimensional (3D) e (ii) cultivos em que o folículo fica sobre o substrato (sistema bidimensional (2D) (Figura 2; DEMEESTERE *et al.*, 2002; PANGAS *et al.*, 2003; BASSO *et al.*, 2007; FIGUEIREDO *et al.*, 2008). Considerando as duas formas de sistemas de cultivo descritas, observa-se uma predominância de metodologias de cultivo 2D nos estudos *in vitro* da foliculogênese inicial. O crescimento de folículos pré-antrais em placas com multi-poços (NATION e SELWOOD, 2009), assim como cultivo em microgotas (NATION e SELWOOD, 2009; CORTVRINDT *et al.*, 1996; ADAM *et al.*, 2004; MOUSSET-SIMEON *et al.*, 2005) produziu oócitos maduros. Além disso, a maturação *in vitro* de folículos pré-antrais em gel de colágeno e fertilização *in vitro* de oócitos MIV resultou no nascimento de camundongos (EPPIG e SCHROEDER, 1989).

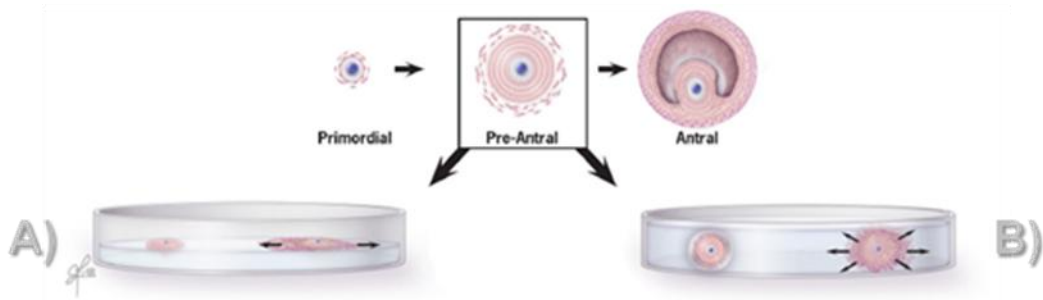


Figura 2. Sistemas de cultivo folicular *in vitro*: 2D e 3D. A) Cultivo bidimensional com folículos isolados cultivados sobre o substrato. B) Cultivo tridimensional com folículos isolados cultivados inclusos no substrato. Adaptado de DESAI *et al.*, 2010.

No desenvolvimento de um sistema de cultivo de folículos pré-antrais eficiente é essencial que ocorra um controle irrestrito de todas as variáveis que possam afetar direta ou indiretamente o ambiente, tais como, temperatura, CO₂, tensão de oxigênio, controle de

contaminações fúngicas e bacterianas, e fatores referentes ao meio de cultivo como a presença de sais inorgânicos, vitaminas, substratos energéticos, aminoácidos dentre outras substâncias (SILVA *et al.*, 2004a,b; TELFER, 2001). Existe uma variedade de meios que são utilizados no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, dentre eles podemos citar o Meio Essencial Mínimo - MEM (MATOS *et al.*, 2007; BRUNO *et al.*, 2008), Waymouth (MURUVI *et al.*, 2005) e McCoy's (TELFER *et al.*, 2008). Recentemente, o meio de cultura denominado α -MEM tem se mostrado eficaz para promover o crescimento de folículos pré-antrais isolados (DUARTE *et al.*, 2010), tendo sido alcançada a maturação oocitária e produção de embriões caprinos (MAGALHÃES *et al.*, 2010a; SARAIVA *et al.*, 2010b).

Dentre os diferentes nutrientes e suplementos adicionados ao meio de cultivo para promover o crescimento e o desenvolvimento folicular *in vitro*, inclui-se a combinação de insulina, transferrina e selênio (ITS) (AUGUSTIN *et al.*, 2003). Da mesma forma, a utilização do ácido ascórbico nos meios de cultivo tem se mostrado importante, uma vez que este suplemento age como um potente antioxidante, podendo reduzir os danos causados pela ação de espécies reativas de oxigênio e complexos metal-oxigênio ao DNA, proteínas, carboidratos, lipídios e membranas celulares (SIES *et al.*, 1992). Por exemplo, a combinação de ácido ascórbico e FSH manteve a integridade, promoveu a ativação e o crescimento folicular após cultivo *in vitro* de longa duração de folículos pré-antrais caprinos (ROSSETTO *et al.*, 2009). Destaca-se ainda a albumina sérica bovina (BSA), utilizada como fonte protéica. Por outro lado, gonadotrofinas exógenas, como o FSH, e diversos fatores de crescimento têm demonstrado atuar positivamente no crescimento de folículos pré-antrais durante o cultivo *in vitro* em diferentes espécies (WANDJI *et al.*, 1996; GUPTA *et al.*, 2002).

Durante o crescimento e desenvolvimento dos folículos ovarianos cultivados *in vitro*, para que as células foliculares possam se multiplicar de forma adequada, é imperativo que o ciclo celular transcorra de forma harmoniosa. Para tal, as células produzem proteínas que regulam, estimulam e inibem o ciclo celular. Sinais provenientes do meio extracelular, dos quais fazem parte os fatores de crescimento, regulam a expressão destas proteínas fazendo com que as células entrem ou saiam do ciclo mitótico (GOLIAS *et al.*, 2004). Em paralelo, uma vez que as proteínas expressas dentro da célula determinam sua biologia, descrições amplas da constituição protéica e da escala de expressão temporal dos genes será a base para a compreensão precisa da diferenciação celular.

Diante destas informações, para compreender melhor o papel de hormônios e fatores de crescimento em ovários mamíferos, além do cultivo *in vitro*, é importante quantificar e identificar as várias substâncias envolvidas nas diferentes etapas do desenvolvimento

folicular. Portanto, diferentes técnicas, como a PCR em tempo real, podem ser empregadas para a análise da expressão de proteínas e receptores envolvidos na foliculogênese antes e depois do cultivo, culminando em uma expansão do conhecimento biológico.

2.8. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Nas últimas décadas, o aperfeiçoamento de técnicas de biologia molecular permitiram surgir formas de diagnóstico baseadas no estudo do sequenciamento e expressão de genes específicos. O principal marco na aplicação das técnicas moleculares foi o desenvolvimento da Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction – PCR*), um método de clonagem *in vitro* proposto por Kary Mullis em 1984 (MULLIS e FALLOONA, 1987). A PCR é uma técnica analítica extremamente sensível na qual se obtém o enriquecimento de um fragmento específico de DNA por meio de sua duplicação em modo exponencial (SILVA-PEREIRA, 2003).

A técnica de PCR é uma metodologia poderosa para a amplificação *in vitro*, de sequências de DNA usando oligonucleotídeos iniciadores ou *primers* de sequência conhecida e complementares às extremidades do segmento a ser amplificado, direcionando a síntese de DNA-alvo, em ciclos repetidos (MULLIS, 1990). Para esta reação, utiliza-se da enzima *Taq*-DNA polimerase extraída da bactéria termoestável *Thermus aquaticus*, sendo realizada em um termociclador. Além da enzima *Taq* - DNA polimerase, os constituintes desta reação são o DNA, os iniciadores (*primers*), os desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), cloreto de magnésio ($MgCl^2$) e um tampão.

A sequência-alvo do genoma é amplificada pela repetição de ciclos de diferentes temperaturas que ocorrem em cadeia (KREUZER e MASSEY, 2002). Cada ciclo de PCR envolve três etapas: desnaturação, anelamento e extensão. A etapa de extensão envolve a adição de nucleotídeos utilizando como molde a sequência-alvo, de maneira que uma cópia desta sequência é feita no processo. Este ciclo é repetido por algumas dezenas de vezes. Uma vez que a quantidade de DNA da sequência-alvo dobra a cada ciclo, a amplificação segue uma progressão geométrica, de maneira que, depois de apenas 20 ciclos, produz-se mais de um milhão de vezes a quantidade inicial de sequência-alvo (Figura 3; ANTONINI *et al.*, 2004).

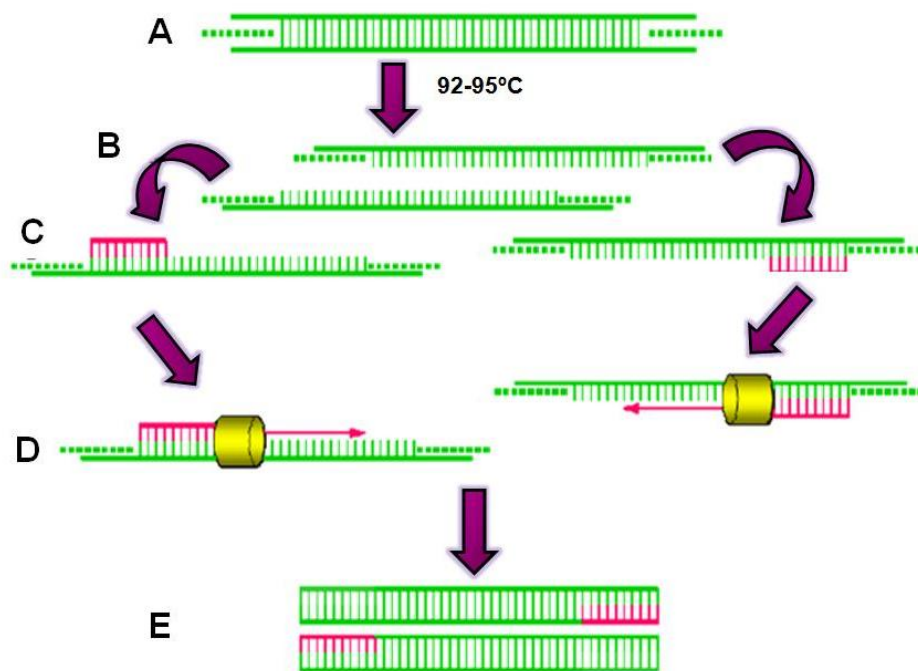


Figura 3: Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

(A) A fita dupla do DNA-alvo sofre aquecimento a 92 a 95°C. (B) O DNA é desnaturado (separação das fitas). (C) Hibridização DNA-DNA de cada *primer* com as sequências complementares no DNA. (D) A enzima *Taq* - DNA polimerase realiza a extensão a partir de cada terminal 3' dos *primers*. (E) Formação de uma nova cópia de DNA.

O método de PCR convencional apresenta forte restrição como técnica analítica quantitativa. Isso ocorre porque a quantidade de produto de amplificação gerado é essencialmente o mesmo, independente da quantidade original de moléculas-molde de DNA presente na amostra. Assim, a PCR convencional permite apenas a distinção entre amostras positivas e negativas para determinado molde de DNA, uma vez que os resultados não são quantificados (expressos em números) e a visualização é feita através do tingimento do DNA com brometo de etídeo, podendo ocorrer contaminações (KUBISTA *et al.*, 2006). Desta forma, para uma análise quantitativa e mais segura da expressão de sequências-alvo, faz-se necessária a utilização de uma técnica mais precisa, definida como PCR quantitativo em tempo real.

2.8.1. PCR em tempo real

Uma inovação tecnológica resultante da PCR convencional, denominada de PCR em tempo real, vem ganhando espaço como técnica empregada para diagnóstico, por apresentar capacidade de gerar resultados quantitativos. Desta forma, essa técnica permite o acompanhamento da reação e a apresentação dos resultados de forma mais precisa e rápida, em relação a PCR convencional. Além disso, na PCR em tempo real não requer o uso de gel de agarose, onde a discriminação é baseada apenas no tamanho do fragmento de DNA amplificado. Neste tipo de análise as amplificações podem ser monitoradas em tempo real, os ciclos são mais rápidos e pode requerer até 1000 vezes menos DNA que a PCR convencional na amplificação (HOLLAND *et al.*, 1991; HEID *et al.*, 1996; NOVAIS e PIRES-ALVES, 2004).

Higuchi *et al.* (1992) foram os pioneiros na análise da cinética da reação de PCR através da construção de um sistema que detecta os produtos de PCR no momento em que são gerados baseados na tecnologia de fluorescência (ZIPPER *et al.*, 2004). Por isso, corantes assimétricos de cianina como o *SYBRGreen* que apresenta seletividade, alta sensibilidade por fita dupla de DNA, capacidade de fluorescência quando excitado com luz ultravioleta, além de estabilidade térmica (ZIPPER *et al.*, 2004) tornou a PCR um processo capaz de ser acompanhado no momento em que acontece.

O sistema analítico de PCR em tempo real utilizando o marcador *SYBRGreen* se baseia na ligação do fluoróforo entre a fita dupla de DNA que, com a excitação da luz emitida pelo sistema óptico do termociclador, emite uma fluorescência verde. Assim, a reação é monitorada continuamente e um aumento da fluorescência é observado em tempo real. No ciclo seguinte, na etapa de desnaturação, as moléculas de *SYBRGreen* são liberadas e há uma queda no sinal da fluorescência. A detecção da fluorescência no fim da etapa de extensão de cada ciclo da PCR permite monitorar a quantidade crescente de DNA amplificado (Figura 4; VITZTHUM *et al.*, 1999).

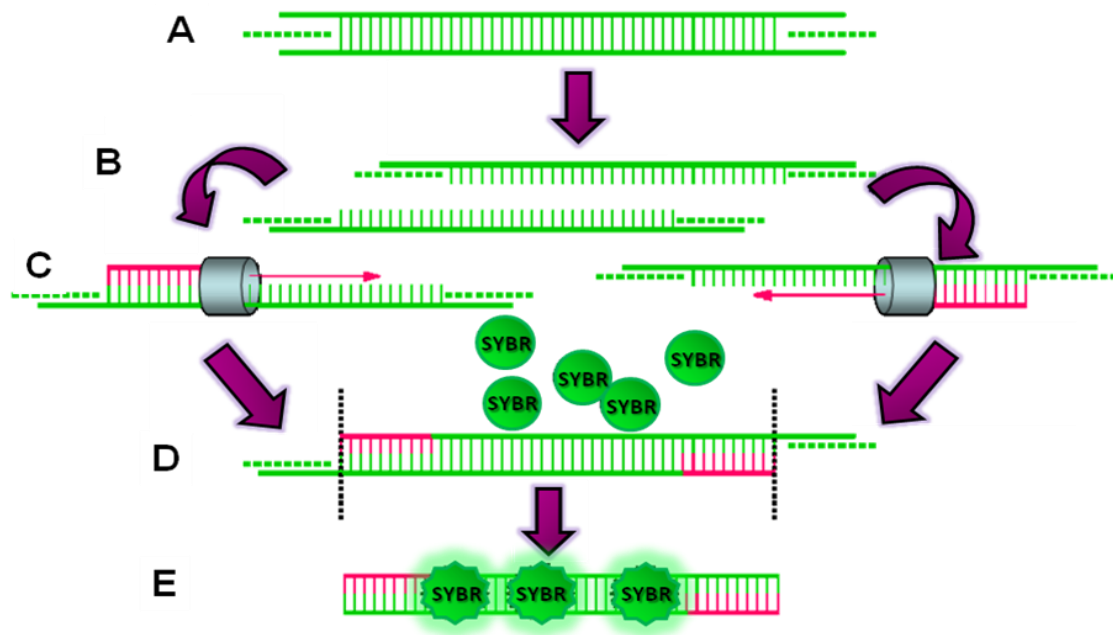


Figura 4: Reação da PCR com SYBRGreen

(A) O DNA dupla fita é separado; (B) DNA desnaturalizado; (C) Síntese do DNA pela enzima *Taq*-DNA polimerase; (D) A cor de fluorescência (SYBR) encontra-se inativa; (E) Ligação do fluoróforo entre a fita dupla de DNA que, com a excitação da luz emitida pelo sistema óptico do termociclador, emite uma fluorescência verde e um aumento da fluorescência é observado em tempo real.

Muitos parâmetros devem ser controlados para se obter uma medida de expressão quantitativa confiável: quantidades iniciais de amostra, assim como qualidade da extração do RNA e eficiência da síntese de cDNA no caso da PCR-transcriptase reversa (RT-PCR). A técnica frequentemente utilizada para normalizar os parâmetros citados é a utilização de um gene de controle interno (gene de referência ou *housekeeping*). De acordo com critérios geralmente aceitáveis, um gene de normalização adequado é um gene que não apresente variação na sua expressão em todas as amostras investigadas (ANDERSEN *et al.*, 2004).

Vale ressaltar que dentre a variedade de genes de referência conhecidos, é importante identificar quais são os normalizadores mais adequados, com maior estabilidade de expressão, e o número mínimo de genes requerido, no modelo biológico em estudo, para o cálculo de um fator de normalização confiável (VANDESOMPELE *et al.*, 2002). Por exemplo, em folículos pré-antrais de caprinos os genes de referência que se mostraram mais adequados como

controle endógeno para a normalização das quantidades de cDNA durante análises de PCR em tempo real foram a β -actina e ubiquitina (FROTA *et al.*, 2010).

Diante do exposto, o desenvolvimento e aprimoramento da técnica de PCR em tempo real tem permitido identificar os mecanismos moleculares envolvidos com cada fase de desenvolvimento folicular, através da quantificação dos níveis de RNAm de diversas substâncias em folículos ovarianos (FEI *et al.*, 2010; SUGIMOTO *et al.*, 2010; CELESTINO *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2010). Com isso, a análise da expressão do RNAm para fatores de crescimento, gonadotrofinas e seus receptores antes e após o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais é de extrema importância para a elucidação do complexo processo de foliculogênese, o que contribuirá para o estabelecimento de um meio de cultivo ideal.

3. HIPÓTESES

- 1) O RNA mensageiro para ativina-A é expresso em diferentes níveis em folículos primordiais, primários e secundários, bem como em COCs e células da granulosa mural/teca de pequenos e grandes folículos antrais em caprinos;
- 2) Ativina-A e FSH influenciam positivamente o crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos durante 6 dias de cultivo e controlam a expressão de RNAm para ativina-A e R-FSH;
- 3) GDF-9 e FSH suportam o crescimento e desenvolvimento de folículos pré-antrais caprinos durante cultivo *in vitro* de 6 dias e afetam os níveis de RNAm para GDF-9 e R-FSH, assim como para BMPs -2, -4, -6, -7 e -15 em folículos secundários cultivados.

4. JUSTIFICATIVA

O ovário de fêmeas mamíferas contém milhares de gametas inclusos em folículos pré-antrais (folículos primordial, primário e secundário) que são potencialmente fertilizáveis. Porém, a capacidade de utilização destes gametas é baixíssima, pois menos de 0,1% desses folículos se desenvolvem, sofrem maturação e ovulam, sendo a maioria perdida naturalmente pelo processo de atresia. Este trabalho foi direcionado para o estudo do crescimento e da expressão de RNAm em folículos pré-antrais na espécie caprina, uma vez que esses animais representam grande valor econômico para o Nordeste brasileiro e o aproveitamento do seu potencial oocitário constitui-se num aumento da eficiência reprodutiva dos mesmos.

A Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais (MOIFOPA) envolve as etapas de isolamento de folículos pré-antrais do ambiente ovariano e cultivo *in vitro* até a completa maturação. No entanto, a eficácia da MOIFOPA ainda é limitada, uma vez que a produção de embriões alcançada (MAGALHÃES *et al.*, 2010a; SARAIVA *et al.*, 2010b) é baixíssima comparada ao número de folículos pré-antrais cultivados. A complexidade desta técnica está no estabelecimento de meios de cultivo que suportem a foliculogênese *in vitro*. Assim, em caprinos e em outras espécies, a etapa de cultivo *in vitro* é considerada uma das mais importantes e críticas para o sucesso da MOIFOPA.

Neste contexto, o primeiro passo para a aplicação em larga escala desta biotécnica reprodutiva é compreender os mecanismos envolvidos em todas as etapas para que o folículo primordial cresça até folículo pré-ovulatório e forneça um oócito viável à fecundação. A ativina-A (SILVA *et al.*, 2006) e o GDF-9 (MARTINS *et al.*, 2008, 2010) são fatores de crescimento importantes para a foliculogênese, mas ainda não se sabe se estes fatores influenciam a expressão de R-FSH, ativina-A, GDF-9 e BMPs após o cultivo folicular *in vitro*. Portanto, estudar especificamente a ação da ativina-A e do GDF-9, assim como a associação destes fatores de crescimento com o FSH sobre o crescimento e expressão gênica em folículos pré-antrais caprinos é um caminho para elucidar a complexidade dos eventos que regem a foliculogênese e alcançar melhorias significantes nos programas de reprodução assistida em animais. O uso de uma ferramenta moderna, como a técnica de PCR em tempo real, para a identificação dos níveis de RNAm para os fatores de crescimento, incluindo a ativina-A, as BMPs e o GDF-9, que estão sendo produzidos pelos folículos, adicionará informações inexistentes até o momento para a reprodução na espécie caprina, servindo de base para aumentar a eficiência da técnica MOIFOPA.

5. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

- Analisar os níveis de expressão de RNAm para ativina-A em folículos primordiais, primários, secundários e antrais na espécie caprina.
- Avaliar a capacidade do FSH, da ativina-A e do GDF-9 para promover o crescimento *in vitro* de folículos secundários caprinos.
- Analisar a expressão de RNAm para R-FSH, ativina-A, GDF-9 e BMP -2, -4, -6, -7 e -15 em folículos secundários caprinos cultivados por 6 dias.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar a expressão do RNAm para ativina-A em folículos primordiais, primários e secundários, assim como em COCs e células da granulosa mural/teca de folículos antrais pequenos e grandes caprinos.
- Avaliar o efeito do FSH sozinho ou em associação com ativina-A ou GDF-9 sobre o crescimento, desenvolvimento e formação de antro de folículos secundários durante 6 dias de cultivo *in vitro*.
- Avaliar o efeito do FSH sozinho ou em associação com ativina-A sobre a expressão de RNAm para R-FSH e ativina-A em folículos cultivados *in vitro*.
- Avaliar o efeito do FSH sozinho ou em associação com GDF-9 sobre a expressão de RNAm para R-FSH, GDF-9 e BMPs -2, -4, -6, -7 e -15 após cultivo de 6 dias de folículos secundários de cabras.

6. ARTIGO I**Levels of mRNA for activin-A in goat ovarian follicles and effect
of activin-A and FSH on secondary follicle growth**

Resumo

Este trabalho faz uma análise dos níveis de RNAm para ativina-A em folículos ovarianos caprinos, bem como avalia os efeitos de ativina-A, sozinha ou associada ao FSH, sobre o crescimento e expressão de RNAm para R-FSH e ativina-A em folículos secundários cultivados por 6 dias. Para isto, folículos primordiais, primários e secundários, assim como complexos cumulus-oócito (COCs) e células da granulosa mural e da teca de folículos antrais pequenos e grandes foram obtidos de ovários caprinos e usados para quantificação dos níveis de RNAm para ativina-A por PCR em tempo real. Para os estudos *in vitro*, folículos secundários (~200µm) foram isolados de ovários caprinos e cultivados *in vitro* por 6 dias na presença de ativina-A (100 ng/mL) adicionada ou não de FSH (50 ng/mL). Após a extração do RNA total e síntese do cDNA, a expressão de RNAm para ativina-A e R-FSH em folículos secundários cultivados foi quantificada por PCR em tempo real. Os resultados mostraram que a expressão de ativina-A é menor em folículos secundários do que em folículos primários e é maior em folículos antrais grandes do que em pequenos folículos antrais. Após o cultivo, ativina-A e/ou FSH promoveram o crescimento de folículos secundários caprinos e FSH aumentou os níveis de RNAm para ativina-A, enquanto a ativina-A aumentou os níveis de RNAm para R-FSH. Em conclusão, ativina-A é expressa em folículos pré-antrais e antrais e atua estimulando a expressão de R-FSH em folículos caprinos. Por outro lado, a expressão de ativina-A é estimulada por FSH, que, juntamente com ativina, promove o crescimento folicular e a formação de antro.

Palavras-chave: ativina-A, caprinos, cultivo, folículos, FSH, RNAm

**Levels of mRNA for activin-A in goat ovarian follicles and effect of activin-A and FSH
on secondary follicle growth**

Cintia C. F. Leitão¹, José J. N. Costa¹, Márcia V. A. Saraiva², Valdevane R. Araújo², José R.
de Figueiredo², Robert van den Hurk³, José R. V. Silva¹

¹Biotechnology Nucleus of Sobral - NUBIS, Federal University of Ceara, Sobral, CE, Brazil.

²Faculty of Veterinary Medicine, Laboratory of Manipulation of Oocytes and Preantral
Follicles - LAMOFOPA, State University of Ceara, Fortaleza, CE, Brazil.

³Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Utrecht,
The Netherlands.

Corresponding address (J.R.V. Silva): Biotechnology Nucleus of Sobral - NUBIS, Federal
University of Ceara, Av. Gerardo Rangel 100, CEP 62041-040, Sobral, CE, Brazil. Phone /
Fax: +55 88 36132603 [jrvsilva@ufc.br]

Abstract

This paper is an analysis of levels of mRNA for activin-A in goat ovarian follicles, and evaluates the effects of activin-A, alone or combined with FSH on the growth and expression of mRNA for FSH-R and activin-A in secondary follicles cultured for 6 days. For this, primordial, primary and secondary follicles, as well as cumulus-oocyte complexes (COCs) and mural granulosa and theca cells of antral follicles small and large were obtained from goat ovaries and used to quantify levels of mRNA for activin-A by real time PCR. For *in-vitro* studies, secondary follicles (~ 200µm) were isolated from goat ovaries and cultured *in vitro*

for 6 days in the presence of activin-A (100 ng/mL) supplemented or not with FSH (50 ng/mL). After extraction of total RNA and cDNA synthesis, the mRNA expression for activin-A and FSH-R in cultured secondary follicles was quantified by real time PCR. The results showed that the expression of activin-A is lower in secondary follicles than in primary follicles and is higher in large antral follicles than in small antral follicles. After culture, activin-A and / or FSH promoted growth of goat secondary follicles, while FSH increased the levels of mRNA for activin-A, and activin-A increased the levels of FSH-R mRNA. In conclusion, activin-A is expressed in pre-antral and antral follicles and acts as a stimulator of the FSH-R expression in goat follicles. On its turn, the expression of activin-A is stimulated by FSH, which together with activin promotes follicle growth and antrum formation.

Keywords: activin-A, goats, culture, follicles, FSH, mRNA

1. Introduction

At birth, the mammalian ovary contains thousands of oocytes enclosed in pre-antral follicles, but the vast majority became atretic during growth and maturation (1). To avoid this huge loss of oocytes, several studies (2, 3, 4) have demonstrated that secondary follicles (~200µm), which have been isolated from the ovarian microenvironment, can grow up to antral stages in a long term culture system. In these studies, the effects of various hormones and growth factors have been evaluated and recently oocyte maturation and *in-vitro* embryo production have been described for goats (5, 6). Despite the success of these studies, the *in-vitro* maturation of isolated pre-antral follicles and *in-vitro* fertilization of *in-vitro* matured oocytes still have a very low efficiency, resulting in a small production rate of embryos. Because the expressed proteins within the cell determine its biology, broad descriptions of

temporal expression of genes assessed by molecular biology techniques, are the basis for an accurate understanding of the complex process of folliculogenesis and oocyte maturation. In this context, quantification of levels of growth factors, such as activin-A during follicular development *in-vitro*, may contribute to the establishment of an ideal culture medium and thus increase the potential of these systems *in-vitro*.

Activins are dimeric glycoproteins, which are composed of two β subunits of inhibin A or B, and exist as homo- or heterodimers. Consequently, three activin isoforms exist: A (consisting of two β_A subunits), AB (consisting of one β_A and one β_B subunit), and B (consisting of two β_B subunits), activin-A being the predominant isoform (7). In goats, mRNA for inhibin β_A subunit has been demonstrated in primordial, primary, secondary and antral follicles (8), but its level at different stages of development is still no known. Two type II receptors, ActRIIA and ActRIIB, have been identified, which bind activin-A with high affinity and specificity. Activin receptor IB (ALK4) interacts with the activated type II receptors to transduce activin-A signals (9). In goat ovaries, both mRNA and protein for activin receptors have been demonstrated at all follicular stages (8). In rodents, the intraovarian effects of activin-A includes proliferation of granulosa cells (7) by potentiating FSH action via up-regulation of FSH receptors (10, 11). FSH receptors are expressed in goat ovarian follicles at different stages of development, but it is unknown if activin-A up-regulates FSH receptor expression during growth and potentiates FSH action *in-vitro*. When tested on goat primordial and primary follicles, activin-A stimulates their activation and growth, and increases the percentage of healthy follicles (12). Moreover, stimulation of development of secondary follicles in porcine (13) and bovine (14) has been achieved by adding FSH to the culture medium, demonstrating that these follicles are responsive to this hormone. However, the *in-vitro* effects of activin-A in presence or absence of FSH on both the development of

goat secondary follicles and the relative expressions of activin-A and FSH-R are still unknown.

This study evaluated the levels of mRNA for activin-A in caprine primordial, primary and secondary follicles, and in cumulus-oocyte complexes (COCs), mural granulosa and theca of small and large antral follicles, the effects of activin-A and FSH on the survival and growth of secondary follicles after their culture for 6 days, and the influence of activin-A and FSH on the levels of mRNA for FSH-R and activin-A in 6-days cultured secondary follicles.

2. Material and Methods

Messenger RNA quantification for activin-A in caprine ovarian follicles

To evaluate mRNA expression, ovaries (n=30) of goats (*Capra hircus*) were collected and rinsed in saline (0.9% NaCl) containing antibiotics (100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin). After this preparation, 10 ovaries were utilized for isolation of primordial, primary, and secondary follicles. The remaining ovaries were used for collection of COCs, mural granulosa cells, and thecal cells from small and large antral follicles. Primordial, primary, and secondary follicles were isolated using a mechanical procedure, as previously described (15). After isolation, these follicles were washed and then placed by category into separate Eppendorf tubes in groups of 10. This procedure was completed within 2 h, and all samples were stored at -80°C until the RNA was extracted. From a second group of ovaries (n=20), COCs aspirated from small (1–3 mm) and large (3–6 mm) antral follicles were recovered. Compact COCs were selected from the follicle content as described by van Tol and Bevers (1998). Thereafter, groups of 10 COCs were stored at -80°C until RNA extraction. To collect mural granulosa / theca cell complexes, small (n=10) and large (n=10) antral follicles

were isolated from ovaries (n=5) and dissected free from stromal tissue with forceps as previously described (16). The follicles were then bisected, where after mural granulosa / theca cell complexes were collected and stored at -80°C.

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

Prior to reverse transcription, the eluted RNA samples were incubated for 5 min at 70°C, and chilled on ice. Reverse transcription was then performed in a total volume of 20µl, which comprised 10 µl of sample RNA, 4 µl 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°C, for 5 min at 80°C, and then stored at -20°C. Negative controls were prepared under the same conditions, but without the inclusion of the reverse transcriptase.

Quantification of the mRNA for activin-A was performed by using *SYBR Green*. PCR reactions were composed of 1 µl cDNA as a template in 7.5 µl of SYBR Green Master Mix (PE Applied Biosystems, Foster City, CA), 5.5 µl of ultra-pure water, and 0.5 µM of each primer. The primers were designed to perform amplification of mRNA for inhibin β_A subunit and housekeeping genes, and are shown in Table 1. The thermal cycling profile for the first round of PCR was: initial denaturation and activation of the polymerase for 15 min at 94°C,

followed by 40 cycles of 15 sec at 94°C, 30 sec at 60°C, and 45 sec at 72°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 transform CT values into normalized relative expression levels.

Effect of activin-A and FSH on growth of caprine secondary follicles and expression of FSH-R and activin-A

Ovaries of goats (n = 10) were collected from a slaughterhouse and transported to the laboratory within 1 h in MEM containing antibiotics (100 µg/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin), while they were kept at 32°C.

In the laboratory, surrounding fat tissue and ligaments were stripped off from the ovaries. Ovarian cortical slices (1 to 2 mm in diameter) were cut from the ovarian surface, using a surgical blade under sterile conditions. The ovarian cortex was subsequently placed in fragmentation medium, consisting of MEM plus HEPES. Secondary follicles of approximately 200 µm in diameter were visualized under a stereo microscope (SMZ 645 Nikon, Tokyo, Japan) and manually dissected from strips of ovarian cortex, using 26 gauge (26 G) needles. After isolation, follicles were transferred to 100 µL drops containing fresh medium under mineral oil to further evaluation of the follicular quality. Follicles with a visible oocyte, surrounded by granulosa cells, an intact basement membrane and no antral cavity were selected for culture.

For *in-vitro* studies, after their selection, follicles were individually cultured in 100 µL drops of culture medium in petri dishes (60 x 15 mm, Corning, USA). Control culture medium consisted of α -MEM (pH 7.2 - 7.4), supplemented with 3.0 mg/mL bovine serum albumin (BSA), ITS (insulin 10 µg/mL, transferrin 5.5 µg/mL and selenium 5 ng/mL), 2 mM

glutamine, 2 mM hypoxanthine and 50 µg/mL of ascorbic acid under mineral oil. Incubation was conducted for 6 days at 39°C with 5% CO₂. For treatments, control culture medium was supplemented with 50 ng/mL of FSH (rFSH[®], Nanocore, Brazil), 100 ng/mL of activin-A (Sigma, St. Louis, USA), or both. These concentrations of FSH and activin-A were those that promoted the highest growth rates in *in-vitro* cultured pre-antral follicles in previous studies (12, 17). One hour prior to use, fresh media were prepared and incubated. For culture, the follicles were randomly chosen and then incubated for 6 days in an incubator, under 5% CO₂ in air and at 39°C. Every other day, 60 µL of the culture media was replaced by fresh medium. Per treatment, a mean number of 30 follicles was used. At the start and the end of a culture, follicular morphology and diameter were assessed by means of an inverted microscope. At the end of a culture, the percentage of follicles, that had reached antrum formation, was additionally determined.

To evaluate the effect of activin-A, FSH and their combination on the expression of the mRNA for FSH-R and activin-A in cultured goat follicles, respectively, for each treatment, three groups of eight follicles were collected at the end of the 6-day culture period and then stored at -80°C until extraction of total RNA. Quantification of mRNA was performed as described in previous experiment and the primers for inhibin β_A subunit and FSH-R are shown in Table 1. This table also shows Ubiquitin (UBQ) and β-actin, which were used as endogenous controls for normalization of gene expression.

Statistical analysis

The nonparametric Kruskal-Wallis test was used to compare data of mRNA for activin-A in uncultured primordial, primary and secondary follicles, and the levels of mRNA for activin-A and FSH-R in cultured follicles. The t-test was used to compare mRNA

expression in uncultured small and large antral follicles and follicular diameter before and after culture. Data of follicular growth by the different treatments were transformed to log₁₀ and compared by the Student-Newman-Keuls test. The chi-square test was used to compare the percentage of follicles that had form an antrum. Data were considered to be significantly different from others when $p < 0.05$.

3. Results

Messenger RNA expression of activin-A in caprine ovarian follicles

Quantification of mRNA for activin-A showed a significant reduction in levels of mRNA for activin-A during the transition of primary follicles to the secondary stage ($p < 0.05$). There was no significant difference in levels of mRNA for activin-A between primordial and primary follicles ($p < 0.05$ - Figure 1A). In addition, there was no significant difference between COCs of small and large antral follicles (Figure 1B), but mural granulosa cell / theca cell complexes from large antral follicles had higher levels of mRNA for activin-A than those from small antral follicles ($p < 0.05$ - Figure 1C). When mRNA levels for activin-A in COCs and corresponding follicular granulosa / theca cell complexes from, respectively, small (Figure 1D) and large (Figure 1E) antral follicles were compared, no significant differences were observed.

***In-vitro* growth of caprine follicles in medium containing FSH and activin-A**

Compared to noncultured secondary follicles (day 0), independent of the treatment, a significant increase in follicular diameter was observed after culturing such follicles for six

days. Dependent of the treatment, 55 to 75% of the cultured follicles developed an antrum (Table 2). Compared to culture in MEM alone, addition of FSH, activin-A or both significantly increased follicular growth ($p < 0.05$). These treatments, however, did not significantly affect the percentage of follicles that had started antrum formation (Table 2).

Expression of activin-A and FSH-R in cultured caprine follicles

As illustrated by Figure 2, compared to culture of secondary follicles in MEM alone, culture in MEM supplemented with FSH significantly increased the follicular levels of mRNA for activin-A. However, culture of follicles in MEM supplemented with activin-A or both activin-A and FSH showed low levels of mRNA for activin-A, i.e. levels comparable to those observed in follicles cultured in MEM. Compared to follicles cultured in MEM alone, addition of activin-A to MEM significantly increased the level of mRNA for FSH-R in cultured follicles, whereas addition of FSH or a mixture of FSH and activin-A had no effect (Figure 3).

4. Discussion

This study is the first that showed changes in follicular activin-A mRNA levels, and particularly a decrease in mRNA for activin-A during the transition of primary follicles to the secondary stage. An explanation for this decrease in activin-A could be that the follicular vascular system is absent in primordial and primary follicles, and starts to develop during the secondary stage (18). As a consequence, secondary follicles are able to easily receive both endocrine and locally derived compounds, including growth factors, which could down-regulate the expression of transcripts for activin-A within these follicles and which apparently

is necessary for their further proper development. In a study with neonatal mouse ovaries, estradiol exposure decreased activin β -subunit mRNA and activin-A protein levels and consequently attenuated intraovarian activin signaling (19). These authors recently showed that activin controls granulosa cell proliferation by regulating the expression of Cyp26b1 in these cells (20). They observed a striking inverse spatial and temporal correlation between Cyp26b1 and activin- β_A mRNA expression, while Cyp26b1 expression was elevated in a transgenic mouse model which showed decreased activin expression, and the Cyp26 inhibitor R115866 stimulated the proliferation of primary cultured mouse granulosa cells. Hence, the currently observed higher activin levels in goat secondary follicles may be indicative of higher mitotic activity of granulosa cells, which will result in follicle growth.

Using reverse transcription PCR (RT-PCR), activin-A mRNA expression was detected in the oocyte and somatic cells of rat secondary follicles (140-160 μ m) (21). These authors furthermore demonstrated that activin-A did not only promote the growth of rat secondary follicles, but also antrum formation. Using *in-situ* hybridization, activin-A mRNA was detected in early porcine follicles (22). A few years later, members of the same group used RT-PCR and detected activin mRNA expression in early goat follicles (8). They moreover demonstrated a stimulating effect of activin-A on goat primary follicle development *in vitro* (12). In immature mice, activin-A has been found to be involved in the *in-vitro* growth and survival of pre-antral follicles (23). Recently, McLaughlin *et al.* (7) showed that activin promoted the follicular integrity and oogenesis in cultured pre-antral bovine follicles. These papers all showed the presence of activin in follicles and/or its importance in early folliculogenesis, but did not deal with its relative concentrations necessary for successive processes that regulate follicular growth and differentiation.

During growth from small to large antral follicles there was an increase in the levels of mRNA for activin-A in granulosa and theca cells. It is known that development of antral

follicle is marked by increased follicular vascularization and permeability of the blood vessels with consequent increased sensitivity to endocrine factors (24). Moreover, in early antral follicles isolated from rat ovaries, the activin-A production was stimulated by FSH (25). Therefore a complex interplay of FSH and paracrine factors during the development of antral follicles may explain changes in gene expression of activin-A. Pangas and colleagues (26) also detected activin-A and activin receptors in human theca cells. In caprine antral follicles, activin-A protein and mRNA were present in the oocyte, cumulus cells, mural granulosa cells and theca cells (8). Furthermore, in sheep antral follicles, activin-A mRNA was found in granulosa cells (27).

In the current study, activin-A and FSH both increased the growth of goat secondary follicles after a 6-day culture period. FSH is known to stimulate follicular growth and maintain the integrity of granulosa cells in pigs (28), sheep (29), humans (30) and cattle (31). FSH treatment was shown to stimulate oocyte growth in bovine pre-antral follicles *in-vitro* (32). Culture of ovarian tissue in medium containing FSH resulted in *in-vitro* growth of caprine pre-antral follicles, while their ultrastructural integrity was maintained (33, 34, 35). Sequential addition of FSH to the culture medium maintained the survival of isolated canine pre-antral follicles and promoted an increased rate of follicular growth and antrum formation (36).

In our present study, like FSH, activin-A also improved the growth of cultured secondary follicles. This result is consistent with previous studies in which activin-A stimulated oocyte growth and development of primordial (cattle: 37, human: 38), primary (goat: 12), and secondary follicles (rodent: 21). Moreover, Li *et al.* (39) showed that this growth factor increased the number of rat granulosa cells mitoses. At a concentration of 100 ng/mL, activin-A enhances oocyte development in secondary follicles of cows (7) and sheep (40). When both activin-A and FSH were added in MEM, we did not observe a positive

interaction between these compounds in regard their effect on secondary follicle development. In contrast, previous *in-vitro* studies have demonstrated that, either alone or in combination with FSH, activin-A is able to promote the development of caprine primary (12) and mouse (41) and ovine (40) secondary follicles. Furthermore, FSH stimulates the proliferation and differentiation of rat pre-antral follicles via paracrine factors such as activin-A (10). Similarly, in a mixture with FSH, activin-A stimulates the growth of bovine primary follicles (42) and mouse secondary follicles (43).

The results of this study furthermore show that treatment of cultured secondary follicles with activin-A does increase the follicular level of FSH-R mRNA. This is in accordance with the previously demonstrated activin-induced FSH-R formation in rat granulosa cells (44, 45). When combined with FSH, activin-A similarly also stimulates expression of FSH-R mRNA in granulosa cells from 6–8 mm hen follicles (46). Another mechanism of activin-A action on follicular FSH functioning is the stimulation of FSH biosynthesis through enhancing FSH β promoter activity. This was demonstrated in a mouse gonadotropic cell line (L β T2 cells) (47). These studies suggest that effects of activin-A on the synthesis of FSH appear simultaneous with its role in the amelioration of the sensitivity of follicular cells to this gonadotropin. Compared to treatment with activin-A or FSH alone, treatment with activin-A and FSH did not further stimulate secondary follicle growth. Possibly, neither FSH-R mRNA was transduced in functional proteins nor the FSH concentration in the culture medium was sufficient to stimulate the newly formed receptors. However, we cannot exclude the possibility of an effect of these compounds on the differentiation of follicle compartments, like the stimulation of production of certain growth factors and hormones.

In this study with goats, activin-A or a mixture of activin-A and FSH had an effect on follicular activin-A mRNA levels, which indicates that FSH enhances the expression of

activin-A mRNA in secondary follicles. This finding suggests that the gonadotropin FSH controls the biological action of activin-A during early follicle growth through modulation of its expression, thus increasing the opportunity to synthesize activin-A protein.

In conclusion this study demonstrates different patterns of mRNA expression for activin-A in the different caprine pre-antral follicle classes and in the somatic follicular components of antral follicles. Most striking is the reduction in activin-A expression during the transition of primary follicles to the secondary stage, and its increase in mural granulosa / theca cell complexes during the development of antral follicles. In cultured secondary follicles, FSH controls the mRNA levels for activin-A, and activin-A those of FSH-R mRNA. Activin-A and FSH are furthermore involved in the growth of *in-vitro* cultured goat secondary follicles.

Acknowledgement

This study was supported by CNPq (Grant N° 474 731 / 2007-3) and FUNCAP.

Reference

1. Markström E, Svensson EC, Shao R, Svanberg B, Billig H. Survival factors regulating ovarian apoptosis: dependence on follicle differentiation. *Reproduction*. 2002; 123: 23-30.
2. Duarte AB, Chaves RN, Araújo VR, Celestino JJ, Silva GM, Lopes CA, Tavares LM, Campelo CC, de Figueiredo JR. Follicular interactions affect the in vitro development of isolated goat preantral follicles. *Zygote*. 2010; 28: 1-13.
3. Magalhães DM, Fernandes D, Mororó M, Silva C, Rodrigues G, Bruno J, Matos M, Campello C, Figueiredo J. Effect of the medium replacement interval on the viability, growth and in vitro maturation of isolated caprine and ovine pre-antral follicles. *Reprod. Domest. Anim.* 2010; 46: 134-140.
4. Romero S, Smitz J. Epiregulin can effectively mature isolated COCs, but fails as a substitute for the hCG/EGF stimulus on cultured follicles. *Reproduction*. 2009; 137: 997-1005.
5. Magalhães DM, Duarte AB, Araújo VR, Brito IR, Soares TG, Lima IM, Lopes CA, Campello CC, Rodrigues AP, Figueiredo JR. In vitro production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. *Theriogenology*. 2010; 75: 182-188.
6. Saraiva MV, Rossetto R, Brito IR, Celestino JJ, Silva CM, Faustino LR, Almeida AP, Bruno JB, Magalhães DM, Matos MH, Campello CC, Figueiredo JR. Dynamic medium produces caprine embryo from preantral follicles grown in vitro. *Reprod. Sci.* 2010; 17: 1135-1143.

7. McLaughlin M, Bromfield JJ, Albertini DF, Telfer EE. Activin promotes follicular integrity and oogenesis in cultured preantral bovine follicles. *Mol. Hum. Reprod.* 2010; doi: 10.1093/molehr/gaq021.
8. Silva JRV, Van den Hurk R, Van Tol HTA, Roelen BAJ, Figueiredo JR. Gene expression and protein localisation for activin-A, follistatin and activin receptors in goat ovaries. *J. Endocrinol.* 2004; 183: 405–415.
9. Kipp JL, Kilen SM, Woodruff TK, Mayo KE. Activin regulates estrogen receptor gene expression in the mouse ovary. *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 36755–36765.
10. Miro F, Hillier SG. Modulation of granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis and differentiation by activin. *Endocrinology.* 1996; 137: 464–468.
11. Knight PG, Glister C. TGF- β superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction.* 2006; 132: 191–206.
12. Silva JRV, Tharasanit T, Taverne MAM, Van der Weijden GC, Santos RR, Figueiredo J R, Van den Hurk R. The activin-follistatin system and in vitro early follicle development in goats. *J. Endocrinol.* 2006; 189: 113–125.
13. Mao J, Wu G, Smith MF, Mccauley TC, Cantley TC, Prather RS, Didion BA, Day BN. Effects of culture medium, serum type, and various concentrations of follicle-stimulating hormone on porcine preantral follicular development and antrum formation in vitro. *Biol. Reprod.* 2002; 67: 1197–1203.
14. Wandji SA, Eppig JJ, Fortune JE. FSH and growth factors affect the growth and endocrine function in vitro of granulosa cells of bovine preantral follicles. *Theriogenology.* 1996; 45: 817-832.
15. Lucci CM, Amorim CA, Bao SN, Figueiredo JR, Rodrigues APR, Silva JRV, Gonçalves PBD. Effect of the interval of serial sections of ovarian tissue in the tissue

- chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. *Anim. Reprod. Sci.* 1999; 56: 39–49.
16. Van Tol HT, Bevers MM. Theca cells and theca cell conditioned medium inhibit the progression of FSH induced meiosis of bovine oocytes surrounded by cumulus cells connected to membrana granulosa. *Mol. Reprod. Dev.* 1998; 51: 315–321.
 17. Matos MHT, Lima-Verde IB, Bruno JB, Lopes CAP, Martins FS, Santos KDB, Rocha RMP, Silva JRV, Bao SN, Figueiredo JR. Follicle stimulating hormone and fibroblast growth factor-2 interact and promote goat primordial follicle development in vitro. *Reprod. Fertil. Dev.* 2007; 19: 677-684.
 18. Macchiarelli G, Jiang JY, Nottola SA, Sato E. Morphological patterns of angiogenesis in ovarian follicle capillary networks. A scanning electron microscopy study of corrosion cast. *Microsc. Res. Tech.* 2006; 69: 459-468.
 19. Kipp JL, Kilen SM, Bristol-Gould S, Woodruff TK, Mayo KE. Neonatal exposure to estrogens suppresses activin expression and signaling in the mouse ovary. *Endocrinology.* 2007; 148: 1968–1976.
 20. Kipp JL, Golebiowski A, Rodriguez G, Demczuk M, Kilen SM, Mayo KE. Gene expression profiling reveals Cyp26b1 to be an activin regulated gene involved in ovarian granulosa cell proliferation. *Endocrinology.* 2011; 152: 303-312.
 21. Zhao J, Taverne MA, Van der Weijden GC, Bevers MM, 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. *Biol. Reprod.* 2001; 65: 967–977.
 22. Van den Hurk R, Van de Pavert SA. Localisation of an activin/activin receptor system in the porcine ovary. *Mol. Reprod. Dev.* 2001; 60: 463–471.
 23. Oktem O, Oktay K. The role of extracellular matrix and activin-A in in vitro growth and survival of murine preantral follicles. *Reprod Sci.* 2007; 14: 358-366.

24. Van den Hurk R, Zhao J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology*. 2005; 63:1717–1751.
25. Andreone L, Velásquez EV, Abramovich D, Ambao V, Loreti N, Croxatto HB, Parborell F, Tesone M, Campo S. Regulation of inhibin/activin expression in rat early antral follicles. *Mol. Cell. Endocrinol*. 2009; 309: 48–54.
26. Pangas SA, Rademaker AW, Fishman DA, Woodruff TK. Localisation of the activin signal transduction components in normal human ovarian follicles: implications for autocrine and paracrine signaling in the ovary. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 2002; 87: 2644–2657.
27. Tisdall DJ, Hudson N, Smith P, McNatty KP. Localisation of ovine follistatin and alpha and beta A inhibin mRNA in the sheep ovary during the oestrous cycle. *J. Mol. Endocrinol*. 1994; 12: 181–193.
28. Hirao Y, Nagai T, Kubo M, Miyano T, Miyake M, Kato S. In vitro growth and maturation of pig oocytes. *J. Reprod. Fertil*. 1994; 100: 333-339.
29. Cecconi S, Barboni B, Coccia M, Mattioli M. In vitro development of sheep preantral follicles. *Biol. Reprod*. 1999; 60: 594-601.
30. Roy, SK., Treacy, BJ. Isolation and long term culture of human preantral follicles. *Fertil. Steril*. 1993; 59: 783-790.
31. Saha, S, Shimizu M, Geshi M, Izaike Y. In vitro culture of bovine preantral follicles. *Anim. Reprod. Sci*. 2000; 63: 27-39.
32. Itoh T, Kacchi M, Abe H, Sendai Y, Hoshi H. Growth, antrum formation, and estradiol production of bovine preantral follicles cultured in a serum-free medium. *Biol. Reprod*. 2002; 67: 1099–1105.

33. Matos MH, Bruno JB, Rocha RM, Lima-Verde IB, Santos KD, Saraiva MV, Silva JR, Martins FS, Chaves RN, Bão SN, Figueiredo JR. In vitro development of primordial follicles after long-term culture of goat ovarian tissue. *Res. Vet. Sci.* 2010; doi:10.1016/j.rvsc.2010.07.007.
34. Lima-Verde IB, Matos MH, Saraiva MV, Bruno JB, Tenório SB, Martins FS, Rossetto R, Cunha LD, Name KP, Bão SN, Campello CC, Figueiredo JR. Interaction between estradiol and follicle-stimulating hormone promotes in vitro survival and development of caprine preantral follicles. *Cells Tissues Organs.* 2010; 191: 240-247.
35. Rossetto R, Lima-Verde IB, Matos MH, Saraiva MV, Martins FS, Faustino LR, Araújo VR, Silva CM, Name KP, Bao SN, Campello CC, Figueiredo JR, Blume H. Interaction between ascorbic acid and follicle-stimulating hormone maintains follicular viability after long-term in vitro culture of caprine preantral follicles. *Domest. Anim. Endocrinol.* 2009; 37:112-123.
36. Serafim MK, Araújo VR, Silva GM, Duarte AB, Almeida AP, Chaves RN, Campello CC, Lopes CA, de Figueiredo JR, da Silva LD. Canine preantral follicles cultured with various concentrations of follicle-stimulating hormone (FSH). *Theriogenology.* 2010; 15: 749-755.
37. McLaughlin M, Telfer EE. Oocyte development in bovine primordial follicles is promoted by activin and FSH within a two-step serum-free culture system. *Reproduction.* 2010; 139: 971-978.
38. Telfer EE, McLaughlin M, Ding C, Thong KJ. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. *Hum. Reprod.* 2008; 23: 1151–1158.
39. Li R, Phillips DM, Mather JP. Activin promotes ovarian follicles development in vitro. *Endocrinology.* 1995; 136: 849-856.

40. Thomas FH, Armstrong DG, Telfer EE. Activin promotes oocyte development in ovine preantral follicles in vitro. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2003; 1: 76.
41. Ola SI, Ai JS, Liu JH, Wang Q, Wang ZB, Chen DY, Sun QY. Effects of gonadotrophins, growth hormone, and activin A on enzymatically isolated follicle growth, oocyte chromatin organization, and steroid secretion. *Mol. Reprod. Dev.* 2008; 75: 89 – 96.
42. Hulshof SCJ, Figueiredo JR, Beckers JF, Bevers MM, Vanderstichele H, Van den Hurk R. Bovine preantral follicles and activin: immunohistochemistry for activin and activin receptor and the effect of bovine activin A in vitro. *Theriogenology.* 1997; 48: 133–142.
43. Liu X, Andoh K, Yokota H, Kobayashi J, Abe Y, Yamada K, Mizunuma H, Ibuki Y. Effects of growth hormone, activin, and follistatin on the development of preantral follicle from immature female mice. *Endocrinology.* 1998; 139: 2342-2347.
44. Hasegawa Y, Miyamoto K, Abe Y, Nakamura T, Sugino H, Eto Y, Shibai H, Igarashi M. Induction of follicle stimulating hormone receptor by erythroid differentiation factor on rat granulosa cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988; 156: 668–674.
45. Xiao S, Robertson DM, Findlay JK. Effects of activin and follicle-stimulating hormone (FSH)-suppressing protein/follistatin on FSH receptors and differentiation of cultured rat granulosa cells. *Endocrinology.* 1992; 131:1009–1016
46. Johnson AL, Bridgham JT, Woods DC. Cellular mechanisms and modulation of activin A and transforming growth factor β -mediated differentiation in cultured hen granulosa cells. *Biol. Reprod.* 2004; 71: 1844–1851.
47. Ge W, Ko N, Pang F Y, Chung M, Lin S, Yuen C, Lau M, Liu L, Sohn Y C, Kobayashi M, Aida K. Activin stimulates goldfish FSH biosynthesis by enhancing FSH β promoter activity. *Fish. Physiol. Biochem.* 2003; 28: 65–71.

Table 1: Primer pairs used in real-time PCR for quantification of activin-A in fresh and 6-days cultured caprine pre-antral follicles.

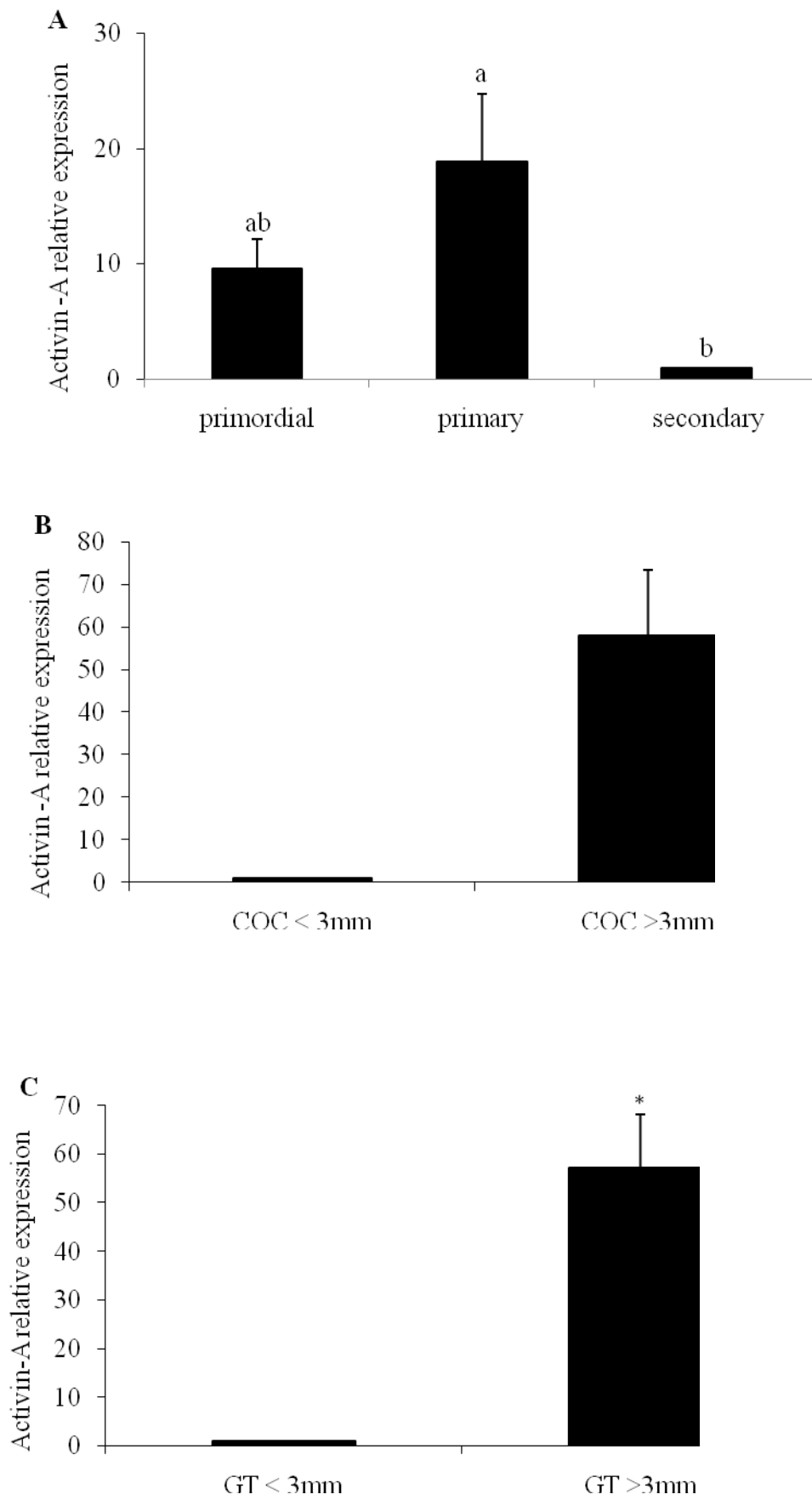
Target gene	Primer sequence (5'→3')	Sense (s)		Position	Genbank accession n°.
			Anti-sense (as)		
β-Actin	ACCACTGGCATTGTCATGGACTCT	s		188-211	GI: 28628620
	TCCTTGATGTCACGGACGATTTCC	as		363-386	
UBQ	GAAGATGGCCGCACTCTTCTGAT	s		607-631	GI: 57163956
	ATCCTGGATCTTGGCCTTCACGTT	as		756-780	
β-Tubulin	TTCATTGGCAACAGCACAGCCA	s		1100-1121	GI: 114052730
	TCGTTCATGTTGCTCTCAGCCT	as		1229-1250	
Inhibin β_A subunit	ATATCGGAGAAGGTGGTGGATGCT	s		616-640	GI: 123229603
	ACTGCTCACAGGCAATCCGTATGT	as		739-763	
FSH-R	AGGCAAATGTGTTCTCCAACCTGC	s		250-274	GI: 95768228
	TGGAAGGCATCAGGGTCGATGTAT	as		316-340	

Table 2. Follicular diameter and antrum formation after culture of secondary follicles in MEM supplemented with FSH, activin-A or both.

Treatment	Day 0 Diameter ± SEM	Day 6 Diameter ± SEM	Growth Diameter ± SEM	Antrum formation (%)
MEM	208.48 ± 8.034	301.02 ± 14.73*	92.541 ± 9.548 ^a	55.17% (16/29)
MEM + FSH	233.23 ± 7.210	363.520 ± 12.590*	130.283 ± 8.313 ^b	67.85% (19/28)
MEM + ACTIVIN-A	201.16 ± 6.268	355.32 ± 23.821*	154.15 ± 20.346 ^b	75% (21/28)
MEM + ACTIVIN-A + FSH	194.067 ± 7.410	332.576 ± 20.906*	138.509 ± 15.90 ^b	74.07% (20/27)

* significant difference compared to day 0 (p<0.05).

^{ab} significant difference between treatments (p<0.05).



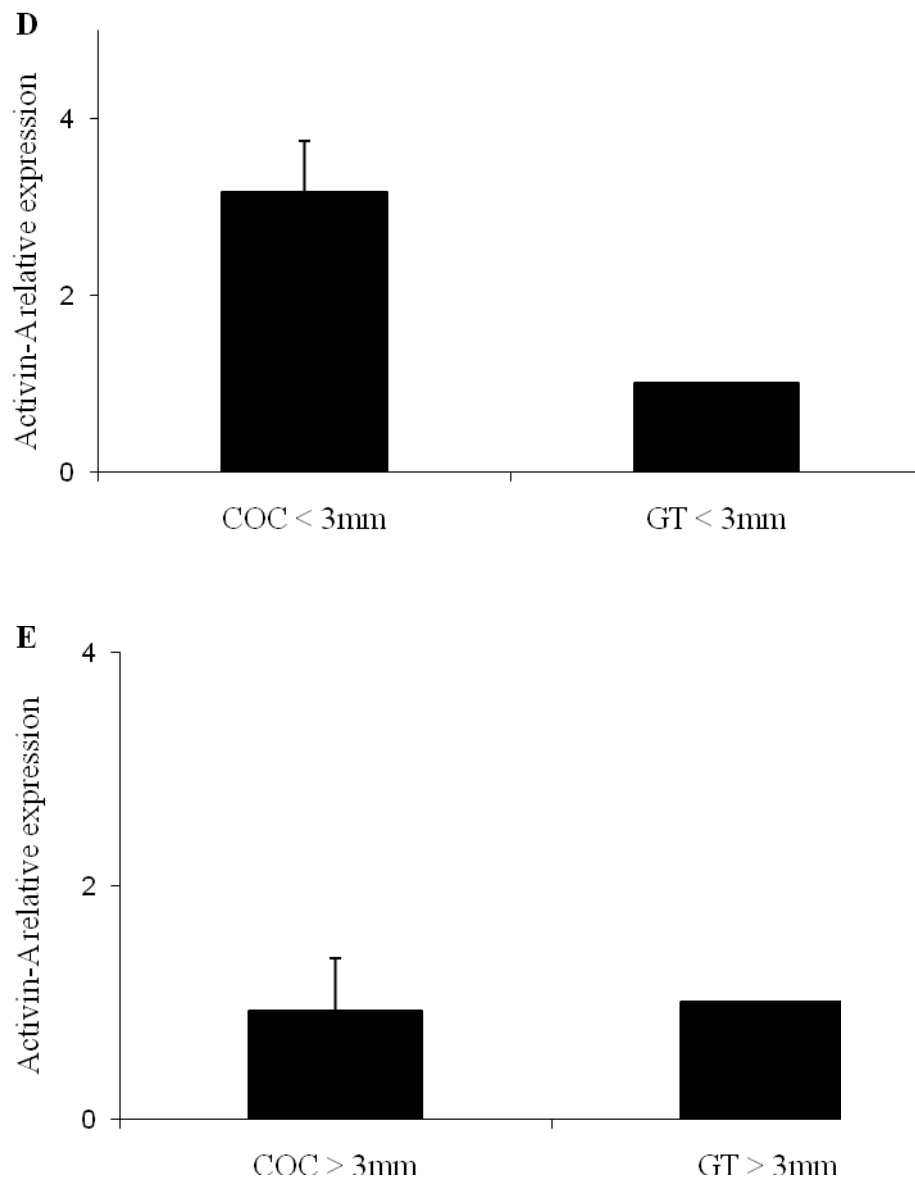


Figure 1. Expression of activin-A mRNA in goat ovarian follicles (means \pm SD). A) primordial, primary and secondary follicles, B) COCs from small and large antral follicles, C) granulosa / theca cells (GT) from small and large antral follicles, D) COCs and GT from small antral follicles, and E) COCs and GT from large antral follicles.

^{ab} significant difference between follicle categories ($p < 0.05$)

* ($p < 0.05$)

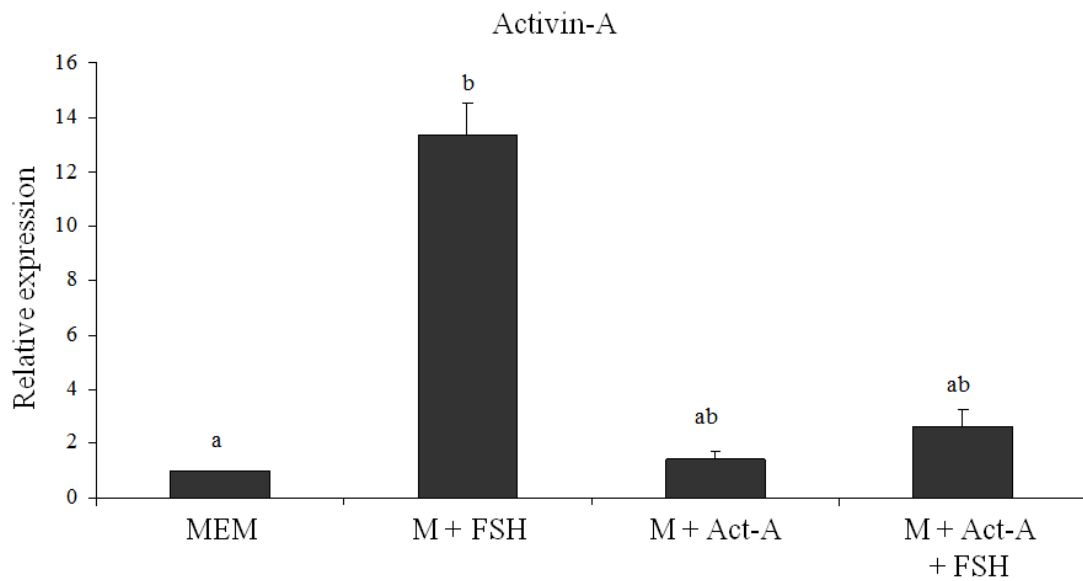


Figure 2. Levels of mRNA for activin-A in goat secondary follicles after culture in MEM alone or supplemented with FSH, activin-A or both. (M: MEM, Act-A: Activin-A)

^{ab} significant difference between treatments ($p < 0.05$).

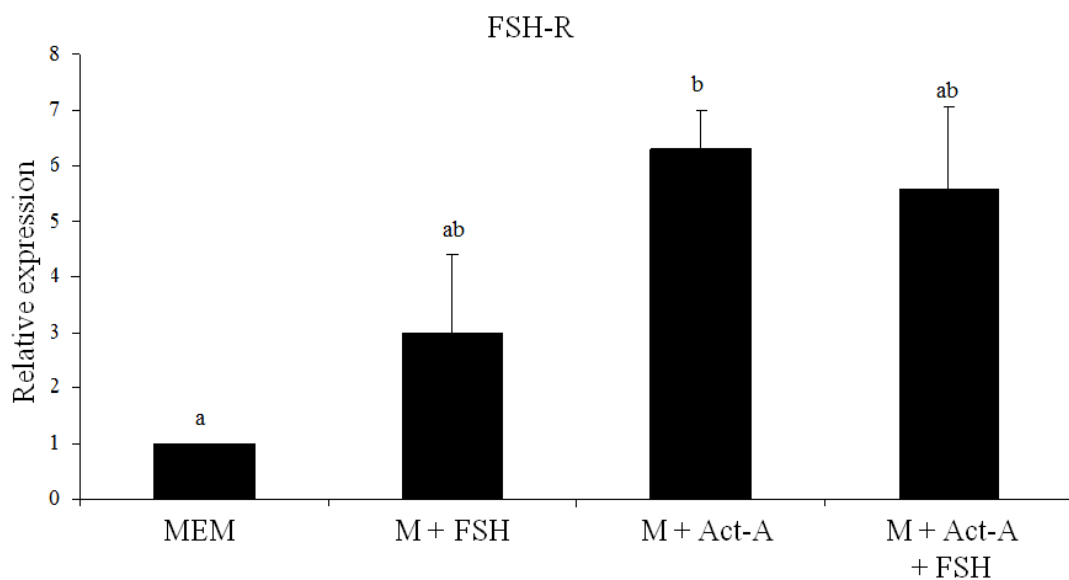


Figure 3. Levels of mRNA for FSH-R in goat secondary follicles after culture in MEM alone or supplemented with FSH, activin-A or both. (M: MEM, Act-A: Activin-A)

^{ab} significant difference between treatments ($p < 0.05$).

7. ARTIGO II

Effects of GDF-9 and FSH on the development of caprine preantral follicles and levels of mRNA for GDF-9, FSH-R and BMPs after *in vitro* culture

Resumo

O objetivo deste estudo foi determinar o papel do GDF-9, sozinho ou em combinação com o FSH, sobre o crescimento e a expressão de RNAm para GDF-9, R-FSH e BMPs em folículos secundários caprinos após cultivo *in vitro*. Folículos secundários caprinos (~200µm) foram isolados e cultivados por 6 dias em meio suplementado com GDF-9 (200 ng/mL), FSH (50 ng/mL) ou ambos, GDF-9 e FSH. No início e fim do cultivo, o diâmetro folicular foi avaliado e comparado. Após a extração do RNA total e a síntese do cDNA, os níveis de RNAm para GDF-9, R-FSH e BMPs -2, -4, -6, -7 e -15 em folículos secundários cultivados foram quantificados por PCR em tempo real. Os resultados mostraram que, após o cultivo, folículos secundários caprinos aumentaram o diâmetro, mas os efeitos sobre os folículos secundários tratados não diferiram dos controles cultivados. Em folículos secundários cultivados, GDF-9 diminuiu os níveis de RNAm para as BMPs -2 e -15, enquanto FSH sozinho ou em combinação com GDF-9 não influenciou na expressão de GDF-9, R-FSH e BMPs. Em conclusão, GDF-9 reduz a expressão de BMP -2 e -15 em folículos pré-antrais caprinos após o cultivo, mas FSH sozinho ou associado ao GDF-9 não controla os níveis de GDF-9, R-FSH e BMPs.

Palavras-chave: BMPs, folículo, GDF-9, *in vitro*, RNAm

Effects of GDF-9 and FSH on the development of caprine preantral follicles and levels of mRNA for GDF-9, FSH-R and BMPs after *in-vitro* culture

Cintia C. F. Leitão¹, José J. N. Costa¹, Ivina R. Brito², Deborah M. Magalhães², Anderson P. Almeida², José R. de Figueiredo², Robert van den Hurk³, José R. V. Silva¹

¹Biotechnology Nucleus of Sobral - NUBIS, Federal University of Ceara, Sobral, CE, Brazil.

²Faculty of Veterinary Medicine, Laboratory of Manipulation of Oocytes and Preantral Follicles - LAMOFOPA, State University of Ceara, Fortaleza, CE, Brazil.

³Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands.

Corresponding address (C. C. F. Leitão): Biotechnology Nucleus of Sobral - NUBIS, Federal University of Ceara, Av. Gerardo Rangel 100, CEP 62041-040, Sobral, CE, Brazil. Phone / Fax: +55 88 3611 8000 [cintia.biologa23@gmail.com]

Abstract

The aim of this study was to determine the role of GDF-9 alone or in combination with FSH on growth and mRNA expression for GDF-9, FSH-R and BMPs in goat secondary follicles after culture *in vitro*. Goat secondary follicles (~200µm) were isolated and cultured for 6 days in medium supplemented with GDF-9 (200 ng/mL), FSH (50 ng/mL) or both GDF-9 and FSH. At the beginning and the end of culture, the follicular diameter was evaluated and compared. After extraction of total RNA and cDNA synthesis, the levels of mRNA for GDF-9, FSH-R and BMPs -2, -4, -6, -7 and -15 in cultured secondary follicles were quantified by

real time PCR. The results showed that, after culture, an increase of goat secondary follicles diameter was observed, but the effects on treated secondary follicles did not differ from the cultured controls. In cultured secondary follicles, GDF-9 down-regulated the levels of mRNA for BMPs -2 and -15, while FSH either alone or in combination with GDF-9 did not affect expression of GDF-9, FSH-R and BMPs. In conclusion, GDF-9 reduces the expression of BMP-2 and -15 in caprine preantral follicles after their culture, but FSH either alone or in association with GDF-9 did not control of GDF-9, FSH-R and BMPs.

Keywords: BMPs, follicles, GDF-9, *in vitro*, mRNA

1. Introduction

The mammalian ovary is a potential source of fertilisable gametes within preantral follicles (i.e. primordial, primary and secondary follicles), but the vast majority becomes atretic during growth and maturation [1]. To increase the efficiency of this gonad, the role of growth factors and gonadotropins, that are involved in the complex bidirectional signaling between the oocyte and the surrounding somatic cells during the growth and development of secondary follicles (~200 μm) up to the antral stage, has been evaluated [2-4]. Recently, oocyte maturation and *in-vitro* embryo production have been described after culture of goat secondary follicles [5, 6], but despite the success of these studies, these *in-vitro* systems still have a very low efficiency, with a small percentage of embryos produced from *in vitro* matured oocytes. In this context, quantification of mRNA of growth factors during follicular development *in vitro* can contribute to the establishment of an ideal culture medium and thus increase the potential of these *in-vitro* models.

Growth and differentiation factor-9 (GDF-9) belongs to the various growth factors that control the early follicle growth in mammals [7]. GDF-9 may be secreted by oocyte and granulosa cells [cattle: 8, goat: 9], but oocyte-specific expression of GDF-9 protein has been reported [mouse: 10, human: 11, 12, rat: 13]. *In vitro*, GDF-9 promotes the growth of the oocyte, proliferation of granulosa cells [14], differentiation of thecal cells [8] and specific cellular functions [12]. Like GDF-9, bone morphogenetic proteins (BMPs) comprise another subgroup of ligands in the TGF- β superfamily and are involved in folliculogenesis [15, 16]. The expression of BMP -2, -4, -6, -7 and -15 has been demonstrated in the somatic follicular components of preantral follicles in several species [mice: 17, ovine: 18, caprine: 19, 9]. Receptors for GDF-9 [9] and FSH [20] are expressed in goat preantral follicles, but it is still not known if GDF-9 either alone or together with FSH controls the expression of FSH-R, GDF-9 and BMP -2, -4, -6, -7 and -15.

It is hypothesized that GDF-9 could promote oocyte and granulosa cell development within goat preantral follicles and that this effect could be enhanced by the addition of FSH. We further hypothesize that the levels of mRNA for GDF-9, FSH-R and BMP-2,-4,-6,-7 and -15 could be up-regulated in the presence of GDF-9 and FSH. To test this hypothesis, the effects of GDF-9 and FSH, alone or in combination, on the morphological development of 6-days cultured goat secondary follicles were investigated, while the levels of mRNA for GDF-9, FSH-R and BMP-2, -4, -6, -7 and -15 in these follicles were quantified.

2. Material and Methods

2.1. Ovaries

Ovaries (n = 10) of goats (*Capra hircus*) were collected from a slaughterhouse and transported to the laboratory in minimal essential medium (MEM) containing antibiotics (100 µg/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin) at 32°C in maximum of 1 hour.

2.2. Isolation and *in-vitro* culture of goat secondary follicles

In the laboratory, surrounding fat tissue and ligaments were stripped off from the ovaries. Ovarian cortical slices (1 to 2 mm in diameter) were cut from the ovarian surface using a surgical blade under sterile conditions. The ovarian cortex was subsequently placed in fragmentation medium, consisting of MEM plus HEPES. Secondary follicles of approximately 200 µm in diameter were visualized under a stereomicroscope (SMZ 645 Nikon, Tokyo, Japan) and manually dissected from strips of ovarian cortex using 26 gauge (26 G) needles. After isolation, follicles were transferred to 100 µL drops containing fresh medium under mineral oil to further evaluate the follicular quality. Follicles with a visible oocyte, surrounded by granulosa cells, an intact basement membrane and no antral cavity were selected for culture.

For *in-vitro* studies, after selection, follicles were individually cultured in 100 µL drops of culture medium in petri dishes (60 x 15 mm, Corning, USA). Control culture medium consisted of α -MEM (pH 7.2 - 7.4) supplemented with 3.0 mg/mL bovine serum albumin (BSA), ITS (insulin 10 µg/mL, transferrin 5.5 µg/mL and selenium 5 ng/mL), 2 mM glutamine, 2 mM hypoxanthine and 50 µg/mL of ascorbic acid under mineral oil. For

treatments, control culture medium was supplemented with 50 ng/mL of FSH (rFSH[®], Nanocore, Brazil), 200 ng/mL of GDF-9 (Sigma, St. Louis, USA) or both. These concentrations of FSH and GDF-9 were those that promoted the highest growth rates in *in vitro* goat preantral follicles in previous studies [21, 22]. Fresh media was prepared and incubated for 1 h prior to use. For culture, the follicles were randomly chosen and incubated for 6 days in the incubator with 5% CO₂ in air at 39 °C. Every other day, 60 µL of the culture media were replaced with fresh medium. A mean number of 30 follicles were used per treatment. The morphology and follicular diameter were assessed at the beginning and end of culture with the aid of an inverted microscope. In addition, the percentages of secondary follicles that reached antrum formation *in vitro* was determined.

To evaluate the effect of GDF-9, FSH and their combination on expression of mRNA of GDF-9, FSH-R and BMP -2, -4, -6, -7 and -15 in goat follicles that have been cultured for a six-day period, for each treatment, three groups of eight follicles were collected at the end of the culture period, which were then stored at -80 °C until extraction of total RNA.

2.3. Quantification of mRNA for GDF-9, FSH-R and BMPs in cultured follicles

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

Prior to reverse transcription, the eluted RNA samples were incubated for 5 min at 70 °C, and chilled on ice. Reverse transcription was then performed in a total volume of 20 µl, which was comprised of 10 µl of sample RNA, 4 µl 5X reverse transcriptase buffer (Invitrogen, São Paulo, Brazil), 8 units 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 °C, for 5 min at 80 °C, and then stored at -20 °C. Negative controls were prepared under the same conditions, but without the inclusion of the reverse transcriptase.

Quantification of mRNA was performed using SYBR Green. PCR reactions were composed of 1 µl cDNA as a template in 7.5 µl of SYBR Green Master Mix (PE Applied Biosystems, Foster City, CA), 5.5 µl of ultra-pure water, and 0.5 µM of each primer. The *primers* were designed to perform amplification of mRNA for GDF-9, FSH-R, BMP -2, -4, -6, -7 and -15 and housekeeping genes β -actin and ubiquitin (Table 1). The thermal cycling profile for the first round of PCR was: initial denaturation and activation of the polymerase for 15 min at 94 °C, followed by 40 cycles of 15 sec at 94 °C, 30 sec at 60 °C, and 45 sec at 72 °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 transform CT values into normalized relative expression levels.

2.4. Statistical analysis

The nonparametric Kruskal-Wallis test was used to compare data of mRNA for GDF-9, FSH-R, BMP -2, -4, -6, -7 and -15 in cultured follicles ($p < 0.05$). The T-test was used to compare the follicular diameter before and after culture ($p < 0.05$). Data of follicular growth in the different treatments were compared by the Student-Newman-Keuls test ($p < 0.05$). The chi-

square test was used to compare the percentage of follicles that had formed an antrum ($p < 0.05$).

3. Results

3.1. *In-vitro* growth of cultured secondary follicles

After culture of secondary follicles by six days in MEM alone or supplemented with FSH, GDF-9 or both FSH and GDF-9, a significant increase in follicular diameter was observed in all treatments when compared to day 0 (Table 2). When the follicular diameter was compared between treatments no difference was observed (Table 2). Moreover, the percentage of follicles that had developed an antrum formation did not differ between treatments (Table 2).

3.2. Levels of mRNA for GDF-9, FSH-R and BMPs in cultured secondary follicles

As illustrated in Figures 1 and 2, culture of goat secondary follicles in medium supplemented with FSH, GDF-9 or both did not influence the levels of mRNA for GDF-9 or FSH-R, compared to MEM alone. On the other hand, when compared to MEM, addition of GDF-9 to this medium significantly decreased the levels of mRNA for BMP-2 and BMP-15, but not those for BMP-4, -6, and -7. However, FSH either alone or in combination with GDF-9 did not affect expression of GDF-9, FSH-R and BMPs (Figures 3 A-E).

4. Discussion

It is well established that paracrine signals from the oocyte play an essential role in growth and development of the ovarian follicle. Oocyte-derived growth differentiation factor-9 (GDF-9) has been shown to favor oocyte growth and follicular development [rat: 23, goat: 24]. In this study, goat secondary follicles exposed for a period of six-day to GDF-9, FSH or both compounds, had an increase in the follicular diameter when compared to uncultured secondary follicles, but not when compared to follicles that had been cultured in MEM alone. Most likely, the absence of effects of GDF-9 and/or FSH on the development of early-staged follicles is due to the presence, in the culture medium used, of nutrients, such as amino acids and carbohydrates, and insulin, a hormone which is crucial in the regulation carbohydrate and fat metabolism [25]. Previously, this medium was used successfully by Silva *et al.* [26] to culture caprine preantral follicles, with addition of a fixed concentration of FSH, which enhanced survival, growth, and development of follicles. Furthermore, the presence of ascorbic acid in the medium aids in maintaining follicular viability, since it is known to promote collagen synthesis, both at the level of the genome, and as a co-factor in the secretion and stabilization of the protein [27]. Therefore, it is likely to assume that a follicle has a high requirement for ascorbic acid for the production of sufficient basal lamina components to maintain expansion of this membrane during its growth. Apart from the presence of certain components in the medium, the lack of GDF-9 and FSH effects on the growth of goat secondary follicles in this study could be attributed to the short culture period or the concentrations of the growth factor and/or the gonadotropin tested.

The results of this study show that, in cultured secondary follicles, FSH, GDF-9 or both do not change the expression patterns of GDF-9 or FSH-R. In contrast, in rodents, the expression of GDF-9 is up-regulated by FSH [28]. Possibly, the concentrations of FSH and/or

GDF-9 in the culture medium were not sufficient to stimulate the newly formation of mRNA for GDF-9 or FSH receptors. Contrary to FSH, addition of GDF-9 decreased the levels of mRNA for BMP-2 and BMP-15 in cultured secondary follicles. Several studies have shown the expression of BMP-15 mRNA in primary follicles [11, 13, 16, 29, 30]. The mRNA for BMP-15 was previously detected in caprine primordial, primary and secondary follicles as well as in oocyte and granulosa cells of antral follicles [9]. BMP-2 mRNA was localized in granulosa cells of rat primary, secondary and antral follicles [18], as well as in theca cells of bovine antral follicles [31]. It is possible that GDF-9 can have down-regulated expression of mRNA for BMP-2 and BMP-15 either directly or indirectly, since GDF-9 is able to induce the expression of BMP antagonists [32]. Several high-affinity binding proteins antagonize BMP signaling, including follistatin, noggin, chordin/SOG, and members of the DAN family, including DAN, cerberus, and gremlin [32].

In conclusion, this study demonstrates that addition of GDF-9 to the culture medium of goat secondary follicles after 6-days *in-vitro* reduces the synthesis of mRNA for BMP-2 and -15, but not that of BMP-4, -6, and -7, while FSH either alone or in combination with GDF-9 did not affect the growth and expression of GDF-9, FSH-R and BMPs in secondary follicles.

Acknowledgement

This study was supported by CNPq (Grant N° 474 731 / 2007-3) and FUNCAP.

Reference

1. Markström E, Svensson, EC, Shao R, Svanberg VB, Billig H. Survival factors regulating ovarian apoptosis-dependence on follicle differentiation. *Reproduction*. 2002; 123: 23-30.
2. Duarte AB, Chaves RN, Araújo VR, Celestino JJ, Silva GM, Lopes CA, et al. Follicular interactions affect the in vitro development of isolated goat preantral follicles. *Zygote*. 2010; 28:1-13.
3. Magalhães D, Fernandes D, Mororó M, Silva C, Rodrigues G, Bruno J, et al. Effect of the medium replacement interval on the viability, growth and in vitro maturation of isolated caprine and ovine preantral follicles. *Reprod Domest Anim*. 2010; 46: 134-140.
4. Romero S, Smitz J. Epregeulin can effectively mature isolated COCs, but fails as a substitute for the hCG/EGF stimulus on cultured follicles. *Reproduction*. 2009; 137: 997-1005.
5. Magalhães DM, Duarte AB, Araújo VR, Brito IR, Soares TG, Lima IM, et al. In vitro production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. *Theriogenology*. 2010; 75: 182-188.
6. Saraiva MV, Rossetto R, Brito IR, Celestino JJ, Silva CM, Faustino LR, et al. Dynamic medium produces caprine embryo from preantral follicles grown in vitro. *Reprod Sci*. 2010; 17: 1135-1143.
7. Vitt UA, Hsueh AJW. Stage-dependent role of growth differentiation factor-9 in ovarian follicle development. *Mol Cell Endocrinol*. 2002; 186: 211–217.
8. Spicer LJ, Aad PY, Allen DT, Mazerbourg S, Payne AH, Hsueh AJ. Growth differentiation factor 9 (GDF9) stimulates proliferation and inhibits steroidogenesis by

- bovine theca cells: influence of follicle size on responses to GDF9. *Biol Reprod.* 2008; 78: 243–253.
9. Silva JRV, Van Den Hurk R, Van Tol HTA, Roelen BAJ, Figueiredo JR. Expression of growth differentiation factor-9 (GDF-9), bone morphogenetic protein 15 (BMP-15) and BMP receptors in the ovaries of goats. *Mol Reprod Dev.* 2004; 70: 11-19.
 10. McGrath SA, Esquela AF, Lee SJ. Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Mol Endocrinol.* 1995; 9: 131–136.
 11. Aaltonen J, Laitinen MP, Vuojolainen K, Jaatinen R, Horelli-Kuitunen N, Seppa L, et al. Human growth differentiation factor 9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999; 84: 2744-2750.
 12. Sadeu C, Smitz J. Growth differentiation factor-9 and anti-müllerian hormone expression in cultured human follicles from frozen-thawed ovarian tissue. *Reprod BioMed Online.* 2008; 17: 537-548.
 13. Jaatinen R, Laitinen MP, Vuojolainen K, Aaltonen J, Louhio H, Heikinheimo K, et al. Localization of growth differentiation factor-9 (GDF-9) mRNA and protein in rat ovaries and cDNA cloning of rat GDF-9 and its novel homolog GDF-9B. *Mol Cell Endocrinol.* 1999; 156: 189–193.
 14. Spicer LJ, Aad PY, Allen D, Mazerbourg S, Hsueh AJ. Growth differentiation factor-9 has divergent effects on proliferation and steroidogenesis of bovine granulosa cells. *J Endocrinol.* 2006; 189: 329–339.
 15. Dube JL, Wang P, Elvin J, Lyons KM, Celeste AJ, Matzuk MM. The bone morphogenetic protein 15 gene is x-linked and expressed in oocytes. *Mol Endocrinol.* 1998; 12: 1809–1817.

16. Hogan BLM. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev.* 1996; 10: 1580–1594.
17. Erickson GF, Shimasaki S. The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003; 1: 9.
18. Juengel JL, Reader KL, Bibby AH, Lun S, Ross I, Haydon LJ, et al. The role of bone morphogenetic proteins 2, 4, 6 and 7 during ovarian follicular development in sheep: contrast to rat. *Reproduction.* 2006; 131: 501–513.
19. Frota IMA, Leitão CCF, Costa JJN, Brito IR, Van Den Hurk R, Silva JRV. Stability of housekeeping genes and expression of locally produced growth factors and hormone receptors in goat preantral follicles. *Zygote.* 2010; 19: 71-83.
20. Saraiva MVA, Celestino JJH, Araújo VR, Chaves RN, Almeida AP, Lima-Verde IB, et al. Expression of follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) in goat ovarian follicles and the impact of sequential culture medium on in vitro development of caprine preantral follicles. *Zygote.* 2010; 21: 1-10.
21. Martins FS, Celestino JJ, Saraiva MV, Matos, MH, Bruno, JB, Rocha-Junior CM, et al. Growth and differentiation factor-9 stimulates activation of goat primordial follicles in vitro and their progression to secondary follicles. *Reprod Fertil Dev.* 2008; 20: 916-924.
22. Matos MHT, Lima-Verde IB, Bruno JB, Lopes CAP, Martins FS, Santos KD, et al. Follicle stimulating hormone and fibroblast growth factor-2 interact and promote goat primordial follicle development in vitro. *Reprod Fertil.* 2007; 19: 677-684.
23. Hayashi M, McGee EA, Min G, Klein C, Rose UM, van Duin M, et al. Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology.* 1999; 140: 1236–1244.

24. Martins FS, Celestino JJ, Saraiva MV, Chaves RN, Rossetto R, Silva CM, Lima-Verde IB, Lopes CA, Campello CC, Figueiredo JR. Interaction between growth differentiation factor 9, insulin-like growth factor I and growth hormone on the in vitro development and survival of goat preantral follicles. *Braz J Med Biol Res.* 2010; 43: 728-36.
25. Van Wezel I, Rodgers RJ. Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment in vivo. *Biol Reprod.* 1996; 55: 1003-1011.
26. Silva CMG, Matos MHT, Rodrigues GQ, Faustino LR, Pinto LC, Chaves RN, et al. In vitro survival and development of goat preantral follicles in two different oxygen tensions. *Anim Reprod Sci.* 2010; 117: 83–89.
27. Pinnell SR. Regulation of collagen biosynthesis by ascorbic acid: a review. *Yale J Biol Med.* 1985; 58: 553–559.
28. Wang C, Roy SK. Expression of growth differentiation factor 9 in the oocytes is essential for the development of primordial follicles in the hamster ovary. *Endocrinology.* 2006; 147: 1725–1734.
29. Laitinen M, Vuojolainen K, Jaatinen R, Ketola I, Aaltonen J, Lehtonen E, et al. A novel growth differentiation factor-9 (GDF-9) related factor is co-expressed with GDF-9 in mouse oocytes during folliculogenesis. *Mech Dev.* 1998; 78: 135-140.
30. Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MPE, Juengel JL, Jokiranta TS, et al. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP-15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet.* 2000; 25: 279-283.
31. Fatehi AN, Van den Hurk R, Colenbrander B, Daemen AJ, Van Tol HT, Monteiro RM, et al. Expression of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2), 4 (BMP-4) and BMP receptors in the bovine ovary but absence of effects of BMP-2 and BMP-4

during IVM on bovine oocyte nuclear maturation and subsequent embryo development. *Theriogenology*. 2005; 63: 872–889.

32. Pangas SA, Jorgez CJ, Matzuk MM. Growth differentiation factor 9 regulates expression of the bone morphogenetic protein antagonist gremlin. *J Biol Chem*. 2004; 279: 32281-32286.

Table 1: Primer pairs used in real-time PCR for quantification of GDF-9, FSH-R and BMPs in 6-days cultured caprine preantral follicles.

Target gene	Primer sequence (5'→3')	Sense (s)		Position	Genbank accession n°.
		Anti-sense (as)			
β- actin	ACCACTGGCATTGTCATGGACTCT	s		188-211	GI:28628620
	TCCTTGATGTCACGGACGATTTCC	as		363-386	
UBQ	GAAGATGGCCGCACTCTTCTGAT	s		607-631	GI:57163956
	ATCCTGGATCTTGGCCTTCACGTT	as		756-780	
GDF-9	ACAACACTGTTTCGGCTCTTCACCC	s		332 – 356	GI:51702523
	CCACAACAGTAACACGATCCAGGTT	as		426-451	
FSH-R	AGGCAAATGTGTTCTCCAACCTGC	s		250-274	GI:95768228
	TGGAAGGCATCAGGGTCGATGTAT	as		316-340	
BMP-2	AGGCCCTTGCTTGTCACCTT	s		778-797	GI: 213521327
	TTGAGGCGTTTCCGCTGTTT	as		875-894	
BMP-4	TCAACCAACCACGCCATTGT	s		3105-3126	GI: 157092665
	TGAGTTCGGTGGGAACACAACA	as		3191-3213	
BMP-6	ACACATGAACGCCACCAACCAT	s		141-163	GI:76262832
	AGGATGACGTTGGAGTTGTCGT	as		262-284	
BMP-7	AGGCAGGCATGTAAGAAGCA	s		78-108	GI: 297481859
	TTGGTGGCGTTCATGTAGGA	as		223-243	
BMP-15	AAGTGGACACCCTAGGGAAA	s		237-257	GI:8925958
	TTGGTATGCTACCCGGTTTGGT	as		362-384	

Table 2. Follicular diameter and antrum formation before and after 6-days culture of secondary follicles in MEM and MEM supplemented with FSH, GDF-9 or both.

Treatments	Day 0 Diameter ± SEM	Day 6 Diameter ± SEM	Growth Diameter ± SEM	Antrum formation at Day 6 (%)
MEM	205.95 ± 8.163	296.089 ± 15.069*	90.136 ± 9.532	53.3% (16/30)
MEM + FSH	229.082 ± 7.397	352.551 ± 14.013*	123.468 ± 9.089	63.3% (19/30)
MEM + GDF-9	221.088 ± 9.52	332.142 ± 14.500*	111.053 ± 9.320	66.6% (20/30)
MEM + GDF-9 + FSH	224.319 ± 10.784	336.053 ± 17.418*	111.734 ± 10.84	76.6% (23/30)

* significant difference compared to day 0 (p<0.05).

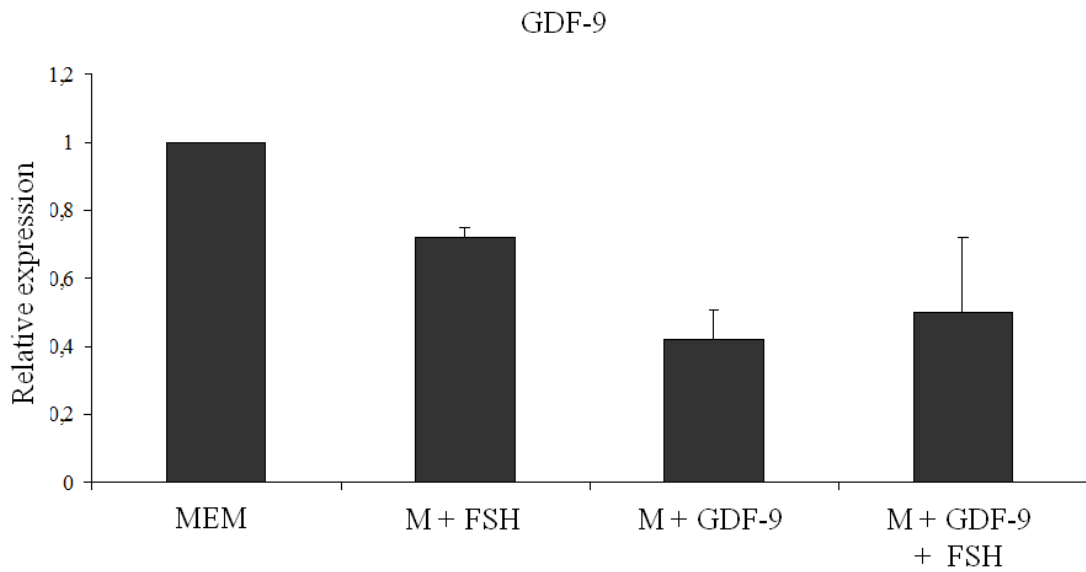


Figure 1. Levels of mRNA for GDF-9 on goat secondary follicles after culture in MEM and MEM supplemented with FSH, GDF-9 or both. (M: MEM)

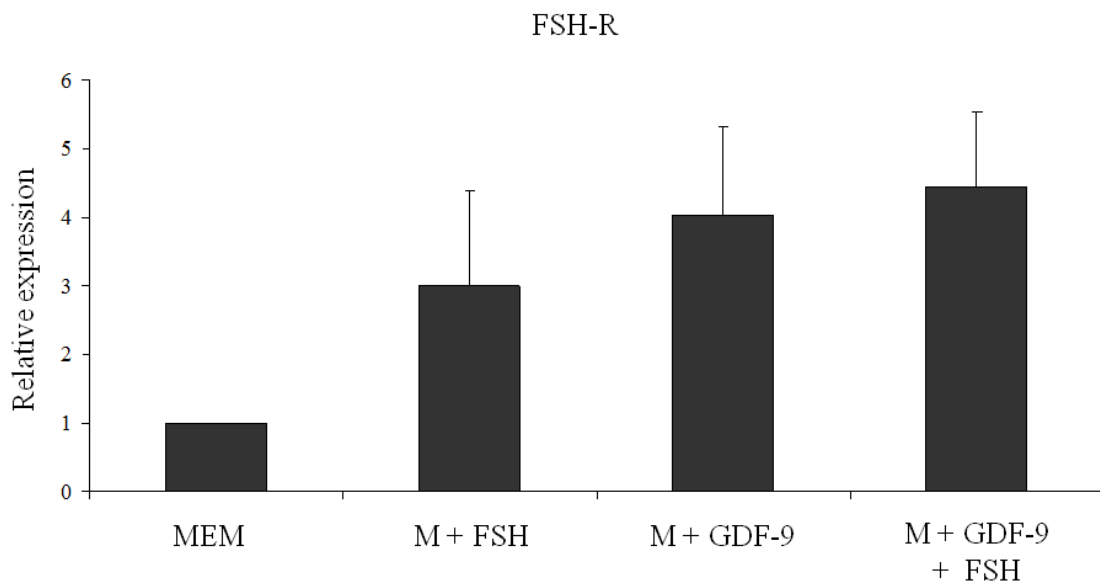
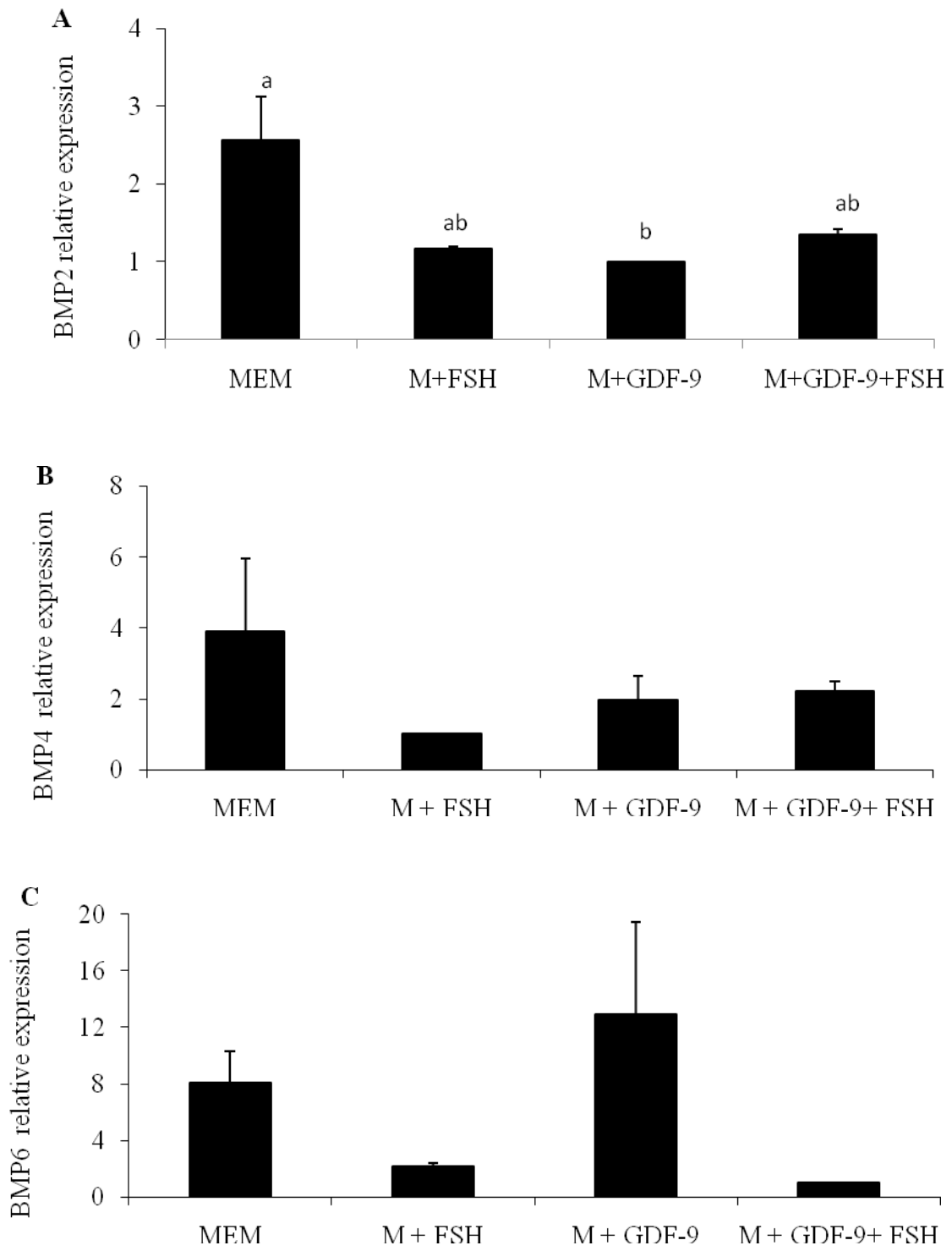


Figure 2. Levels of mRNA for FSH-R on goat secondary follicles after culture in MEM and MEM supplemented with FSH, GDF-9 or both. (M: MEM)



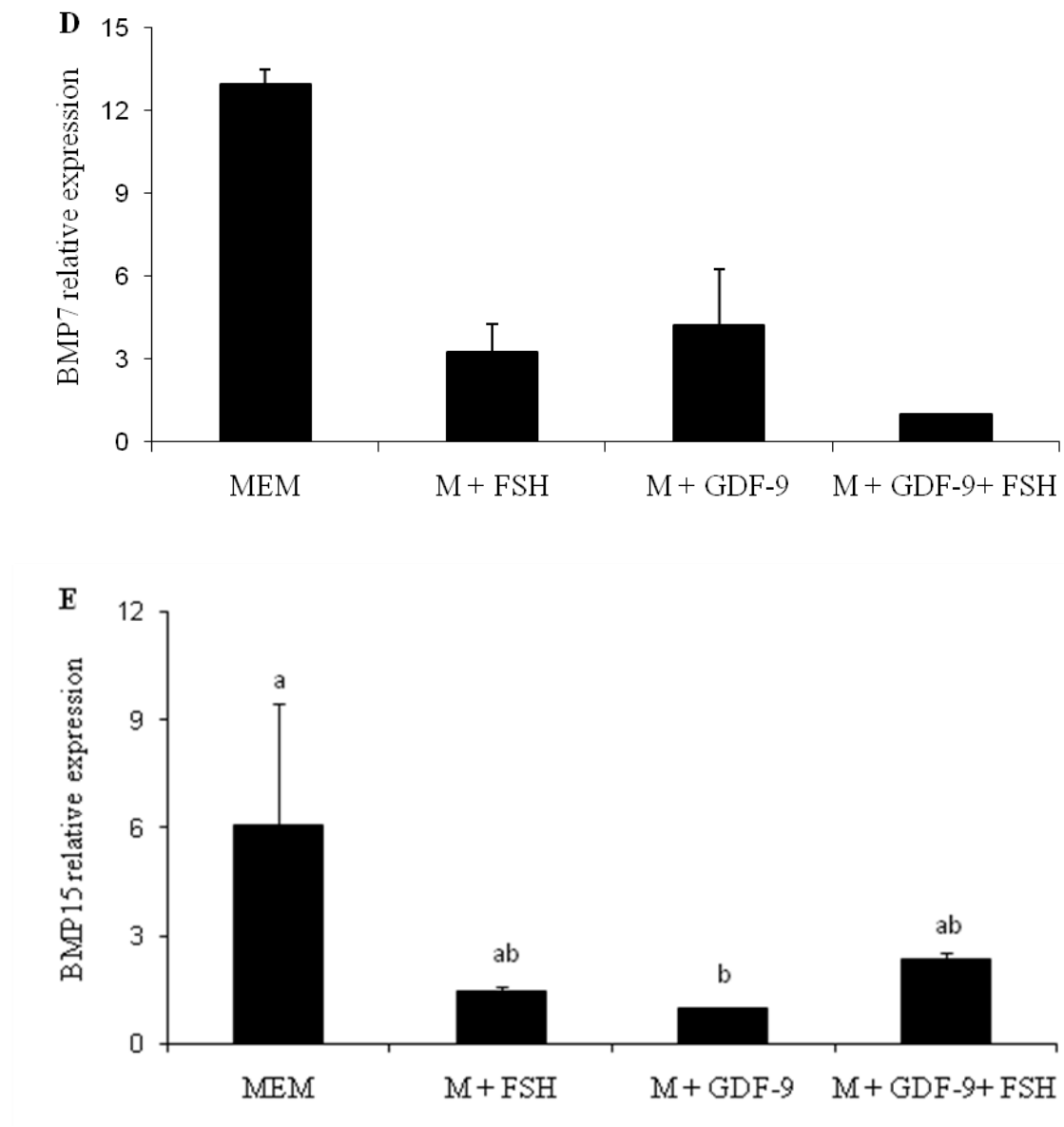


Figure 3. Levels of mRNA for (A) BMP-2, (B) BMP-4, (C) BMP-6, (D) BMP-7 and (E) BMP-15 on goat secondary follicles after culture in MEM and MEM supplemented with FSH, GDF-9 or both. (M: MEM)

^{ab} significant difference between treatments ($p < 0.05$).

8. CONCLUSÕES GERAIS

- Folículos secundários apresentam níveis menores de RNAm para ativina-A do que folículos primários;
- Células da granulosa e da teca de grandes folículos antrais apresentam maiores quantidades de RNAm para ativina-A do que de pequenos folículos antrais;
- COCs de folículos antrais e suas respectivas células da granulosa e da teca expressam níveis de RNAm para ativina-A semelhantes;
- FSH, sozinho ou em combinação com ativina-A e GDF-9, promove aumento das taxas de crescimento folicular e formação de antro.
- O FSH aumenta os níveis de RNAm para ativina-A em folículos secundários cultivados *in vitro* por seis dias, enquanto a ativina-A aumenta os níveis de RNAm para R-FSH.
- O GDF-9 regula de forma negativa a expressão de RNAm para as BMPs -2 e -15 em folículos secundários cultivados *in vitro* por seis dias.

9. PERSPECTIVAS

Diferentes padrões de expressão de RNAm para ativina-A são observados durante o desenvolvimento folicular em caprinos e, em folículos secundários cultivados, os níveis de expressão de RNAm para ativina-A, R-FSH e BMPs-2 e -15 podem ser regulados através de uma complexa interação de fatores intra (ativina-A e GDF-9) e extra-ovarianos (FSH). Estas informações podem contribuir para o estabelecimento de um meio de cultivo ideal para promover o crescimento e maturação de oócitos inclusos em folículos pré-antrais caprinos, culminando com a obtenção de embriões viáveis. Em futuros experimentos, pode ser testada a adição de outros hormônios e fatores de crescimento, em diferentes momentos do cultivo ou do desenvolvimento folicular.

REFERÊNCIAS

AALTONEN, J.; LAITINEN, M. P.; VUOJOLAINEN, K.; JAATINEN, R.; HORELLI-KUITUNEN, N.; SEPPA, L.; LOUHIO, H.; TUURI, T.; SJORBERG, J.; BUTZOW, R.; HOVATA, O.; DALE, L.; RITVOS, O. Human growth differentiation factor 9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 84, p. 2744–2755, 1999.

ABIR, R.; FISCH, B.; NAHUN, R.; ORVIETO, E.; NITKE, S.; OKON, E.; BEN-RAFAEL, Z. Turner's syndrome and fertility: Current status and possible future prospects. **Hum. Reprod.**, v. 7, p. 603-610, 2001.

ADAM, A. A.; TAKAHASHI, Y.; KATAGIRI, S.; NAGANO, M. *In vitro* culture of mouse preantral follicles using membrane inserts and developmental competence of *in vitro* ovulated oocytes. **J. Reprod. Dev.**, v. 50, p. 579-586, 2004.

ADAMS, G. P.; JAISWAL, B.; SINGH, J.; MALHI, P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. **Theriogenology**, v. 69, n. 1, p. 72-80, 2008.

ADASHI, E. Y. Endocrinology of the ovary. **Hum. Reprod.**, v. 9, p. 815-827, 1994.

ALAK, B. M.; COSKUN, S.; FRIEDMAN, C. I.; KENNARD, E. A.; KIM, M. H.; SEIFER, D. B. Activin A stimulates meiotic maturation of human oocytes and modulates granulosa cell steroidogenesis *in vitro*. **Fertility and Sterility**, v. 70, p. 1126–1130, 1998.

ALAK, B. M.; SMITH, G. D.; WOODRUFF, T. K.; STOUFFER, R. L.; WOLF, D. P. Enhancement of primate oocyte maturation and fertilization *in vitro* by inhibin A and activin A. **Fertility and Sterility**, v. 66, p. 646–653, 1996.

ALBAMONTE, M. S.; WILLIS, M. A.; ALBAMONTE, M. I.; JENSEN, F.; ESPINOSA, M. B.; VITULLO, A. D. The developing human ovary: immunohistochemical analysis of germ-cell-specific VASA protein, BCL-2/BAX expression balance and apoptosis. **Hum. Reprod.**, v. 23, p. 1895–1901, 2008.

AMORIM, C. A.; LUCCI, C. M.; RODRIGUES, A. P. R.; CARVALHO, F. C. A.; FIGUEIREDO, J. R.; RONDINA, D.; CECCHI, R.; GIORGETTI, A.; ARTINI, A.; GONÇALVES, P. B. D. Quantitative and qualitative analysis of the effectiveness of a mechanical method for the isolation of preantral follicles from ovine ovaries. **Theriogenology**, v. 53, p. 1251-1262, 2000a.

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

ANDERSEN, C. L.; JENSEN, J. L.; ORNTOFT, T. F. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Res.**, v. 64, p. 5245-5250.

ANDREONE, L.; VELÁSQUEZ, E. V.; ABRAMOVICH, D.; AMBAO, V.; LORETI, N.; CROXATTO, H. B.; PARBORELL, F.; TESONE, M.; CAMPO, S. Regulation of inhibin/activin expression in rat early antral follicles. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 309, p. 48–54, 2009.

ANTONINI, S. R. C.; MENEGHIN, S. P.; URASHIMA, A. S. **Técnicas básicas de Biologia Molecular**. São Paulo: Universidade Federal de São Carlos, 2004. 49 p.

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

AUGUSTIN, R.; POCAR, P.; WRENZYCKI, C.; NIEMANN, H.; FICHER, B. Mitogenic and anti-apoptotic activity of insulin on bovine embryos produced *in vitro*. **Reproduction**, v. 126, p. 91-99, 2003.

BAKER, S. J.; SPEARS, N. Follicle stimulating hormone inhibits apoptosis in pre- and earlyantral murine follicles *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility Abstract**, v. 19, p. 21, 1997.

BARNETT, K. R.; SCHILLING, C.; GREENFELD, C. R.; TOMIC, D.; FLAWS, J. A. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. **Hum. Reprod. Update**, v. 12, p. 537-555, 2006.

BASSO, A. C.; GARCIA, J. M.; ESPER, C. R. Efeitos de diferentes sistemas de cultivo *in vitro* sobre o crescimento de folículos pré-antrais isolados de ovários de fetos bovinos. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v. 44, p. 134-143, 2007.

BERNARD, D. J.; CHAPMAN, S. C.; WOODRUFF, T. K. An emerging role for coreceptors in inhibin signal transduction. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 180, p. 55–62, 2001.

BEZERRA, M. B.; RONDINA, D.; OLIVEIRA, L. C.; LIMA, A. K. F.; CECCHI, R.; LUCCI, C. M.; GIORGETTI, A.; FIGUEIREDO, J. R. Aspectos quantitativos da foliculogênese na fase pré-natal na espécie caprina. **Ciência Animal**, v. 8, p. 30-41, 1998.

BILLIAR, R. B.; CLAIR, J. B.; ZACHOS, N. C.; BURCH, M. G.; ALBRECHT, E. D.; PEPE, G. J. Localization and developmental expression of the activin signal transduction proteins smads 2, 3, and 4 in the baboon fetal ovary. **Biol. Reprod.**, v. 70, p. 586–592, 2004.

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

BRUNO, J. B.; LIMA-VERDE, I. B.; MARTINS, F. S.; MATOS, M. H. T.; LOPES, C. A. P.; MAIA-JR, J. E.; BÁO, S. N.; NOBRE JUNIOR, H. V.; MAIA, F. D.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O., SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R. Característica histológica, ultra-estrutural e produção de nitrito de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro* na ausência ou presença de soro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 2008.

BUCCIONE, R.; SCHROEDER, A. C.; EPPIG, J. J. Interactions between somatic cells and germ cells throughout mammalian oogenesis. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 543-547, 1990.

CALDER, M. D.; CAVENEY, A. N.; SMITH, L. C.; WATSON, A. J. Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation *in vitro*. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 14, 2003.

CECCONI, S.; BARBONI, B.; COCCIA, M.; MATTIOLI, M. In vitro development of sheep preantral follicles. **Biol. Reprod.**, v. 60, p. 594-601, 1999.

CELESTINO, J. J.; BRUNO, J. B.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H.; SARAIVA, M. V.; CHAVES, R. N.; MARTINS, F. S.; ALMEIDA, A. P.; CUNHA, R. M.; LIMA, L. F.; NAME, K. P.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R.; 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*. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 77, p. 231-240, 2010.

CHANG, H.; BROWN, C. W.; MATZUK, M. M. Genetic analysis of the mammalian transforming growth factor- β superfamily. **Endocr. Rev.**, v. 23, p. 787–823, 2002.

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

CORTVRINDT, R.; SMITZ, J.; VAN STEIRTEGHEM, A. C. *In vitro* maturation, fertilization and embryo development of immature oocytes from early preantral follicles from prepuberal mice in a simplified culture system. **Hum. Reprod.**, v. 11, p. 2656-2666, 1996.

CUNNINGHAM, J. **Veterinary Physiology**. Guanabara Koogan, 2004.

DEMEESTERE, I.; DELBAERE, A.; GERVY, C.; VAN DEN BERGH, M.; DEVREKE, F.; ENGLERT, Y. Effect of preantral follicle isolation technique on *in vitro* follicular growth, oocyte maturation and embryo development in mice. **Hum. Reprod.**, v. 17, p. 2152-2159, 2002.

DESAI, N.; ALEX, A.; ABDELHAFEZ, F.; CALABRO, A.; GOLDFARB, J.; FLEISCHMAN, A.; FALCONE, T. Three-dimensional *in vitro* follicle growth: overview of culture models, biomaterials, design parameters and future directions. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 8, p. 119, 2010.

DISKIN, M. G.; AUSTIN, E. J.; ROCHE, J. F. Exogenous hormonal manipulation of ovarian activity in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p. 211-228, 2002.

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

DRAGOVIC, R. A.; RITTER, L. J.; SCHULZ, S. J.; AMATO, F.; ARMSTRONG, D. T.; GILCHRIST, R. B. Role of oocyte-secreted growth differentiation factor 9 in the regulation of mouse cumulus expansion. **Endocrinology**, v. 146, p. 2798-2806, 2005.

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

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

DRUMMOND, A. E.; DYSON, M.; LE, M. T.; ETHIER, J. F.; FINDLAY, J. K. Ovarian follicle populations of the rat express TGF-beta signalling pathways. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 202, p. 53-57, 2003.

DUARTE, A. B.; CHAVES, R. N.; ARAÚJO, V. R.; CELESTINO, J. J.; SILVA, G. M.; LOPES, C. A.; TAVARES, L. M.; CAMPELO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Follicular

interactions affect the *in vitro* development of isolated goat preantral follicles. **Zygote**, v. 28, p. 1-13, 2010.

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

DUFFY, D. M. Growth differentiation factor-9 is expressed by the primate follicle through the periovulatory interval. **Biol. Reprod.**, v. 69, p. 725–732, 2003.

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

EPPIG, J. J.; O'BRIEN, M. J. Comparison of preimplantation developmental competence after mouse oocyte growth development *in vitro* and *in vivo*. **Theriogenology**, v. 49, p. 415-422, 1998.

ERICKSON, G.F.; SHIMASAKI, S. The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v. 1, p. 9, 2003

ETHIER, J. F.; FINDLAY, J. K. Roles of activin and its signal transduction mechanisms in reproductive tissues. **Reproduction**, v. 121, p. 667–675, 2001.

FATEHI, A.N.; VAN DEN HURK, R.; COLENBRANDER, B.; DAEMEN, A.J.; VAN TOL, H.T.; MONTEIRO, R.M.; ROELEN, B.A.; BEVERS, M.M.. Expression of bone morphogenetic protein 2 (BMP-2), 4 (BMP-4) and BMP receptors in the bovine ovary but absence of effects of BMP-2 and BMP-4 during IVM on bovine oocyte nuclear maturation and subsequent embryo development. **Theriogenology**, v.63, p.872-889, 2005.

FEI, J.; QU, J. H.; DING, X. L.; XUE, K.; LU, C. C.; CHEN, J. F.; SONG, L.; XIA, Y. K.; WANG, S. L.; WANG, X. R. Fenvalerate inhibits the growth of primary cultured rat preantral ovarian follicles. **Toxicology**, v. 12, p. 1-6, 2010.

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

FIGUEIREDO, J. R.; HULSHOF, S. C.; VAN DEN HURK, R.; ECTORS, F. J.; FONTES, R. S.; NUSGENS, B.; BEVERS, M. M.; BECKERS, J. F. Development of a combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. **Theriogenology**, v. 40, p. 789-799, 1993.

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

FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; SILVA, J. R. V. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2.ed. São Paulo: Roca, p. 303-327. 2008.

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.; RIVERA, G. M.; EVANS, A. C. O.; TURZILLO, A. M. Differentiation of dominant vesus subordinate follicles in cattle. **Biol. Reprod.**, v. 65, p. 648-654, 2001.

FROTA, I. M.A.; LEITÃO, C.C.F.; COSTA, J.J.N.; BRITO, I.R.; VAN DEN HURK, R.; SILVA, J.R.V. Stability of housekeeping genes and expression of locally produced growth factors and hormone receptors in goat preantral follicles. **Zygote**, v. 19, p.71-83, 2010.

GALLOWAY, S.M.; MCNATTY, K.P.; CAMBRIDGE, L.M.; LAITINEN, M.P.E.; 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. **Nat. Genet.**, v. 25, p. 279-283, 2000.

GE, W.; KO, N.; PANG, F.Y.; CHUNG, M.; LIN, S.; YUEN, C.; LAU, M.; LIU, L.; SOHN, Y. C.; KOBAYASHI, M.; AIDA, K. Activin stimulates goldfish FSH biosynthesis by enhancing FSH β promoter activity. **Fish Physiol. Biochem.**,v. 28, p. 65–71, 2003.

GILCHRIST, R. B.; RITTER, L. J.; ARMSTRONG, D. T. Oocyte-somatic cel interactions during follicle development in mammals. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 82-83, p. 431-446, 2004.

GILCHRIST, R. B.; RITTER, L. J.; MYLLYMAA, S.; KAIVO-OJA, N.; DRAGOVIC, R. A.; HICKEY, T. E.; RITVOS, O.; MOTTERSHEAD, D. G. Molecular basis of oocyte-

paracrine signalling that promotes granulosa cell proliferation. **J. Cell Sci.**, v. 119, p. 3811–3821, 2006.

GOLIAS, C. H.; CHARALABOPOULOS, A.; CHARALABOPOLOS, K. Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. **International Journal Clinical Practice**, v. 58, p. 1134-1141, 2004.

GORDON, I. **Laboratory Production of Cattle Embryo**. Cambridge: University Press, 1994. 640p.

GOSDEN, R. G.; TELFER, E. Numbers of follicles and oocytes in mammalian ovaries and their allometric relationships. **J. Zoo.**, v. 211, p. 169-175, 1987.

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

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

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

HAFEZ, E. S. E. **Reproduction in farm animals**. 7.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1995. p.573.

HASEGAWA, Y.; MIYAMOTO, K.; ABE, Y.; NAKAMURA, T.; SUGINO, H.; ETO, Y.; SHIBAI, H.; IGARASHI, M. Induction of follicle stimulating hormone receptor by erythroid differentiation factor on rat granulosa cell. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 156, p. 668–674, 1988.

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, p. 1236–1244, 1999.

HEID, C. A.; STEVENS, J.; LIVAK, K. J.; WILLIAMS, P. M. Real time quantitative PCR. **Genome Research**, v. 6, p. 986-994, 1996.

HELDIN, C. H.; MIYAZONO, K.; TEN DIJKE, P. TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. **Nature**, v. 390, p. 465–471, 1997.

HEYWOOD, R. S.; SMITH, P.; HEATH, D. A.; JUENGEL, J. L.; WAKEFIELD, J.; MCNATTY, K. P. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. **Biol. Reprod.**, v. 66, p. 1134 – 1150, 2002.

HIRAO, Y.; NAGAI, T.; KUBO, M.; MIYANO, T.; MIYAKE, M.; KATO, S. In vitro growth and maturation of pig oocytes. **J Reprod Fertil.**, v.100, p.333-9,1994.

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

HOGAN, B.L.M. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. **Genes Dev.**, v. 10, p.1580-1594, 1996.

HOLLAND, P. M.; ABRAMSON, R. D.; WATSON, R.; GELFAND, D. H. Detection of specific 23 polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of 24 *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proceeding of the National Academy of 25 Sciences**, v. 88, p. 7276-7280, 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. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 87, p. 316-321, 2002.

HULSHOF, S. C. J.; FIGUEIREDO, J. R.; BECKERS, J. F. Isolation and characterization of preantral follicles from fetal bovine ovaries. **Vet. Quart.**, v. 16, p. 78-80, 1994.

HULSHOF, S. C. J.; FIGUEIREDO, J. R.; BECKERS, J. F.; BEVERS, M. M.; VANDERSTICHELE, H.; VAN DEN HURK, R. Bovine preantral follicles and activin: immunohistochemistry for activin and activin receptor and the effect of bovine activin A *in vitro*. **Theriogenology**, v. 48, p. 133–142, 1997.

HULSHOF, S. C. J.; FIGUEIREDO, J. R.; BECKERS, J. F.; BEVERS, M. M.; VAN DER DONK, J. A. Effects of fetal bovine serum, FSH and 17 β -estradiol on the culture of bovine preantral follicles. **Theriogenology**, v. 44, p. 217-226, 1995.

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

ITOH, T.; KACCHI, M.; ABE, H.; SENDAI, Y.; HOSHI, H. Growth, antrum formation, and estradiol production of bovine preantral follicles cultured in a serum-free medium. **Biol. Reprod.**, v. 67, p. 1099–1105, 2002.

JAATINEN, R.; LAITINEN, M. P.; VUOJOLAINEN, K.; AALTONEN, J.; LOUHIO, H.; HEIKINHEIMO, K.; LEHTONEN, E.; RITVOS, O. Localization of growth differentiation factor-9 (GDF-9) mRNA and protein in rat ovaries and cDNA cloning of rat GDF-9 and its novel homolog GDF-9B. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 156, p. 189–193, 1999.

JOHNSON, A. L.; BRIDGHAM, J. T.; WOODS, D. C. Cellular mechanisms and modulation of activin A and transforming growth factor β -mediated differentiation in cultured hen granulosa cells. **Biol. Reprod.**, v. 71, p. 1844–1851, 2004.

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

JUENGEL, J. L.; HUDSON, N. L.; WHITING, L.; MCNATTY, K. P. Effects of immunization against bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 on ovulation rate, fertilization, and pregnancy in ewes. **Biol. Reprod.**, v. 70, p. 557-561, 2004.

JUENGEL, J.L.; READER, K.L.; BIBBY, A.H., LUN, S.; ROSS, I.; HAYDON, L.J.; MCNATTY, K. P. The role of bone morphogenetic proteins 2, 4, 6 and 7 during ovarian follicular development in sheep: contrast to rat. **Reproduction**, v. 131, p. 501-513, 2006.

JUNEJA, S. C.; CHEGINI, N.; WILLIAMS, R. S.; KSANDER, G. A. Ovarian intrabursal administration of transforming growth factor β 1 inhibits follicle rupture in gonadotropin-primed mice. **Biol. Reprod.**, v. 55, p. 1444–1451, 1996.

KATAYAMA, T.; SHIOTA, K.; TAKAHASHI, M. Activin A increases the number of folliclestimulating hormone cells in anterior pituitary cultures. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 69, p. 179-185, 1990.

KIPP, J. L.; KILEN, S. M.; BRISTOL-GOULD, S.; WOODRUFF, T. K.; MAYO, K. E. Neonatal Exposure to Estrogens Suppresses Activin Expression and Signaling in the Mouse Ovary. **Endocrinology**, v. 148, p. 1968–1976, 2007a.

KIPP, J. L.; GOLEBIOWSKI, A.; RODRIGUEZ, G.; DEMCZUK, M.; KILEN, S. M.; MAYO, K. E. Gene expression profiling reveals Cyp26b1 to be an activin regulated gene involved in ovarian granulosa cell proliferation. **Endocrinology**, v. 152, p. 303-312, 2011.

KIPP, J. L.; KILEN, S. M.; WOODRUFF, T. K.; MAYO, K. E. Activin regulates estrogen receptor gene expression in the mouse ovary. **J. Biol. Chem.**, v. 282, p. 36755–36765, 2007b.

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

KRETZER, D. M.; ROBERTSON, D. M. The isolation and physiology of inhibin and related proteins. **Biol. Reprod.**, v. 40, p. 33–47, 1989.

KREUZER, H.; MASSEY, A. **Engenharia genética e biotecnologia**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2002. 434p.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J. M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONAK, J.; LIND, K.; SINDELKA, R.; SJOBACK, R.; SJOGREEN, B.; STROMBOM, L.; STAHLBERG, A.; ZORIC, N. The real-time polymerase chain reaction. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 95–125, 2006.

LAITINEN, M.; VUOJOLAINEN, K.; JAATINEN, R.; KETOLA, I.; AALTONEN, J.; LEHTONEN, E.; HEIKINHEIMO, M.; RITVOS, O. A novel growth differentiation factor-9 (GDF-9) related factor is co-expressed with GDF-9 in mouse oocytes during folliculogenesis. **Mech. Dev.**, v. 78, p. 135-140, 1998.

LEE, V. H. Expression of rabbit zona pellucida-1 messenger ribonucleic acid during early follicular development. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 401, 2000.

LENIE, S.; CORTVRIND, T. R, SMITZ, A. J. A reproducible two-step culture system for isolated primary mouse ovarian follicles as single functional units. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 1730-1738, 2004.

LEWIS, K. A.; GRAY, P. C.; BLOUNT, A. L.; MACCONELL, L. A.; WIATER, E.; BILEZIKJIAN, L. M.; VALE, W. Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. **Nature**, v. 404, p. 411–414, 2000.

LI, R.; PHILLIPS, D. M.; MATHER, J. P. Activin promotes ovarian follicles development *in vitro*. **Endocrinology**, v.136, p. 849-856, 1995.

LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H.; SARAIVA, M. V.; BRUNO, J. B.; TENÓRIO, S. B.; MARTINS, F. S.; ROSSETTO, R.; CUNHA, L. D.; NAME, K. P.; BÁO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Interaction between estradiol and follicle-stimulating hormone promotes *in vitro* survival and development of caprine preantral follicles. **Cells Tissues Organs**, v. 191, p. 240-247, 2010.

LIU, X.; ANDOH, K.; YOKOTA, H.; KOBAYASHI, J.; ABE, Y.; YAMADA, K.; MIZUNUMA, H.; IBUKI, Y. Effects of growth hormone, activin, and follistatin on the development of preantral follicle from immature female mice. **Endocrinology**, v. 139, p. 2342-2347, 1998.

LUCCI, C. M.; AMORIM, C. A.; BAO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; SILVA, J. R. V.; GONCALVES, P. B. D. Effect of the interval of serial sections of ovarian tissue in the tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 56, p. 39-49, 1999.

LUCCI, C. M.; SILVA, R. V.; CARVALHO, C. A.; FIGUEIREDO, R.; BÁO, N. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. **Small Ruminant Research**, v. 41, p. 61-69, 2001.

MACCHIARELLI, G.; JIANG, J. Y.; NOTTOLA, S. A.; SATO, E. Morphological patterns of angiogenesis in ovarian follicle capillary networks. A scanning electron microscopy study of corrosion cast. **Microsc. Res. Tech.**, v.69, p. 459-468, 2006.

MAGALHÃES, D. M.; ARAÚJO, V. R.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H.; SILVA, R. C.; LUCCI, C. M.; BÁO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Impact of pituitary FSH purification on *in vitro* early folliculogenesis in goats. **Biocell**, v. 33, p. 91-97, 2009.

MAGALHÃES, D. M.; DUARTE, A. B.; ARAÚJO, V. R.; BRITO, I. R.; SOARES, T. G.; LIMA, I. M.; LOPES, C. A.; CAMPELLO, C. C.; RODRIGUES, A. P.; FIGUEIREDO, J. R. In vitro production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. **Theriogenology**, v. 75, p. 182-188, 2010a.

MAGALHÃES, D. M.; FERNANDES, D.; MORORÓ, M.; SILVA, C.; RODRIGUES, G.; BRUNO, J.; MATOS, M.; CAMPELLO, C.; FIGUEIREDO, J. Effect of the medium replacement interval on the viability, growth and *in vitro* maturation of isolated caprine and ovine pre-antral follicles. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 46, p. 134-140, 2010.

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

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

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

MARTINS DA SILVA, S. J.; BAYNE, R. A.; CAMBRAY, N.; HARTLEY, P. S.; MCNEILLY, A. S.; ANDERSON, R. A. Expression of activin subunits and receptors in the developing human ovary: Activin A promotes germ cell survival and proliferation before primordial follicle formation. **Dev. Biol.**, v. 266, p. 334–345, 2004.

MARTINS, F. S.; CELESTINO, J. J.; SARAIVA, M. V.; CHAVES, R. N.; ROSSETTO, R.; SILVA, C. M.; LIMA-VERDE, I. B.; LOPES, C. A.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. R. Interaction between growth differentiation factor 9, insulin-like growth factor I and growth hormone on the *in vitro* development and survival of goat preantral follicles. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 43, p. 728-736, 2010.

MARTINS, F. S.; CELESTINO, J. J.; SARAIVA, M. V.; MATOS, M. H.; BRUNO, J. B.; ROCHA-JUNIOR, C. M.; LIMA-VERDE, I. B.; LUCCI, C. M.; 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. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 20, p. 916-924, 2008.

MARTINS, F.S. **Papel do GDF-9, IGF-I e GH sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos.** 2009. 215f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, 2009.

MASSAGUE, J.; CHEN, Y. G. Controlling TGF- β signaling. **Genes Dev.**, v. 14, p. 627–644, 2000.

MATHEWS, L. S.; VALE, W. W. Expression cloning of an activin receptor, a predicted transmembrane serine kinase. **Cell**, v. 65, p. 973–982, 1991.

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*. **Reprod. Fertil. Dev.**, v. 19, p. 677-684, 2007.

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

MATOS, M. H.; BRUNO, J. B.; ROCHA, R. M.; LIMA-VERDE, I. B.; SANTOS, K. D.; SARAIVA, M. V.; SILVA, J. R.; MARTINS, F. S.; CHAVES, R. N.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R. In vitro development of primordial follicles after long-term culture of goat ovarian tissue. **Res. Vet. Sci.**, 2010, doi:10.1016/j.rvsc.2010.07.007.

MATZUK, M. M.; KUMAR, T. R.; COERVER, S. K. A.; LAU, A. L.; BEHRINGER, R. R.; FINEGOLD, M. J. Transgenic models to study the roles of inhibins and activins in reproduction, oncogenesis, and development. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 51, p. 123–154, 1996.

MAZERBOURG, S.; KLEIN, C.; ROH, J.; KAIVO-OJA, N.; MOTTERSHEAD, D. G.; KORCHYNSKYI, O.; RITVOS, O.; HSUEH, A. J. Growth differentiation factor-9 signaling is mediated by the type I receptor, activin receptor-like kinase 5. **Mol. Endocrinol.**, v. 18, p. 653–665, 2004.

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

McGRATH, S. A.; ESQUELA, A. F.; LEE, S. J. Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. **Mol. Endocrinol.**, v. 9, p. 131–136, 1995.

McLAUGHLIN M.; TELFER, E. E. Oocyte development in bovine primordial follicles is promoted by activin and FSH within a two-step serum-free culture system. **Reproduction**, v. 139, p. 971-978, 2010.

McLAUGHLIN, M.; BROMFIELD, J. J.; ALBERTINI, D. F.; TELFER, E. E. Activin promotes follicular integrity and oogenesis in cultured preantral bovine follicles. **Mol. Hum. Reprod.**, 2010, doi: 10.1093/molehr/gaq021.

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.

MIRO F.; HILLIER, S. G. Modulation of granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis and differentiation by activin. **Endocrinology**, v. 137, p. 464–468, 1996.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. Início do desenvolvimento humano. In MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia Clínica**, 480p. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994, p. 13-38.

MOUSSET-SIMEON, N.; JOUANNET, P.; LE COINTRE, L.; COUSSIEU, C.; POIROT, C. Comparison of three *in vitro* culture systems for maturation of early preantral mouse ovarian follicles. **Zygote**, v. 13, p. 167-175, 2005.

MULLIS, K. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**, v. 262, p. 56-62, 1990.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerasecatalyzed chain reaction. **Methods in Enzymology**, v. 155, p. 335-350, 1987.

MURDOCH, W. J. Ovarian surface epithelium, ovulation and carcinogenesis. **Biol. Ver.**, v. 71, p. 529-543, 1996.

MURUVI, W.; PICTON, H. M.; RODWAY, R. G.; JOYCE, I. M. *In vitro* growth of oocytes from primordial follicles isolated from frozen-thawed lamb ovaries. **Theriogenology**, v. 64, p. 1357-1370, 2005.

MYERS, M.; VAN DEN DRIESCHE, S.; MCNEILLY, A. S.; DUNCAN, W. C. Activin A reduces luteinisation of human luteinised granulosa cells and has opposing effects to human chorionic gonadotropin *in vitro*. **Journal of Endocrinology**, v. 199, p. 201-212, 2008.

NATION, A.; SELWOOD, L. The production of mature oocytes from adult ovaries following primary follicle culture in a marsupial. **Reproduction**, v. 138, p. 247-255, 2009.

NOVAIS, C. M.; PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 33, p. 10-13, 2004.

OKTEM, O.; OKTAY, K. The role of extracellular matrix and activin-A in *in vitro* growth and survival of murine preantral follicles. **Reprod. Sci.**, v. 14, p. 358-366, 2007.

OLA, S. I.; AI, J. S.; LIU, J. H.; WANG, Q.; WANG, Z. B.; CHEN, D. Y.; SUN, Q. Y. Effects of gonadotrophins, growth hormone, and activin A on enzymatically isolated follicle growth, oocyte chromatin organization, and steroid secretion. **Mol. Reprod. Dev.**, v.75, p. 89-96, 2008.

ORISAKA, M.; ORISAKA, S.; JIANG, J. Y.; CRAIG, J.; WANG, Y.; KOTSUJI, F.; TSANG, B. K. Growth differentiation factor-9 is anti-apoptotic during follicular development from preantral to early antral stage. **Mol. Endocrinol.**, v. 20, p. 2456–2468, 2006.

PANGAS, S. A.; RADEMAKER, A. W.; FISHMAN, D. A.; WOODRUFF, T. K. Localisation of the activin signal transduction components in normal human ovarian follicles: implications for autocrine and paracrine signaling in the ovary. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 87, p. 2644–2657, 2002.

PANGAS, S. A.; SAUDYE, H.; SHEA, L. D.; WOODRUFF, T. K. Novel approach for the three-dimensional culture of granulosa cell–oocyte complexes. **Tissue Engineering**, v. 9, p. 1013-1021, 2003.

PARROT, J. A.; SKINNER, M. K. Kit ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. **Endocrinology**, v. 140, p. 4262-4271, 1999.

PENNETIER, S.; UZBEKOVA, S.; PERREAU, C.; PAPILLIER, P.; MERMILLOD, P.; DALBIES-TRAN, R. Spatio-temporal expression of the germ cell marker genes MATER, ZAR1, GDF9, BMP15, and VASA in adult bovine tissues, oocytes, and preimplantation embryos. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 1359–1366, 2004.

PESTY, A.; MIYARA, F.; DEBEY, P.; LEFEVRE, B.; POIROT, C. Multiparameter assessment of mouse oogenesis during follicular growth *in vitro*. **Molecular Human Reproduction**, v. 13, p. 3-9, 2007.

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

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.

PINEDA, M. H. Female reproductive system. In: MCDONALD, L.E. **Veterinary Endocrinology and Reproduction**. Lea & Febiger. Philadelphia, 1989, p. 303-354.

PINNELL, S.R. Regulation of collagen biosynthesis by ascorbic acid: a review. **Yale J. Biol. Med.**, v. 58, p. 553-559, 1985.

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

ROMERO, S.; SMITZ, J. Epreglulin can effectively mature isolated COCs, but fails as a substitute for the hCG/EGF stimulus on cultured follicles. **Reproduction**, v. 137, p. 997-1005, 2009.

ROSSETTO, R.; LIMA-VERDE, I. B.; MATOS, M. H.; SARAIVA, M. V.; MARTINS, F. S.; FAUSTINO, L. R.; ARAÚJO, V. R.; SILVA, C. M.; NAME, K. P.; BÁO, S. N.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R.; BLUME, H. Interaction between ascorbic acid and follicle-stimulating hormone maintains follicular viability after long-term *in vitro* culture of caprine preantral follicles. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 37, p. 112-23, 2009.

ROY, S. K.; TREACY, B. J. Isolation and long term culture of human preantral follicles. **Fertil. Steril.**, v. 59, p.783-790, 1993.

SADATSUKI, M.; TSUTSUMI, O.; YAMADA, R.; MURAMATSU, M.; TAKETANI, Y. Local regulatory effects of activin A and follistatin on meiotic maturation of rat oocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 196, p. 388-395, 1993.

SADEU, C.; SMITZ, J. Growth differentiation factor-9 and anti-müllerian hormone expression in cultured human follicles from frozen-thawed ovarian tissue. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 17, p. 537-548, 2008.

SAHA, S.; SHIMIZU, M.; GESHI, M.; IZAIKE, Y. In vitro culture of bovine preantral follicles. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 63, 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 (FSHR) in goat ovarian follicles and the impact of sequential culture medium on *in vitro* development of caprine preantral follicles. **Zygote**, v. 21, p. 1-10, 2010a.

SARAIVA, M. V. A.; ROSSETTO, R.; BRITO, I. R.; CELESTINO, J. J.; SILVA, C. M.; FAUSTINO, L. R.; ALMEIDA, A. P.; BRUNO, J. B.; MAGALHÃES, D. M.; MATOS, M. H.; CAMPELLO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Dynamic medium produces caprine embryo from preantral follicles grown *in vitro*. **Reprod. Sci.**, v. 17, p. 1135-1143, 2010b.

SAUMANDE, J. Ovogenèse et folliculogenèse. **Rec. Méd. Vét.**, v. 157, p. 29-38. 1981.

SENEDA, M. M.; BORDIGNON, V. New concepts on folliculogenesis. **Acta Science Veterinarie**, v. 35, p. 863-868, 2007.

SERAFIM, M. K.; ARAÚJO, V. R.; SILVA, G. M.; DUARTE, A. B.; ALMEIDA, A. P.; CHAVES, R. N.; CAMPELLO, C. C.; LOPES, C. A.; FIGUEIREDO, J. R.; DA SILVA, L. D. Canine preantral follicles cultured with various concentrations of follicle-stimulating hormone (FSH). **Theriogenology**, v. 74, p. 749-755, 2010.

SIES, H.; STAHL, W.; SUNDQUIST, A. R. Antioxidant functions of vitamins. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 669, p. 7-20, 1992.

SILVA, C. C.; GROOME, N. P.; KNIGHT, P. G. Immunohistochemical localisation of inhibin/activin alpha, betaA and betaB subunits and follistatin in bovine oocytes during *in vitro* maturation and fertilization. **Reproduction**, v. 125, p. 33-42, 2003.

SILVA, C. C.; KNIGHT, P. G. Modulatory actions of activin-A and follistatin on the developmental competence of *in vitro*-matured bovine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 58, p. 558-565, 1998.

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

SILVA, J. R. V. **Growth factors in goat ovaries and the role of activin-A in the development of early-staged follicles**. 2005. Phd Thesis - Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine, p.142, 2005.

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

SILVA, J. R. V.; LEITAO, C. C. F.; SILVA, T. F. P.; MARTINS, F. S.; LOPES, C. A. P.; VAN DEN HURK, R. Gene expression during early follicular development and mechanisms of activation and growth of primordial follicles in mammals. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 38, p. 437-443, 2010.

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. **J. Endocrinol.**, 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.

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

SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; VAN TOL, H. T. A.; ROELEN, B. A. J.; FIGUEIREDO, J. R. Expression of growth differentiation factor 9 (GDF9), bone morphogenetic protein 15 (BMP15) and BMP receptors in the ovaries of goats. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 70, p. 11-19, 2004c.

SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R.; VAN TOL, H.T. A.; ROELEN, B. A. J.; FIGUEIREDO, J. R. Gene expression and protein localisation for activin-A, follistatin and activin receptors in goat ovaries. **J. Endocrinol.**, v. 183, p. 405-415, 2004d.

SILVA-PEREIRA, I. Amplificação de DNA por PCR. In: AZEVEDO, M. O.; FELIPE, M. S. S.; BRÍGIDO, M. M.; MARANHÃO, A. Q.; DE-SOUZA, M. T. **Técnicas básicas em Biologia molecular**. Editora: Universidade de Brasília. Brasília: p. 99-110, 2003.

SIRARD, M. A.; DESROSIER, S.; ASSIDI, M. *In vivo* and *in vitro* effects of FSH on oocyte maturation and developmental competence. **Theriogenology**, v. 68, p. S71-S76, 2007.

SMITH, P. W. S-O.; BRAW-TAL, R.; CORRIGAN, K.; HUDSON, N. L.; HEATH, D. A.; McNATTY, K. P. Ontogeny of ovarian follicle development in Booroola sheep fetuse that are homozogous carriers or non-carriers of the FecB gene. **J. Reprod. Fert.**, v. 98, p. 41-54. 1994.

SPICER, L. J.; AAD, P. Y.; ALLEN, D. T.; MAZERBOURG, S.; PAYNE, A. H.; HSUEH, A. J. Growth differentiation factor 9 (GDF9) stimulates proliferation and inhibits steroidogenesis by bovine theca cells: Influence of follicle size on responses to GDF9. **Biol. Reprod.**, v. 78, p. 243-253, 2008.

SPICER, L. J.; AAD, P. Y.; ALLEN, D.; MAZERBOURG, S.; HSUEH, A. J. Growth differentiation factor-9 has divergent effects on proliferation and steroidogenesis of bovine granulosa cells. **J. Endocrinol.**, v. 189, p. 329-339, 2006.

SUDO, S.; AVSIAN-KRETCHMER, O.; WANG, L. S.; HSUEH, A. J. Protein related to DAN and cerberus is a bone morphogenetic protein antagonist that participates in ovarian paracrine regulation. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 23134-23141, 2004.

SUGIMOTO, M.; KAGAWA, N.; MORITA, M.; KUME, S.; WONGPANIT, K.; JIN, H.; MANABE, N. Changes in the expression of decoy receptor 3 in granulosa cells during follicular atresia in porcine ovaries. **J. Reprod. Dev.**, v. 56, p. 467-74, 2010.

SUH, C. S.; SONNTAG, B.; ERICKSON, G. F. The ovarian life cycle: a contemporary view. **Rev. Endocr. Metab. Disord.**, v. 3, p. 5–12, 2002.

TELFER, E. E.; MCLAUGHLIN, M.; DING, C.; THONG, K. J. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. **Hum. Reprod.**, v. 23, p. 1151–1158, 2008.

TELFER, E. E. *In vitro* development of pig preantral follicles. **Reprod.**, v. 58, p. 81–90, 2001.

TELFER, E. E. *In vitro* models for oocyte development. **Theriogenology**, v. 15, p. 451-60, 1998.

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

TELFER, E. E.; MCLAUGHLIN, M.; KINI, S.; WILLIAMS, A.; THONG, K. J. Development of human preantral follicles *in vitro* is enhanced by timed exposure to activin-A followed by FSH. **Fertility and Sterility**, v. 90, p. 54, 2008.

THOMAS, F. H.; ARMSTRONG, D. G.; TELFER, E. E. Activin promotes oocyte development in ovine preantral follicles *in vitro*. **Reprod. Biol. Endocrinol.**, v. 1, p. 76, 2003.

TISDALL, D. J.; HUDSON, N.; SMITH, P.; MCNATTY, K. P. Localisation of ovine follistatin and alpha and beta A inhibin mRNA in the sheep ovary during the oestrous cycle. **J. Mol. Endocrinol.**, v. 12, p. 181–193, 1994.

VAN DEN HURK, R.; ABRIR, R.; TELFER, E. E.; BEVERES, M. M. Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. **Human Reproduction Update**, v. 6, p. 457-474, 2000.

VAN DEN HURK, R.; VAN DE PAVERT, S. A. Localisation of an activin/activin receptor system in the porcine ovary. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 60, p. 463–471, 2001.

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

VAN TOL, H. T.; BEVERS, M. M. Theca cells and theca cell conditioned medium inhibit the progression of FSH induced meiosis of bovine oocytes surrounded by cumulus cells connected to membrana granulosa. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 51, p. 315–21, 1998.

VAN WEZEL, I.; RODGERS, R.J. Morphological characterization of bovine primordial follicles and their environment *in vivo*. **Biol. Reprod.**, v. 55, p. 1003-1011, 1996.

VANDESOMPELE, J.; DE PRETER, K.; PATTYN, F.; POPPE, B.; VAN ROY, N.; DE PAEPE, A.; SPELEMAN, F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, 2002.

VITT, U. A.; HSUEH, A. J. W. Stage-dependent role of growth differentiation factor-9 in ovarian follicle development. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 186, p. 211–217, 2002.

VITZTHUM, F.; GEIGER, G.; BISSWANGER, H.; BRUNNER, H.; BERNHAGEN, J. A quantitative fluorescence based microplate assay for the determination of double stranded DNA using SybrGreen I and a standard ultraviolettransilluminator gel imaging system. **Anal Biochemical**, v. 276, p. 59-64, 1999.

WANDJI, S. A.; EPPIG, J. J.; FORTUNE, J. E. FSH and growth factors affect the growth and endocrine function *in vitro* of granulosa cells of bovine preantral follicles. **Theriogenology**, v.45, p.817-832, 1996.

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. **Biol. Reprod.**, v. 47, p. 807-813, 1992.

WANG, C. AND ROY, S. K. Expression of growth differentiation factor 9 in the oocytes is essential for the development of primordial follicles in the hamster ovary. **Endocrinology**, v. 147, p. 1725–1734, 2006.

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. **Biol. Reprod.**, v. 70, p. 577–585, 2004.

XIAO, S.; ROBERTSON, D. M.; FINDLAY, J. K. Effects of activin and follicle-stimulating hormone (FSH)-suppressing protein/follistatin on FSH receptors and differentiation of cultured rat granulosa cells. **Endocrinology**, v. 131, p. 1009–1016, 1992.

YEO, C. X.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G.; LANE, M. Exogenous growth differentiation factor 9 in oocyte maturation media enhances subsequent embryo development and fetal viability in mice. **Hum. Reprod.**, v. 23, p. 67–73, 2008.

ZHAO, J. **Development of rat preantral follicles *in vitro***. PhD thesis, Utrecht University, The Netherlands, 2000.

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. **Biol. Reprod.**, v. 65, p. 967–977, 2001.

ZIPPER, H.; BRUNNER, H.; BERNHAGEN, J.; VITZTHUM, F. Investigation on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. 294-299, 2004.