



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

EFEITO DA LECTINA DE *Phaseolus vulgaris* SOBRE O CULTIVO
***in vitro* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS (*Capra hircus*)**

ELLEN DE VASCONCELOS DA CUNHA

SOBRAL

2012

ELLEN DE VASCONCELOS DA CUNHA

**EFEITO DA LECTINA DE *Phaseolus vulgaris* SOBRE O CULTIVO
in vitro DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS (*Capra hircus*)**

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

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pires dos Santos

Co-orientador: Prof. Dr. José Roberto Viana Silva

SOBRAL

2012

ELLEN DE VASCONCELOS DA CUNHA

**EFEITO DA LECTINA DE *Phaseolus vulgaris* SOBRE O CULTIVO *in vitro* DE
FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS CAPRINOS (*Capra hircus*)**

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

Aprovada em 26/03/2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Pires dos Santos – Orientador
(Universidade Federal do Ceará – UFC)

Prof. Dr. João Batista Cajazeiras - Examinador
(Universidade Federal do Ceará – UFC)

Prof. Dr. Victor Alves Carneiro - Examinador
(Universidade Federal do Ceará – UFC)

À minha mãe Antonita e à minha filha Laís.

Com amor, dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus por providenciar tudo para a realização dessa dissertação. Obrigada por me atender em tudo o que peço.

Ao orientador Professor Dr. Ricardo Pires dos Santos pela confiança, pelos ensinamentos, pela atenção e paciência.

Ao Professor Dr. José Roberto Viana Silva por ter me co-orientado de forma tão gentil, por me deixar fazer parte de sua equipe e por ser um exemplo a ser seguido como profissional e pessoa.

Aos meus colegas do laboratório de cultivo de células Rodrigo Rossi, Jackson Costa, Moemia Portela, Anderson Weiny, Gisvani Lopes, Renato Passos, Juliane Passos, Regislane Ribeiro, Diego Tavares, Taiã Gomes, Glaucinete Borges e Katiane Freitas pela ajuda em todas as etapas do experimento. Vocês tornaram o trabalho mais “leve” e divertido.

Ao Professor Dr. Claudio Cabral Campello pelo auxílio nas análises estatísticas dos dados e pela atenção disponibilizada.

A Professora Dra. Márcia Viviane Alves Saraiva pela valorosa contribuição nas correções deste trabalho.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo apoio financeiro concedido na forma de bolsa de estudo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela disponibilização de recursos financeiros para realização do projeto.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pelos valorosos ensinamentos.

A todos os funcionários da Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral, em especial aos técnicos de laboratório, pela presteza e auxílio nos experimentos.

Aos meus pais Antonio Edson da Cunha e Antonia de Vasconcelos da Cunha pelo carinho, apoio e incentivo. Agradeço especialmente a minha mãe por ter me apoiado nas horas difíceis, por acreditar que eu conseguiria e por me amar incondicionalmente.

À minha filha Laís, que mesmo sem saber, me deu força para vencer as dificuldades encontradas ao longo dessa jornada.

À minha “segunda mãe” Maria pelo incentivo e amor. Obrigada por sempre me ajudar em todos os momentos.

A Jarbas Joaci de Mesquita Sá Junior pelo carinho e valiosa ajuda durante esses anos. Obrigada por compartilhar comigo suas experiências acadêmicas.

A todos os amigos e familiares, meu irmão Elvis, minha cunhada Viviane, meus sobrinhos Gustavo e Larissa, meus sogros Hélio e Marlene, meus cunhados Luciana e Cláudio, tios e primos, que torceram por mim.

A todos que não foram mencionados aqui, mas, que contribuíram para a realização deste trabalho.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo, fará coisas admiráveis.”

(José de Alencar)

RESUMO

Os caprinos são considerados importantes fontes de carne, leite e pele, e, portanto, desempenham importante papel econômico especialmente na região nordeste do Brasil. Diante disso, o desenvolvimento de sistemas de cultivo de folículos ovarianos pode otimizar o potencial reprodutivo desta espécie. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da lectina PHA de *Phaseolus vulgaris* sobre o desenvolvimento de folículos ovarianos caprinos cultivados *in vitro*. Folículos secundários (~ 0,2mm) foram isolados de córtex ovariano e individualmente cultivados por seis dias em α -MEM⁺ suplementado com 0, 1, 10, 50, 100 ou 200 μ g/mL da lectina PHA. Ao final do período de cultivo, os níveis de RNAm para FSH-R, PCNA e NOS₁ nestes folículos foram quantificados por qRT-PCR. Os resultados mostraram que, após o cultivo, todos os tratamentos foram capazes de manter a sobrevivência folicular. Além disso, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos e o controle no aumento do diâmetro folicular durante o cultivo. Entretanto, a PHA na concentração de 10 μ g/mL promove uma maior taxa de formação de antro em relação ao controle (α -MEM⁺). Nessa concentração houve maior expressão dos níveis de RNAm para FSH-R e PCNA. Em conclusão, a PHA na concentração de 10 μ g/mL mostrou ação biológica na formação antro e estimulou um aumento nos níveis de expressão de RNAm para FSH-R e PCNA em folículos secundários caprinos cultivados *in vitro* por 6 dias.

Palavras-chave: caprinos, folículos, lectina PHA, FSH.

ABSTRACT

Goats are considered important sources of meat, milk and skin, and therefore play an important economic role, especially in northeastern Brazil. Thus, the development of culture systems can optimize the reproductive potential of this species. This study aimed to evaluate the effect of lectin PHA of *Phaseolus vulgaris* on the development of caprine secondary follicles cultured *in vitro*. Secondary follicles (~0,2mm) were isolated from the cortex of caprine ovaries and individually cultured for six days in α -MEM+ supplemented with PHA at concentrations of 0, 1, 10, 50, 100 or 200 μ g/mL. The levels of mRNA for R-FSH, PCNA and NOS₁ in these follicles were also evaluated. The results showed that, after culture, all treatments were capable of maintaining the follicular survival. Moreover, there was no significant difference among all treatments regarding follicular growth. However, PHA at concentrations of 10 μ g/mL increased the antrum formation rate when compared with control. In this concentration, there was a higher expression of mRNA for R-FSH and PCNA. In conclusion, PHA at concentration 10 μ g/mL showed a biological action in antrum formation and stimulated an increase of levels of expression of RNAm in caprine ovarian follicles cultured for six days.

Keywords: caprine, follicle, lectin PHA, FSH.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Representação esquemática do ovário mamífero com suas principais estruturas	18
Figura 2 -	União das subunidades da PCNA com a braçadeira deslizante da DNA polimerase	22
Figura 3 -	Representação esquemática da formação do complexo carboidrato-lectina	28
Figura 4 -	Estrutura da Fitohemaglutinina de <i>Phaseolus vulgaris</i> (PHA)	30
Figura 5 -	Níveis de expressão de RNAm para FSH-R, PCNA e NOS ₁ em folículos cultivados por seis dias em meio suplementado com a lectina PHA nas concentrações 0 (MEM), 10 e 50µg/mL	40

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Primers usados na reação de PCR em tempo real para quantificação do mRNA para FSH-R, PCNA e NOS₁ 37
- Tabela 2 - Frequência (em percentual) de sobrevivência de folículos pré-antrais caprinos cultivados por seis dias em meio controle sem lectina (MEM) e com lectina PHA (tratado) em diferentes concentrações 38
- Tabela 3 - Valores médios \pm SEM dos diâmetros (em micrômetros) de folículos pré-antrais caprinos cultivados por seis dias em meio controle sem lectina (MEM) e com lectina PHA (tratado) em diferentes concentrações 39
- Tabela 4 - Frequência (em percentual) de formação de antro em folículos pré-antrais caprinos cultivados por seis dias em meio controle sem lectina (MEM) e com lectina PHA (tratado) em diferentes concentrações 39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMH	Hormônio anti-mülleriano
As	Anti-senso
BMP	Proteína Morfogenética Óssea
BSA	Albumina sérica bovina
°C	Graus Celsius
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CG	Célula da granulosa
CGPs	Células germinativas primordiais
CO ₂	Dióxido de carbono
ConA	Concanavalina A
CT	Cycle threshold
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Desoxirribonuclease
EGF	Fator de crescimento epidermal
FGF-2	Fator de crescimento fibroblástico-2
FSH	Hormônio folículo estimulante
G	Gauge
GDF-9	Fator de crescimento e diferenciação-9
GVB	Quebra da vesícula germinativa
h	Hora
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina-1
IL-4	Interleucina-4

ITS	Insulina, transferrina e selênio
KL	Kit Ligand
KDa	Quilodálon
LH	Hormônio luteinizante
LIF	Fator inibidor de leucemia
MEM	Meio essencial mínimo
mL	Mililitros
mg	Miligrama
min	Minuto
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de Sódio
Ng	Nanograma
NGF	Fator de crescimento neural
Nm	Nanômetro
NOS	Óxido Nítrico Sintetase
NUBIS	Núcleo de Biotecnologia de Sobral
Oo	Oócito
PBS	Tampão fosfato
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PGK	Fosfogliceratoquinase
R-FSH	Receptor para o hormônio folículo estimulante
PHA	Fitohemaglutinina de <i>Phaseolus vulgaris</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
PWN	Lectina de <i>Phytolacca americana</i>
P>0,05	Probabilidade de erro menor do que 5%

P<0,05	Probabilidade de erro maior do que 5%
RNA	Ácido ribonucléico
RNAm	Ácido ribonucléico mensageiro
RNase	Ribonuclease
SCNT	Transferência nuclear de células somáticas
SD	Standard deviation (Desvio-padrão)
S	Senso
Seg	Segundo
SEM	Média do erro padrão
TGF- β	Superfamília de fatores de crescimento transformante beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VIP	Peptídeo vasoativo
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro
μ m	Micrômetro
μ M	Micromolar
%	Porcentagem
~	Aproximadamente

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	O ovário e a formação folicular	18
2.1.1	<i>Formação de folículos primordiais</i>	19
2.1.2	<i>Ativação de folículos primordiais</i>	20
2.1.3	<i>Formação e crescimento de folículos primários e secundários</i>	21
2.1.4	<i>Formação de folículos antrais</i>	23
2.2	Atresia folicular	25
2.3	Sistemas de cultivo de folículos ovarianos	26
2.4	Lectinas	27
2.4.1	<i>Fitoemaglutinina de Phaseolus vulgaris – PHA</i>	29
2.5	Importância do FSH no controle da foliculogênese <i>in vitro</i>	31
3	JUSTIFICATIVA	32
4	HIPÓTESES	33
5	OBJETIVOS	34
6	MATERIAL E MÉTODOS	35
6.1	Substâncias Químicas	35
6.2	Coleta de ovários	35
6.3	Isolamento e cultivo de folículos	35
6.3.1	<i>Crescimento folicular e avaliação morfológica</i>	36
6.3.2	<i>Expressão de RNA mensageiro para PCNA, FSH-R e NOS</i>	36
6.4	Análise estatística	37
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
8	CONCLUSÃO	41
9	PERSPECTIVAS	42
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1 INTRODUÇÃO

A caprinocultura é uma atividade de alto valor econômico no cenário mundial e que vem crescendo nas últimas décadas, sobretudo em países em desenvolvimento, detentores dos maiores rebanhos (FONSECA, 2005). O nordeste brasileiro é considerado uma região propícia para criação de caprinos e ovinos, onde são importantes fontes de carne, leite e pele (BELCHIOR, 2003). Apesar do grande potencial de exploração, a caprinocultura no Brasil ainda é uma atividade de baixa produtividade. Diante disso, pesquisas na área de reprodução animal têm sido realizadas visando aumentar o potencial reprodutivo de caprinos de alto valor zootécnico.

Ao nascimento, o ovário caprino contém milhares de folículos primordiais, os quais são considerados o *pool* de estoque de folículos ovarianos. Entretanto, mais de 99,9% destes folículos nunca atingem a ovulação, visto que a maioria morre por um processo natural designado atresia folicular (MARKSTRÖM *et al.*, 2002).

O desenvolvimento e aprimoramento de sistemas de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos permitem a recuperação de um maior número de oócitos desde as fases iniciais do desenvolvimento até sua completa maturação, prevenindo a morte por atresia que ocorre *in vivo*. Além disso, são importante ferramenta para compreensão dos mecanismos que controlam o início e a progressão do crescimento folicular (FIGUEIREDO, 2008). Em camundongos, já foi relatada a obtenção de crias saudáveis a partir do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais (O'BRIEN *et al.*, 2003). Em caprinos, o cultivo *in vitro* de folículos secundários resultou na produção de oócitos maduros, os quais foram fecundados *in vitro* gerando embriões (SARAIVA *et al.*, 2010; MAGALHÃES *et al.*, 2011). No entanto, a obtenção de um grande número de oócitos maduros ainda é uma limitação desses sistemas de cultivo (SMITZ e CORTVRINDT, 2002).

Diversas substâncias têm sido testadas em sistemas de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos, dentre elas os hormônios FSH (SILVA *et al.*, 2004a) e LH (SARAIVA *et al.*, 2008) e fatores de crescimento que atuam no ovário como GDF-9 (MARTINS, *et al.*, 2010), KL, BMP-15 e EGF (CELESTINO *et al.*, 2010). Contudo, algumas substâncias não produzidas pelo ovário, como as lectinas, ainda não foram testadas em cultivo de folículos pré-antrais. Lectinas são proteínas ou glicoproteínas que se ligam reversível e especificamente a carboidratos (PEUMANS e VAN DAMME, 1995). Além de reconhecerem açúcares, algumas lectinas podem promover estimulação mitogênica de linfócitos (LIS e SHARON,

1986; NOWELL *et al.*, 1960), leucócitos (SHENG *et al.*, 2000) e fibroblastos (SELL e COSTA, 1998).

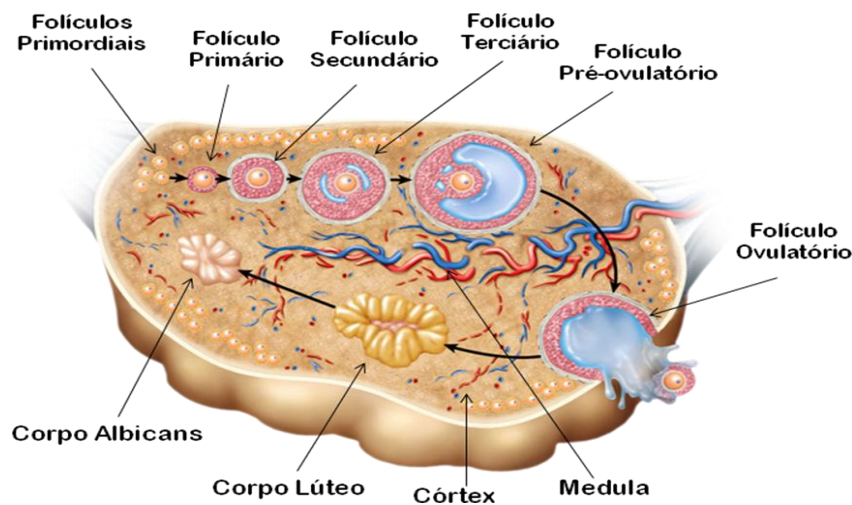
Para uma melhor compreensão deste trabalho, a revisão de literatura a seguir aborda aspectos relacionados ao ovário mamífero, formação e crescimento dos folículos ovarianos, atresia folicular, sistemas de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos e lectinas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O ovário e a formação folicular

O ovário mamífero é o principal órgão do sistema reprodutor feminino que desempenha dupla função no organismo: estimular o desenvolvimento e a liberação de óvulos e a síntese de hormônios esteróides (PINEDA, 1989). É composto por uma região cortical e uma medular. A camada superficial do ovário é revestida por um epitélio denominado túnica albugínea, abaixo da qual está situado o córtex que contém grande massa de folículos em vários estágios de desenvolvimento, corpos lúteos e elementos do estroma (REECE, 2005) (FIGURA 1). A região medular, responsável pela nutrição e sustentação do ovário, sendo composta por tecido conjuntivo frouxo, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e terminações nervosas que atingem o ovário através do seu hilo (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

Figura 1- Representação esquemática do ovário mamífero com suas principais estruturas.



Fonte: Adaptado de http://academic.kellogg.cc.mi.us/herbrandsonc/bio201_McKinley/Reproductive.

O folículo ovariano é a unidade morfológica e funcional do ovário. É composto por um oócito (célula germinativa) circundado por células da granulosa e células da teca (células somáticas). O folículo proporciona um ambiente ideal para crescimento e maturação do oócito (CORTVRINDT e SMITZ, 2001), bem como produz hormônios esteróides (BARNETT *et al.*, 2006). Assim, desempenha atividade gametogênica e esteroidogênica (McGEE *et al.*, 2000).

O processo de formação, desenvolvimento e maturação folicular é denominado de foliculogênese (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005).

A foliculogênese inicia com a formação do oócito (oogênese) ainda na vida fetal a partir das células germinativas primordiais (CGPs), derivadas do endoderma do saco vitelínico do embrião, seguido da proliferação e migração por movimentos amebóides até a crista genital e colonização da gônada primitiva (ADAMS *et al.*, 2008). As CGPs se diferenciam em oogônias, as quais sofrem uma série de divisões mitóticas antes do início de sua primeira divisão meiótica e formação do oócito primário, que permanece na fase de prófase I até o indivíduo atingir a maturidade sexual (PICTON, 2001; VAN DEN HURK e ZHAO, 2005).

Este processo de diferenciação e formação do oócito é um evento mediado por diversos fatores, alguns atuando na formação das células germinativas primordiais como as Proteínas Morfogenéticas Ósseas-2, 4 e 8 (BMP-2/4/8), outros atuando na sobrevivência (Kit Ligand-KL e Fator Inibidor de Leucemia-LIF), migração (KL) e diferenciação (Fator de Crescimento Fibroblástico-2 - FGF-2 e Fator de Necrose Tumoral-TNF α). Alguns fatores atuam também na proliferação das oogônias (Interleucina-4 e KL), no processo de colonização das gônadas pelas células germinativas primordiais (B1-integrina) e posterior compactação delas (E-caderina) (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005).

2.1.1 Formação de folículos primordiais

Após a colonização dos ovários pelas CGPs e posterior diferenciação em oogônias e oócitos, uma camada de células somáticas achatadas, conhecidas como células da pré-granulosa, circundam os oócitos formando assim os folículos primordiais (PICTON, 2001). Os oócitos remanescentes que não formaram folículos primordiais entram em processo de degeneração.

As células da pré-granulosa são originadas do mesonéfron ou podem ser recrutadas das células mesoteliais oriundas do epitélio da superfície ovariana que tem alta atividade proliferativa. Após circundarem os oócitos, as células da pré-granulosa param de se multiplicar e os folículos primordiais entram num período de quiescência (PICTON, 2001; SAWYER *et al.*, 2002). Os folículos primordiais representam o pool de células germinativas disponíveis durante toda a vida reprodutiva da fêmea (EPIFANO e DEAN, 2002) e correspondem a um total de 95% de todos os folículos presentes no ovário (CORTVRINDT e SMITZ, 2001).

A proliferação celular é retomada somente quando um folículo primordial quiescente começa a crescer, dias, meses ou anos após a sua formação (HIRSHFIELD, 1991). A formação dos folículos primordiais em ovários de caprinos é observada aos 62 dias de desenvolvimento fetal (BEZERRA *et al.*, 1998).

2.1.2 Ativação de folículos primordiais

Uma vez formados, os folículos primordiais podem permanecer quiescentes por meses ou anos, ou serem estimulados a crescer por um processo conhecido como ativação (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005). Assim, a ativação dos folículos primordiais permite o recrutamento de um grupo de folículos que passarão do pool de reserva ou de folículos quiescentes para o pool de folículos em crescimento (RÛSSE, 1983). Durante a vida reprodutiva, apenas um número limitado de folículos primordiais são selecionados para crescimento e diferenciação (FAIR, 2003).

A manutenção da quiescência é importante para garantir a fertilidade das fêmeas, pois impede a ativação precoce de todos os folículos e/ou a morte folicular (REDDY, 2008). O folículo primordial pode então seguir por três destinos: 1) permanecer em quiescência; 2) ser ativado e estimulado a se desenvolver até folículo ovulatório e 3) sofrer atresia antes mesmo de ser ativado.

Os fatores e mecanismos responsáveis pela ativação e folículos primordiais são pouco conhecidos. Acredita-se que a ativação seja regulada por um balanço entre fatores inibitórios e estimulatórios originários do ovário (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005). Em relação aos fatores inibitórios, estudos têm demonstrado que o Hormônio Anti-Mülleriano (AMH) inibe a ativação de folículos primordiais (DURLINGER *et al.*, 2002; REDDY *et al.*, 2009). Por outro lado, estudos mostram que o Kit Ligand (KL) promove ativação de folículos primordiais em ratas (PARROT e SKINNER, 1999) e camundongas (HUTT *et al.*, 2006). Da mesma forma, as BMPs têm um papel importante na ativação folicular de diferentes espécies (vacas: BODENSTEINER *et al.*, 1999; camundongas: LEE *et al.*, 2001; ovelhas: ovelhas: MERY *et al.*, 2007).

Na espécie caprina, diversos estudos realizados com folículos primordiais têm demonstrado que, KL (CELESTINO *et al.*, 2010), FSH (SILVA *et al.*, 2004a), Proteína Morfogenética Óssea-7 (BMP-7) (ARAÚJO *et al.*, 2010) Fator de Crescimento Fibroblástico-2 (FGF-2) (MATOS *et al.*, 2007a), GDF-9 (MARTINS *et al.*, 2008), Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-1 (IGF-1) (MARTINS *et al.*, 2009), Fator de Crescimento Epidermal

(EGF) (CELESTINO *et al.*, 2009), Ativina-A (SILVA *et al.*, 2006), Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF) (BRUNO *et al.*, 2009), Peptídeo Intestinal Vasoativo (VIP) (BRUNO *et al.*, 2010), estradiol e progesterona (LIMA-VERDE *et al.*, 2010) promovem a ativação de folículos primordiais e crescimento oocitário. O Fator Inibidor de Leucemia (LIF) também pode promover o desenvolvimento de folículos primordiais. Estudos com ovários de ratas demonstraram que o LIF promove transição de folículo primordial para primário e que pode interagir com KL para aumento na ativação folicular (NILSSON *et al.*, 2002).

A ativação é independente de gonadotrofinas. Apesar disso, o Hormônio Folículo Estimulante (FSH) exerce um efeito indireto sobre o desenvolvimento folicular inicial através da liberação de fatores parácrinos produzidos por folículos maiores ou pelas células do estroma ovariano (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005). Alguns trabalhos demonstraram que o FSH regula a expressão de vários fatores de crescimento, tais como Kit Ligand (KL), Fator de Crescimento e Diferenciação-9 (GDF-9) e Proteína Morfogenética Óssea-15 (BMP-15), que possuem papéis importantes na ativação e no posterior crescimento folicular (JOYCE *et al.*, 1999, THOMAS *et al.*, 2005).

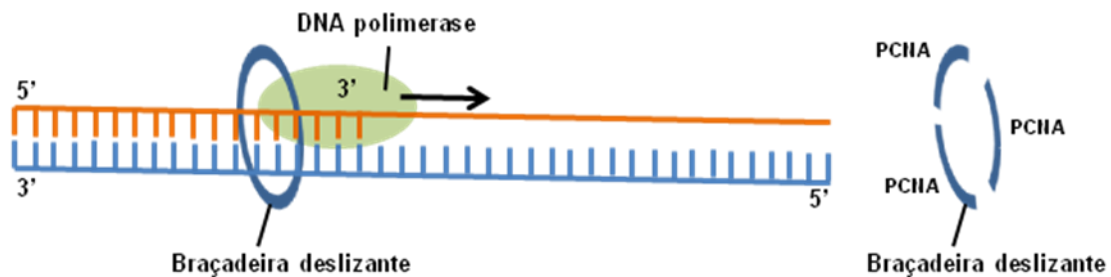
2.1.3 Formação e crescimento de folículos primários e secundários

Com a ativação, há a transição de folículos primordiais para folículos primários. A camada de células achatadas da pré-granulosa torna-se cubóide e adquire atividade mitogênica, passando a serem chamadas células da granulosa (SALHA *et al.*, 1998). Quando o oócito é circundado por uma camada completa de células da granulosa de formato cúbico, os folículos são classificados como primários (BARNETT *et al.*, 2006). Na espécie caprina, os folículos primários possuem diâmetro médio de 34,7 μm e sua formação ocorre ao redor do 71º dia de gestação (BEZERRA *et al.*, 1998). À medida que os folículos iniciam o crescimento, as proteínas que irão formar a zona pelúcida começam a ser sintetizadas (LEE, 2000).

A multiplicação das células da granulosa dos folículos primários leva à formação de várias camadas destas células ao redor do oócito, formando os folículos secundários. Neste estágio, a zona pelúcida é claramente identificada ao redor do oócito. Folículos secundários podem ser observados em ovários de cabras no 80º dia de gestação (BEZERRA *et al.*, 1998). Durante esta fase, ocorre uma intensa atividade mitótica nas células da granulosa, que é regulada por inúmeros fatores, dentre os quais se destaca o Antígeno Nuclear de Proliferação

Celular (PCNA). O PCNA é uma proteína nuclear que atua como co-fator para a DNA polimerase e se expressa diferentemente de acordo com o ciclo celular. A sua taxa de síntese é diretamente proporcional à taxa de proliferação celular. Essa proteína constitui-se em um marcador de células em proliferação, sendo expressa durante a replicação do DNA, no início da fase G1, como expressão máxima na fase S e declínio na fase G2 (GAN *et al.*, 1995; WANDJI *et al.*, 1996). A PCNA atua quando três subunidades dessa proteína se ligam a braçadeira deslizante onde estão unidas as DNAs polimerases durante a replicação do DNA (FIGURA 2).

Figura 2 - União das subunidades da PCNA com a braçadeira deslizante da DNA polimerase.



Fonte: Adaptada de De Robertis, 2006.

Alguns fatores de crescimento locais estão envolvidos na transição de folículo primário para secundário e também no seu crescimento, tais como GDF-9, BMP-15, ativinas, BMP-4, BMP-7 e família do fator de crescimento transformante- β (TGF- β) (DONG *et al.*, 1996; McNATTY *et al.*, 2007;). Outros fatores como a testosterona, VEGF, EGF e o Fator de Crescimento Neural (NGF) também podem influenciar a transição de folículos primários para secundários (YANG e FORTUNE, 2007; DISSEN *et al.*, 2001). Por outro lado, estudos mostram que o AMH exerce um papel negativo no desenvolvimento desses folículos (KNIGHT e GLISTER, 2006).

O crescimento de folículos secundários não requer a presença de gonadotrofinas, embora possuam receptores para FSH nas células da granulosa (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005). Entretanto, a presença desses receptores sugere seu papel na manutenção da viabilidade e crescimento de folículos pré-antrais (WANDJI *et al.*, 1992; ROY, 1993). Além disso, o crescimento folicular depende da comunicação bidirecional entre o oócito e as células da granulosa. Essa comunicação ocorre através de projeções transzonais (ALBERTINI *et al.*, 2001) ou por junções “gap” ou intercomunicantes, que permitem a passagem de íons,

moléculas e fatores de crescimento para auxiliar no desenvolvimento do oócito/células da granulosa (KIDDER e MHAWI, 2002).

Quando os folículos possuem de duas a três camadas de células da granulosa, algumas células semelhantes a fibroblastos são recrutadas do estroma ovariano e originam as células da teca. (PARROT e SKINNER, 2000). Honda e colaboradores (2007), demonstraram que o IGF1 e o KL estimulam a diferenciação das células do estroma em células da teca. Logo após terem sido recrutadas do estroma ovariano, as células da teca desenvolvem sua vascularização (FRASER E DUNCAN, 2009), atuando de forma endócrina e participando da síntese de hormônios esteróides (MAGOFFIN, 2005).

As células da granulosa e as células da teca começam a interagir durante as fases iniciais da foliculogênese através da sinalização célula-célula, que é mediada por fatores parácrinos locais e justácrinos (SKINNER, 2005). No ovário, interações celulares entre a granulosa, teca e oócito são essenciais para controlar a diferenciação e a proliferação das células foliculares, permitindo o crescimento do oócito e a diferenciação final. As interações entre as células da granulosa e da teca são necessárias para a biossíntese de estrógeno (BONNET *et al.*, 2008). Os estrógenos protegem o folículo dominante da atresia, sendo fundamentais para a sobrevivência dos folículos antrais (YOUNG e McNEILLY, 2010).

Com o crescimento e desenvolvimento dos folículos secundários, há um conseqüente aumento no número de camadas tecais, ocorrendo uma diferenciação celular. As células situadas próximas à membrana basal são denominadas teca interna, enquanto que as células localizadas periféricamente são denominadas teca externa. As células da teca sintetizam andrógenos que posteriormente são convertidos em estrógenos pelas células da granulosa numa via que se inicia pela ação da aromatase presente nas suas mitocôndrias.

2.1.4 Formação de folículos antrais

Com o crescimento dos folículos secundários e organização das células da granulosa em várias camadas, ocorre a formação de uma cavidade repleta de líquido denominada antro. O fluido folicular que preenche a cavidade antral contém água, eletrólitos, proteínas séricas e alta concentração de hormônios esteróides secretados pelas células da granulosa (BARNETT *et al.*, 2006) e é provavelmente derivado de sangue que flui dos capilares da teca. Para que o líquido da teca seja transportado para a cavidade antral, é necessário atravessar o endotélio dos capilares da teca, a membrana folicular e as células da granulosa. Alterações na permeabilidade dos capilares da teca são observadas após um pico de Hormônio Luteinizante

(LH), mas mecanismos adicionais são necessários para o líquido se acumular no antro (ESPEY, 1980; CAVENDER, 1988). As células da granulosa podem secretar unidirecionalmente moléculas osmoticamente ativas, como por exemplo, proteoglicanos e glicosaminoglicanos (ácido hialurônico, versican, sulfato de condroitina, dermatam sulfato), em direção ao centro do folículo produzindo um gradiente osmótico. Este gradiente é responsável pelo recrutamento de fluido para o centro do folículo (RODGERS, 2010). Durante o crescimento de folículos pré-antrais, múltiplos focos de fluido se formam, acumulam-se e desenvolvem o antro (CLARKE *et al*, 2006). O fluido antral pode servir como uma importante fonte de substâncias reguladoras ou moduladoras derivadas do sangue ou secreções de células foliculares como gonadotrofinas, fatores de crescimento, enzimas e proteoglicanos (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005).

A partir deste estágio, os folículos passam a ser denominados terciários ou antrais. O diâmetro dos folículos terciários aumenta acentuadamente devido ao crescimento do oócito, multiplicação das células da granulosa, da teca e aumento do fluido antral (DRIANCOURT, 2001). Com a progressão do desenvolvimento folicular em direção à fase pré-ovulatória, os folículos tornam-se criticamente dependentes de FSH e, posteriormente, de LH.

Alguns folículos terciários são recrutados para crescerem após o aumento nos níveis séricos de FSH. Estes folículos deixam de ser sensíveis e passam a ser dependentes de FSH. Durante esse período, os folículos recrutados, sintetizam grandes quantidades de estradiol sob estímulo de FSH e de LH, o que é fundamental para sobrevivência folicular (DRIANCOURT, 2001). Nesta fase, o FSH estimula a produção de outras substâncias como inibina e IGF-1 que regularão a síntese de estradiol. Em espécies monovulatórias, apenas um folículo é selecionado dentre os recrutados para continuar a crescer e diferenciar-se em folículo ovulatório, enquanto os demais se tornam subordinados e entram em atresia. O folículo selecionado é conhecido como folículo dominante e suprime ativamente o crescimento dos subordinados pela secreção de estradiol e inibina (GINTHER *et al.*, 1996; FORTUNE *et al.*, 2001). Na fase final da foliculogênese, o folículo dominante ovula sob influência do pico pré-ovulatório de LH. Em todas as espécies, a formação de folículos pré-ovulatórios ocorre geralmente durante a puberdade (DRIANCOURT, 2001).

2.2 Atresia folicular

Conforme foi relatado anteriormente, os gametas femininos são estocados no ovário nos folículos pré-antrais que representam cerca de 90% da população folicular e, destes, 95%

correspondem aos folículos primordiais. A reserva folicular ovariana é estabelecida durante a vida fetal na maioria das espécies mamíferas, ou imediatamente após o nascimento, em pequenos roedores. Apesar de este conceito ter sido descrito por Waldeyer desde 1870 (WALDEYER, 1870) e vigorar há mais de 150 anos (BYSKOV *et al.*, 2005), recentes trabalhos têm demonstrado mecanismos na formação, após o nascimento, de novas células germinativas e folículos na mulher (BUKOVSKY *et al.*, 2005) e em camundongas adultas pela atuação de células-tronco (JOHNSON *et al.*, 2004). A população folicular ovariana é composta por milhares de folículos e a quantidade destes folículos varia enormemente com a espécie animal, idade, estado nutricional e estado do ciclo estral. Embora a população de folículos seja vasta, a grande maioria, cerca de 99,9% é eliminada por um processo degenerativo conhecido como atresia (FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

A atresia pode ocorrer por via degenerativa e/ou apoptótica (SAUMANDE, 1991; FIGUEIREDO *et al.*, 2003). Na via degenerativa, a isquemia pode ser uma das principais causas do desencadeamento da morte folicular, resultando em alterações na permeabilidade da membrana celular, aumento de água intracelular, vacuolização citoplasmática e, conseqüentemente, degeneração (FARBER, 1982; BARROS *et al.*, 2001). A degeneração folicular pode ser reconhecida pela presença de mudanças morfológicas como presença de núcleo picnótico e de corpos apoptóticos na célula da granulosa, seguida pela retração da camada de células da granulosa da membrana basal do folículo e fragmentação da membrana basal (HIRSHFIELD, 1989).

A apoptose (morte celular programada) é um mecanismo celular essencial para o desenvolvimento embrionário e para a homeostase de tecidos adultos, visando eliminar células desnecessárias, infectadas ou danificadas geneticamente pela ativação de um programa de autodestruição celular intrínseco e controlado, dependente da expressão de genes pró e anti-apoptóticos (HURWITZ e ADASHI, 1992). O processo de apoptose é caracterizado por mudanças na membrana celular, fragmentação nuclear, condensação da cromatina e degradação do DNA. Durante a vida fetal, a apoptose ocorre principalmente nos oócitos, enquanto na vida adulta é detectada nas células da granulosa de folículos secundários e antrais (HÜSSEIN, 2005).

Visando reduzir essa grande perda folicular que ocorre naturalmente *in vivo*, diversos sistemas de cultivo *in vitro* têm sido desenvolvidos para otimizar o potencial reprodutivo das fêmeas com alto valor zootécnico e em vias de extinção. A seguir serão abordados os principais sistemas de cultivo de folículos ovarianos.

2.3 Sistemas de cultivo de folículos ovarianos

Os folículos pré-antrais podem ser cultivados inclusos no próprio ovário ou em fragmentos de ovário (*in situ*) e na forma isolada. O cultivo *in situ* permite o estudo de fatores relacionados com a ativação e crescimento de folículos primários. Esse sistema de cultivo mantém a estrutura tridimensional dos folículos, além de manter o contato e troca de substâncias entre as células (ABIR *et al.*, 2006). Em roedores, a pequena dimensão dos ovários possibilita o cultivo do órgão inteiro, o que tem sido bastante útil para o estudo da foliculogênese inicial em pequenos mamíferos (FORTUNE, 2003). Em animais domésticos de médio e grande porte, devido às grandes dimensões dos ovários, pode-se utilizar o cultivo de fragmentos do córtex ovariano (SILVA *et al.*, 2004b).

Folículos secundários e antrais são geralmente cultivados na forma isolada (PICTON *et al.*, 2008). Esse sistema permite a avaliação individual dos folículos e facilita a perfusão de meio e substâncias para o folículo (ABIR *et al.*, 2006). O isolamento pode ser feito por métodos enzimáticos e/ou mecânicos.

Modelos bi e tridimensionais têm sido criados e aperfeiçoados para o cultivo de folículos pré-antrais isolados. Em modelos bidimensionais, o folículo é cultivado diretamente sobre uma placa de cultivo ou sobre uma matriz extracelular, como por exemplo, o colágeno. Esse modelo tem a desvantagem de interferir na integridade folicular, pois o folículo tende a aderir e se achatar no fundo da placa ou matriz. Em modelos de cultivo tridimensionais, onde o folículo geralmente é recoberto por gel de colágeno ou alginato, sua estrutura esférica é mantida, o que permite a preservação da integridade estrutural do tecido (ABIR *et al.*, 2006; FIGUEIREDO *et al.*, 2008).

Em diferentes espécies, grandes avanços têm sido observados no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais. Em felinos (JEWGENOW e STOLTE, 1996) e marsupiais (BUTCHER e ULLMAN, 1996), observou-se o crescimento de folículos pré-antrais isolados, porém, sem a formação de antro. Em humanos, bovinos e caninos, folículos secundários isolados cresceram *in vitro* até o estágio antral (ROY e TREACY, 1993; GUTIERREZ *et al.*, 2000; SERAFIM *et al.*, 2010). Resultados mais satisfatórios foram obtidos com suínos (WU e TIAN, 2007), bubalinos (GUPTA *et al.*, 2008), ovinos (ARUNAKUMARI *et al.*, 2010) e caprinos (SARAIVA *et al.*, 2010; MAGALHÃES *et al.*, 2011), em que se alcançou a produção de embriões após cultivo *in vitro* de grandes folículos secundários.

No entanto, em ruminantes domésticos, como os caprinos, a limitação da técnica de cultivo de folículos pré-antrais isolados é a obtenção de um reduzido número de oócitos

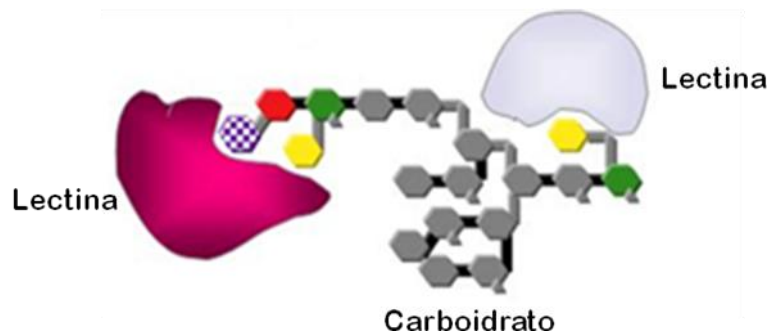
maturos, o que explica o diminuto número de embriões produzidos (SARAIVA *et al.*, 2010; MAGALHÃES *et al.*, 2011). Devido a essa limitação faz-se necessário o aperfeiçoamento dos sistemas de cultivo *in vitro* atualmente empregados. Diversas substâncias e fatores de crescimento intra-ovarianos vêm sendo testadas nos meios de cultivo a fim de melhorar a eficiência dos sistemas de cultivo (FSH: SILVA *et al.*, 2004; LH: SARAIVA *et al.*, 2008; GDF-9: Martins, *et al.*, 2010). Nesse sentido, uma grande quantidade de substâncias que ainda não foram investigadas, como as lectinas, podem ser inseridas ao meio de cultivo, visando à obtenção de um maior número de oócitos maduros.

2.4 Lectinas

Lectinas são proteínas ou glicoproteínas de origem não imune, que se ligam especifica e reversivelmente a mono e/ou oligossacarídeos (GOLDSTEIN, 1980; KOCOUREK e HOREJSI, 1983; PEUMANS e VAN DAMME, 1995). Na superfície da maioria das células, encontram-se padrões de carboidratos que podem ser reconhecidos por uma ou mais lectinas através de ligações seletivas. A ligação a carboidrato pode resultar em diferentes estímulos ou respostas celulares (KAPLOWITZ, 1985). A função das lectinas endógenas na interação célula - célula e célula - matriz é fundamental na proliferação, diferenciação e migração celular (SHARON e LIS, 1993). Estas proteínas são encontradas entre animais, plantas e microrganismos (LIS e SHARON, 1998).

Os sítios de ligação para açúcares nas lectinas são em forma de depressões rasas e cada lectina possui um, dois ou mais destes sítios. Em geral, apenas uma ou duas faces do carboidrato faz ligação com a proteína (LIS e SHARON, 1998). A afinidade das lectinas por monossacarídeos é usualmente fraca, com constantes de associação na faixa de milimolar, embora sejam de grande seletividade. A formação do complexo carboidrato-lectina (FIGURA 3) envolve o deslocamento de moléculas de água associadas aos grupos polares da proteína e ao redor do açúcar também polar, com o estabelecimento de novas ligações de hidrogênio. Estas ligações e as interações de Van der Waals são dominantes para a estabilidade da associação entre estas moléculas (KENNEDY *et al.*, 1995).

Figura 3- Representação esquemática da formação do complexo carboidrato-lectina.



Fonte: Adaptado de www.ncbi.nlm.nih.gov/books/glycobiology.

Lectinas possuem a habilidade de induzir o fenômeno de aglutinação celular. Assim, a presença dessas proteínas é detectada através de um ensaio de hemaglutinação (KENNEDY *et al.*, 1995). Porém, apenas algumas lectinas são capazes de aglutinar células (KOCOUREK e HOREJSI, 1983).

Van Damme e colaboradores (1995, 1998), classificaram as lectinas vegetais, de acordo com sua estrutura geral, em: 1) Merolectinas, que são proteínas compostas de um sítio de ligação a carboidrato e conseqüentemente, não apresentam atividade hemaglutinante ou capacidade de precipitar glicoconjugados. São exemplos as proteínas monoméricas das orquídeas e a heveína, lectina de *Hevea brasiliensis* (ANDERSEN *et al.*, 1993); 2) Hololectinas, proteínas que possuem dois ou mais domínios idênticos ou homólogos de reconhecimento a carboidratos. Apresentam-se, normalmente como dímeros ou tetrâmeros e, geralmente, possuem a capacidade de aglutinar células e precipitar glicoconjugados. A maior parte das lectinas de leguminosas são classificadas como hololectinas; 3) Quimerolectinas, que são lectinas que possuem pelo menos um único sítio de ligação a carboidratos, e que junto a este, possui um outro domínio que exerce uma função distinta de reconhecimento a açúcar como por exemplo a lectina da espécie *Ricinus communis* (RIP) (RUTENBER *et al.*, 1991). e 4) Superlectinas, proteínas que possuem pelo menos dois sítios de ligação a carboidratos, assim como as hololectinas, porém com especificidade a açúcares distintos. A estrutura da banana-lectin, lectina da espécie *Musa acuminata* é um exemplo ((MEAGHER *et al.*, 2005).

Inicialmente essa classificação foi feita, em quatro grupos, abrangendo significativamente inúmeras proteínas vegetais. Entretanto, algumas lectinas de plantas hoje descobertas e estruturalmente resolvidas, não se enquadram especificamente em nenhuma destas classificações. Um exemplo é a lectina da semente de *Parkia platycephala* que possui um domínio com capacidade de reagir enzimaticamente com o polissacarídeo composto de

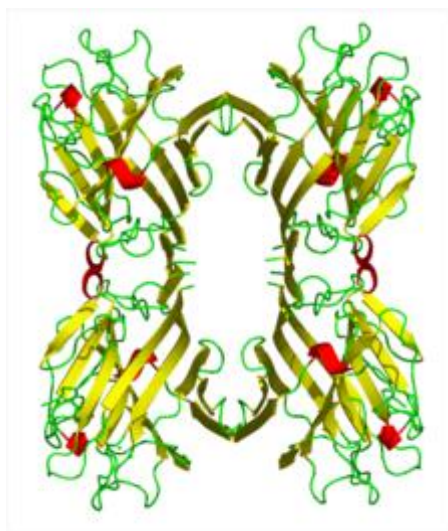
monômeros de *N*-acetyl-D-glucosamina (quitina) e, ao mesmo tempo, dentro deste mesmo domínio, possui um outro sítio de reconhecimento a carboidrato (CAVADA *et al.*, 2006).

Lectinas estão envolvidas em diversas atividades biológicas como comunicação celular, migração celular, defesa imunológica, fertilização, embriogênese, infecção parasitária, metástases tumorais e inflamação (GABIUS e GABIUS,1997; SHARON e LIS, 2004). Algumas lectinas são capazes de estimular a proliferação celular e por isso são consideradas mitogênicas. Dentre elas se destacam as lectinas PHA de *Phaseolus vulgaris* (NOWELL, 1960), a Con A de *Concanavalina ensiformis* (REICHERT *et al.*,1973), jacalina de *Artocarpus integrifolia* (SAXON *et al.*, 1987).

O efeito da suplementação dos meios de produção *in vitro* de embriões com lectinas vem despertando o interesse de muitos pesquisadores. Em 2009, Pandey e colaboradores, demonstraram aumento nos índices de maturação e melhora na regulação da expressão gênica de oócitos bubalinos maturados *in vitro*, em presença de lectinas. Da mesma forma, outros autores verificaram aumento na expansão de células do *cumulus*, maiores índices de extrusão do corpúsculo polar, da proporção de oócitos que alcançaram o estágio de metáfase II e ainda, um maior potencial de desenvolvimento do oócito maturado em diferentes espécies (bubalino: PANDEY *et al.*, 2009; bovino:WANG *et al.*, 2001; rato: FAGBOHUN & DOWNS, 1990). No entanto, não existem trabalhos mostrando os efeitos das lectinas em sistemas de cultivo de folículos pré-antrais.

2.4.1 Fitoemaglutinina de *Phaseolus vulgaris* – PHA

A fitoemaglutinina (PHA) é uma lectina extraída do feijão (*Phaseolus vulgaris*). É uma glicoproteína tetramérica com peso molecular 125 KDa e composta de duas subunidades distintas não covalentemente ligadas com peso molecular entre 29 e 35 KDa (FIGURA 4). As subunidades são denominadas E e L, e referem-se à atividade de hemaglutinação de eritrócitos e leucócitos humanos, respectivamente. Estas subunidades são sintetizadas em paralelo no retículo endoplasmático e depois aleatoriamente combinadas para produzir cinco isolectinas denominadas L4, L3E1, L2E2, L1E3 e E4 (LEAVITT *et al.*, 1977). Estas isolectinas tem propriedades físico-químicas semelhantes e homologia estrutural, mas diferem na especificidade aos carboidratos e na atividade biológica, indicando que a diferença reside em pequenas variações nas suas estruturas primárias. O açúcar específico dessa lectina é *N*-acetilgalactosamina, mas ela é capaz de reconhecer estruturas oligossacarídicas (LIENER, 1990).

Figura 4 - Estrutura da Fitohemaglutinina de *Phaseolus vulgaris* (PHA).

Fonte: Adaptado de Protein Data Bank identifier 1FAT.

Mody e colaboradores (1995) citam que a PHA pode exercer diversas atividades terapêuticas como estimular a linfopoiese, atrair células mononucleares ao sítio de injeção, agir como imunoestimulante, ativando a proliferação e ativação das células efectoras e estimular a produção de citocinas endógenas. Devido à sua capacidade de estimular subpopulações de células T, a PHA tem sido usada como mitógeno para estudos *in vitro* de proliferação de vários tipos celulares (MYERS, 1995). Em caprinos, tanto os linfócitos T como B, são estimulados com a mesma intensidade pela PHA (GONZALEZ, 1989).

Fagbouhun e Downs (1990) demonstraram que lectinas mitogênicas, como a PHA, promoveram a maturação oocitária e expansão das células do cúmulus isoladas ou em associação no complexo cúmulus-oócito em ratas. A indução da quebra da vesícula germinativa (GVB) foi dependente da presença das células do cúmulus, pois quando estas foram isoladas a GVB foi inibida. Esse estudo sugere que as lectinas podem estimular um sinal ou via metabólica comum para mitogênese e maturação do complexo cúmulus-oócito. Entretanto, Wang e colaboradores (2001), concluíram que a PHA não tem efeito aparente na maturação oocitária ou desenvolvimento de embriões a partir de folículos bovinos. Além disso, PHA tem sido usada para melhorar a eficiência da técnica de transferência nuclear de células somáticas (SCNT) em oócitos de diversas espécies (humanos: TESARIK *et al.*, 2000; caprinos: BEGIN *et al.*, 2004; bovinos: HONG *et al.*, 2005).

Ming-jie e colaboradores (2011) trataram oócitos de camundongos com diferentes concentrações de PHA e demonstraram que ela se liga à zona pelúcida e à membrana do

oócito e que, com o aumento da concentração de PHA, a ligação à membrana do oócito foi intensificada.

2.5 Importância do FSH no controle da foliculogênese *in vitro*

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 esta etapa eles se tornam dependentes de LH (DRIANCOURT, 2001; 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).

Estudos *in vitro* demonstraram que a adição de FSH ao meio pode contribuir para o crescimento folicular durante o cultivo de folículos secundários, estágio que corresponde à fase responsiva ao FSH (CORTVRINDT *et al.*, 1998; WANDJI *et al.*, 1996; MATOS *et al.*, 2007b). Além disso, vários estudos *in vitro* têm mostrado que o FSH pode promover a formação de antro a partir do cultivo de folículos secundários avançados (camundongas: SPEARS *et al.*, 1998; vacas: GUTIERREZ *et al.*, 2000; cabras: ZHOU E ZHANG, 2005; ovelhas: CECCONI *et al.*, 1999; porcas: MAO *et al.*, 2002).

O FSH também é importante para a manutenção da morfologia dos folículos pré-antrais caprinos após sete dias de cultivo (MATOS *et al.*, 2007b). Do mesmo modo, a adição de crescentes concentrações de FSH tem melhorado as taxas de formação de antro e de desenvolvimento em caprinos (SARAIVA *et al.*, 2010).

3 JUSTIFICATIVA

Os folículos primordiais constituem o *pool* de reserva de folículos quiescentes e compreendem cerca de 95% de toda população folicular presente no ovário mamífero. No entanto, a maioria deles morrem por um processo natural denominado atresia folicular (Markström *et al.*, 2002). Neste contexto, sabendo-se do grande valor econômico que os caprinos representam, em especial para o Nordeste Brasileiro, justifica-se o desenvolvimento de pesquisas que contribuam para uma melhor compreensão dos processos relacionados com a formação, crescimento e maturação dos oócitos inclusos em folículos ovarianos caprinos.

O desenvolvimento de um sistema de cultivo capaz de assegurar o crescimento *in vitro* de folículos isolados do ovário permite o aproveitamento do potencial oocitário desses animais. Os oócitos oriundos destes folículos crescidos *in vitro* poderiam ser utilizados em programas de produção *in vitro*, transferência de embriões e/ou criopreservação.

Determinar condições de cultivo apropriadas para dar suporte ao crescimento de folículos pré-antrais *in vitro*, é de extrema importância, visto que esta fase apresenta alta sensibilidade à degeneração em virtude da alta atividade biossintética e consumo de nutrientes, sendo a composição do meio um importante fator para a obtenção de sucesso durante o cultivo (WANDJI *et al.*, 1997).

Diferentes substâncias vêm sendo utilizadas em sistemas de cultivo visando a manutenção da viabilidade folicular, bem como o estímulo ao crescimento de folículos pré-antrais *in vitro*, incluindo algumas que originalmente não são produzidas no ovário (MATOS *et al.*, 2006). Assim, a utilização de proteínas como as lectinas que são de fácil obtenção e relativamente de baixo custo, pode ser uma alternativa para melhoramento do meio de cultivo de folículos pré-antrais.

Com o desenvolvimento de um eficiente sistema de cultivo, será possível, no futuro, a utilização dos oócitos oriundos de uma numerosa população de folículos pré-antrais crescidos *in vitro* em diversas biotécnicas reprodutivas, dentre elas a fecundação *in vitro*, contribuindo assim para a produção de embriões em larga escala.

4 HIPÓTESES

- 1) A lectina PHA, por ser mitogênica, estimula o desenvolvimento de folículos pré-antrais caprinos cultivados *in vitro*;

- 2) A lectina PHA influencia a expressão de RNAm para o receptor de FSH (FSH-R), para o antígeno de proliferação celular (PCNA) e para a enzima óxido nítrico sintetase (NOS);

5 OBJETIVOS

- 1) Avaliar o efeito de diferentes concentrações da lectina PHA sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos isolados;
- 2) Investigar o efeito da PHA sobre a expressão de RNA mensageiro para o receptor de FSH (FSH-R), para o antígeno de proliferação celular (PCNA) e para a enzima óxido nítrico sintetase (NOS);

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Substâncias Químicas

A menos que indicado de outra forma, o meio de cultivo, a lectina PHA-P (L-1668) e outras substâncias químicas foram comprados de Sigma-Aldrich Corporation (Saint Louis, MO, USA). A solução estoque da lectina PHA foi preparada em tampão fosfato (PBS) e armazenada a 4°C.

6.2 Coleta de ovários

Ovários (n=42) foram coletados de cabras sem raça definida (SRD) em abatedouros locais de Sobral – Ceará. Os ovários foram lavados em álcool 70% e duas vezes em solução de NaCl 0,9% contendo penicilina (100µg/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). Os pares de ovários de cada animal foram transferidos para tubos cônicos contendo Meio Essencial Mínimo (MEM) suplementado com penicilina (100µg/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) e transportados ao laboratório em isopor com gelo a uma temperatura de 4°C dentro de 1 hora. (CHAVES *et al.*, 2004).

6.3 Isolamento e cultivo de folículos

Ovários (n=42) foram coletados e transportados ao laboratório seguindo o procedimento anteriormente citado. No laboratório, fragmentos do córtex ovariano com 1-2mm de espessura foram cortados usando lâmina cirúrgica sob condições estéreis. Os fragmentos foram lavados em meio de fragmentação, consistindo de α -MEM suplementado com 100µg/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina. Folículos pré-antrais (~0,15mm) foram visualizados em microscópio estereoscópico (SMZ 645 Nikon, Tokyo, Japan) e manualmente microdissecados usando agulhas (26G) acopladas a seringas de 1mL. Após o isolamento, os folículos foram transferidos para gotas de 100µL de meio fresco para avaliação da qualidade folicular. Folículos com oócito visível, circundados por duas ou mais camadas de células da granulosa, membrana basal intacta e sem cavidade antral foram selecionados para cultivo. Após a seleção, folículos foram randomicamente distribuídos e individualmente cultivados em gotas de 100µL de meio base suplementados com a lectina PHA nas concentrações 1, 10, 50, 100 e 200µg/mL, sob óleo mineral, em placas de Petri (60 x 15 mm,

Corning, USA). Como controle foi utilizado apenas o meio base (MEM) que consistiu de α -MEM (pH 7,2-7,4) suplementado com 3,0mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), 1% de ITS (insulina 10 μ g/mL, transferrina 5.5 μ g/mL e selênio 5ng/mL), 2mM de glutamina, 2mM de hipoxantina, 50 μ g/mL de ácido ascórbico, 100 μ g/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina e 50ng/mL de FSH. Os folículos foram cultivados em estufa a 39°C/5%CO₂ por 6 dias. O meio foi preparado e incubado por 1h antes do uso. A cada dois dias, 60 μ L de meio foram substituídos por meio fresco em cada gota. Foram cultivados em média 28 folículos por tratamento.

6.3.1 Crescimento folicular e avaliação morfológica

Após o cultivo, os folículos foram classificados de acordo com sua morfologia, sendo considerados normais quando apresentavam oócitos homogêneos e centralmente localizados, circundados por duas ou três camadas compactas de células da granulosa, sem danos aparentes na membrana basal no início do cultivo. Alguns folículos apresentaram sinais de degeneração como escurecimento do oócito e ao redor de células do cúmulus ou oócito disforme, foram considerados degenerados. O crescimento folicular, a viabilidade, a presença ou ausência de cavidade antral foram avaliadas a cada dois dias de cultivo. A formação da cavidade antral foi definida como uma cavidade translúcida sem massa de células da granulosa. O diâmetro folicular foi medido apenas de folículos saudáveis usando o programa Motic Images Plus 2.0[®]. A média do crescimento folicular foi calculada pelos valores dos diâmetros de folículos viáveis no dia 6 de cultivo menos os valores dos diâmetros destes no dia 0, dividido pelo total de folículos viáveis no dia 6. As taxas de sobrevivência, extrusão e formação de antro foram calculadas como se segue: 1. Taxa de viabilidade (%)= (número de folículos degenerados/número de folículos viáveis) x 100; 2. Taxa de formação de antro (%)= (número de folículos com antro no dia 6/número inicial de folículos) x 100.

6.3.2 Expressão de RNA mensageiro para PCNA, R-FSH, NOS₁

Após o cultivo isolado, um grupo de 28 folículos dos tratamentos (PHA 0, 10 e 50 μ g/mL) foi coletado e estocado a -80°C para posterior extração de RNA. O RNA total foi isolado usando o reagente TRIzol[®] (Invitrogen, São Paulo, Brasil). As amostras de RNA foram tratadas com DNase I com RNeasy Micro Kit (Invitrogen, São Paulo, Brasil). O DNA complementar (DNAc) foi obtido utilizando a Superscript[™] II RNase H-Reverse

Transcriptase (Invitrogen). A reação de PCR foi realizada num volume final de 20µl contendo: 1µl de cada DNAC, Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (10 µl), 7,4 µl de água ultra-pura e 0,4 µl de primer (senso e anti-senso). Os primers gene-específicos para amplificação dos diferentes transcritos são mostrados na Tabela 1. Os genes de referência utilizados foram β-tubulina e Fosfoglicerato quinase (PGK). As amostras foram primeiramente desnaturadas a 95°C por 10 min e então submetidas a 50 ciclos de PCR (15 seg a 95°C, 30seg a 58°C, 30seg a 60°C), seguido por uma extensão final de 15 seg a 95°C. A especificidade de cada primer foi testada com uma curva de fusão (melt curve), realizada entre 58 e 95°C para todos os genes. As amplificações foram realizadas no PCR mastercycler (Eppendorf, Germany). O método delta-delta-Ct ($\Delta\Delta\text{-Ct}$) foi usado para transformar os valores de CT em níveis de expressão relativa.

Tabela 1- Primers usados na reação de PCR em tempo real para quantificação do mRNA para FSH-R, PCNA e NOS₁.

Gene Alvo	Sequência (5'→3')	Senso (s), anti-senso (As)	Posição	Gen Bank no.
β-tubulina	TTCATTGGCAACAGCACAGCCA	S	1100–1121	GI:114052730
	TCGTTTCATGTTGCTCTCAGCCT	As	1229–1250	
PGK	AGCCTTCCGAGCTTCACTTT	S	444–466	GI:77735550
	AAACCTCCAGCCTTCTTTGGCA	As	541–563	
FSH-R	AGGCAAATGTGTTCTCCAACCTGC	S	250-274	GI:95768228
	TGGAAGGCATCAGGGTCGATGTAT	As	316-340	
PCNA	TGCCGAGATCTCAGTCACAT	S	566-586	GI:77735938
	TATGGCAACAGCTTCCTCTCT	As	695-715	
NOS₁	TGGAGGATGTGGCCAAGAAGATGA	S	1835- 1859	GI: 358416368
	TCTGGAAGCTGTACAGAACCGCAA	As	1942-1966	

6.4 Análise estatística

Para a comparação da sobrevivência folicular e formação do antro, foi utilizado o teste não paramétrico Exato de Fisher, pois o número de amostras esteve entre 20 e 40 com frequências menores que cinco. Os resultados das medidas de sobrevivência folicular e formação do antro para cada grupo (tratados e não tratados) foram expressos na forma de frequências.

Para a comparação dos diâmetros foliculares, foi utilizado o teste paramétrico t para duas amostras independentes, pois os grupos apresentaram distribuições normais (conforme teste de normalidade de Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variâncias (conforme teste Levene). Os resultados das medidas dos diâmetros para cada grupo (tratados e não tratados) foram expressos por meio de seus valores médios \pm erro padrão e as diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

Para a comparação dos deltas CT na análise da expressão do RNAm para os genes FCH-R, PCNA e NOS₁, foi utilizado o teste não paramétrico Mann-Whitney. Os resultados foram expressos por meio de seus valores médios \pm erro padrão (SEM). Estes valores foram utilizados no cálculo da expressão relativa. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao final do período de cultivo, todos os tratamentos se mostraram capazes de manter a sobrevivência folicular. A porcentagem de sobrevivência folicular é mostrada na tabela 2. Não houve diferença significativa entre os tratamentos nem entre os dias de cultivo.

Tabela 2- Frequência (em percentual) de sobrevivência de folículos pré-antrais caprinos cultivados por seis dias em meio controle sem lectina (MEM) e com lectina PHA (tratado) em diferentes concentrações. Não ocorreu diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos e o controle (MEM) no mesmo período de cultivo.

PERÍODO (DIAS)	MEM	PHA 1µg/mL	PHA 10µg/mL	PHA 50µg/mL	PHA 100µg/mL	PHA 200µg/mL
0	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%	100,00%
2	100,00%	100,00%	100,00%	94,12%	100,00%	100,00%
4	97,30%	96,43%	87,88%	91,18%	94,29%	93,75%
6	94,59%	96,43%	84,85%	85,29%	88,57%	87,50%

A lectina PHA não mostrou ação biológica na sobrevivência durante seis dias de cultivo, nas concentrações até 200µg/mL. Foram observadas elevadas taxas de sobrevivência (superiores a 84%) em todos os grupos (tratados e não tratado). Este fato pode estar associado à utilização de um meio de cultivo rico em nutrientes como vitaminas, aminoácidos e minerais e suplementado com FSH. O FSH é considerado um fator de sobrevivência folicular, pois tem ação direta na inibição de proteínas apoptóticas (MAKSTRÖM *et al.*, 2002).

A tabela 3 mostra a média dos diâmetros após o cultivo. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle e tratados com a lectina PHA nas diferentes concentrações, no mesmo período de cultivo. A lectina não mostrou ação biológica sobre o diâmetro folicular nas concentrações até 200µg/mL.

Tabela 3- Valores médios \pm SEM dos diâmetros (em micrômetros) de folículos pré-antrais caprinos cultivados por seis dias em meio controle sem lectina (MEM) e com lectina PHA (tratado) em diferentes concentrações. Não ocorreu diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos e o controle no mesmo período de cultivo.

PERÍODO (DIAS)	MEM	PHA 1µg/mL	PHA 10µg/mL	PHA 50µg/mL	PHA 100µg/mL	PHA 200µg/mL
0	181,30 \pm 41,70	179,78 \pm 47,66	173,98 \pm 46,91	160,00 \pm 49,39	181,49 \pm 56,38	173,08 \pm 48,15
2	199,98 \pm 50,83	197,67 \pm 56,10	201,04 \pm 58,11	186,49 \pm 58,81	216,24 \pm 69,20	206,50 \pm 66,24

Continua Tabela 3- Valores médios \pm SEM dos diâmetros (em micrômetros) de folículos pré-antrais caprinos cultivados por seis dias em meio controle sem lectina (MEM) e com lectina PHA (tratado) em diferentes concentrações. Não ocorreu diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos e o controle no mesmo período de cultivo.

PERÍODO (DIAS)	MEM	PHA 1 μ g/mL	PHA 10 μ g/mL	PHA 50 μ g/mL	PHA 100 μ g/mL	PHA 200 μ g/mL
4	214,29 \pm 59,30	205,64 \pm 64,10	215,88 \pm 66,40	194,30 \pm 57,34	228,08 \pm 69,76	217,07 \pm 62,14
6	225,96 \pm 65,26	212,30 \pm 60,01	228,34 \pm 76,50	200,90 \pm 54,27	230,76 \pm 70,92	223,51 \pm 64,25

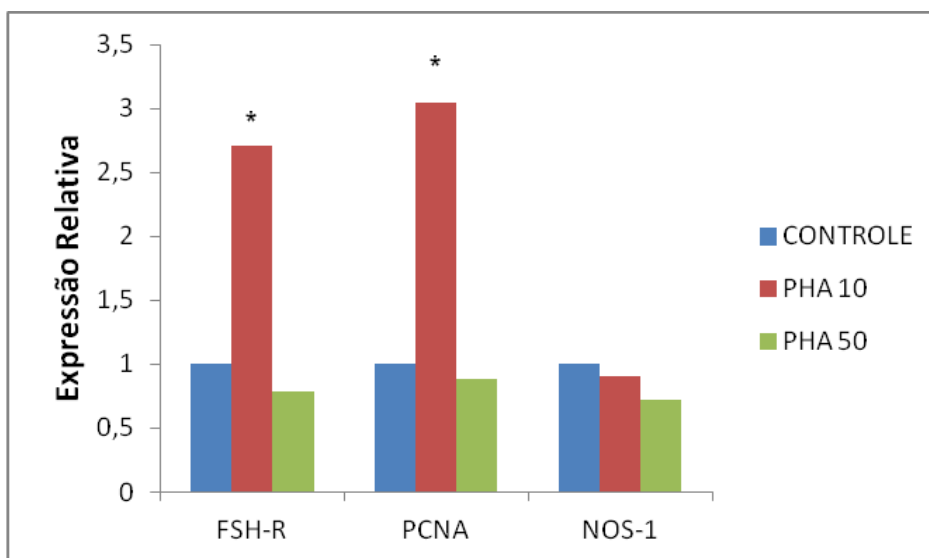
Com relação à formação do antro, podemos observar que houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle e tratados com a lectina PHA na concentração de 10 μ g/mL, a partir de quatro dias de cultivo. Nas demais concentrações (abaixo e acima de 10 μ g/mL), nenhum efeito foi observado (tabela 4). A lectina PHA mostrou ação biológica, influenciando positivamente a formação do antro.

Tabela 4- Frequência (em percentual) de formação de antro em folículos pré-antrais caprinos cultivados por seis dias em meio controle sem lectina (MEM) e com lectina PHA (tratado) em diferentes concentrações. O símbolo “*” representa diferença significativa entre o tratamento e o controle (MEM) no mesmo período de cultivo ($P < 0,05$).

PERÍODO (DIAS)	MEM	PHA 1 μ g/mL	PHA 10 μ g/mL	PHA 50 μ g/mL	PHA 100 μ g/mL	PHA 200 μ g/mL
0	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
2	0,00%	0,00%	6,06%	0,00%	0,00%	0,00%
4	0,00%	3,57%	12,12% *	0,00%	5,71%	0,00%
6	5,41%	7,14%	21,21% *	5,88%	5,71%	0,00%

A partir desses resultados foi realizada qRT-PCR para analisar a expressão de RNAm para FSH-R, PCNA e NOS₁ em folículos cultivados em meio controle (MEM) e tratados com a lectina PHA nas concentrações de 10 μ g/mL (onde ocorreu ação biológica) e 50 μ g/mL (uma das concentrações onde não ocorreu ação biológica), após seis dias de cultivo. Os níveis de expressão de RNAm para os genes FSH-R, PCNA e NOS₁ são mostrados na Figura 5.

Figura 5- Níveis de expressão de RNAm para FSH-R, PCNA e NOS₁ em folículos cultivados por seis dias em meio suplementado com a lectina PHA nas concentrações 0 (MEM), 10 e 50µg/mL.



Ao analisar a influência da PHA na concentração de 10 e 50µg/mL sobre a expressão de NOS-1, não foram verificadas diferenças na expressão. A NOS-1 é uma enzima responsável pela síntese de óxido nítrico. A PHA pode estimular a produção de óxido nítrico em diferentes tipos celulares, como por exemplo, em macrófagos (KESHERWANI e SODHI, 2007; KIM *et al.*, 2010). O óxido nítrico pode atuar como um agente pro ou anti-apoptótico em uma variedade de estruturas incluindo folículos ovarianos, dependendo de sua produção (LI e BILLIAR, 2000). Em bovinos, já foi demonstrado que folículos pequenos produzem mais óxido nítrico do que folículos maiores. Isso indica seu papel no desenvolvimento folicular e oocitário (BASINI *et al.*, 1998). Em baixas concentrações, o óxido nítrico tem ação anti-apoptótica. Com o aumento da sua produção, ele causa danos ao DNA celular e induz a morte por apoptose (GOUD, 2007).

No entanto, a PHA na concentração de 10µg/mL aumentou os níveis de expressão de RNAm para PCNA, uma proteína nuclear envolvida na proliferação celular. Isso sugere o potencial mitogênico da PHA nessa concentração. Embora extensivamente estudado, o mecanismo da estimulação mitogênica das lectinas é desconhecido. Tem sido sugerido que lectinas mitogênicas interagem com componentes das membranas celulares que podem atuar como “receptores desencadeadores” e que as lectinas não mitogênicas podem não reconhecer esses componentes (LIS e SHARON, 1986). Estudos demonstram a atividade mitogênica da

PHA em vários tipos celulares (linfócitos: NOWELL *et al.*, 1960; fibroblastos: SELL e COSTA, 1998; leucócitos: SHENG *et al.*, 2000).

Além disso, a PHA na concentração de 10µg/mL aumentou os níveis de expressão de RNAm para FSH-R em relação ao controle. Esse resultado pode estar associado ao aumento da expressão dos receptores de FSH estimulado por este tratamento. É conhecido que a formação da cavidade antral é um evento independente da ação do FSH (VAN DEN HURK e ZHAO, 2005). Entretanto, estudos *in vitro* mostram que esta gonadotrofina melhora taxas de formação de antro em folículos secundários (CORTVRINDT *et al.*, 1998; SARAIVA *et al.*, 2010). Desta forma é sugerido que a PHA na concentração de 10µg/mL estimula um aumento no número de receptores para FSH nas células da granulosa, amplificando a ação desta gonadotrofina.

8 CONCLUSÃO

Em todos os grupos (tratados e não tratados) foram observadas altas taxas de sobrevivência. Apesar disso, não foi observado aumento no diâmetro folicular após o período de cultivo em todos os grupos. A lectina PHA, nas concentrações testadas, não aumentou a sobrevivência folicular nem promoveu o aumento do diâmetro dos folículos após o cultivo quando comparados ao controle.

No entanto, a lectina PHA na concentração de 10 μ g/mL aumentou a taxa de formação antral e estimulou um aumento nos níveis de expressão de RNAm para FSH-R e PCNA em folículos secundários caprinos cultivados *in vitro* por seis dias.

9 PERSPECTIVAS

Estudos adicionais deverão ser desenvolvidos, a fim de esclarecer o papel das lectinas, especialmente da PHA e suas interações com gonadotrofinas hipofisárias sobre o desenvolvimento de folículos secundários. A avaliação da ultra-estrutura de folículos cultivados em meio suplementado com a lectina através de microscopia eletrônica de transmissão poderá confirmar a manutenção da integridade morfológica desses folículos. Estes contribuirão para a elucidação dos mecanismos que regulam o desenvolvimento folicular *in vitro*. Em adição, o cultivo de longa duração com a utilização de lectinas, como a PHA, em combinação com fatores de crescimento/hormônios, em um meio de cultivo dinâmico, pode ser alternativa de sucesso na busca por melhores resultados para o crescimento folicular e posterior maturação citoplasmática, culminado com a obtenção de embriões viáveis.

REFERÊNCIAS

- ABIR, R., NITKE, S., BEM-HAROUSH, A., FISCH, B. *In vitro* maturation of human primordial ovarian follicles: clinica significance, progress in mammals, and methods for growth evaluation. **Histology and Histopathology**, v.26, p.887-898, 2006.
- 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.
- ANDERSEN N.H. *et al.* Hevein: NMR assignment and assessment of solutionstate folding for the agglutinin-toxin motif. **Biochemistry**. Feb 16;32(6):1407-22, 1993.
- ALBERTINI, D. F., COMBELLES, C. M., BENECCHI, E., CARABATSOS, M. J. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**, v. 121, p. 647-653, 2001.
- ARAÚJO V. R., SILVA C. M. G., LIMA-VERDE I. B., MAGALHÃES D. M., SILVA G.M., BÃO S.N., CAMPELLO C.C., SILVA J. R. V., TAVARES L. M. T., FIGUEIREDO, J. R. & RODRIGUES A. P. R. Effect of Bone Morphogenetic Protein-7 (BMP-7) on *in vitro* survival of caprine preantral follicles. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, p.305-310, 2010.
- ARUNAKUMARI, G., SHANMUGASUNDARAM, N., RAO, V. H. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. **Theriogenology**, v. 74, p. 884-894, 2010.
- BARNETT, K. R., SCHILLING, C., GREENFELD, C. R., TOMIC, D., FLAWS, J. A. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. **Humam Reproduction Update**, v. 12, p. 537-555, 2006.
- BARROS, L. F., HERMOSILLA, T., CASTRO, J. Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 130, p. 401-409, 2001.
- BASINI, G., BARATTA, M., PONDERATO, N., BUSSOLATI, S., TAMANINI, C. Is nitric oxide an autocrine modulator of bovine granulosa cell function? **Reproduction, Fertility and Development**, v.10, p.471-478, 1998.
- BEGIN, I., BHATIA, B., RAO, K., KEYSTON, R., PIERSON, J. T., NEVEU, N. Pregnancies resulted from goat NT embryos produced by fusing couplets in the presence of lectin. **Reproduction, Fertility and Development**, p. 16:136, 2004.
- BELCHIOR, F. Caprinocultura busca representatividade. **Revista Leite e Derivados**, n.71, p.54-63, 2003.
- BEZERRA, M. B., RONDINA, D., LIMA, A. K. F., OLIVEIRA, L. C., CECCHI, R., LUCCI, C. M., GIORGETTI, A., FIGUEIREDO, J. R. Aspectos quantitativos e qualitativos da foliculogênese na fase pré-natal na espécie caprina. **Ciência Animal**, v. 8, p. 47-56, 1998.

BYSKOV AG, FADDY MJ, LEMMEN JG, ANDERSEN CY. Eggs forever? **Differentiation**, 73:438-46, 2005.

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

BONNET, A., DALBIÈS-TRAN, R., SIRARD, M. A. Opportunities and challenges in applying genomics to the study of oogenesis and folliculogenesis in farm animals. **Reproduction**, v. 135, p. 119-128, 2008.

BRUNO J.B., CELESTINO J.J.H., LIMA-VERDE I.B., LIMA L.F., MATOS M.H.T., ARAÚJO V.R., SARAIVA M.V. A., MARTINS F.S., NAME K.P.O., CAMPELLO C.C., BÁO S.N., SILVA J. R.V., FIGUEIREDO J.R. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor in goat ovaries and improvement of *in vitro* caprine preantral follicle survival and growth with VEGF. **Reproduction, Fertility and Development**. v.21, p. 679-687, 2009.

BRUNO, J. B., CELESTINO, J. J. H., LIMA-VERDE, I. B., MATOS, M. H. T., LIMA, L. F., NAME, K. P. O., ARAÚJO, V. R., SARAIVA, M. V. A., MARTINS, F. S., CAMPELLO, C. C., SILVA, J. R. V., BÁO, S. N., FIGUEIREDO, J. R. Vasoactive Intestinal Peptide improves the survival and development of caprine preantral follicles after *in vitro* tissue culture. **Cells Tissues Organs**, v. 191, p. 414-421, 2010.

BUKOVSKY, A., SVETLIKOVA, M., CAUDLE, M.R. Oogenesis in cultures derived from adult human ovaries. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.3, p.17, 2005.

BUTCHER, L., ULLMANN, S. L. Culture of Preantral Ovarian Follicles in the Grey, Shorttailed Opossum, *Monodelphis domestica*. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 8, p. 535-539, 1996.

CAVADA, B. S., MORENO, F. B., DA ROCHA, B. A., DE AZEVEDO, W. F. JR., CASTELLON, R. E., GOERSCH, G. V., NAGANO, C. S., DE SOUZA, E. P., NASCIMENTO, K. S., RADIS-BAPTISTA, G., DELATORRE, P., LEROY, Y., TOYAMA, M. H., PINTO, V. P., SAMPAIO, A. H., BARETTINO, D., DEBRAY, H., CALVETE, J.J., SANZ, L. cDNA cloning and 1.75 Å crystal structure determination of PPL2, an endochitinase and N-acetylglucosamine-binding hemagglutinin from *Parkia platycephala* seeds. **FEBS J**. Sep;273(17):3962-74, 2006.

CAVENDER, J. L., MURDOCH, W. J. Morphological studies of the microcirculatory system of periovulatory ovine follicles. **Biology of Reproduction** , 39:989–997, 1988.

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

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

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

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

CLARKE, H.G., HOPE, S.A., BYERS, S., RODGERS, R.J. Formation of ovarian follicular fluid may be due to the osmotic potential of large glycosaminoglycans and proteoglycans. **Reproduction**, v.132, p.119–131, 2006.

CORTVRINDT, R., HU, Y., SMITZ, J. Recombinant luteinizing hormone as a survival and differentiation factor increases oocyte maturation in recombinant follicle stimulating hormone-supplemented mouse preantral follicle culture. **Human Reproduction**, v. 13, p. 1292-1302, 1998.

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

DE ROBERTIS, E. M. F, HIB, J. Bases da Biologia celular e molecular. Editora Guanabara Koogan S.A. 4º edição, 2006.

DISSEN, G. A., ROMERO, C., HIRSHFIELD, A. N., OJEDA, S. R. Nerve growth factor is required for early follicular development in the mammalian ovary. **Endocrinology**, v. 142, p. 2078-2086, 2001.

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**, 383: 531–535, 1996.

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

DURLINGER, A. L, GRUIJTERS, M. J, KRAMER, P., KARELS B., INGRAHAM H. A., NACHTIGAL, M. W, UILENBROEK, J.T, GROOTEGOED, J. A, THEMME, A. P. Anti-Mullerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. **Endocrinology** 143:1076–1084, 2002.

EPIFANO, O., DEAN, J. Genetic control of early folliculogenesis in mice. **Trends Endocrinol Metab**, v. 13, p. 169-173, 2002.

ESPEY, L. L. Ovulation as an inflammatory reaction: a hypothesis. **Biology of Reproduction**, v.22, n.1, p.73-106. 1980.

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal Reproduction and Science**, v.78, p.203-216, 2003.

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

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

FIGUEIREDO, J. R., RODRIGUES, A. P. R., AMORIM, C. A. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais – MOIFOPA. In: **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. Ed. Varela., p. 227-260, 2003.

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.

FONSECA, J. F., Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 16. Goiânia, GO. Anais: Palestras, 2005.

FORTUNE, J. E., RIVERA, G. M., EVANS, A. C. O., TURZILLO, A. M. Differentiation of dominant vesus subordinate follicles in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 648-654, 2001.

FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Anim Reprod Sci**, 78:135-163, 2003.

FRASER, H. M., DUNCAN, W. C. Regulation and manipulation of angiogenesis in the ovary and endometrium. **Reproduction, Fertility and Development**, 21 377–392, 2009.

GABIUS, H. J., GABIUS, S. Glycoscience: Status and Perspectives, 1997.

GAN, L., VAN SETTEN G., SEREGARD S., FAGERHOLM P. Proliferating cell nuclear antigen colocalization with corneal epithelial stem cells and involvement in physiological cell turnover. **Acta Ophthalmol. Scan.**, c.73, p.491-495, 1995.

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

GONZALEZ, A. M. Inmunologia veterinaria. Mexico:Editorial Diana, p.497, 1989.

GOUD, A.P., GOUD, P. T., DIAMOND, M. P., GONIK, B., ABU-SOUD, H. M. Reactive oxygen species and oocyte aging: role of superoxide, hydrogen peroxide and hypochlorous acid. **Free Radical Biology and Medicine**, v.44, p.1295-1304, 2007.

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

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

HAFEZ, B., HAFEZ, E. S. E. Anatomia da reprodução feminina. In: HAFEZ, E. S. E. Reprodução animal. São Paulo: Manole, 7 ed., p. 261-278, 2004.

HIRSHFIELD, A. N. Rescue of atretic follicles *in vitro* and *in vivo*. **Biol Reprod.** v.40, p.181-190, 1989.

HIRSHFIELD, A. N. Development of follicles in mammalian ovary. **Int. Rev. Cytol.** 124, 43–101, 1991.

HONDA, A., HIROSE, M., HARA, K., MATOBA, S., INOUE, K., MIKI, H., HIURA, H., KANATSU-SHINOHARAM, KANAI, Y., KONO, T. et al. Isolation, characterization, and *in vitro* and *in vivo* differentiation of putative thecal stem cells. **PNAS**, v. 104, p. 12389–12394, 2007.

HONG, S. B., UHM, S. J., LEE, H. Y., PARK, C. Y., GUPTA, M. K., CHUNG, B. H. Developmental ability of bovine embryos nuclear transferred with frozen-thawed or cooled donor cells. **Asian Aust J Anim Sci**, 18:1242–8, 2005.

HURWITZ, A., ADASHI, E. Y. Ovarian follicular atresia as an apoptotic process: a paradigm for programmed cell death in endocrine tissues. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 84, p. 19-23, 1992.

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

HUTT, K.J., MCLAUGHLIN, E. A., HOLLAND, M. K. KIT/KIT ligand in mammalian oogenesis and folliculogenesis: roles in rabbit and murine ovarian follicle activation and oocyte growth. **Biol Reprod**, 75:421-433, 2006.

JEWGENOW, K., STOLTE, M. Isolation of preantral follicles from nondomestic cats: viability and ultrastructural investigations. **Animal Reproduction Science**, v. 44, p.183–193, 1996.

JOHNSON, J., CANNING, K., KANEKO, T., PRU, J. K., TILLY, J. L. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. **Nature**, v. 428 p. 145-150, 2004.

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

KAPLOWITZ, P. B. Wheat germ agglutinin and concanavalin A inhibit the response of human fibroblasts to peptide growth factors by a post-receptor mechanism. **J. Cell. Physiol.**, Philadelphia, 124: 474-480, 1985.

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

KESHERWANI, V., SODHI, A. Differential activation of macrophages *in vitro* by lectin Concanavalin A, Phytohemagglutinin and Wheat germ agglutinin: Production and regulation of nitric oxid. **Nitric Oxide**. v.16, p.294-305, 2007.

KIDDER, G. M., MHAWI, A. A. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. **Reproduction**, 123:613, 2002.

KIM, D., YAMASAKI, Y., JIANG, Z., NAKAYAMA, Y., YAMANISHI, T., YAMAGUCHI, K., ODA, T. Comparative study on modeccin and Phytohemagglutinin (PHA) induced secretion of cytokines and nitric oxide (NO) in RAW 264.7 cells. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**. v.43, n.1, p.52-60, 2010.

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

KOCOUREK, J., HOREJSI, V. A note on the recent discussion on definition of the term 'lectin'. In: **Lectins: Biology, Biochemistry and Clinical Biochemistry**. Vol. 3, pp. 3–6. Bøg- Hansen, T. C. and Spengler, G. A., Eds., Walter de Gruyter, Berlin, Germany, 1983.

LEAVITT, R. D., FELSTED, R. L., BACHUR, N. R. Biological and biochemical properties of *Phaseolus vulgaris* isolectinas. **J. Biol. Chem.**, 252(9):2961-2966, 1977.

LEE, V. H. Expression of Rabbit Zona Pellucida Messenger Ribonucleic Acid During Early Follicular Development. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 401, 2000.

LEE, W. S., OTSUKA, F., MOORE, R. K., SHIMASAKI, S. Effect of bone morphogenetic protein-7 on folliculogenesis and ovulation in the rat. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 994-999, 2001.

LI, J., BILLIAR, T.R. The role of nitric oxide in apoptosis. **Semin Perinatol**. v.24, p.46-50, 2000.

LIENER, I.E. The nutritional significance of the plant lectins. In: ORY, R.L. Antinutrients and natural toxicants in foods. Westport: Food & Nutrition Press, p.143-157, 1981.

LIENER, I. E. Lectins and protein inhibitors of proteolytic enzymes (an overview). **Proceed. Conbrap**, 1-10, 1990.

LIMA-VERDE ,I.B., MATOS, M.H., SARAIVA, M.V., BRUNO, J.B., TENÓRIO, S.B., MARTINS, F., 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. 19, p.240-247, 2010.

LIS, H., SHARON, N. Biological properties of lectins. In: **The Lectins: Properties, Functions and Applications in Biology and Medicine**. London: Academic Press, p. 265-285, 1986.

LIS, H., SHARON, N. Lectins: carbohydrate-specific proteins that mediate cellular recognition. **Chemical Reviews**, v. 98, n. 2, p. 637-674, 1998.

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, 2011.

MAGOFFIN, D. A. Ovarian theca cell. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, 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*. **Biology of Reproduction**, v.67, p.1197-1203, 2002.

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

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

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. Interaction between growth differentiation factor 9, insulin-like growth factor I and growth hormone on the *in vitro* development and survival of goat preantral follicles. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 43, p. 728-736, 2010.

MATOS, M. H. T., VAN DEN HURK, R., MARTINS, F. S., SANTOS, R. R., LUQUE, M. C. A., SILVA, J. R. V., CELESTINO, J. J. H., BÁO, S. N., FIGUEIREDO, J. R. Histological and ultrastructural features of caprine preantral follicles after *in vitro* culture in the presence or absence of indole-3-acetic acid. **Animal Reproduction**, v. 3, n. 4, p. 415-422, 2006.

MATOS, M. H. T., VAN DEN HURK, R., LIMA-VERDE, I. B., LUQUE, M. C. A., SANTOS, K. D. B., MARTINS, F. S., BÁO, S. N., LUCCI, C. M., FIGUEIREDO, J. R. Effects of fibroblast growth factor-2 on the *in vitro* culture of caprine preantral follicles. **Cell Tissues Organs**, v. 186, p. 112-120, 2007a.

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

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.

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

McNATTY, K. P., READER, K., SMITH, P., HEATH, D. A., JUENGEL, J. L. Control of ovarian follicular development to the gonadotrophin dependent phase: a perspective. **Society for Reproduction and Fertility**, v.64, p.55-68, 2007.

MERY, L., LEFEVRE, A., BENCHAI, M., DEMIRCI, B., SALLE, B., GUERIN, J-F., LORNAGE, J. Follicular growth *in vitro*: Detection of growth differentiation factor 9 (GDF9) and Bone morphogenetic protein 15 (BMP15) during *in vitro* culture of ovine cortical slices. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, p. 767-774, 2007.

MING-JIE, D. *et al.* Distribution and function of Phytohemagglutinin receptors from *Phaseolus vulgaris* in mice reproductive cells. **Journal of Anhui Agricultural Sciences**. 2011.

MYERS, R. L. Immunology – a laboratory manual. Dubuque: WCB Publishers, 1995.

MODY, R., JOSHI, S., CHANEY, W. Use of lectins as diagnostic and therapeutic tools for cancer. **J Pharmacol. Toxicol. Methods**, 33 (1): 1-10, 1995.

NILSSON, E. E., KEZELE, P., SKINNER, M. K. Leukemia inhibiting factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 188, p. 65–73, 2002.

NOWELL, P.C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leucocytes. **Cancer Res.**, 20:426-426, 1960.

O'BRIEN, M. J., PENDOLA, J. K., EPPIG, J. J. A revised protocol for *in vitro* development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 1682-1686, 2003.

PANDEY A., GUPTA N., GUPTA, S. C. Improvement of *in vitro* oocyte maturation with lectin supplementation and expression analysis of Cx43, GDF-9, FGF-4 and Fibronectin mRNA transcripts in Buffalo (*Bubalus bubalis*). **Journal of Assisted Reproduction Genetic**. Jun, 26(6):365-71., 2009.

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.

PEUMANS, W. J., VAN DAMME, E. J. L. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v.109, p.347-352, 1995.

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

PICTON, H. M., HARRIS, S. E., MURUVI, W., CHAMBERS, E. L. The *in vitro* growth and maturation of follicles. **Reproduction**, v. 136, p. 703–715, 2008.

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

REECE, W. O. (2005). Functional anatomy and physiology of domestic animals. *In*: LINPPICOTT, W. e WILKINS. **Female Reproduction**, 513p. 3 ed.

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

REDDY, P., ZHENG, W., LIU, K. Mechanisms maintaining the dormancy and survival of mammalian primordial follicles. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.21, n.2, p.96-103, 2009.

REICHERT, C. F. *et al.* Lectin induced blast transformation of human lymphocytes. **Nature**, London, 242: 146-148, 1973.

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

ROY, S. K., TREACY, B. J. Isolation and long-term culture of human preantral follicles. **Fertility and Sterility**, v.59, p. 783-791, 1993.

RÜSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca Anatomica**, v.24, p.77-92, 1983.

RUTENBER, E., KATZIN, B.J., ERNST, S., COLLINS, E.J., MLSNA, D., READY, M.P., ROBERTUS, J.D. Crystallographic refinement of ricin to 2.5 Å. **Proteins**. v10 pp.240-250, 1991.

SALHA, O., ABUSHEIKA, N., SHARMA, V. Dynamics of human follicular growth and *in vitro* oocyte maturation. **Human Reproduction Update**. v.4, p.818-32, 1998.

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., CELESTINO, J. J. H., CHAVES, R. N., MARTINS, F. S., BRUNO, J. B., LIMA-VERDE, I. B., MATOS, M. H. T., SILVA, G. M., PORFIRIO, E. P., BÁO, S. N., CAMPELLO, C. C., SILVA, J. R. V., FIGUEIREDO, J. R.. Influence of different concentrations of LH and FSH on *in vitro* caprine primordial ovarian follicle development. **Small Ruminant Research**, v. 78, p. 87-95, 2008.

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*. **Reproductive Science**, v. 17, p. 1135-1143, 2010b.

SAUMANDE, J. La folliculogénese chez les ruminants. **Rec. Vet.** 167:205-218, 1991.

SAWYER, H. R., SMITH, P., HEATH, D. A., JUENGEL, L., WAKEFIELD, J. Formation of ovarian follicles during fetal development in sheep. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 1134-1150, 2002.

SAXON, A., TSUI, F., MARTINEZ-MAZA, O. Jacalin, an IgA-binding lectin, inhibits differentiation of human B cells by both a direct effect and by activating T-suppressor cells. **Cell. Immunol.**, New York, 104:134-141. 1987.

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.

SELL, A. M., COSTA, C. P.. PHA: a lectin that enhanced wound healing in the skin rats. In: Interanational meeting on vaccines, 1998, Salvador. *Summary...* Salvador, p.124, 1998.

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

SILVA, J. R. V., VAN DEN HURK, R., 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, 2004b.

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

SKINNER, M. K. Regulation of primordial follicle assembly and development. **Human Reproduction Update**. v.11, p.461-471, 2005.

SPEARS, N., MURRAY, A.A., ALISSON, V., BOLAND, N.I., GOSDEN, R.G. Role of gonadotrofins and ovarian steroids in the development of mouse follicles *in vitro*. **Journal of reproduction and fertility**, v. 113, p. 19-26, 1998.

SHARON, N., LIS H.. Carbohydrates in cell recognition. **Sci. Am.** 268:82-88, 1993.

SHARON, N., LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, 14 (11), 53R-62R, 2004.

SHENG, Y. , PERO, R. W., WAGNER, H. Treatment of chemotherapy-induced leucopenia in a rat model with aqueous extract from *Uncaria tomentosa*. **Phytomedicine**, V.7, P. 137-143, 2000.

SMITZ, J. E. J., CORTVRINDT, R. G. The earliest stages of folliculogenesis *in vitro*. **Reproduction**, v.123, p.185-202, 2002.

TESARIK, J., NAGY, Z. P., MENDOZA, C., GRECO, E. Chemically and mechanically induced membrane fusion: nonactivating methods for nuclear transfer in mature human oocytes. **Human Reproduction**, 15:1149–54, 2000.

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

VAN DAMME, E. J. M., PEUMANS, W. J., BARRE, A., ROUGE, P.. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Crit. Rev. Plant Sci.** 17, 575–692, 1998.

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

WALDEYER, W. Eierstock und Ei, Leipzig: Engelmann, 1870.

WANDJI, S., FORTIER, M. A., SIRARD, M. Differential response to gonadotrophins and prostaglandin E₂ in ovarian tissue during prenatal and postnatal development in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 46, p. 1034-1041, 1992.

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

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

WANG, S., PANTER, K.E., EVANS, R.C., BUNCH, T.D. The effects of pokeweed mitogen (PWN) and phytohemagglutinin (PHA) on bovine oocyte maturation and embryo development *in vitro*. **Animal Reproduction Science**. v.67, p.215-220, 2001.

WU, J., TIAN, Q. Role of follicle stimulating hormone and epidermal growth factor in the development of porcine preantral follicle *in vitro*. **Zygote**, v. 15, p. 233–240, 2007.

YANG, M. Y., FORTUNE, J. E. Vascular endothelial growth factor stimulates the primary to secondary follicle transition in bovine *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v. 74, p. 1095-1104, 2007.

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

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

