



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

**ANDERSON WEINY BARBALHO SILVA**

**EFEITO DA ATIVINA-A E DO HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH)**  
**SOBRE O DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS**  
**BOVINOS**

**SOBRAL - CEARÁ**

**2012**

**ANDERSON WEINY BARBALHO SILVA**

**EFEITO DA ATIVINA-A E DO HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH)  
SOBRE O DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS  
BOVINOS**

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

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Viana Silva.

**SOBRAL - CEARÁ**

**2012**

**ANDERSON WEINY BARBALHO SILVA****EFEITO DA ATIVINA-A E DO HORMÔNIO FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH) SOBRE  
O DESENVOLVIMENTO IN VITRO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS BOVINOS**

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** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

**Conceito obtido:** \_\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Profa. Dra. Ana Beatriz Graça Duarte  
(Universidade Estadual do Ceará – UECE)

---

Profa. Dra. Alice Andrioli Pinheiro  
(Embrapa Caprinos e Ovinos)

*Dedico essa inestimável conquista às  
pessoas mais importantes de minha vida.*

*Aos meus pais Silva e Antônia, por serem a força que sustenta meus  
ideais com paciência e amor.*

*A minha irmã Sheilliany,*

*Aos meus verdadeiros amigos, por tudo que representam em minha vida.*

*Com amor, dedico.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, acima de tudo, por sua suprema bondade e infinita misericórdia de me guiar por caminhos retos, sempre em sua presença. Agradeço ao Criador por me dá discernimento para entender a sua palavra, por me ensinar a cumprir os teus mandamentos, por me fazer forte quando estou fraco, por me dá alegria mesmo quando já não há no que se alegrar, agradeço por me mostrar a verdadeira alegria que só vem de Ti ó Pai! Obrigado Senhor por poder contar com teu Santo poder em minha vida, por ser teu escolhido, e por desfrutar sempre da Tua Santa bondade! Sou grato por sempre iluminar meus caminhos, dando-me determinação, fé e força de vontade para nunca desistir! A luz que me guia é mais forte que os olhos que me cercam.

Aos meus amados pais, Antonia Lopes Barbalho Silva e Francisco Ferreira Silva, que por muito me amarem, renunciaram aos seus próprios sonhos para que os meus fossem realizados. Obrigado por cada palavra de incentivo, por cada olhar que muitas vezes falaram mais que mil palavras. Obrigado por me sentir amado e protegido sempre. Vocês são os maiores exemplos de verdadeiros PAIS que nessa terra pode existir. Obrigado por terem projetado em mim o Anderson Weiny que hoje sou. Amo muito vocês! Razão do meu existir.

A minha irmã linda, minha neguinha, pelo nosso amor, que é o elo que nos une, fazendo com que palavras sejam inúteis para sabermos que sempre nos apoiaremos em todas as decisões de nossas vidas. Você minha irmã: às vezes um poço de mistério; às vezes acorda sem humor; às vezes não tem paciência; às vezes um silêncio impenetrável; às vezes ninguém te merece; às vezes eu que não te mereço; Mas uma pessoa sempre amiga, sincera, generosa, sensível, e guerreira. Não tenho mais adjetivos para ti! Eis um presente que Deus me deu! Que vou cuidar e amar para sempre. Que Deus lhe abençoe, que sejas uma vitoriosa e que tudo o que desejas sejam presentes dados por Deus. Tenho orgulho em ter você como irmã. Beijos em seu coração. Amo Você!

Agradeço a toda minha família, especialmente a minha iluminada Avó D. Antônia (Vovó Toinha), pela admiração incondicional, pelas doces recordações da infância e pelos grandes ensinamentos eternizados.

Aos meus amigos de infância Quênia Isaías, Laura Nogueira, Henoque Pontes, Conceição Silva, Isabela Venuto, Dandara Venuto, Helton Mesquita, Ícaro Frota, Victor Rubens, Gardênia Fernandes, Kallvyanne Cavalcante, Kariny Sousa, e todos aqueles que de alguma forma contribuíram para que eu pudesse viver cada etapa de minha vida, construindo sonhos e acreditando que eles seriam concretizados um a um. Agradeço por terem me proporcionado inesquecíveis momentos de abstração e aventura. *"Tudo pode ser, se quiser será ...O sonho sempre vem pra quem sonhar...Tudo pode ser, só basta acreditar...Tudo que tiver que ser, será (...)"*. Cada um com sua parcela de contribuição em minha vida, a vocês meu muito obrigado!

Aos irmãos que a vida me permitiu escolher: Raphaella Carneiro, Juliana Almeida, Lilyan Baima, Neryssa Flecker, Enéas Mamede e Eleones Filho. Agradeço pela palavra amiga, pela companhia, pelo sorriso sincero e pelo abraço caloroso. Serei eternamente grato pelo incentivo dado, que me fez viver e trabalhar de uma forma diferente, onde o novo não era temido e sim enfrentado, mesmo com as dificuldades, tudo que vocês me fizeram crer, sentir, tem um alto significado. Nada é feito sem finalidade, sem valor. Cada pensamento, cada palavra, cada ato, representou algo para o meu destino final. A concretização de um sonho, ser Mestre! Amo Vocês!

A dois pequenos grandes homens, Rafael Gomes de Olivindo e Dennis Fagner Vasconcelos, que apareceram em minha vida como anjos que caem do céu, apesar da pouca idade, uma experiência de vida que tenho como exemplo. O exímio caráter, conduta, personalidade forte e vontade de vencer sempre é o que faz a diferença na vida desses jovens. Nas grandes batalhas da vida, o primeiro passo para a vitória é o desejo de vencer. Com isso, vocês se tornam essenciais. Sou grato por toda atenção e carinho que me é dedicado. Acreditem, foram extremamente importantes para o sucesso deste trabalho.

Aos meus amores, Débora Pinto (Mamãe lindona), Mariângela Tavares, Renata Pinheiro, Larisse Alves, Mariana Almeida, Maria José, Lêda Frota, Lara Mendes, Ileana Mendes, Eline Vasconcelos, Camila Mesquita, Gabriela Cordeiro, Valeska Frota, Fatinha Dantas, Camila Kércia e Fábria Cristiane (Fabethy). A cada passo com amor você cresce, aperfeiçoa-se, sublima-se, e graças ao carinho de vocês consegui vencer mais uma etapa em minha vida. O destino final de todos é a infinita felicidade e a perfeita comunhão com Deus. Obrigado pelo carinho sincero e pela palavra amiga.

Aos amigos, Acrisío Junior, Gabriel de Brito, Renan Prado, Osvaldo Angelim, Kleber Silva, Ákila Vasconcelos, Vinicius Pompilio, Junior Viana, Frota Junior, Dávson Freitas, Diogo Aguiar, Felipe Aguiar, André Dias, Philipe Moreira, Carlos Philho, Venâncio Henrique, João Germano, Rodrigo Olivindo, Alisson Maia e Paulo Castro. Mesmo com o corre-corre diário sei que estão sempre me enviando positividade e força para seguir em frente. *“Amigos são como acordes musicais, mesmo longe soam dentro de nós.”* Desta forma, sinto-me acolhido e privilegiado por a vida ter me presenteado com a amizade de vocês, que por algum momento isso fez e faz o meu mundo ser diferente.

Ao Prof. Dr. José Roberto Viana Silva, meu orientador, meu Pai científico, meu orgulho. Palavras me faltam para preencher essas linhas em forma de agradecimento. Agradeço pelas oportunidades, pelos grandes ensinamentos, por me provar que ter coragem e ousadia, acima de tudo, não temer o desconhecido é um fator imprescindível para alcançarmos o sucesso profissional e pessoal. Sou grato por todo o tempo dedicado a mim ao longo desses anos de produção de conhecimento e formação profissional. Obrigado por me “projetar” e ter acreditado em mim, por várias vezes, e ter possibilitado que hoje eu sentisse uma das maiores alegrias de minha vida, me tornar Mestre.

A Profa. Dra. Márcia Viviane Alves Saraiva, minha co-orientadora. Obrigado por ter posto tanta sabedoria, cuidado e dedicação em minhas atividades, por compartilhar tantas coisas boas e por marcar tantas lembranças positivas em minha vida. Obrigado por sempre ser honesta comigo, ser gentil e sempre presente quando necessito. Obrigado por ser além de orientadora, um grande exemplo de profissional e de compromisso! De tantas diferentes e significativas formas, Muito Obrigado por tudo! Agradeço também ao seu esposo Sr. Vando Santiago, que me acolheu com tamanho carinho e atenção nos momentos em que mais precisei! Obrigado de coração meu caro!

Agradeço aos meus companheiros de aventura, minha equipe, meus amigos: Ellen Vasconcelos, Cintia Guedes, Moêmia Portela, Glaucinete Borges, Katianne Freitas, Renato Passos, Diego Tavares, Gleison Ribeiro, Karen dos Anjos e Tânia Lopes pela parceria de trabalho e, principalmente, por me proporcionarem a virtude do trabalho em equipe. Sem vocês, esse sonho teria sido difícil de ser concretizado.

Aos meus “braços direito e esquerdo”, Regislane Ribeiro e Taiã Gomes, antes meus estudantes de Iniciação Científica, meus ICs, meus projetos de pesquisadores, hoje são líderes, adquiriram autonomia, ousadia e conhecimento o bastante, para voarem com suas próprias asas em busca do novo, do desconhecido, me ensinam muito, sem ao menos perceber, dedico a vocês toda minha atenção, carinho e admiração. Vocês vão longe! Obrigado por se fazerem presentes e extremamente responsáveis! Grande parte do sucesso deste trabalho pertence, por direito, a vocês.

Em especial, agradeço ao GDF-9 (Gisvani Lopes) e a BMP-15 (Juliane Passos) pelo companheirismo, pela ajuda incansável, pela dedicação ao longo das minhas atividades e principalmente pela amizade! Sei que sou chato, mas não esqueçam nunca que EU AMO MUITO VOCÊS.

Aos amigos de bancada e da VIDA, Jackson Costa e Rodrigo Rossi, agradeço pelos “choques de realidade”, pelas longas conversas, pela amizade e pelo prazeroso convívio ao lado de vocês. Enfim, pelos momentos especiais desde a época de iniciação científica, que jamais serão esquecidos. Agradeço de coração a vocês por tudo!

Aos meus amigos da graduação, minha amada turma Biologia 2009.2: “Pés no chão..e olhos nas estrelas”, agradeço pelo apoio, carinho e reconhecimento, obrigado por fazerem parte da minha história: Maria Juliane Passos, Merivalda Doroteu da Silva, Joseíres Lira de Sousa Fontinelle, Francisco Ricardo Lopes da Rocha, Maria de Jesus Gomes de Sousa, Francisco Rony Gomes Barroso, Maria Amélia Araújo Soares, Antonia Moêmia L. Rodrigues Portela, Jordânia Marques de Oliveira, Maria Gleiciane de Queiroz Martins, Francisca Cíntia Aguiar Eufrásio. Sejam Felizes hoje e sempre!

Á minha turma de Mestrado, BIOTEC003, agradeço primeiramente pela confiança e credibilidade que depositaram em mim ao longo desses anos, ter sido escolhido por vocês, em unanimidade, para representá-los diante do colegiado desde Programa foi uma grande responsabilidade que me foi atribuída e que procurei oferecer o melhor de mim para atender a necessidade de todos. Agradeço ainda pela amizade de cada um, todos, sem exceção, a partir de então são peças chave em minha trajetória pessoal e profissional. Que o nosso elo de companheirismo e amizade nunca seja deixado quebrar pelo tempo e pela distancia que possivelmente existirá entre nós. Sejam a paz, sintam o amor e façam o bem! A vocês meus



amigos: Daniel de Brito; Danielle Rocha do Val; Ellen de Vasconcelos da Cunha; Fco. Flávio Vasconcelos Evaristo; Fco. Ronaldo Farias Lima; Gisvani Lopes de Vasconcelos; Joséires Lira Sousa Fontenelle; Luciana Antonia Araújo de Castro; Manuela Almeida Montenegro; Maria Gleiciane Queiroz Martins; Maria Juliane Passos; Maria Nágila Carneiro Matos; Nairley Cardoso Sá; Robério Ferreira Fiúza, Dr. Thiago Corrêa, muito obrigado!

Ao meu anjo do Recife, Mariana Donato (big friend) agradeço pelo acolhimento, pelo teto, pela mão amiga, pela atenção, carinho e amizade, acredito que ganhei neste estado além de uma parceria profissional, uma grande amiga. Adoro Você. Sinto saudades. Meu muito obrigado por tudo.

Aos integrantes do Laboratório de Manipulação de oócitos e folículos pré-antrais (LAMOFOPA – UECE), principalmente ao Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo, por viabilizarem etapa de análise de viabilidade folicular após cultivo *in vitro*. Em especial, agradeço à Dra. Ana Beatriz Duarte e aos amigos Rafael Rossetto e Isadora Lima pelo acolhimento e todo suporte oferecido. Agradeço ainda ao Dr. Cláudio Lopes por ter intermediado parcerias entre nosso laboratório e instituições nas quais obtivemos total atenção na execução de nossas atividades.

À amiga MSc. Ivina Rocha Brito, pela grande colaboração na escrita deste trabalho, além de sua valiosa contribuição para minha formação profissional, especialmente nas fases de execução deste projeto. Agradeço pelo carinho, atenção e presteza em todas as atividades propostas.

Agradeço ao corpo técnico, aos pesquisadores e estudantes do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ-PE e do Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), em especial a Profa. Dra. Christina Peixoto, pela parceria e oportunidade que me foi dada em executar parte de meus experimentos nesta instituição. Uma experiência inenarrável que levarei comigo para sempre.

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

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

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

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

Ao Professor Dr. Claudio Cabral Campello pelo auxílio nas análises estatísticas dos dados, por toda sua paciência e atenção disponibilizada.

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

Aos integrantes da Banca Examinadora, Prof. Dr. José Roberto Viana Silva, Profa. Dr. Ana Beatriz Graça Duarte e Profa. Dra. Alice Andrioli Pinheiro por terem gentilmente aceito o convite para participar da banca da defesa desta dissertação e pela disposição em contribuir no engrandecimento deste trabalho.

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

A todos, muito obrigado!

*“Teorias nada mais são que verdades parciais e temporárias que necessitamos, como etapas, na investigação ao progresso... O essencial princípio da experimentação está, portanto, na dúvida, aquela dúvida filosófica que permite ao espírito liberdade e iniciativa...”*

*(Claude Bernard, 1865)*

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi o de avaliar o efeito do FSH sozinho ou em combinação com a ativina-A na sobrevivência, crescimento e expressão de RNAm para ActR-IB, ActR-IIB, FSH-R, PCNA e HAS1/2/3 em folículos secundários de bovinos *cultivados in vitro* por 18 dias. Folículos pré-antrais (~0,2mm) foram isolados do córtex de ovários bovinos e cultivados individualmente na ausência-  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> (grupo controle) ou na presença de ativina-A sozinha na concentração de (100ng/mL); FSH sozinho em concentrações seriadas - 50ng/mL (do dia 0 ao dia 6), 100 ng/mL (do dia 7 ao dia 12), e 200ng/mL (do dia 13 ao dia 18) ou em associação com a ativina-A nas mesmas concentrações. Após 18 dias de cultivo *in vitro*, folículos cultivados com FSH apresentaram aumento significativo no diâmetro em comparação aos demais tratamentos. Por outro lado, a ativina-A sozinha não induz o crescimento folicular comparado ao grupo controle. Além disso, quando combinada com FSH, a ativina-A inibiu o crescimento folicular promovido pelo FSH. Ao final de 18 dias de cultivo, todos os tratamentos apresentaram a formação de antro embora sem diferenças significativas entre os tratamentos. A análise ultra-estrutural confirmou a integridade dos folículos cultivados em FSH após 18 dias de cultivo. Folículos cultivados na presença de ativina-A associada ao FSH, reduziram significativamente ( $p < 0,05$ ) os níveis de RNAm para ActR-IB, ActR-IIB, FSH-R e PCNA. Além disso, em folículos cultivados com FSH sozinho, os níveis de RNAm para HAS1 e HAS 2 foram significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) que em folículos cultivados com ativina-A em associação ao FSH. Ademais, o nível de expressão do RNAm para HAS-3 não diferiu ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos. Em conclusão, a ativina-A é importante para o desenvolvimento folicular inicial (até 6 dias), mas reduz o efeito estimulatório do FSH em folículos pré-antrais bovinos após 18 dias de cultivo *in vitro*. Nossos resultados apontam que o FSH é um fator chave para a sobrevivência e crescimento de folículos pré-antrais cultivados *in vitro* por um longo período (18 dias). Além disso, ativina-A em associação ao FSH reduz os níveis de RNAm para o receptor de ativina do tipo IB (ActR-IB), tipo II-B (ActR-IIB), FSH-R e PCNA, após 18 dias *in vitro*. Em adição, folículos cultivados em meio suplementado com FSH sozinho, apresentaram níveis de expressão de RNAm para HAS-1 e HAS-2 maiores que em folículos cultivados em meio suplementado pela associação de ativina-A e FSH.

**Palavras-chave:** ovário, bovino, folículo, cultivo, ativina-A, FSH.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of FSH alone or in combination with activin-A on survival, growth and expression of mRNA for ActR- IB, ActR- IIB, FSH-R, PCNA, and HAS1/2/3 in bovine secondary follicles cultured *in vitro* for 18 days. Preantral follicles (~0,2mm) were isolated from the cortex of bovine ovaries and individually cultured in the absence (control medium) or presence of activin-A alone at concentrations of (100ng/mL); FSH alone in increased concentrations - 50ng/mL (from day 0 to day 6), 100ng/mL (from day 7 to day 12), and 200ng/mL (from day 13 to day 18) or in association with activin-A in the same concentrations. After 18 days *in vitro*, follicles cultured with FSH showed a significant increase in diameter compared to the other treatments. On the other hand, the activin-A alone did not increase follicular diameter compared to control medium. Moreover, when combined with FSH, activin-A inhibited the growth promoted by FSH. At the end of 18 days of culture, all treatments presented antrum formation but without difference between treatments. Ultrastructural analysis confirmed the integrity of follicles cultured in FSH after 18 days. Follicles cultured in the presence of activin-A in association with FSH significantly reduced ( $P<0.05$ ) levels of mRNA for ActR-IB, ActR-IIB, FSH-R and PCNA. Moreover, in follicles cultured with FSH alone, levels of mRNA for HAS 1 and HAS 2 were significantly higher ( $P<0.05$ ) that in follicles cultured with activin-A in association with FSH. In addition, the level of mRNA expression for HAS-3 did not differ ( $P> 0.05$ ) between treatments. In conclusion, activin-A is important for early follicular development (up to 6 days), but reduces the stimulatory effect of FSH on bovine preantral follicles after 18 days of culture *in vitro*. Our results also indicate that FSH is a key factor for survival and growth of bovine preantral follicles cultured *in vitro* for a long period (18 days). Moreover, activin-A in combination with FSH reduce the levels of mRNA for activin receptor type IB (ActR-IB), type II-B (ActR-IIB), FSH-R and PCNA after 18 days *in vitro*. In addition, follicles cultured in medium supplemented with FSH alone levels of mRNA for HAS-1 and HAS-2 were higher than in follicles cultured in medium supplemented by the association of activin-A and FSH.

**Keywords:** ovary, bovine, follicle, culture, activin-A, FSH.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 1.	Esquema ilustrando o ovário mamífero com suas principais estruturas.....	25
FIGURA 2.	Representação esquemática da oogênese e foliculogênese em fêmeas mamíferas.....	26
FIGURA 3.	Desenho esquemático de um folículo antral (folículo <i>de Graaf</i> ) evidenciando o antro folicular, bem como os componentes presentes no fluido que preenche esta cavidade.....	31
FIGURA 4.	Receptores e via de sinalização da ativina-A.....	38

**ARTIGO I**

- FIGURE 1. Viability assessment of bovine ovarian follicles after 18 days of *in vitro* cultured. A1 ( $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>), A2 ( $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> + activin-A), A3 ( $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> + FSH) e A4 ( $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> + activin-A+FSH) - visualization of the normal morphology of the follicles by light microscopy; B1 ( $\alpha$  -MEM<sup>+</sup>), B2 ( $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> + activin-A), B3 ( $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> + FSH) e B4 ( $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> + activin-A+FSH) characterization of viable follicles marked with calcein-AM (green fluorescence)..... 64
- FIGURE 2. MET photomicrographs of bovine ovarian follicles cultured for 18 days in  $\alpha$ -MEM (A, B) and in the presence of FSH (C, D). G: Golgi apparatus, M: mitochondria, N: nucleus; Nu: nucleolus; O: oocyte, ZP: zona pellucida; Er: endoplasmic reticulum; \*: Concentric circles of endoplasmic reticulum; black arrows: changes in cell membrane, white arrows: changes in the nuclear membrane. Bars: Photos (A) and (B) 10000nm / Photos (C) e (D) 5000nm..... 65
- FIGURE 3. Relative profile expression of mRNA in bovine ovarian follicles (means  $\pm$  SD) A) ActR-IB; B) ActR-IIB; C) FSH-R; D) PCNA; E) HAS 1; F) HAS 2; G) HAS 3. Distinct uppercase letters (A/B) represent significant differences between treatments (P<0.05)..... 66

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO I

Table 1. Primer pairs used in real-time PCR for quantification of proteins of follicular fluid in cultured bovine follicles.....	62
Table 2. Follicular diameter (mean $\pm$ S.E.M.) of preantral bovine follicles with normal morphology after 18 days of <i>in vitro</i> culture in the following treatments: $\alpha$ -MEM <sup>+</sup> , $\alpha$ -MEM <sup>+</sup> + activin-A, $\alpha$ -MEM <sup>+</sup> + FSH , and $\alpha$ - MEM <sup>+</sup> + FSH + activin-A.....	63
Table 3. Survival of bovine isolated preantral follicles cultured <i>in vitro</i> for 18 days in $\alpha$ -MEM <sup>+</sup> , $\alpha$ -MEM <sup>+</sup> supplemented with activin-A, FSH or both ..	63



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ActRIA	Activin Receptors Type I A (Receptor de Ativina do Tipo I A)
ActRIB	Activin Receptors Type I B (Receptor de Ativina do Tipo I B)
ActRIIA	Activin Receptors Type II A (Receptor de Ativina do Tipo II A)
ActRIIB	Activin Receptors Type II B (Receptor de Ativina do Tipo II B)
As	Anti-senso
BMP-15	Proteína Morfogenética Óssea-15
BSA	Albumina Sérica Bovina
°C	Graus Celsius
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CGPs	Células germinativas primordiais
CT	Cycle threshold
dATP	Deoxyadenosine triphosphate (Desoxiadenosina trifosfato)
dCTP	Deoxycytosine triphosphate (Desoxicitosina trifosfato)
dTTP	Deoxythymidine triphosphate
dGTP	Deoxyguanine triphosphate (Desoxiguanina trifosfato)
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNase	Desoxirribonuclease
dTTP	Deoxythymidine triphosphate (Desoxitimidina trifosfato)
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
FSHp	Hormônio folículo estimulante porcino

G	Gauge
GDF-9	Fator de Crescimento e Diferenciação – 9
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofina
GAPDH	Gliceraldeído 3-Fosfato Desidrogenase
HAS-1	Ácido hialurônico sintase do tipo 1
HAS-2	Ácido hialurônico sintase do tipo 2
HAS-3	Ácido hialurônico sintase do tipo 3
KL	Kit Ligand
IA	Inseminação Artificial
ITS	Insulina, transferrina e selênio
LH	Hormônio Luteinizante
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEM	Meio essencial mínimo
MEM <sup>+</sup>	Meio essencial mínimo suplementado
MgCl <sup>2</sup>	Cloreto de magnésio
ml	Mililitros
mm	Milímetro
MOIFOPA	Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais
Ng	Nanograma
Nm	Nanômetro
OPU	<i>ovum pick up</i>
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PCR	Reação em cadeia da polimerase

R-FSH	Receptor para o hormônio folículo estimulante
pH	Potencial Hidrogeniônico
p>0.05	Probabilidade de erro maior do que 5%
p<0.05	Probabilidade de erro menor do que 5%
PIB	Produto Interno Bruto
RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucléico mensageiro
RNA <sub>se</sub>	Ribonuclease
SD	standard deviation (Desvio Padrão)
SMAD	Mensageiro intracelular
S	Senso
sec	segundo
UBQ	Ubiquitina
TGF-β	Superfamília de fatores de crescimento transformante beta
α-MEM <sup>+</sup>	Meio Essencial Mínimo – α suplementado

## LISTA DE SÍMBOLOS

±	Mais ou menos o desvio padrão
%	Porcentagem
~	Aproximadamente
μm	Micrômetro
μg	Micrograma
H <sub>2</sub> O	Água

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	22
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	24
<b>2.1. Ovário dos mamíferos .....</b>	24
<b>2.2. Oogênese.....</b>	25
<b>2.3. Foliculogênese e caracterização folicular.....</b>	27
2.3.1.Foliculogênese.....	27
2.3.2.Folículos pré-antrais.....	27
2.3.3.Folículos antrais.....	29
<b>2.4. População e Atresia Folicular.....</b>	31
<b>2.5. Cultivo folicular <i>in vitro</i>.....</b>	33
2.5.1. Técnicas de isolamento folicular.....	33
2.5.2 Sistemas de cultivo.....	34
<b>2.6. Ativina-A.....</b>	35
<b>2.7. Hormônio Folículo Estimulante (FSH).....</b>	38
<b>2.8 Técnicas para avaliação da eficiência do cultivo <i>in vitro</i> de folículos pré-antrais.....</b>	40
2.8.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real.....	40
2.8.2 Microscopia de fluorescência.....	41
2.8.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	42
<b>3. JUSTIFICATIVA.....</b>	43
<b>4. HIPÓTESES.....</b>	45
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	46
<b>5.1 Objetivos gerais.....</b>	46
<b>5.2 Objetivos específicos.....</b>	46
<b>6. ARTIGO I: <i>Effect of activin-A and follicle stimulating hormone (FSH) on in vitro development of bovine preantral follicles</i> .....</b>	47
<b>7. CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	71
<b>8. PERSPECTIVAS.....</b>	71
<b>9. REFERÊNCIAS.....</b>	72

## 1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, as biotecnologias reprodutivas vêm se destacando no cenário nacional e internacional, criando oportunidades extraordinárias para a reprodução animal, especialmente no que se refere ao aumento da eficiência reprodutiva dos rebanhos de elevado potencial econômico. A criação de bovinos no Brasil é a atividade econômica que ocupa a maior extensão de terras. No Nordeste brasileiro, a criação de rebanho bovino apresenta um impacto significativo no cenário socioeconômico, atuando como fonte de renda alternativa para criadores, além de produzir alimento de alto valor nutricional e contribuir com valioso material genético voltado às pesquisas para reprodução animal.

A utilização e o desenvolvimento de biotécnicas da reprodução são condições indispensáveis para o aumento da eficiência produtiva e reprodutiva dos rebanhos, e têm apresentado um crescimento extraordinário, tanto no contexto molecular quanto nos aspectos aplicados. No intuito de incrementar a eficiência reprodutiva na espécie bovina, algumas biotécnicas já estão estabelecidas ou encontram-se em desenvolvimento, destacando-se a Inseminação Artificial (IA), Fecundação *in vitro* (FIV), Transferência de Embriões (TE), Transgênese, Clonagem e Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais (MOIFOPA), a qual vem sendo bastante explorada por sua potencialidade em aproveitar a abundância oocitária presente no ovário. Tendo em vista que o ovário mamífero contém milhares de oócitos inclusos em folículos pré-antrais e que poucos destes folículos desenvolvem-se até o estágio de folículo pré-ovulatório (Van den HURK e ZHAO., 2005) a biotécnica de MOIFOPA visa recuperar, preservar e cultivar *in vitro* um grande número de folículos pré-antrais a fim de promover a sua ativação, crescimento e completa maturação, prevenindo-os da morte folicular que ocorre naturalmente *in vivo*.

Sabendo-se que é possível isolar cerca de 7.832 folículos pré-antrais de um ovário bovino (DE BEM *et al.*, 1997), o desenvolvimento de sistemas de cultivo *in vitro* que possibilitem o crescimento destes folículos até estarem aptos à maturação pode revolucionar a produção *in vitro* de embriões bovinos. Desta forma, o desenvolvimento de meios de cultivo, associado com o estudo dos hormônios e fatores de crescimento que controlam o crescimento e a maturação folicular, possibilitará a aplicação de estratégias eficientes para o aproveitamento dos milhares de oócitos presentes em ovário bovinos. Dentre as substâncias que participam da regulação do desenvolvimento folicular, destacam-se a Ativina-A e o Hormônio Folículo Estimulante (FSH).

Estudos recentes tem demonstrado que a ativina-A adicionada ao meio de cultivo, mantém a morfologia e integridade de oócitos recuperados de folículo secundários bovinos cultivados por oito dias (McLAUGHLIN *et al.*, 2010). Além disso, quando associada ao FSH, aumenta os níveis de RNAm para os receptores de FSH em células da granulosa, bem como para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), os quais desempenham um papel importante na progressão do ciclo celular (EL-HEFNAWY & ZELEZNIK, 2001).

Para um maior esclarecimento da importância deste trabalho, a revisão de literatura a seguir aborda aspectos relacionados ao ovário mamífero, oogênese, folículoogênese, caracterização folicular, população folicular e atresia, modelos utilizados para estudo da foliculogênese *in vitro*, incluindo sistemas de cultivo, destacando a importância dos hormônios e fatores de crescimento tais como ativina-A e FSH, técnicas de isolamento folicular e técnicas utilizadas na avaliação do cultivo folicular. Os benefícios oriundos de uma melhor compreensão do desenvolvimento folicular para o aumento da eficiência reprodutiva dos bovinos também serão citados.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Os ovários dos mamíferos

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

Além dos nutrientes e hormônios provenientes da corrente sanguínea, fatores produzidos pelos diferentes tipos celulares contribuem para a formação de um sistema bastante complexo que regula as funções do ovário, ou seja, a produção de gametas e hormônios (ERICKSON e SHIMASAKI *et al.*, 2003). Estas funções são exercidas pela interação de dois fenômenos que ocorrem no ovário, a oogênese e a foliculogênese; estes correspondem a processos biológicos complexos e coordenados que requerem uma série de eventos que induzem as mudanças morfológicas e funcionais dentro do folículo, conduzindo a diferenciação de células e o desenvolvimento dos oócitos (BONNET *et al.*, 2008). Assim, os ovários são as gônadas feminina dos mamíferos, responsáveis pela produção e armazenamento das células germinativas, bem como pela produção de moléculas bioativas, principalmente os hormônios esteróides e fatores de crescimento, que são reguladores críticos da função ovariana.



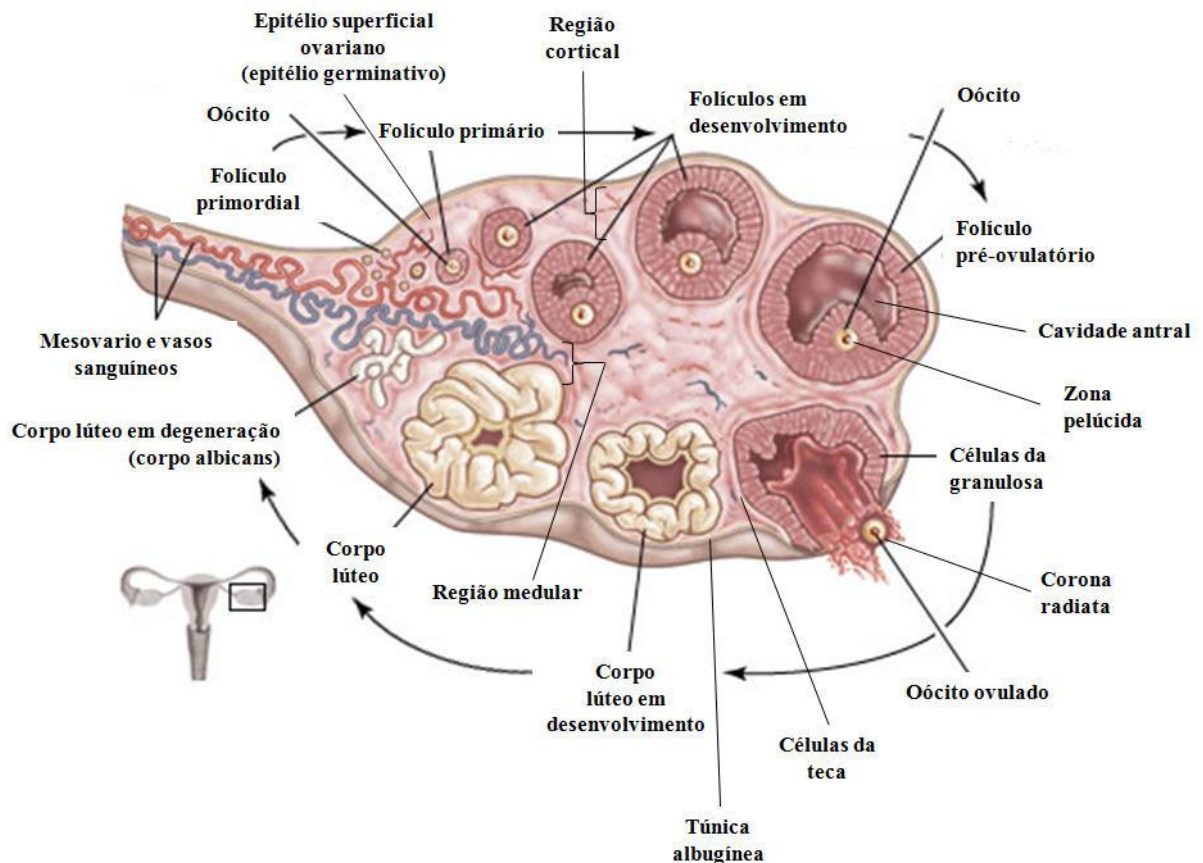


Figura 1. Esquema ilustrando o ovário mamífero com suas principais estruturas. (Adaptado de <<http://www.britannica.com/EBchecked/media/99761/The-steps-of-ovulation-beginning-with-a-dormant-primordial-follicle>>.)

## 2.2 Oogênese

A oogênese pode ser definida como um processo celular, molecular e fisiológico que envolve a formação, o crescimento e a maturação do oócito que tem início na vida intra-uterina e termina após a fertilização (Figura 2). Na maioria dos mamíferos, a oogênese começa com a formação das células germinativas primordiais (CGPs), cuja origem é extragonadal, do endoderma primitivo, sendo oriundas da porção caudal da linha primitiva e do saco vitelínico adjacente (WASSARMAN e ALBERTINI *et al.*, 1994). Em vacas este evento pode ser observado no 35º dia de gestação (ERICKSON *et al.*, 1966).

As células germinativas primordiais passam por sucessivas mitoses e migram através de movimentos amebóides do saco vitelínico para as gônadas em desenvolvimento (SOTO-SUAZO e ZORN *et al.*, 2005). Após perderem suas características de motilidade e sofrerem extensiva proliferação celular e redistribuição das organelas citoplasmáticas, as células germinativas primordiais se transformam em oogônias (SADEU *et al.*, 2006).

As oogônias formadas são envolvidas por um cordão de células somáticas provenientes do mesonéfron e a partir de então sofrem divisão mitótica e originam o oócito (FREMAN, 2003; Van den HURK e ZHAO, 2005). Os oócitos começam a primeira divisão meiótica, passando pelos estágios da prófase I (leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno) da primeira divisão meiótica (Van den HURK e ZHAO, 2005). No estágio de diplóteno ou vesícula germinativa da prófase I, ocorre a primeira interrupção da divisão meiótica e formação dos oócitos primários, que permanecem neste estágio até a puberdade (SUH *et al.*, 2002). Na puberdade, imediatamente antes da ovulação, com o pico dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), os oócitos que terminaram seu crescimento retomam a meiose e o núcleo passa do estágio de vesícula germinativa para diacinese (CECCONI *et al.*, 2004b). Em seguida, ocorre o rompimento da vesícula germinativa, progressão para metáfase I, anáfase I, telófase I, expulsão do primeiro corpúsculo polar e formação do oócito secundário, iniciando a segunda divisão meiótica, em que o núcleo do oócito evolui até o estágio de metáfase II, quando ocorre a segunda interrupção da meiose (GORDON *et al.*, 1994). O oócito permanece assim até ser fecundado pelo espermatozóide, quando então completa a meiose e expulsa o segundo corpúsculo polar, formando o oócito haplóide fecundado (MOORE e PERSAUD, 1994).

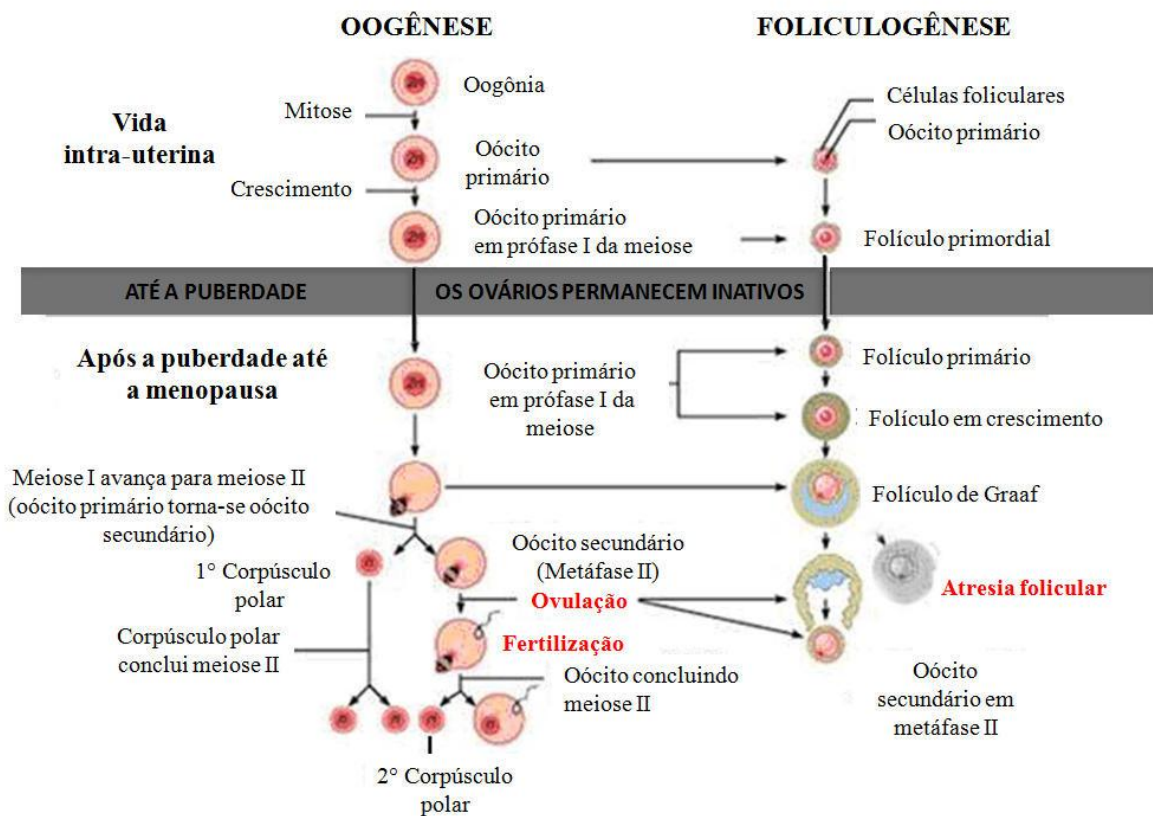


Figura 2. Representação esquemática da oogênese e foliculogênese em fêmeas mamíferas. (fonte primária)

## 2.3 Foliculogênese e caracterização folicular

### 2.3.1 Foliculogênese

A foliculogênese é o processo de crescimento dos folículos ovarianos caracterizado por alterações morfológicas acompanhado por um desenvolvimento funcional. Este começa com o recrutamento de folículos primordiais e termina com a ovulação ou morte por atresia (HUSSEIN, 2005) (Figura 2).

O folículo é a unidade fundamental do ovário de mamíferos, apresentando duas funções importantes: assegurar a nutrição, o crescimento e a maturação do oócito de forma a permitir a ovulação, bem como produzir hormônios como o estrógeno, e peptídeos como inibina A e B e ativina (CORTVRINDT e SMITZ, 2001; ADASHI, 1994), eles são constituídos por diferentes tipos celulares (oócito, células da granulosa e da teca) dos quais suas interações são essenciais para a foliculogênese (BONNET *et al.*, 2008).

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

### 2.3.2 Folículos pré-antrais

Após a colonização dos ovários pelas células germinativas primordiais e posterior diferenciação em oogônias e oócitos, uma camada de células somáticas planas, conhecidas também como células da pré-granulosa, circundam os oócitos formando assim os folículos primordiais (JUENGEL *et al.*, 2002). CHEN *et al.* (2007) evidenciou que o estradiol, progesterona e a genisteína inibem a dissociação dos aglomerados de células germinativas e impedem a formação dos folículos primordiais. Aliado a isso, estudos recentes indicam que tanto as proteínas E-caderina e N-caderinas são expressos em ovários perinatal de hamsters e

estão envolvidas diretamente na formação dos folículos primordiais (CHENG WANG & SHYAMAL K. ROY, 2010).

#### **a) Folículos primordiais**

Os folículos primordiais são constituídos por um oócito quiescente, imaturo e circundado por uma camada de células da pré-granulosa de morfologia pavimentosa (SILVA, 2005), um grande núcleo do oócito ocupa uma posição central demonstrando um nucléolo evidente. As organelas são uniformemente distribuídas no citoplasma ou bem próximas ao núcleo. A mitocôndria é a organela mais evidente e é predominantemente redonda, o retículo endoplasmático liso e o complexo de Golgi são pouco desenvolvidos e várias vesículas estão espalhadas pelo citoplasma (LUCCI *et al.*, 2001).

As células da pré-granulosa são recrutadas das células mesoteliais do epitélio da superfície ovariana ou de mesonéfron renal. Estes dois tipos celulares têm alta atividade proliferativa. No entanto, após circundarem os oócitos, as células da pré-granulosa param de se multiplicar e entram em um período de quiescência (SAWYER *et al.*, 2002). A zona pelúcida nesse estágio não é observada, verificando-se apenas uma justaposição do oócito e células da granulosa, sem nenhuma junção específica. Os folículos primordiais permanecem quiescentes até seu recrutamento para o grupo de folículos em crescimento constituindo o *pool* de reserva ovariano (Van den HURK e ZHAO, 2005). Na espécie bovina, os folículos primordiais surgem no ovário fetal no 90° dia de gestação (RÛSSE, 1983) e o seu diâmetro varia de 30 a 40 µm, enquanto seu oócito apresenta entre 20 e 25 µm (BECKERS *et al.*, 1996).

Durante a vida reprodutiva das fêmeas, cada folículo primordial tem três possíveis destinos: (I) Manter-se quiescente, ou em repouso, durante todo o período reprodutivo; (II) ser ativado e fazer parte do *pool* de folículos em crescimento, podendo sofrer atresia ou ovulação em uma fase posterior do desenvolvimento, ou ainda (III) sair da quiescência e sofrer atresia diretamente (McGEE & HSUEH, 2000; BROEKMANS *et al.*, 2007).

#### **b) Folículos primários**

A ativação dos folículos primordiais é caracterizada pelo aparecimento de uma camada completa de células da granulosa de formato cúbico ao redor do oócito, formando o folículo primário (HULSHOF *et al.*, 1992). Este evento é marcado por um período de

crescimento acentuado do oócito, com intensa atividade metabólica. Nesta fase de crescimento, inicia-se o surgimento de uma rede de junções *gap*, que correspondem a canais intercelulares que permitem a passagem de nutrientes, íons inorgânicos, segundos mensageiros e pequenos metabólitos de uma célula para outra.

Estes canais são compostos por conexinas, sendo a conexina 43 a mais abundante no ovário uma vez que esta é expressa nas células da granulosa desde o início da foliculogênese (ACKERT *et al.*, 2001). Em contrapartida, a membrana plasmática do oócito apresenta projeções que penetram entre as células da granulosa adjacentes e algumas microvilosidades aparecem na superfície oocitária (LUCCI *et al.*, 2001). Além disso, à medida que os folículos iniciam o crescimento, as proteínas que irão formar a zona pelúcida começam a ser sintetizadas (LEE, 2000).

### c) Folículos secundários

Após intensa multiplicação das células da granulosa, uma nova camada de células é formada, dando origem ao grupo de folículos secundários. Durante a multiplicação destas células evidencia-se a expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), que pode ser usado como um marcador confiável de crescimento folicular por meio da multiplicação das células da granulosa (WANDJI *et al.*, 1996). Os folículos secundários são constituídos por um oócito circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa de formato cubóide. O núcleo do oócito assume uma posição excêntrica e as organelas começam a mover-se para a periferia. Com o desenvolvimento dos folículos, o espessamento da zona pelúcida torna-a visível (LUCCI *et al.*, 2001), e as células da teca começam a surgir, formando uma camada circundante, provavelmente a partir de fibroblastos presentes no estroma ovariano (HONDA *et al.* 2007).

### 2.3.3 Folículos antrais

Com o crescimento dos folículos secundários e a organização das células da granulosa em várias camadas, ocorre a formação de uma cavidade repleta de líquido entre as camadas de células da granulosa, denominada antro.

O fluido folicular que preenche esta cavidade contém água, eletrólitos, proteínas séricas e alta concentração de hormônios esteróides secretados pelas células da granulosa

(BARNETT *et al.*, 2006), sendo a produção deste fluido intensificada pelo aumento da vascularização folicular e permeabilidade dos vasos sanguíneos, os quais estão fortemente relacionados com o aumento do folículo antral (Van den HURK e ZHAO, 2005). Em adição, verificou-se a presença de grandes moléculas osmoticamente ativas no fluido folicular ovariano, tais como ácido hialurônico, sulfato de condroitina e dermatan sulfato, que são fortemente hidrofílicas e carregadas negativamente, e assim contribuem diretamente para uma intensa atividade osmótica (CLARKE *et al.*, 2006) (Figura 3).

O ácido hialurônico é sintetizado na superfície de células por isoenzimas denominadas ácido hialurônico sintases (HAS 1, 2 ou 3). No ovário, a produção de ácido hialurônico pelas células *cumulus* tem sido extensivamente estudada (CHEN *et al.* 1993, 1996; HIRASHIMA *et al.* 1997; HESS *et al.* 1999; KOBAYASHI *et al.* 1999). Acredita-se que o ácido hialurônico esteja envolvido na formação do fluido folicular. Desta forma, é necessário que sua produção seja realizada antes mesmo da ovulação, pelo complexo *cumulus* oócito. Observou-se a presença de ácido hialurônico no fluido folicular, sugerindo que ele esteja envolvido com a manutenção e/ou formação do antro folicular. Recentemente, baixos níveis de expressão de HAS 2 e uma baixa produção de ácido hialurônico foi observado em cultivo de células da granulosa (SCHOENFELDER & EINSPANIER, 2003). Desta forma, claramente, o ácido hialurônico tem todas as evidências para ser um regulador chave da formação do fluido folicular.

Na fase antral, o oócito aumenta progressivamente o diâmetro e prepara-se para adquirir competência para concluir sua divisão meiótica e, em seguida, para ser fertilizado (SENEDA e BORDIGNON, 2007). Nos folículos antrais, as células da teca sofrem alterações morfológicas e funcionais e, aquelas células localizadas próximas da membrana basal são denominadas teca interna, enquanto que as localizadas periféricamente são classificadas como teca externa. Já as células da granulosa são diferenciadas em células do *cumulus* (mais próximas ao oócito) e células murais, aquelas adjacentes à parede folicular.

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

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

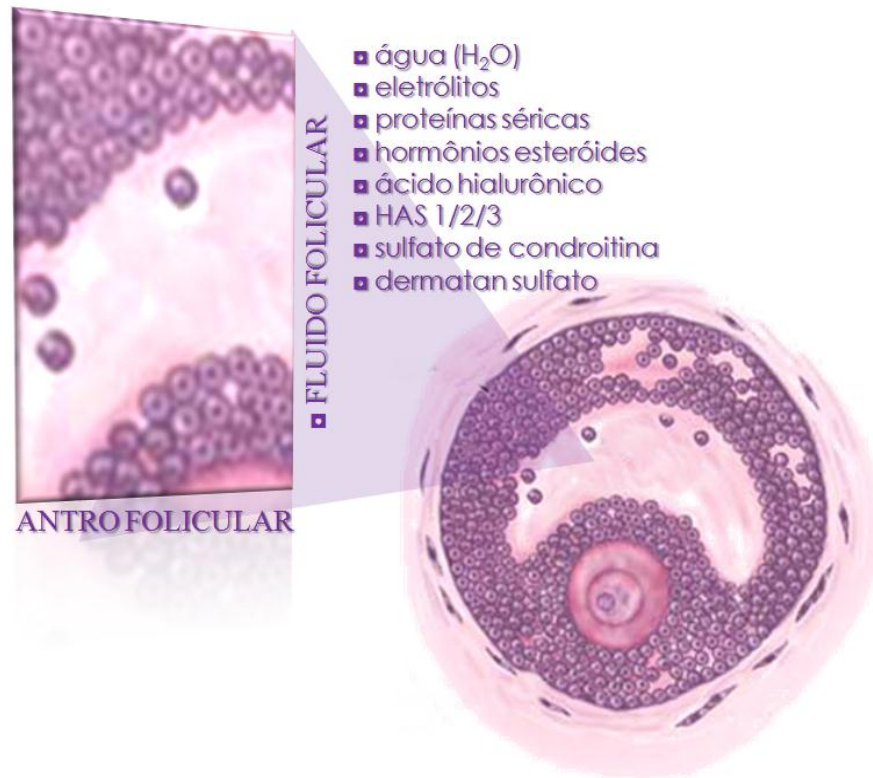


Figura 3. Desenho esquemático de um folículo antral (folículo de *Graaf*) evidenciando o antro folicular, bem como os componentes presentes no fluido que preenche esta cavidade. (fonte primária)

## 2.4 População e Atresia folicular

O “*pool*” de folículos pré-antrais existente nos ovários de mamíferos representa uma significativa reserva de material para estudos com a manipulação genética de espécies domésticas, bem como para a preservação de espécies em extinção e tratamento de algumas formas de infertilidade (PICTON, 2001).

A população folicular presente no ovário bovino foi estimada em 235.000 folículos, podendo variar de 0 a 720.000 folículos por ovário (BETTERIDGE *et al.*, 1989). Vários fatores como a espécie, raça (CAHILL *et al.*, 1979), genética (ERICKSON, 1966; SMITH *et al.*, 1994), idade (PETERS, 1976; RÜSSE, 1983; ROY & TREACY, 1993) e estado reprodutivo do animal (ERICKSON *et al.*, 1976) podem influenciar a população de folículos ovarianos.

Durante a vida reprodutiva das fêmeas, ocorre uma redução ordenada no número de folículos pré-antrais (SHAW, ORANRATNACHAI e TROUNSON, 2000), a quase totalidade dos folículos, ou seja, 99,9% não atingem a ovulação, pois morrem por um processo natural denominado atresia, fazendo com que o desenvolvimento de um folículo pré-ovulatório a partir de um folículo primordial seja um evento biológico extremamente raro (FIGUEIREDO *et al.*, 2008). A atresia está associada a uma série de mudanças morfológicas e bioquímicas, que variam de acordo com o estágio do crescimento folicular e também com a espécie animal (CUNNINGHAM, 2004).

Este processo, pelo qual o folículo perde completamente a sua integridade, pode se dar por duas vias distintas: (1) via degenerativa (SAUMANDE *et al.*, 1981), na qual pode ser observada alterações no fornecimento de oxigênio e nutrientes para o ovário, além de ser causada por isquemia, que resulta em algumas alterações na permeabilidade da membrana celular. Essas alterações podem levar ao aumento de água intracelular e do volume das células, vacuolização citoplasmática e, conseqüentemente, degeneração (BARROS, HERMOSILLA e CASTRO, 2001). Além disso, a atresia folicular pode ocorrer pela (2) via apoptótica (FIGUEIREDO *et al.*, 1995), na qual observa-se um processo de morte celular individual e ativo, caracterizado pela fragmentação nuclear e pela formação de corpos apoptóticos (RACHID *et al.*, 2000), sendo um processo altamente dependente da expressão gênica, em que o desbalanço entre os genes pró e anti-apoptóticos determinam a morte celular (HURWITZ e ADASHI, 1992). É observado também que quando os fatores parácrinos ou endócrinos não são apropriados para suportar o crescimento folicular e/ou diferenciação das células da granulosa este processo acaba por ocorrer (SILVA *et al.*, 2002). O processo apoptótico é dependente da expressão de genes (BARNETT *et al.*, 2006), bem como de proteínas intracelulares (GOUGEON, 2010).

Em folículos antrais, as gonadotrofinas FSH e LH atuam como importantes inibidores da apoptose a partir do estágio em que eles estão aptos a serem recrutados (MARKSTROM *et al.*, 2002). Provavelmente o balanço entre os fatores que promovem sobrevivência e aqueles que induzem a apoptose decidirá se um determinado folículo continuará o seu desenvolvimento ou sofrerá atresia (HSU e HSUEH, 2000). A atresia, apesar de causar a perda de vários folículos ovarianos, é um evento crucial para manutenção da homeostase ovariana em mamíferos, assegurando a ciclicidade dos animais e prevenindo o desenvolvimento de múltiplos embriões durante a gestação (AMSTERDAM *et al.*, 2003).

Neste contexto, entende-se que o crescimento do folículo e desenvolvimento até a fase antral requer um complexo de sinalização bidirecional entre o oócito e as células



somáticas vizinhas, envolvendo citocinas específicas, fatores de crescimento e gonadotrofinas hipofisárias (ADASHI, 1994; Van den HURK e ZHAO, 2005; DRUMMOND, 2006).

## **2.5 Cultivo folicular *in vitro***

O cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais é utilizado a fim de avaliar o efeito de diferentes substâncias, nas diferentes fases do desenvolvimento folicular, com o objetivo de otimizar *in vitro* os eventos que ocorrem com os folículos ovarianos que não são ovulados *in vivo*. Nas últimas duas décadas, vários sistemas de cultivo foram desenvolvidos e os resultados são dependentes do tipo de meio, do sistema de cultivo utilizado e da espécie animal estudada (EPPIG e SCHOEDER, 1989, BOLAND *et al.*, 1993, FORTUNE, 2003). Além disso, o cultivo folicular tem por objetivo fornecer um grande número de oócitos viáveis para posterior utilização em outras biotécnicas como fecundação *in vitro*, visando a produção de embriões, transgenia e clonagem. Entretanto, para alcançar esses objetivos, é necessário o desenvolvimento de um sistema de cultivo *in vitro* ideal para cada etapa do desenvolvimento folicular.

Nesse sentido, diversos estudos vêm sendo realizados no intuito de se avaliar a ação de diferentes fatores, tais como tempo do cultivo, influência das diferentes concentrações de determinadas substâncias utilizadas (suplementos, hormônios e fatores de crescimento (MATOS *et al.*, 2007; ERICKSON, 2001; SARAIVA *et al.*, 2010), bem como diferentes regimes de troca de meio, sobre a elaboração de um sistema de cultivo adequado (MAGALHÃES *et al.*, 2011).

### **2.5.1 Técnicas de isolamento folicular**

O sucesso do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais depende, em grande parte, do emprego de métodos eficazes que possibilite a obtenção de um maior número de folículos pré-antrais, com a melhor viabilidade possível, para então se proceder as técnicas de crescimento e cultivo *in vitro* (TELFER, 1996)

Para a aplicação da biotécnica de MOIFOPA, é importante definir a melhor metodologia de isolamento dos folículos de forma que se permita seu adequado isolamento, evitando danos estruturais e garantindo a sobrevivência folicular.

O princípio das técnicas de isolamento folicular consiste na dissociação ou separação dos folículos pré-antrais dos demais componentes do estroma ovariano (fibroblastos, fibras colágenas e elásticas, fibronectina, etc.) utilizando-se, para tanto, instrumentos mecânicos associados ou não aos químicos ou enzimáticos.

Atualmente, os métodos mecânicos vêm sendo amplamente utilizados para isolar folículos secundários, de aproximadamente 0,2mm, categoria folicular alvo deste estudo. A microdissecção, método de isolamento folicular com o auxílio de agulhas tem se tornado uma das técnicas mais adotadas para o isolamento de folículos pré-antrais secundários em camundongas (CORTVRINDT *et al.* 1996), ratas (DANIEL *et al.*, 1989), gatas (JEWGENOW, 1996), ovelhas (TAMILMANI *et al.*, 2005), vacas (GUTIERREZ *et al.*, 2000), búfalas (SANTOS *et al.*, 2006), cabras (SARAIVA *et al.*, 2010) e mulheres (ABIR *et al.*, 1999), por ser uma técnica de baixo custo, comparado ao método enzimático e que permite o adequado isolamento folicular. Esta técnica tem a vantagem de permitir a manutenção da estrutura folicular e membrana basal, além de preservar os receptores de superfície e a interação entre os compartimentos foliculares (teca-granulosa-oócito) após o isolamento (KURVILA, 2007).

### 2.5.2 Sistemas de cultivo

O desenvolvimento de um sistema *in vitro* que suporte o crescimento de folículos pré-antrais nas espécies domésticas é ambicioso, pois o desenvolvimento folicular nesta espécie ocorre em um período mais longo comparando aos animais de laboratório e por isso, os folículos pré-antrais precisam crescer mais até tornarem-se pré-ovulatórios. Enquanto um folículo de camundonga é necessário crescer em torno de 400  $\mu\text{m}$  *in vitro*, um folículo pré-antral bovino necessita crescer aproximadamente 8 mm (TELFER *et al.*, 2000).

Diferentes sistemas de cultivo vêm sendo utilizados para o teste de diferentes substâncias, visando a manutenção da viabilidade folicular, bem como o estímulo ao crescimento de folículos pré-antrais *in vitro* (ROSSETTO *et al.*, 2011). Dentre os métodos de cultivo comumente utilizados, podemos destacar o cultivo do ovário inteiro, de fragmentos do córtex ovariano (cultivo *in situ*) e de folículos isolados, sendo este último realizado nas formas bidimensional, onde o folículo é cultivado sobre o substrato ou na forma tridimensional, na qual o folículo é internalizado no substrato (DEMEESTERE *et al.*, 2002; PANGAS *et al.*, 2003; BASSO *et al.*, 2007; FIGUEIREDO *et al.*, 2008). Neste sentido, a aplicação de sistemas *in vitro* utilizando estes folículos isolados têm sido possível, o que

permite o monitoramento diário do crescimento, bem como a análise do efeito de hormônios e fatores de crescimento sobre cada categoria folicular (ABIR *et al.*, 2001).

Um notável progresso tem sido observado no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais em diferentes espécies animais. Os resultados mais satisfatórios foram obtidos a partir de estudos *in vitro* com o cultivo de folículos pré-antrais de camundongas, os quais demonstraram que é possível a obtenção de crias vivas a partir de oócitos oriundos de folículos cultivados *in vitro* (O'BRIEN; PENDOLA; EPPIG, 2003; HASEGAWA *et al.*, 2006). Já em animais de produção, como caprinos (SARAIVA *et al.*, 2010; MAGALHÃES *et al.*, 2011), ovinos (ARUNAKUMARI; SHANMUGASUNDARAM; RAO, 2010), bubalinos (GUPTA *et al.*, 2008) e suínos (HIRAO *et al.*, 1994; WU; EMERY; CARRELL, 2001), o cultivo *in vitro* de folículos secundários resultou na produção de oócitos maduros, os quais foram fecundados *in vitro* gerando embriões. Contudo, a quantidade de embriões produzidos a partir de oócitos provenientes de folículos pré-antrais crescidos *in vitro* ainda é limitado nestas espécies. Em bovinos, o cultivo de folículos pré-antrais não têm obtido sucesso no que se refere a produzir oócitos meioticamente competentes (TELFER, 1996), tendo-se alcançado apenas a formação de antro após o cultivo *in vitro* de folículos secundários (GUTIERREZ *et al.*, 2000; ITOH *et al.*, 2002, McLAUGHLIN *et al.*, 2010). A produção de embriões obtida após cultivo de folículos pré-antrais de búfalas em detrimento dos principais resultados obtidos na espécie bovina, limitados apenas a formação do antro, deixa clara a grande necessidade de se aperfeiçoar os sistemas de cultivo adotados.

O presente desafio é determinar condições de cultivo apropriadas para dar suporte à transição de folículos primários para secundários *in vitro*, 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 *in vitro* de folículos pré-antrais (WANDJI *et al.*, 1997). Nestes sistemas de cultivo, a adição de fatores de crescimento, e hormônios como por exemplo, a ativina-A e o FSH são de grande importância para o sucesso do desenvolvimento folicular *in vitro*.

## 2.6 Ativina-A

A ativina é um dos membros pertencentes à família de fatores de crescimento transformante -  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e tem sido descrita como molécula chave que controla o desenvolvimento folicular (KNIGHT & GLISTER, 2006). As ativinas são glicoproteínas diméricas compostas de duas subunidades  $\beta$  de inibina, A ou B, e existem como homo ou

heterodímeros. Assim, existem três isoformas de ativina: A, AB e B, em que a ativina A é a isoforma predominante no ovário (PENG & MUKAI, 2000.) A inibina é o antagonista funcional da ativina, o qual consiste em um heterodímero de uma única subunidade  $\alpha$  com qualquer uma das duas subunidades  $\beta$  compartilhadas para formar inibina A ( $\alpha\beta A$ ) ou inibina B ( $\alpha\beta B$ ) (KRETSER e ROBERTSON, 1989). Assim, ativina e inibina são estruturalmente relacionadas e, além disso, compartilham uma via de sinalização em comum. Desta forma, a inibina antagoniza a ação de ativina por competição pelas subunidades  $\beta$  ou pela ligação com receptores de ativina tipo II (MATHEWS e VALE, 1991). Um co-receptor,  $\beta$ -glycan, é o mediador desta última ação (BERNARD *et al.*, 2001; LEWIS *et al.*, 2000).

As ativinas possuem um importante papel autócrino/parácrino no desenvolvimento folicular, controlando o crescimento e a diferenciação dos folículos (FINDLAY, 1993; MATHER *et al.*, 1997). Em ovários de cabra, tanto o RNAm como a proteína para os receptores de ativina foram demonstrados em todas as fases foliculares (SILVA *et al.*, 2004). McLAUGHLIN *et al.*, (2010) evidenciaram que a ativina-A está associada com a proliferação de células somáticas, formação de cavidade antral e manutenção da morfologia de oócitos de folículos pré-antrais bovinos cultivados *in vitro*. Em primatas, a ativina-A regula a esteroidogênese nas células da granulosa (ALAK *et al.*, 1998).

Durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais de camundongas, a adição de ativina ao meio de cultivo propiciou a manutenção de altas taxas (92%) de sobrevivência folicular (OLA *et al.*, 2008) e, quando foi adicionada no cultivo tridimensional, resultou em melhores condições para o crescimento e sobrevivência folicular *in vitro* (OKTEM & OKTAY, 2007). Sabe-se, no entanto, que durante o desenvolvimento folicular, os efeitos da ativina podem ser limitados pelo excesso da produção de inibina (NEWTON *et al.*, 2002).

A atuação biológica das ativinas ocorre através de dois tipos de receptores, caracterizados como serina/treonina quinase, designados tipo I e tipo II. Cada um apresenta duas isoformas, originando os receptores para ativina tipo IA (ActR-IA), IB (ActR-IB), IIA (ActR-IIA) e IIB (ActR-IIB) (PANGAS & WOODRUFF, 2000). Após a ligação do ligante, o receptor do tipo II fosforila o receptor do tipo I em múltiplos resíduos de serina e treonina. Durante este processo, os receptores do tipo I fosforilam proteínas efetoras, chamadas SMADs 2 e 3, as quais associam-se com a co-SMAD 4, formando um complexo que é translocado para o núcleo, onde ligam-se ao DNA e recrutam co-fatores transcricionais. Outra importante proteína regulatória é a SMAD 7, a qual exerce um efeito inibitório ao se ligar diretamente a receptores do tipo I, impedindo, assim, a sua interação com as SMADs 2 e 3 e,

portanto, bloqueando esta via de sinalização (ETHIER e FINDLAY, 2001; MASSAGUE e CHEN, 2000; HELDIN *et al.*, 1997) (Figura 4).

Os receptores de ativina dos tipos A e B já foram demonstrados em folículos pré-antrais de bovinos (HULSHOF *et al.*, 1997) e suínos (Van den HURK e VAN DE PAVERT, 2001). Em ovários de cabra, tanto o RNAm como a proteína para os receptores de ativina foram demonstrados em todas as fases foliculares (SILVA *et al.*, 2004). Ademais, o RNAm para ativina-A em folículos pré-antrais de suínos foi demonstrado por hibridização *in situ* (Van den HURK e VAN DE PAVERT, 2001).

Durante o cultivo *in vitro*, a ativina-A promoveu a proliferação de células da granulosa isoladas de folículos pré-antrais e antrais iniciais em ovários de ratas (MIRO e HILLIER, 1996). Estudos com bovinos relataram que ativina-A suportou o crescimento de folículos primários e secundários (HULSHOF *et al.*, 1997). Quando testada em folículos primordiais e primários de cabra, a ativina-A estimulou a ativação, crescimento e aumentou a percentagem de folículos saudáveis (SILVA *et al.*, 2006).

Van den Hurk & Van de Pavert (2001), demonstraram que as células da granulosa e da teca funcionam como principais locais de síntese de ativina, enquanto o oócito e as células da granulosa são os principais sítios de ligação. Esses achados indicam um papel tanto autócrino como parácrino da ativina sobre as células foliculares em suínos. Este fator de crescimento ainda atua na regulação do receptor de FSH, expressão de aromatase FSH-induzida e diminuição da produção de andrógenos por células da teca (KNIGHT e GLISTER, 2006). A ativina também regula a esteroidogênese ovariana em primatas (ALAK *et al.*, 1998) e a expressão de genes para receptor de estrógeno (ER $\alpha$  e ER $\beta$ ) em ovários de ratas (KIPP *et al.*, 2007).

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

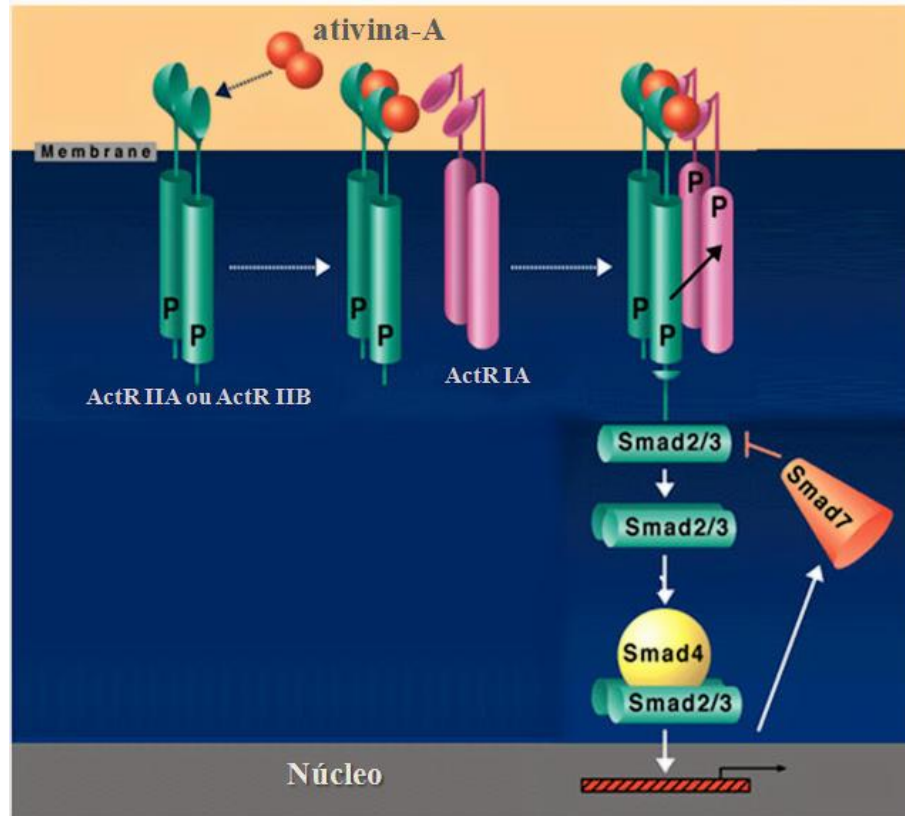


Figura 4. Receptores e via de sinalização da ativina-A. (Adaptado de : YARON SHAV-TA *et al.*, 2001)

## 2.7 Hormônio Foliculo Estimulante (FSH)

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

antrais caprinos foram observados após adição de FSH ao meio de cultivo *in vitro* (MATOS *et al.*, 2007).

O FSH parece estar envolvido na proliferação e diferenciação das células da granulosa *in vitro*. Aparentemente, níveis basais de FSH são necessários para o desenvolvimento de pequenos folículos (Van den HURK *et al.*, 1997). Além disso, alguns estudos *in vitro* demonstraram que a adição de FSH ao meio de cultivo promoveu a inibição de apoptose e a formação de antro em grandes folículos secundários isolados de diferentes espécies (murina: McGEE *et al.*, 1997; humana: WRIGHT *et al.*, 1999; ovina: CECCONI *et al.*, 1999; bovina: GUTIERREZ *et al.*, 2000; suína: MAO *et al.*, 2002). Contrariamente aos efeitos benéficos do FSH no desenvolvimento folicular *in vitro*, NUTTINCK *et al.*, (1996) mostraram que o FSH porcino (FSHp) induz a degeneração em pequenos folículos pré-antrais bovinos. Nesta mesma espécie, durante cultivo de pequenos folículos pré-antrais (30-70  $\mu\text{m}$ ), o FSH promoveu um aumento do diâmetro folicular (HULSHOF *et al.*, 1995).

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

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

O FSH atua se ligando a receptores localizados exclusivamente nas gônadas. Este receptor é do tipo acoplado à proteína G, que é dividido em três domínios: um extracelular, um transmembranário, composto por 7 hélices hidrofóbicas que ancoram o receptor no plasmalema, e um domínio intramembranário (GUDERMANN *et al.*, 1995). O domínio intracelular do receptor do FSH (C-terminal) é acoplado a uma proteína G e, após a ativação do receptor pela interação hormonal com o domínio extracelular (N-terminal), inicia-se uma cascata de eventos que culmina com efeitos biológicos específicos da gonadotrofina (SIMONI *et al.*, 1997).

Diferentemente do estágio pré-antral, o desenvolvimento folicular antral é criticamente dependente do suporte das gonadotrofinas. Embora pelo menos 80% dos oócitos bovinos coletados de folículos antrais sofram maturação nuclear espontaneamente em cultivo, são adicionadas gonadotrofinas ao meio de maturação (CALDER *et al.*, 2003). O FSH é adicionado para induzir maturação citoplasmática, expansão do *cumulus* e assim melhorar a

eficiência do processo de maturação, mediando a produção de fatores pelas células somáticas que circundam o oócito (GILCHRIST *et al.*, 2004; SIRARD *et al.*, 2007)

## 2.8 Técnicas para avaliação da eficiência do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais

A otimização da exploração do potencial reprodutivo das fêmeas requer uma compreensão mais ampla dos mecanismos que controlam o crescimento e o desenvolvimento folicular após um determinado período de cultivo *in vitro*. Além disso, uma avaliação precisa da eficiência do cultivo *in vitro* permite o monitoramento das alterações ocorridas, sendo, portanto, de grande importância para a melhoria dos sistemas de crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais. Assim, o entendimento dos eventos ocorridos durante a foliculogênese, associados à técnicas como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real, Microscopia de Fluorescência e Microscopia Eletrônica de Transmissão, poderão ser úteis na elucidação da fisiologia ovariana de mamíferos e, conseqüentemente, na otimização da eficiência reprodutiva destes animais.

### 2.8.1 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real

A PCR em tempo real combina amplificação e quantificação em uma mesma etapa. Isso foi alcançado utilizando-se uma variedade de produtos químicos fluorescentes que correlacionam a concentração do produto da PCR com a intensidade da fluorescência (HIGUCHI *et al.*, 1993). Esta é uma técnica útil para a amplificação *in vitro*, de sequências de DNA usando oligonucleotídeos iniciadores ou *primers* de sequência conhecida e complementares às extremidades do segmento a ser amplificado, direcionando a síntese de DNA-alvo, em ciclos repetidos (MULLIS, 1990). Para esta reação, utiliza-se da enzima Taq-DNA polimerase extraída da bactéria termoestável *Thermus aquaticus*, sendo realizada em um termociclador. Além da enzima Taq - DNA polimerase, os constituintes desta reação são o DNA molde, os iniciadores (*primers*), os desoxirribonucleotídeos trifosfatados (dATP, dTTP, dCTP, dGTP), cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) e um tampão.

A análise da expressão gênica tem adquirido importância em muitos campos de pesquisa biológica. O conhecimento acerca dos padrões de expressão de genes deve fornecer um melhor entendimento dos complexos sistemas regulatórios e irá, provavelmente, levar à identificação de genes relevantes para novos processos biológicos. Além disso, muitos eventos que ocorrem nas células dos folículos ovarianos, tais como sobrevivência,



crescimento e diferenciação são mediados a partir da alteração dos padrões de expressão gênica. Contudo, a possibilidade de se quantificar os níveis de transcrição de genes específicos é de fundamental importância para qualquer investigação das funções foliculares (ZAMORANO *et al.*, 1997).

### 2.8.2 Microscopia de fluorescência

A Microscopia de Fluorescência é uma técnica utilizada na análise de viabilidade folicular após o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais isolados do ambiente ovariano (BRUNO *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2010). Esta técnica utiliza marcadores fluorescentes, que quando excitados com radiação de baixo comprimento de onda, absorvem energia e emitem luz de comprimento de onda maior (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2005). É considerada uma técnica confiável, prática e rápida para analisar a viabilidade folicular (CORTVRINDT & SMITZ, 2001; LOPES *et al.*, 2009), tendo sido, portanto, empregada para avaliação da viabilidade de folículos pré-antrais após o cultivo *in vitro* em diversos trabalhos (BRUNO *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2010; MAGALHÃES *et al.*, 2010).

Para a análise de viabilidade de folículos pré-antrais ou oócitos por fluorescência, os marcadores comumente utilizados são o etídio homodímero-1 e calceína-AM, que permitem a detecção simultânea de células mortas (etídio homodímero-1) e vivas (calceína-AM). O etídio homodímero-1 marca ácidos nucleicos em células não viáveis, indicando a perda da integridade da membrana plasmática celular (LOPES *et al.*, 2009), enquanto a atividade enzimática (esterases) no citoplasma é detectada nas células foliculares através do composto calceína-AM (SCHOTANUS *et al.*, 1997; Van den HURK *et al.*, 1998), que é clivado por enzimas esterase em células vivas, resultando em um produto fluorescente (DE CLERCK *et al.*, 1994). As sondas fluorescentes calceína-AM e etídio homodímero-1 já haviam sido utilizadas com sucesso para avaliação da viabilidade de folículos bovinos em estágios iniciais (SCHOTANUS *et al.*, 1997; Van den HURK *et al.*, 1998). Além disso, esta técnica é empregada no intuito de avaliar a configuração da cromatina de oócitos oriundos de folículos pré-antrais, indicando assim o estágio meiótico alcançado após terem sido cultivados e maturados *in vitro* (SARAIVA *et al.*, 2010).

### 2.8.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é considerada uma boa técnica para avaliação das membranas celulares e das mudanças ultra-estruturais (SALEHNIA *et al.*, 2002) ocorridas durante o desenvolvimento e a atresia folicular, sendo, portanto, um método mais preciso e eficiente do que a histologia clássica para avaliar os folículos pré-antrais. Tal técnica é capaz de identificar alterações ocorridas durante o cultivo *in vitro* que não foram visíveis durante a análise morfológica, utilizando-se microscópio óptico. Isso porque o emprego da MET permite uma maior ampliação do material estudado e melhor visualização dos elementos celulares. Um microscópio eletrônico de transmissão pode chegar até um aumento de 180.000 vezes, com um limite de resolução de 0,45 nm, o que fornece ao pesquisador resultados cada vez mais precisos e relevantes.

Em 2006, Matos e colaboradores realizaram análises histológicas e ultraestruturais após o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos e após cinco dias de cultivo, evidenciou-se uma elevada percentagem de folículos histologicamente normais. No entanto, os estudos ultraestruturais não confirmaram a manutenção da integridade morfológica desses folículos. Já em outros estudos com o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, os resultados obtidos por histologia clássica puderam ser confirmados por MET (MATOS *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 2008; ROSSETTO *et al.*, 2009; LIMA-VERDE *et al.*, 2010).

### 3 JUSTIFICATIVA

O Brasil detém o segundo maior efetivo bovino do mundo, em torno de 190 milhões de animais, sendo que a produção de carne bovina representa cerca de 1,8% do PIB nacional. Nesse contexto, o desenvolvimento de biotécnicas da reprodução surge como importante alternativa para o aumento da eficiência produtiva e reprodutiva em bovinos. Dentre as biotécnicas utilizadas com esta finalidade destaca-se à coleta de oócitos a partir da punção folicular guiada por ultra-som (*ovum pick up* - OPU) associada a técnica de produção *in vitro* de embriões, as quais têm sido utilizadas como instrumento importante para diminuir o intervalo entre gerações e acelerar o melhoramento genético animal. Entretanto, estas biotécnicas exploram apenas a população de folículos antrais, que correspondem apenas a 10% da população folicular ovariana. Isto de fato, reduz o aproveitamento do potencial reprodutivo das fêmeas e deixa muito clara a necessidade de se elucidar os complexos mecanismos que regulam a foliculogênese em sua fase inicial, ou pré-antral.

Nesse sentido, a biotécnica de Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais (MOIFOPA) vem sendo empregada com o intuito de recuperar um grande número de oócitos inclusos nos folículos pré-antrais e posteriormente cultivá-los *in vitro* até sua completa maturação, e é considerada uma ferramenta importante para estudar a foliculogênese, testando e avaliando o efeito de diferentes substâncias (gonadotrofinas, fatores intra-ovarianos) no cultivo *in vitro*. Além disso, tal biotécnica é uma alternativa para o fornecimento de milhares de oócitos viáveis inclusos em folículos ovarianos pré-antrais, para as biotécnicas de fecundação *in vitro* (FIV) e clonagem (Telfer, 1996), contribuindo assim para a produção *in vitro* de embriões em larga escala. A utilização desta técnica já possibilitou o nascimento de crias saudáveis em roedores (O'BRIEN *et al.*, 2003) bem como embriões em ovinos (ARUNAKUMARI *et al.*, 2010), caprinos (SARAIVA *et al.*, 2010; MAGALHÃES *et al.*, 2011) e búfalas (GUPTA *et al.*, 2008), mas em bovinos os resultados são limitados apenas a formação de antro (ITOH *et al.*, 2002)

O principal fator que limita o rendimento desta técnica é a falta de conhecimento acerca dos mecanismos que controlam a foliculogênese inicial tanto *in vivo* como *in vitro*, o que dificulta o estabelecimento de meios de cultivo que suportem a foliculogênese inicial *in vitro*. Na busca pelo sistema ideal de cultivo de folículos pré-antrais, diversas substâncias e fatores intra-ovarianos já foram testados *in vitro*, sendo ainda avaliada a expressão de diversas substâncias e de seus respectivos receptores no ovário. Entretanto, ainda não foi relatada a ação do FSH e da ativina-A, isolados ou em associação, no desenvolvimento *in vitro* de

folículos pré-antrais bovinos (~0,2mm) em cultivo de longa duração (18 dias). Sabendo que o FSH é indispensável para o desenvolvimento de folículos antrais e seu papel sobre a foliculogênese inicial ainda não está bem elucidado (FORTUNE, 2003), é de grande importância a avaliação do efeito deste hormônio associado ou não com a ativina-A. A realização deste estudo poderá contribuir para uma melhor compreensão dos diversos componentes implicados na foliculogênese, tais como crescimento folicular e formação de antro, bem como no processo de atresia folicular em bovinos. Além disso, a avaliação dos níveis de RNA para FSH-R, PCNA, ActR- IB, ActR- IIB, bem como as isoenzimas HAS 1/2/3, podem contribuir para se entender como FSH e / ou ativina-A estimulam o desenvolvimento folicular na espécie bovina.

#### 4 HIPÓTESES

- 1) A adição de ativina-A e FSH ao meio de cultivo, influenciam positivamente o crescimento, mantém a viabilidade e a integridade ultraestrutural de folículos pré-antrais bovinos cultivados *in vitro*.
  
- 2) Ocorre um aumento dos níveis de RNA mensageiros para o receptor de FSH (FSH-R), receptores de ativina do tipo IB (ActR - IB) e IIB (ActR – IIB), bem como para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) durante o crescimento *in vitro* de folículos pré-antrais bovinos em meio contendo ativina-A e FSH.
  
- 3) A adição de ativina-A e FSH ao meio de cultivo promove um aumento da expressão de RNAs mensageiros para as isoenzimas HAS 1/2/3 e estimulam a formação de cavidade antral em folículos pré-antrais cultivados *in vitro*.

## **5 OBJETIVOS**

### **5.1 OBJETIVOS GERAIS**

- Avaliar a capacidade do FSH e da ativina-A de promover o crescimento, a formação de antro e manter a viabilidade de folículos pré-antrais bovinos cultivados *in vitro*.
- Investigar o efeito do FSH e da ativina-A sobre a expressão de RNA mensageiro para o receptor de FSH (FSH-R), receptores de ativina do tipo IB (ActR-IB) e IIB (ActR-IIB), para as isoenzimas HAS 1/2/3, bem como para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) após o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais.

### **5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar o efeito da interação da ativina-A e do FSH sobre o perfil de expressão do RNA mensageiro para FSH-R, PCNA, ActR-IB, ActR-IIB, bem como para as isoenzimas HAS 1/2/3 em folículo ovariano bovinos cultivado *in vitro* por 18 dias.
- Identificar os efeitos da ativina-A, do FSH ou da associação de ambos sobre a viabilidade, formação de antro e manutenção da ultraestrutura de folículos pré-antrais bovinos, durante 18 dias de cultivo *in vitro*;

**6 ARTIGO I**

*Effect of activin-A and follicle stimulating hormone (FSH) on in vitro development of bovine preantral follicles*

## RESUMO

O objetivo deste estudo foi o de avaliar o efeito do FSH sozinho ou em combinação com a ativina-A na sobrevivência, crescimento e expressão de RNAm para ActR-IB, ActR-IIB, FSH-R, PCNA e HAS1/2/3 em folículos secundários bovinos *cultivados in vitro* por 18 dias. Folículos pré-antrais (~0,2mm) foram isolados do córtex de ovários bovinos e cultivados individualmente na ausência ( $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>:controle) ou a presença de ativina-A sozinha na concentração de (100ng/mL); FSH sozinho em concentrações seriadas ao longo de todo o período de cultivo - 50ng/mL (do dia 0 ao dia 6), 100 ng/mL (do dia 7 ao dia 12), e 200ng/mL (do dia 13 ao dia 18) ou em associação com a ativina-A (100ng/mL). O desenvolvimento folicular foi avaliado com base na sobrevivência, formação de cavidade antral e diâmetro folicular. Folículos cultivados foram processados para avaliação ultra-estrutural. Após 6 dias de cultivo, em todos os tratamentos, houve aumento significativo no diâmetro folicular em comparação com  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>. Uma comparação entre os diferentes tratamentos após 12 dias de cultivo mostrou que o uso de ativina-A sozinha não promove aumento no diâmetro folicular, quando comparado com FSH sozinho e ativina-A em associação ao FSH ( $p > 0,05$ ). Após 18 dias de cultivo *in vitro*, folículos cultivados com FSH apresentaram aumento no diâmetro em comparação aos demais tratamentos ( $p < 0,05$ ). Por outro lado, quando combinado ativina-A e FSH foi observada a inibição do crescimento folicular promovido pelo FSH. A análise ultra-estrutural confirmou a integridade dos folículos cultivados em FSH após 18 dias de cultivo. Folículos cultivados na presença de ativina-A associada ao FSH, reduziram significativamente ( $p < 0,05$ ) os níveis de RNAm para ActR-IB, ActR-IIB, FSH-R e PCNA. Além disso, em folículos cultivados com FSH sozinho, os níveis de RNAm para HAS1 e HAS 2 foram significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) que em folículos cultivados com ativina-A em associação ao FSH. Ademais, o nível de expressão do RNAm para HAS-3 não diferiu ( $p > 0,05$ ) entre os tratamentos. Em conclusão, a ativina-A é importante para o desenvolvimento folicular inicial (até 6 dias), mas reduz o efeito estimulatório do FSH em folículos pré-antrais bovinos após 18 dias de cultivo *in vitro*. Nossos resultados apontam que o FSH é um fator chave para a sobrevivência e crescimento de folículos pré-antrais cultivados *in vitro* por um longo período (18 dias). Além disso, ativina-A em associação ao FSH reduz os níveis de RNAm para o receptor de ativina do tipo IB (ActR-IB), tipo II-B (ActR-IIB), FSH-R e PCNA, após 18 dias *in vitro*. Em adição, folículos cultivados com FSH sozinho, apresentaram níveis de expressão de RNAm para HAS-1



e HAS-2 maiores que em folículos cultivados em meio suplementado pela associação de ativina-A e FSH.

**Palavras-chave: ovário, bovino, folículo, cultivo, ativina-A, FSH.**

**Effect of activin-A and follicle stimulating hormone (FSH) on *in vitro* development of bovine preantral follicles**

Anderson Weiny B. Silva<sup>1</sup>, Francisco Taiã Gomes Bezerra<sup>1</sup>, José Jackson do Nascimento Costa<sup>1</sup>, Rodrigo Otávio Decaria de Sales Rossi<sup>1</sup>, Maria Juliane Passos<sup>1</sup>, Gisvani Lopes de Vasconcelos<sup>1</sup>, Rafael Rossetto<sup>2</sup>, Mariana A. M. Donato<sup>3</sup>, Deborah de Melo Magalhães Padilha<sup>2</sup>, Claudio Cabral Campello<sup>2</sup>, Márcia V. A. Saraiva<sup>1</sup>, José R. de Figueiredo<sup>2</sup>, Cristina A. Peixoto<sup>3</sup>, José R. V. Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Biotechnology Nucleus of Sobral - NUBIS, Federal University of Ceara, Sobral, CE, Brazil.

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

<sup>3</sup>Laboratory of Ultrastructure, CPqAM/FIOCRUZ, Federal University of Pernambuco, Recife-PE, Brazil.

Corresponding address (A.W.B. Silva): Biotechnology Nucleus of Sobral - NUBIS, Federal University of Ceara, Av. Comandante Maurocélío Rocha Ponte 100, CEP 62041-040, Sobral, CE, Brazil. Phone / Fax: +55 88 36118000 [andersonweiny@hotmail.com]

**Abstract**

The aim of this study was to evaluate the effect of FSH alone or in combination with activin-A on survival, growth and expression of mRNA for FSH-R, PCNA, ActR- IB, ActR- IIB and HAS1/2/3 in bovine secondary follicles cultured *in vitro* for 18 days. Preantral follicles (~0,2mm) were isolated from the cortex from bovine ovaries and individually cultured for 18 d in absence ( $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> : control) or presence of activin-A alone (100ng/mL); FSH alone in increased concentrations throughout the culture period - 50 ng/mL (from day 0 to day 6), 100 ng/mL (from day 7 to day 12) and 200 ng/mL (from day 13 to day 18) or in association with activin-A (100ng/mL). Follicle development was evaluated on the basis of survival, antral cavity formation, diameter follicle. Cultured follicles were processed for ultrastructural evaluation. After 6 days of culture, all treatments showed significant increase in follicular diameter compared to  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>. A comparison of the different treatments after 12 days of culture showed that the use of activin-A alone does not promote increase in follicular diameter when compared with FSH alone and activin-A in association with FSH (P>0.05). After 18 days, follicles cultured with FSH showed a significant increase in diameter compared

to the other treatments ( $P < 0.05$ ). On the other hand, when combined activin-A and FSH was observed inhibited the growth promoted by FSH. Ultrastructural analysis confirmed the integrity of follicles cultured in FSH after 18 days. Follicles cultured in the presence of activin-A in association with FSH significantly reduced ( $P < 0.05$ ) levels of mRNA for ActR-IB, ActR-IIB, FSH-R and PCNA. Moreover, in follicles cultured with FSH alone, levels of mRNA for HAS 1 and HAS 2 were significantly higher ( $P < 0.05$ ) than in follicles cultured with activin-A in association with FSH. In addition, the level of mRNA expression for HAS-3 did not differ ( $P > 0.05$ ) between treatments. In conclusion, activin-A is important for early follicular development (up to 6 days), but reduces the stimulatory effect of FSH on bovine preantral follicles after 18 days of culture *in vitro*. Our results also indicate that FSH is a key factor for survival and growth of bovine preantral follicles cultured *in vitro* for a long period (18 days). Moreover, activin-A in combination with FSH reduce the levels of mRNA for activin receptor type IB (ActR-IB), type II-B (ActR-IIB), FSH-R and PCNA after 18 days *in vitro*. In addition, follicles cultured with FSH alone levels of mRNA for HAS-1 and HAS-2 were higher than in follicles cultured in medium supplemented by the association of activin-A and FSH.

## Introduction

The gonadotropins are the primary regulators of ovarian follicular growth, but it has become increasingly apparent that locally produced factors are involved in modulating the response of the developing follicle to FSH. The ultimate fate of a follicle is dependent, therefore, on the interaction of a complex array of extra- and intraovarian signals. In order, to maximize the utilization of female gametes, several *in vitro* culture techniques for preantral follicles have been developed to evaluate the role of hormones and growth factors *in vitro*.

The growth factor known as Activin is dimeric glycoprotein, member of transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) superfamily, composed of two  $\beta$  subunits of inhibin A or B, and exist as homo- or heterodimers. The dimerisation of activin subunits gives rise to three forms of activin, which are classified as, activin-A ( $\beta A - \beta A$ ), activin-B ( $\beta B - \beta B$ ) and activin-AB ( $\beta A - \beta B$ ) (PANGAS & WOODRUFF, 2000). Activin receptors are structurally related membrane proteins and two main types, I (ActR- IA ; ActR- IB) and II (ActR- IIA; ActR- IIB) activin receptors have been identified which consist of an extracellular ligand-binding domain, a transmembrane domain, and an intracellular domain containing a serine/threonine kinase region (MATHEWS and VALE, 1993).

*In vitro*, activin-A promoted ovine preantral follicle and oocyte growth, but did not accelerate follicle differentiation over a six-day culture period (THOMAS *et al.*, 2003). In rats, activin-A in the presence of FSH, induced reorganization of follicular structures from monolayer culture of cells and caused cells from primary follicles to develop into large follicle-like structures. In addition, stimulated the growth of rat preantral follicles and promoted antrum formation after 6 days of culture (LI *et al.*, 1995) and plays an important role in early follicular development (ZHAO *et al.*, 2001). Activin-A stimulated granulosa cell proliferation after culture of the preantral follicles isolated from cryopreserved mouse ovaries (CHOI *et al.*, 2008). Recently, McLaughlin *et al.* (2010) showed that addition of activin on the *in vitro* culture maintained the morphology and integrity of oocytes retrieved from bovine isolated secondary follicles after 8 days. Activin has also stimulated antral cavity formation and proliferation of granulosa cells *in vitro* (ZHAO *et al.*, 2001). In addition, studies have confirmed that activin has ability of upregulating FSH receptors (R-FSH) (NAKAMURA *et al.*, 1993), and in turn, FSH and its receptor play an important role in follicular development and regulation of ovarian steroidogenesis, especially in antral stage (RICHARDS, 1980, HSUEH *et al.*, 1989). Although the development of preantral follicles is FSH independent, the expression of FSH-R in granulosa cells of primary, secondary and antral follicles was identified in cattle, reinforcing the idea of the action of FSH on the growth of preantral follicles (WANDJI *et al.*, 1992).

El-Hefnawy and Zeleznik (2001) demonstrated that activin interacts positively with FSH in granulosa cells by increasing levels of mRNA for the FSH receptor, as well as cyclin D2 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA), which play an important role in cell cycle progression. In cattle, Hulshof *et al.* (1997) found that the addition of activin in association with FSH in the culture medium increased follicular growth and proliferation of granulosa cells. In addition, activin-A also acts synergistically with GnRH and resulted in an increased transcriptional activity of the  $\beta$  subunit of FSH (GREGORY *et al.*, 2005). Despite advances, the exact cellular mechanisms that coordinate the actions of activin in gonadal cells, as well as the kinetics of expression of key factors in follicular development, are not yet fully elucidated. However, little is known about the *in vitro* effects of activin-A in combination or not with FSH on the development of isolated bovine secondary follicles after a long time of culture (18 days) and on the expression of FSH-R, ActR-IB, ActR-IIB, PCNA, HAS 1/2/3 after culture.

Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of FSH alone or in combination with activin-A on survival, growth and expression of mRNA for FSH-R, PCNA, ActR- IB, ActR- IIB and HAS1/2/3 in bovine secondary follicles cultured *in vitro* for 18 days.

## **Materials and Methods**

### ***Source of chemicals and ovaries***

Unless indicated otherwise, culture media and other chemicals used in this study were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Bovine ovaries (n=40) from locally abattoir-slaughtered cows (n=20) were collected. Immediately post-mortem, ovaries were washed in 70% alcohol, followed by two rinses in minimum essential medium (MEM) supplemented with 100µg/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. Ovaries were transported within 1 h to the laboratory in MEM at 4°C (CHAVES *et al.*, 2008). In the laboratory, under laminar flow conditions surrounding, fat tissue and ligaments were stripped from the ovaries.

### ***Isolation and selection of bovine preantral follicles***

In laboratory, ovarian cortical slices (1–2 mm in diameter) were cut from the ovarian surface using a surgical blade under sterile conditions. The ovarian cortex was subsequently placed in fragmentation medium, consisting of MEM supplemented with 100µg/mL penicillin and 100µg/mL streptomycin. Preantral follicles (~0,2 mm) were then visualized under a stereo-microscope (SMZ 645 Nikon, Tokyo, Japan) and manually microdissected, using 26 gauge (26G) needles, attached to 1mL syringes. After isolation, follicles were transferred to 100µL drops containing fresh medium to evaluate the follicular quality further. Follicles with a visible oocyte, surrounded by two or more layers of granulosa cells, an intact basement membrane and without antral cavity were selected for culture.

### ***In-vitro culture of bovine secondary follicles***

For *in vitro* studies, the normal selected follicles were randomized between treatments and individually cultured in 100µl drops of culture medium in Petri dishes (60×15 mm; Corning, USA) under mineral oil. Control culture medium, called  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>, consisted of

$\alpha$ -MEM (pH 7.2–7.4) supplemented with 3.0mg/mL bovine serum albumin (BSA), ITS (10 $\mu$ g/mL insulin, 5.5 $\mu$ g/mL transferrin, 5ng/mL selenium), 2mM glutamine, 2mM hypoxanthine and 50 $\mu$ g/mL ascorbic acid under mineral oil. Preantral follicles obtained from each animal were cultured in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> alone (control medium, n=58) or supplemented with activin-A (100ng/mL, n=60); sequential FSH (50ng/mL from day 0 to day 6, 100ng/mL from day 7 to day 12 and 200ng/mL from day 13 to day 18) (n=50) (Sigma, St. Louis, USA) or 100ng/ml of activin-A associated with sequential FSH (n=61). These concentrations of FSH and activin-A were those that promoted the highest growth rates *in-vitro* cultured pre-antral follicles in previous study (McLAUGHLIN *et al.*, 2010) Incubation was conducted at 39°C, 5% CO<sub>2</sub> in air for 18 days. Every other day, 60 $\mu$ L of the culture media were replaced with fresh medium, except at days 6 and 12, in which total medium (100 $\mu$ L) replenishment was performed because of the different treatments tested. Fresh medium was prepared and incubated for 1 h prior to use.

### ***Morphological evaluation of follicular development***

The ovarian follicles were classified as normal or degenerated, based on their morphological characteristics. The latter includes irregularities in the contour of the basal membrane, or the darkening of the oocyte and / or surrounding granulosa cells. On days 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 and 18, the normal follicles were measured using a software Motic Images Plus 2.0 ML. Two perpendicular measurements were performed. In addition, the percentages of secondary follicles that reached antrum formation *in vitro* were determined. Once a translucent cavity was visible between the granulosa cells, the antrum was considered to be formed.

### ***Levels of expression of mRNA for ActR-IB, ActR-IIB, FSH-R, PCN, and HAS 1/2/3 in bovine preantral follicles cultured in vitro.***

After 18 days of culture, follicles cultured in different treatments ( $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>: n= 29; activin-A: n=34; FSH: n= 32; activin-A+FSH: n= 29) were stored in microcentrifuge tubes at -80 °C, until RNA extraction. Four groups of ten *in vivo* grown follicles of ~0.2 mm (n= 40) and 0.3 mm (n=40) were isolated, stored at -80°C, and used as control.

Total RNA was extracted using the TRIzol<sup>®</sup> reagent (Invitrogen, São Paulo, Brazil). According to the manufacturer's instructions, 1 mL of Trizol solution was added to

each frozen samples and the lysate was aspirated through a 20-gauge needle before centrifugation at 10,000g for 3 min at room temperature. Thereafter, all lysates were diluted 1:1 with 70% ethanol and subjected to a mini-column. After binding of the RNA to the column, DNA digestion was performed using RNase-free DNase (340 Kunitz units/mL) for 15 min at room temperature. After washing the column three times, the RNA was eluted with 30µL RNase-free water. The RNA concentration was estimated by reading the absorbance at 260nm and was checked for purity at 280 nm in a spectrophotometer (Amersham, Biosciences Cambridge, England). Before the reverse transcription reaction, samples of RNA were incubated for 5 min at 70°C and then cooled in ice. The reverse transcription was performed in a total volume of 20µL composed of 10µL of sample RNA, 4µL reverse transcriptase buffer (Invitrogen, São Paulo, Brazil), 8 units RNasin, 150 units of reverse transcriptase Superscript III, 0.036 U random primers, 10 mM DTT and 0.5mM of each dNTP (Invitrogen, São Paulo, Brazil). The mixture was incubated at 42°C for 1h, subsequently at 80°C for 5 min, and finally stored at -20°C. The negative control was prepared under the same conditions, but without addition of reverse transcriptase.

Quantification of the mRNA for ActR-IB, ActR-IIB, FSH-R, PCNA, and HAS 1/2/3 was performed by using *SYBR Green*. Each reaction in real time (20µL) containing 10µL of SYBR Green Master Mix® (Applied Biosystems, Warrington, UK), 7.3µL of ultra pure water, 1µL of cDNA and 0.85 M of each *primer*. Real-time PCR was performed in a thermocycler (Mastercycler® ep Realplex, Eppendorf, Germany). The primers were designed to perform amplification of mRNA for FSH-R, PCNA, ActR-IB, ActR-IIB and HAS 1/2/3 are shown in Table 1. This table also shows Ubiquitin (UBQ) and Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), which were used as endogenous controls for normalization of gene expression. The thermal cycling profile for the first round of PCR was: initial denaturation and activation of the polymerase for 10 min at 95°C, followed by 50 cycles of 15 sec at 95°C, 30 sec at 58°C, and 30 sec at 60°C. The final extension was for 10 min at 72°C. All reactions were performed in a real time PCR Mastercycler® ep Realplex (Eppendorf, Germany). The delta-delta-CT method was used to transform CT values into normalized relative expression levels (LIVAK and SCHMITTGEN, 2001).

### ***Assessment of preantral follicle viability by fluorescence microscopy***

To confirm the results of the morphological analyses, the viability of follicles cultured in all treatments was further analyzed using a more accurate method of assessment based on fluorescent probes.

After culture, follicles (n=10/treatment) were incubated in 100  $\mu$ L droplets of MEM containing 4 $\mu$ M calcein-AM and 2 $\mu$ M ethidium homodimer-1 (Molecular Probes, Invitrogen, Karlsruhe, Germany) at 37°C for 15 min. Afterwards, the follicles were washed three times in MEM and examined under fluorescence microscope (Eclipse 80i; Nikon). The emitted fluorescent signals of calcein-AM and ethidium homodimer-1 were collected at 488nm. Oocytes and granulosa cells were considered to be viable if the cytoplasm was stained positively with calcein-AM (green) and if the chromatin was not labeled with ethidium homodimer-1 (red) (SCHOTANUS *et al.*, 1995; Van den HURK *et al.*, 1998).

### ***Ultrastructural features of bovine preantral follicles***

In order to better examine follicular morphology, transmission electron microscopy (TEM) was performed to analyze ultrastructure of bovine preantral follicles grown from *in vitro* treatments that provided the best results. Isolated follicles were fixed in Karnovsky solution (4% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in 0.1M sodium cacodylate buffer pH 7.2) for at least 4h at room temperature (approximately 25°C). After fixation, cultured follicles were embedded in drops of 4% low melting agarose, and kept in sodium cacodylate buffer. Specimens were post-fixed in 1% osmium tetroxide, 0.8% potassium ferricyanide and 5 mM calcium chloride in 0.1M sodium cacodylate buffer for 1 h at room temperature, washed in sodium cacodylate buffer and counterstained with 5% uranyl acetate. The samples were then dehydrated through a gradient of acetone solutions and thereafter embedded in epoxy resin (Epoxy-Embedding Kit, Fluka Chemika-BioChemika). Afterwards, semi-thin sections (2 $\mu$ m) were cut, stained with toluidine blue and analyzed by light microscopy at a 400 $\times$  magnification. Ultra-thin sections (70nm) were obtained from bovine preantral follicles classified as morphologically normal in semi-thin sections. Subsequently, ultra-thin sections were counterstained with uranyl acetate and lead citrate, and examined under a Morgani-FEI transmission electron microscope.



### *Statistical analysis*

In the analysis of discrete variables, i.e., number of morphologically normal follicles (follicular survival) and the formation of the antrum along the culture period, the data were grouped in "pools" for each treatment and analyzed by frequency spread by Chi-square, and the results are expressed in percentage. The results corresponding to follicular diameters were subjected to Shapiro-Wilk test and Bartlett for verification of normal distribution and homoscedasticity, respectively. Unconfirmed requirements to perform the analysis of variance, even after data transformation, the diameters were compared using the nonparametric Kruskal-Wallis test (SAS, 2002).

ANOVA using General Linear Model (GLM) procedure of SAS was used to test the effect of activin-A and FSH on the relative expression of FSH-R, PCNA, ActR-IB, ActR-IIB and HAS 1/2/3 on follicles submitted to culture for 18 days in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> alone or cultured with activin-A alone, FSH alone or in association with activin-A. If an effect of treatment were significant, data were further examined by Duncan test to locate differences among treatments. The results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) and differences were considered significant when  $P < 0.05$ .

### **Results**

#### *Effects of activin-A and FSH in follicular growth, antrum formation and survival*

After 6 days of culture, the follicles cultured in all treatments showed significant increase in follicular diameter compared to day 0. The follicles cultured in presence of FSH, activin-A or both had a significant increase in their diameter when compared to  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> that showed significant lower follicular diameter. After 12 days of culture, contrary to FSH or both FSH and activin-A, activin-A alone did not stimulate follicular growth. In addition, a positive interaction between FSH and activin-A was observed neither after 6 days nor after 12 days of culture (Table 2).

After 18 days, the follicles cultured in the presence of FSH showed the highest diameter when compared to the other treatments (Table 2). On the other hand, activin-A was similar to  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> ( $P > 0.05$ ), and when combined with FSH reduced the growth stimulated by FSH ( $P < 0.05$ ).

The antrum formation was observed in all the treatments after 18 days of culture. However, no significant difference among treatments was observed. The follicles cultured in

presence of both activin-A and FSH had a significant increase in the rate of antrum formation from day 12 (14.58% (7 / 48)) to day 18 of the culture (33.33% (16/48)).

At the end of the culture period, the percentage of surviving follicles ranged from 83.33% for follicles cultured in medium containing both activin-A and FSH to 100% for follicles cultured in the presence of FSH alone. Follicles cultured with FSH alone had a survival rate equivalent to activin-A ( $P>0.05$ ) and both were superior to follicles cultured in MEM alone or supplemented with both FSH and activin-A ( $P<0.05$ ) (Table 3). The viability of the follicles considered morphologically normal was confirmed by staining with calcein-AM after *in vitro* culture. In this analysis, it was evident that the oocytes and granulosa cells were positively stained green, indicating the follicular viability (Figure 1).

#### ***Ultrastructural analysis of bovine preantral follicles after 18 days of culture***

To better evaluate follicular integrity, we performed ultrastructural analysis of bovine ovarian follicles cultured for 18 days in  $\alpha$ -MEM and in follicles cultured with FSH. Regarding the ultrastructural features of the follicles evaluated in culture with  $\alpha$ -MEM, there was irregularity in zona pellucida (ZP) and oocyte membrane (Figure 02 - A). Furthermore, it can be observed the presence Golgi complex (G), nucleus (N), endoplasmic reticulum (Er) and mitochondria (M) with some swollenness, with no visible cristae. Detachment of surrounding granulosa cells was observed in follicles cultured in  $\alpha$ -MEM (Figura 02-B), but not in medium supplemented with FSH (Figure 2-D). After treatment with FSH, follicles had central oocyte, defined zona pellucida (Figure 2-C), and organized granulosa cells. These cells presented concentric circles of endoplasmic reticulum (Figure 2-D) and augmented number of mitochondriae with visible cristae and regular cromatin.

#### ***Expression of mRNA ActR-IB, ActR-IIB, FSH-R, PCNA and HAS 1/2/3 in cultured follicles***

Analysis of steady-state level of mRNA for activin receptor type I-B (ActR-IB) and type II-B (ActR-IIB) in follicles cultured in the presence of activin-A in association with FSH showed the expression profiles significantly reduced ( $P <0.05$ ) when compared to follicles cultured in  $\alpha$ -MEM (Figure 3A and 3B). Furthermore, it was observed that the same treatment (ATV-A+FSH) levels of mRNA for FSH-R and PCNA were also reduced (Figure 3C and 3D) when compared to follicles cultured in medium supplemented with activin-A

alone. Concerning the isoenzymes involved in the antrum formation, it was found that the follicles cultured in FSH alone, levels of mRNA for HAS-1 and HAS-2 were significantly higher ( $P < 0.05$ ) than follicles cultured in medium supplemented by the activin-A in association with FSH (Figure 3E and 3F). Moreover, the level of mRNA expression for HAS-3 did not differ ( $P > 0.05$ ) between treatments (Figure 3G).

## Discussion

This study shows for the first time that activin-A in association with FSH did not stimulate follicles growth after 12 days of culture or inhibits the positive effect of FSH after 18 days. The negative effect of this interaction can be explained by a reduction of the levels for HAS-1 and HAS-2. However, activin-A stimulates growth of bovine preantral follicles after six day of culture, but not for longer culture periods. Furthermore, this study demonstrated the importance of the addition of FSH for development, survival and antrum formation of bovine secondary follicles cultured *in vitro* for a long period.

Activin-A stimulated follicular growth during the first six days of culture, but not for longer period, which indicates that activin-A is important for initial phases of secondary follicles development, for stimulated granulosa cell proliferation *in vitro* (CHOI *et al.*, 2008). In this same species, previous studies have identified that activin-A promotes growth and differentiation of preantral follicles after a short period (8 days) of the culture (McLAUGHLIN *et al.*, 2010). On the other hand, the addition of FSH increased follicles growth during culture. The positive effect of FSH can be associated to stimulation of expression of Hyaluronan Sintase-2 (HAS 2), wich is an enzyme responsible for synthesis of hyaluran, a osmotically active molecules able to generate an osmotic gradient that draws in follicular fluid (RODGERS *et al.*, 2010). Thus, it would appear that synthesis of osmotically active molecules can be regulated by endocrine and autocrine mechanisms, and this might lead to regulation of formation of follicular fluid.

Additionally, activin-A in association with FSH inhibited the expression of activin and FSH receptors, proteins involved in antrum formation and PCNA, involved in cell proliferation, which can explain the low rate of follicular growth in this treatment. Study by Mizunuma *et al.* (1999) showed that preantral follicles *in vitro* cultured had a significant increase in size and estrogen and inhibin secretion in response to FSH, but administration of activin-A blocked the effect of FSH. Withdrawal of activin-A not only restored the follicular response to FSH but also enhanced the effect of FSH, indicating that the action of activin-A is

to cause small preantral follicles to become dormant at the preantral stage. In addition, Woodruff *et al.* (1990) have demonstrated that activin-A have an atretogenic action on follicular development.

In this study, follicles cultured in medium containing FSH alone or associated with activin-A, showed a significant reduction of mRNA for FSH-R when compared with activin alone. Studies in goats showed that after 6 and 12 days of culture the addition of increasing concentrations of FSH to the medium (properly established) maintains the level of expression of its own receptor (FSH-R) similar to the control medium (CELESTINO *et al.*, 2011; SARAIVA *et al.*, 2010). This ensures the bioavailability of the receptor and ensures the action of the hormone in the follicles. Probably, concentration of FSH used in this study are high, caused down-regulation of its receptors.

Regarding the formation of the antrum, none of the treatments stood out compared to MEM. In goats, secondary follicles acquire antrum spontaneously during culture of secondary follicles (SARAIVA *et al.*, 2010, SILVA *et al.*, 2011) in culture medium similar to that used in this experiment. However, the addition of FSH increases the percentage of antral formation compared to control (SARAIVA *et al.*, 2010). In cattle, culture of short duration (8 days), the addition of activin-A alone or associated with FSH increased the percentage of formation of the antrum in the control group (McLAUGHLING *et al.*, 2010). Differences between these results and those obtained in this study may be associated with the distinction between the basic medium used (McCoy (McLAUGHLING *et al.*, 2010) versus  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>), concentrations of the supplements tested, and especially the manner of addition of FSH, since in present study that this hormone was added in increasing concentrations throughout the culture.

In this study, in all the treatments, after 18 days, an extremely high percentage of healthy follicles (> 91%) was observed during the morphological analysis under light microscopy. Follicular survival was confirmed by fluorescence microscopy at the end of the culture period (day 18). This technique has been successfully described for assessing the viability of pre-antral follicles in cows (SCHOTANUS *et al.* 1997; Van den HURK *et al.* 1998) and goats (SANTOS *et al.* 2006, 2007; SILVA *et al.* 2010).

The morphological and fluorescence analysis highlighted the important role of FSH as a survival factor, since all follicles had grown in this treatment are morphologically intact. On the other hand, electron microscopy revealed that, although the follicles cultured in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> have been presented viable after detection of esterase activity by fluorescence

microscopy, ultrastructural damage compromised the viability of these follicles. Furthermore, electron microscopy analysis of the follicles cultured in FSH first showed that this hormone ensures the integrity ultrastructural, preserved important structures, such as mitochondria, endoplasmic reticulum, and granulosa cells of bovine follicles grown for a long period (18 days). This observation suggests that the addition of increasing concentrations of FSH is efficient in maintaining the bovine preantral follicle ultrastructure, in the absence of FSH, *i.e.*  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> in the treatment, did not ensure preantral follicle integrity. In fact, FSH is considered a major factor in follicular survival, because as well as playing a direct action by stimulating the inhibitor of apoptosis proteins (MAKSTROM *et al.*, 2002), may act indirectly by stimulating the action of factors such as KL, BMP -15 and GDF-9 (JOYCE *et al.*, 1999, THOMAS *et al.*, 2005), known to act on the follicular survival (CELESTINO *et al.*, 2010. CELESTINO *et al.*, 2011, MARTINS *et al.*, 2010)

In conclusion, activin-A is important for early follicular development (up to 6 days), but reduces the stimulatory effect of FSH on bovine preantral follicles after 18 days of culture *in vitro*. Our results also indicate that FSH is a key factor for survival and growth of bovine preantral follicles cultured *in vitro* for a long period (18 days). Moreover, activin-A in combination with FSH reduce the levels of mRNA for activin receptor type IB (ActR-IB), type II-B (ActR-II-B), FSH-R and PCNA after 18 days *in vitro*. In order, reduced levels of PCNA expression suggest that the interaction between activin-A and FSH inhibits cell proliferation. In addition, follicles cultured in medium supplemented with FSH alone levels of mRNA for HAS-1 and HAS-2 were higher than in follicles cultured in medium supplemented by the association of activin-A and FSH.

Table 1: Primer pairs used in real-time PCR for quantification of proteins of follicular fluid in cultured bovine follicles

Target gene	Primer sequence (5' → 3')	Sense (s), anti-sense (As)	Position	GenBank accession no.
<b>GAPDH</b>	TGTTTGTGATGGGCGTGAACCA ATGGCGTGGACAGTGGTCATAA	S As	288-309 419-440	GI: 27525390
<b>UBQ</b>	GAAGATGGCCGCACTCTTCTGAT ATCCTGGATCTTGGCCTTCACGTT	S As	607-631 756-780	GI: 57163956
<b>PCNA</b>	TGCCGAGATCTCAGTCACAT TATGGCAACAGCTTCCTCCT	S As	566-586 695-715	GI:77735938
<b>HAS 1</b>	TACTGGGTGGCCTTCAATGT AACTGCTGCAGGAGGTTGTT	S As	1636-1656 1722-1742	GI:297485936
<b>HAS 2</b>	ACTCCTGGGTGGTGTGATTT TTCTTCCGCTGCCACATTT	S As	2005-2025 2149-2169	GI:31342885
<b>HAS 3</b>	TTCTTCGTGTGGCGCAGCAA ATGATGCACGAGAAGGTGCT	S As	1030-1050 1128-1148	GI:300797592
<b>ActR- IB</b>	ACAGGAAATTATTGGCAAGGGCCG TCTCATGGCGAAGCATGACTGTCT	S As	540 - 564 691-715	GI: 194667070
<b>ActR- IIB</b>	AGAAAGGCGTCTCTCTGGAAGTTG TGCCACAGGGACTTTAAGAGCAA	S As	580-604 705- 729	GI: 31341841
<b>FSH-R</b>	AGGCAAATGTGTTCTCCAACCTGC TGGAAGGCATCAGGGTTCGATGTAT	S As	250-274 316-340	GI: 95768228

Table 2. Follicular diameter (mean  $\pm$  S.E.M.) of preantral bovine follicles with normal morphology after 18 days of *in vitro* culture in the following treatments:  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>,  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> + activin-A,  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> + FSH, and  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> + FSH + activin-A.

	$\alpha$ -MEM <sup>+</sup>	activin-A	FSH	activin-A+ FSH
D0	183.86 $\pm$ 36.87 Ac	199.01 $\pm$ 35.99 Ab	188.84 $\pm$ 36.80 Ad	201.52 $\pm$ 46.78 Ac
D6	210.04 $\pm$ 47.78 Bb	231.64 $\pm$ 38.56 Aa	245.11 $\pm$ 55.16 Ac	255.46 $\pm$ 62.03 Ab
D12	226.56 $\pm$ 47.67 Bab	238.48 $\pm$ 56.12 Ba	297.48 $\pm$ 91.40 Ab	282.18 $\pm$ 84.33 Aab
D18	241.17 $\pm$ 52.10 Ca	251.81 $\pm$ 80.00 Ca	349.61 $\pm$ 108.70 Aa	302.65 $\pm$ 95.91 Ba

Distinct uppercase letters (A / B / C) represent significant differences between columns (treatments). Distinct lowercase letters (a / b / c) represent significant differences between lines (time of culture), P <0.05.

Table 3. Survival of bovine isolated preantral follicles cultured *in vitro* for 18 days in  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>,  $\alpha$ -MEM<sup>+</sup> supplemented with activin-A, FSH or both.

	$\alpha$ -MEM <sup>+</sup>	activin-A	FSH	activin-A+FSH
D0	100.00% (45/45) Aa	100.00% (48/48) Aa	100.00% (44/44) Aa	100.00% (48/48) Aa
D6	100.00% (45/45) Aa	100.00% (48/48) Aa	100.00% (44/44) Aa	100.00% (48/48) Aa
D12	97.78% (44/45) ABab	100.00% (48/48) Aa	100.00% (44/44) Aa	91.67% (44/48) Bb
D18	88.89% (40/45) BCb	97.92% (47/48) Aa	100.00% (44/44) Aa	83.33% (40/48) Cb

Distinct uppercase letters (A / B / C) represent significant differences between columns (treatments). Distinct lowercase letters (a / b / c) represent significant differences between lines (time of culture), P <0.05.

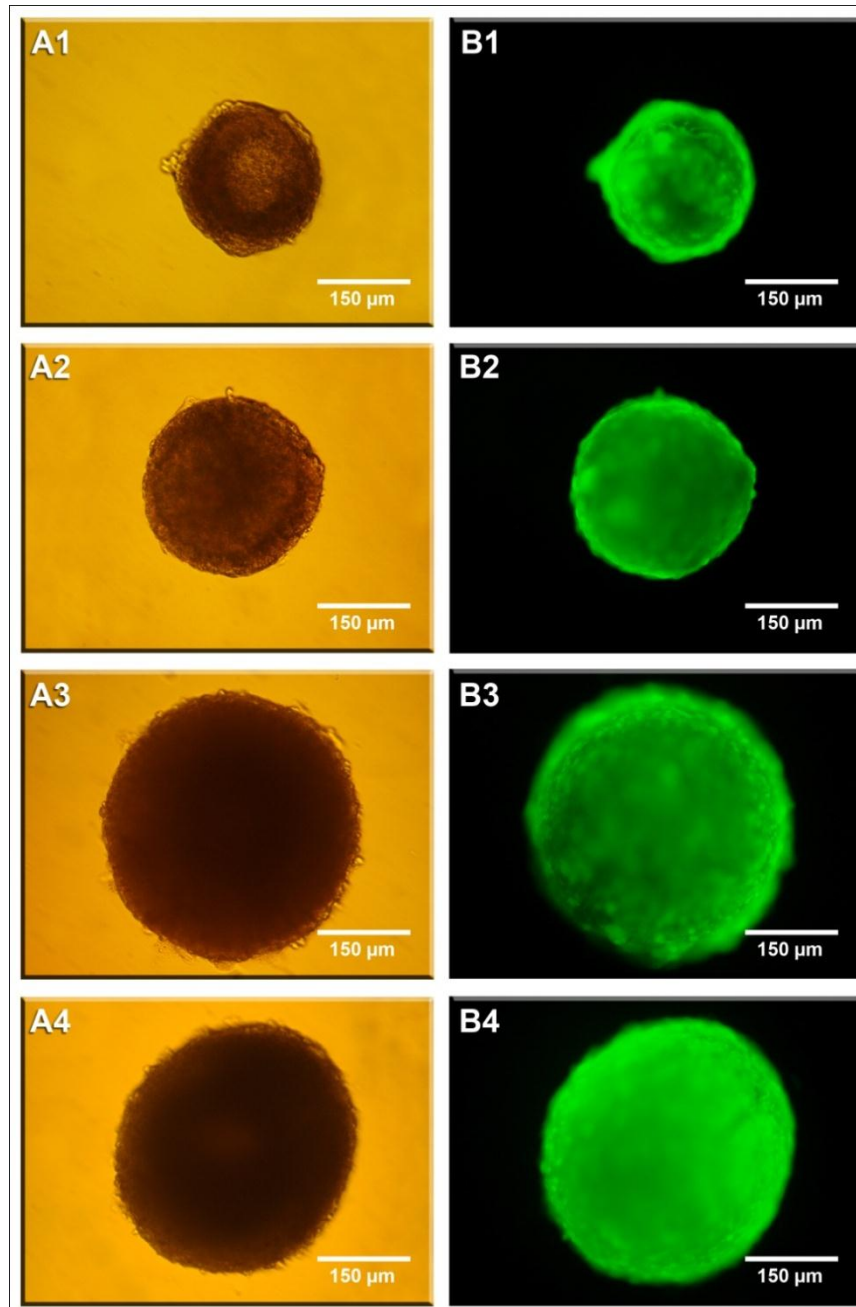


Figure 1: Viability assessment of bovine ovarian follicles after 18 days of *in vitro* cultured. A1 ( $\alpha$ -MEM<sup>+</sup>), A2 (activin-A), A3 (FSH) e A4 (activin-A+FSH) - visualization of the normal morphology of the follicles by light microscopy; B1 ( $\alpha$  -MEM<sup>+</sup>), B2 (activin-A), B3 (FSH) e B4 (activin-A+FSH) characterization of viable follicles marked with calcein-AM (green fluorescence).



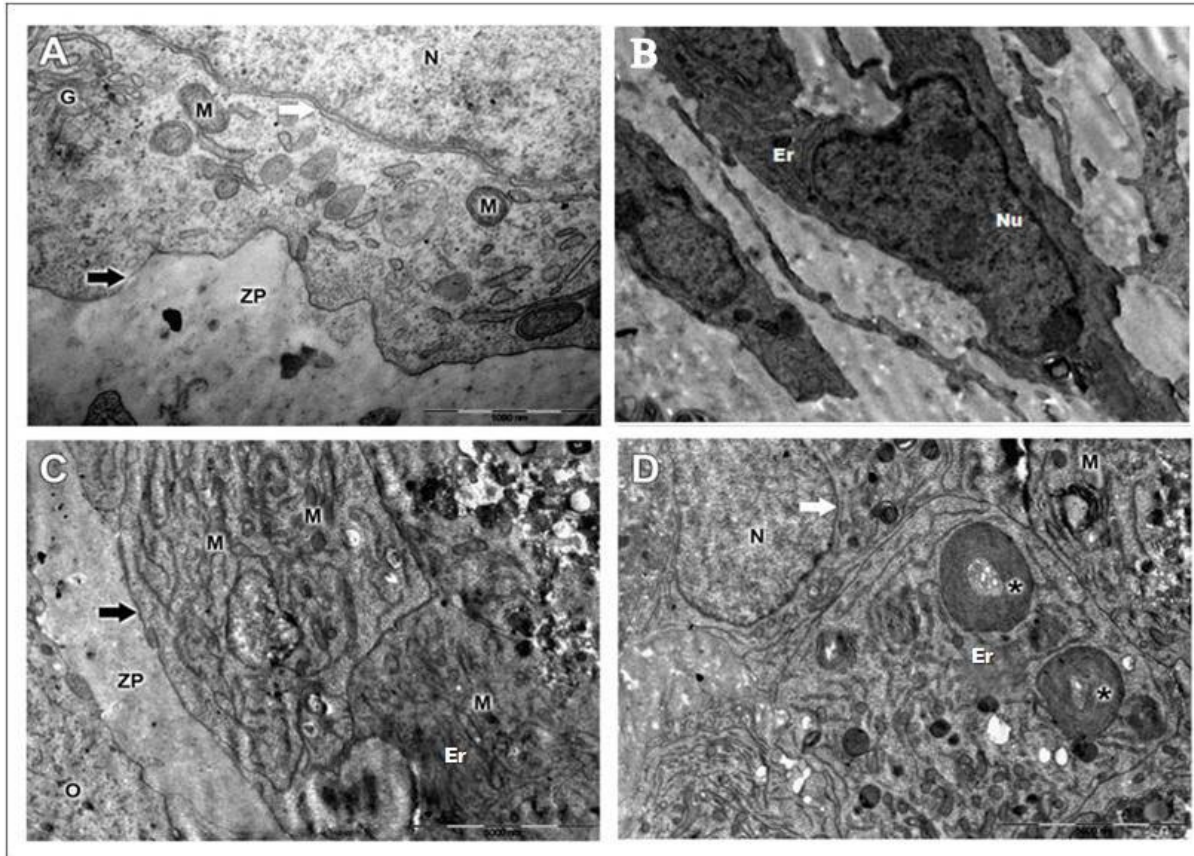


Figure 2- MET photomicrographs of bovine ovarian follicles cultured for 18 days in  $\alpha$ -MEM (A, B) and in the presence of FSH (C, D). G: Golgi apparatus, M: mitochondria, N: nucleus; Nu: nucleolus; O: oocyte, ZP: zona pellucida; Er: endoplasmic reticulum; \*: Concentric circles of endoplasmic reticulum; black arrows: changes in cell membrane, white arrows: changes in the nuclear membrane. Bars: Photos (A) and (B) 10000nm / Photos (C) e (D) 5000nm.

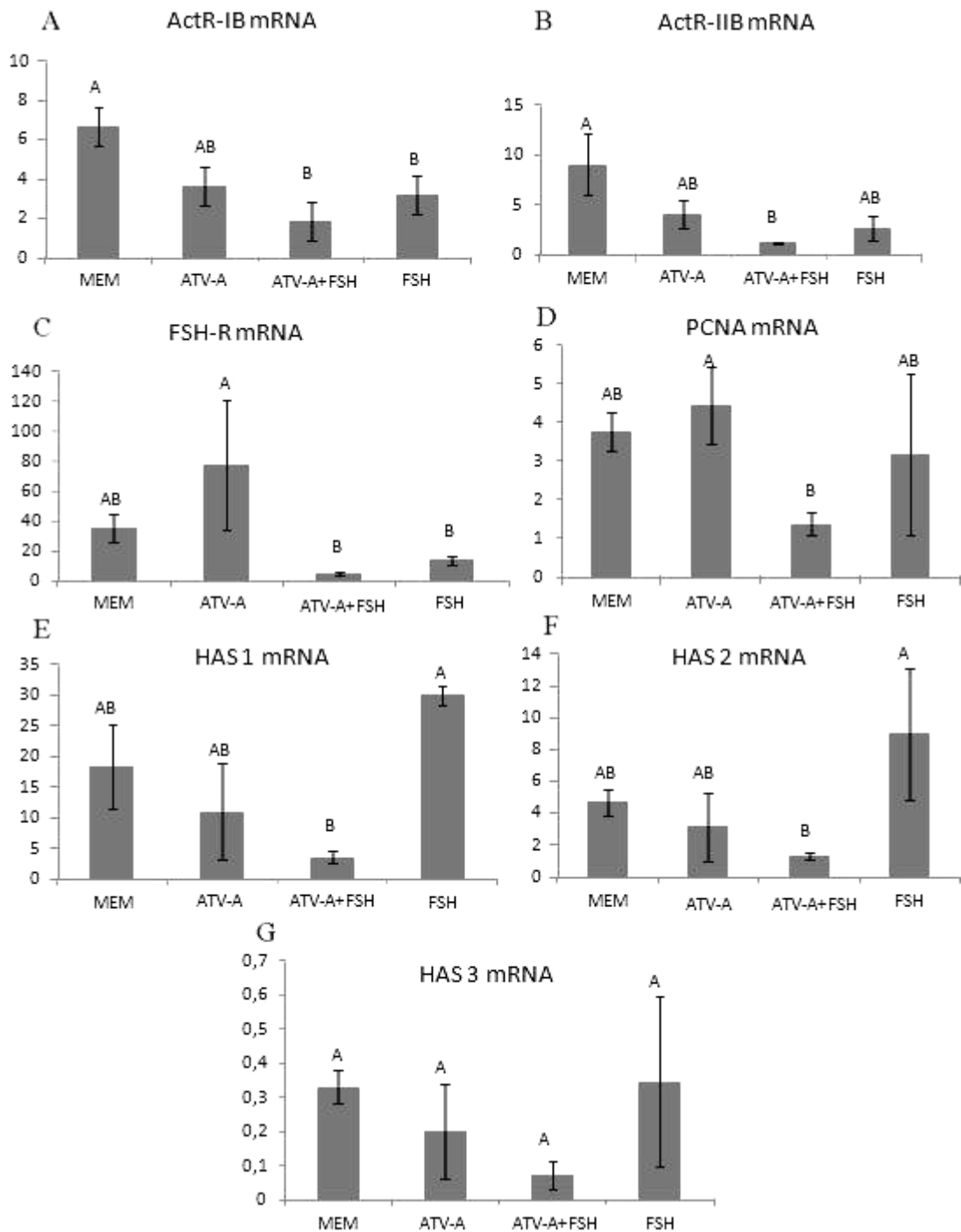


Figure 3. Relative profile expression of mRNA in bovine ovarian follicles after 18 days of culture (means  $\pm$  SD) A) ActR-IB; B) ActR-IIB; C) FSH-R; D) PCNA; E) HAS 1; F) HAS 2; G) HAS 3. Distinct uppercase letters (A/B) represent significant differences between treatments ( $P < 0.05$ ).

## Acknowledgments

This research was supported by grants from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil, grant number 477025/2009-9). Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and the Brazilian Innovation Agency (FINEP). Anderson Weiny Barbalho Silva is a recipient of a grant from CAPES.

## Author contributions

In this study, the co-authors Bezerra F.T.G, Costa J.J.N, Rossi R.O.D.S, Rossetto R, Donato M.A.M and Peixoto C.A. contributed to the designed study and drafted paper. Campello CC and Magalhães Padilha D.M contributed to the analysed data. Finally, Silva JRV, Figueiredo JR and Saraiva M.V.A.contributed to the drafted paper.

## Conflict of interest

There was no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

## References

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.

CELESTINO, J. J. H.; BRUNO, J. B.; SARAIVA, M. V. A.; ROCHA, R. M. P.; BRITO, I. R.; DUARTE, A. B. G.; ARAÚJO, V. R.; SILVA, C. M. G.; MATOS, M. H. T.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Steady-state level of epidermal growth factor (EGF) mRNA and effect of EGF on in vitro culture of caprine preantral follicles. **Cell and Tissue Research**, v. 344, p. 539–550, 2011.

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.

CHOI, J.; LEE, B.; LEE, E.; YOON, B.K.; CHOI, D. Effect of activin A and insulin-like growth factor-I on in vitro development of preantral follicles isolated from cryopreserved ovarian tissues in the mouse. **Cryobiology**, v. 57, n. 3, p.209-15, 2008.

EL-HEFNAWY, T.; ZELEZNIK, A. J. Antigen (PCNA) and Cyclin D2 expression in rat granulosa cells synergism between FSH and activin in the regulation of proliferating cell nuclear. **Endocrinology**, v. 142, n. 10, p. 4357-4362, 2001.

GONZALEZ MANCHON, C.; VALE, W. Activin-A, inhibin and transforming growth factor- $\beta$  modulate growth of two gonadal cell lines. **Endocrinology**, v. 125, p. 1666-1672, 1989.

GREGORY, S.J.; LACZA, C.T.; DETZ, A.A.; XU, S.; PETRILLO, L.A.; KAISER, U.B. Synergy between activin A and gonadotropin-releasing hormone in transcriptional activation of the rat follicle-stimulating hormone-beta gene. **Molecular Endocrinology**, v. 19, n. 1, p. 237-54, 2004.

GUTIERREZ, C. G.; CAMPBELL, B. K.; WEBB, R. Development of a long term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 608-616, 1990.

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.

HSUEH, A. J. W.; BICSAK, T. A.; JIA, X. C.; DAHL, K. D.; FAUSER, B. C.; GALWAY, A. B.; CZEKALA, N.; PAVLOU, S. N.; PAPKOFF, H.; KEENE, J. Granulosa cells as hormone targets: the role of biologically active follicle stimulating hormone in reproduction. **Recent Progress in Hormone Research**, v.5, p.209-277, 1989.

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

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.

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

LIVAK, K. J., and SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $^{-2\Delta\Delta CT}$  method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

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

MARTINS, F. S.; CELESTINO, J. J.; 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.

MATHEWS, L. S.; VALE, W. W. Characterization of type II activin receptors. Binding, processing, and phosphorylation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 19013–19018, 1993.

McLAUGHLIN, M.; BROMFIELD, J. J.; ALBERTINI, D. F.; TELFER, E. E. Activin promotes follicular integrity and oogenesis in cultured preantral bovine follicles. **Molecular Human Reproduction**, v. 16, n. 9, p. 644-653, 2010.

MIZUNUMA, H.; LIU, X.; ANDOH, K.; ABE, Y.; KOBAYASHI, J.; YAMADA, K.; YOKOTA, H.; IBUKI, Y.; HASEGAWA, Y. Activin from secondary follicles causes small preantral follicles to remain dormant at the resting stage. **Endocrinology**, v. 140, n. 1, p. 37-42, Jan. 1999.

NAKAMURA, M.; MINEGISHI, T.; HASEGAWA, Y.; NAKAMURA, K.; IGARASHI, S.; ITO, I.; SHINOZAKI, H.; MIYAMOTO, K.; ETO, Y.; IBUKI, Y. Effect of an activin A on follicle-stimulating hormone (FSH) receptor messenger ribonucleic acid levels and FSH receptor expressions in cultured rat granulosa cells. **Endocrinology**, v. 133, p. 538–544, 1993.

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

PANGAS, S.A.; WOODRUFF, T.K. Activin signal transduction pathways. **Trends in endocrinology and Metabolism**, v. 11, n. 8, p. 1043-2760, 2000.

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

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

SANTOS, R. R.; THARASANIT, T.; VAN HAEFTEN, T.; FIGUEIREDO, J. R.; SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R. Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. **Cell and Tissue Research**, v. 327, p. 167–176, 2007.

SANTOS, R. R.; THARASANIT, T.; FIGUEIREDO, J. R.; VAN HAEFTEN, T.; VAN DEN HURK, R. Preservation of caprine preantral follicle viability after cryopreservation in sucrose and ethylene glycol. **Cell and Tissue Research**, v. 325, p. 523–531, 2006.

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, 2010.

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 Sciences**, v. 17, p. 1135-1143, 2010.

SAS. Institute Inc. Statistical Analysis System user's guide. Version 9.13 ed. Cary: SAS Institute, USA, 2002.

SCHOTANUS, K.; HAGE, W.J.; VANDERSTICHELE, H.; VAN DEN HURK, R. Effects of conditioned media from murine granulosa cell lines on the growth of isolated bovine preantral follicles. **Theriogenology**, v. 48, p. 471-483, 1997.

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

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

THOMAS, F. H.; ARMSTRONG, D. G.; TELFER, E. E. Activin promotes oocyte development in ovine preantral follicles *in vitro*. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 76, 2003.

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 DEN HURK, R.; SPEK, E. R.; HAGE, W. J.; FAIR, T., RALPH, J. H.; SCHOTANUS, K. Ultrastructure and viability of isolated bovine preantral follicles. **Human Reproduction**, v. 4, p. 833-841, 1998.

WOODRUFF, T. K.; LYON, R. J.; HANSEN, S. E.; RICE, G. C.; MATHER, J. P. Inhibin and activin locally regulate rat ovarian folliculogenesis. **Endocrinology**, v. 127, p. 3196–3205, 1990.

XIAO, S.; FINDLAY, J.K.; ROBERTSON, D.M. The effect of bovine activin and follicle-stimulating hormone (FSH) suppressing protein/follistatin on FSH-induced differentiation of rat granulosa cells *in vitro*. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 69, p. 1 – 8, 1990.

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

ZHAO, J.; TAVERNE, M. A.; VAN DER WEIJDEN, G. C.; BEVERS, M. M.; VAN DEN HURK, R. Effect of activin A on *in vitro* development of rat preantral follicles and localization of activin A and activin receptor II. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 967–977, 2001.

## 7. CONCLUSÕES GERAIS

- A adição de Ativina-A e/ou FSH ao meio de cultivo promove o crescimento folicular após seis dias *in vitro*. No entanto, após doze dias a Ativina-A sozinha não estimula o crescimento folicular.
- Após dezoito dias de cultivo, o FSH sozinho aumenta o diâmetro folicular e mantém a integridade ultraestrutural dos folículos cultivados *in vitro*, mas a presença de Ativina-A reduz o crescimento folicular estimulado pelo FSH.
- O meio suplementado com Ativina-A e/ou FSH promove taxas significativas de formação de antro.
- Ativina-A em associação ao FSH reduzem os níveis de expressão do RNAm para os receptores de ativina do tipo I-B (ActR-IB), do tipo II-B (ActR-IIB), FSH-R e PCNA após dezoito dias de cultivo *in vitro*.
- Nos folículos cultivados em meio suplementado com FSH sozinho os níveis de RNAm para HAS-1 e HAS-2 foram maiores do que nos folículos cultivados em meio suplementado pela associação de Ativina-A e FSH.

## 8. PERSPECTIVAS

As informações obtidas neste trabalho poderão ser utilizadas para aperfeiçoar a elaboração de meios de cultivo dinâmicos capazes de propiciar ótimas condições para um completo crescimento folicular durante a fase pré-antral, preservando a viabilidade destas células em um longo período de cultivo. Em experimentos futuros, pode ser testada a adição de outros hormônios e fatores de crescimento, em diferentes fases do cultivo *in vitro* ou do desenvolvimento folicular. Nesse sentido o meio de cultivo dinâmico desenvolvido no presente estudo poderá ser utilizado como modelo com o intuito de se avaliar a ação do FSH com várias outras substâncias envolvidas na regulação da foliculogênese *in vitro*. A compreensão dos eventos fisiológicos relacionados a foliculogênese, regulados pelo FSH, é de grande importância para o melhoramento das condições de cultivo de folículos ovarianos imaturos, tais como os folículos secundários (~0,2mm) que podem ser isolados do microambiente ovariano e posteriormente cultivados e maturados *in vitro*. O estudo dessas interações abre ainda inúmeras possibilidades já que envolve também a investigação da influência do FSH sobre a expressão de várias substâncias e seus receptores e sobre vias de sinalização que estão envolvidas no controle do desenvolvimento folicular.

## REFERÊNCIAS

- ABIR, R.; FISCH, B.; NAHUN, R.; ORVIETO, E.; NITKE, S.; OKON, E.; BEN-RAFAEL, Z. Turner's syndrome and fertility: Current status and possible future prospects. **Human Reproduction**, v. 7, p. 603-610, 2001.
- ABIR, R.; ROIZMAN, P.; FISCH, B. et al. Pilot study of isolated early human follicles cultured in collagen gels for 24 hours. **Human Reproduction**, v. 14, p. 1299–1301, 1999.
- ACKERT, C. L.; GITTENS, J.E.; O'BRIEN, M.J.; EPPIG, J.J.; KIDDER, G. M. Intercellular communication via connexin 43 gap junctions is required for ovarian folliculogenesis in the mouse. **Developmental Biology**, v. 233, p. 258–70, 2001.
- ADASHI, E. Y. Endocrinology of the ovary. **Human Reproduction**, v. 9, p. 815-827, 1994.
- ADASHI, E.Y. Endocrinology of the ovary. **Human Reproduction**, v. 9, p. 815-827, 1994.
- ALAK, B. M.; COSKUN, S.; FRIEDMAN, C. I.; KENNARD, E. A.; KIM, M. H.; SEIFER, D. B. Activin A stimulates meiotic maturation of human oocytes and modulates granulosa cell steroidogenesis *in vitro*. **Fertility and Sterility**, v. 70, p. 1126–1130, 1998.
- ALAK, B. M.; SMITH, G. D.; WOODRUFF, T. K.; STOUFFER, R. L.; WOLF, D. P. Enhancement of primate oocyte maturation and fertilization *in vitro* by inhibin A and activin A. **Fertility and Sterility**, v. 66, p. 646–653, 1996.
- AMSTERDAM, A.; SASSON, R.; KEREN-TAL, I.; AHARONI, D.; DANTES, A.; RIMON, E.; LAND, A.; COHEN, T.; DOR, Y.; HIRSH, L. Alternative pathways of ovarian apoptosis: death for life. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 1355-1362, 2003.
- ANDJI, S.A.; SRŠEÒ, V.; VOSS, A.K.; EPPIG, J.J.; FORTUNE, J.E. Initiation *in vitro* of growth of bovine primordial follicles. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 942-948, 1996.
- 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. **Human 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.
- BASSO, A. C.; GARCIA, J. M.; ESPER, C. R. Efeitos de diferentes sistemas de cultivo *in vitro* sobre o crescimento de folículos pré-antrais isolados de ovários de fetos bovinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, v. 44, p. 134-143, 2007.
- BECKERS, J.F. *et al.* The ovarian follicle in cow: *in vivo* growth and *in vitro* culture. **Reproduction in Domestic Animals**, v.31, p.543-548, 1996.



- BERNARD, D. J.; CHAPMAN, S. C.; WOODRUFF, T. K. An emerging role for coreceptors in inhibin signal transduction. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 180, p. 55–62, 2001.
- BETTERIDGE, K. J.; SMITH, C.; STUBBINGS, R. B.; XU, K. P.; KING, W. A. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 38, p. 87-98, 1989.
- BOLAND, N. I.; HUMPHERSON, P. G.; LEESE, H. J.; GOSDEN, R. G. Pattern of lactate production and steroidogenesis during growth and maturation of mouse ovarian follicles in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 48, p. 798-806, 1993.
- 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.
- BROEKMANS, F. J.; KNAUFF, E. A.; TE VELDE, E. R.; MACKLON, N. S.; FAUSER, B. C. Female reproductive ageing: current knowledge and future trends. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 18, p. 58-65, 2007.
- 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.
- CAHILL, L.P.; MARIANA, J.C.; MAULÉON. Total Follicular Populations in Ewes of High and Low Ovulation Rates. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 55, p. 27-36, 1979.
- CALDER, M.D.; CAVENEY, A.N.; SMITH, L.C.; WATSON, A.J. Responsiveness of bovine *cumulus*oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and Cx43 marker gene mRNAs during maturation in vitro. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.14, p.1-12, 2003.
- CECCONI, S.; BARBONI, B.; COCCIA, M.; MATTIOLI, M. In vitro development of sheep preantral follicles. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 594-601, 1999.
- CECCONI, S.; BARBONI, B.; COCCIA, M.; MATTIOLI, M. In vitro development of sheep preantral follicles. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 594-601, 1999.
- CECCONI, S.; CICCARELLI, C.; BARBERI, M.; MACCHIARELLI, G.; CANIPARI, R. Granulosa cell-oocyte interactions. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v.115, p. 19-22, 2004b.
- 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.

CELESTINO, J. J. H.; BRUNO, J. B.; SARAIVA, M. V. A.; ROCHA, R. M. P.; BRITO, I. R.; DUARTE, A. B. G.; ARAÚJO, V. R.; SILVA, C. M. G.; MATOS, M. H. T.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R. V.; FIGUEIREDO, J. R. Steady-state level of epidermal growth factor (EGF) mRNA and effect of EGF on in vitro culture of caprine preantral follicles. **Cell and Tissue Research**, v. 344, p. 539–550, 2011.

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.

CHEN, L.; ZHANG, H.; POWERS, R. W.; RUSSELL, P. T. & LARSEN, W. J. Covalent linkage between proteins of the inter-alpha-inhibitor family and hyaluronic acid is mediated by a factor produced by granulosa cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 19409–19414, 1996.

CHEN, L.; RUSSELL, P. T.; LARSEN, W. J. Functional significance of *cumulus* expansion in the mouse: roles for the preovulatory synthesis of hyaluronic acid within the *cumulus* mass. **Molecular Reproduction and Development**, v. 34, p. 87–93, 1993.

CHOI, J.; LEE, B.; LEE, E.; YOON, B. K.; CHOI, D. Effect of activin A and insulin-like growth factor-I on in vitro development of preantral follicles isolated from cryopreserved ovarian tissues in the mouse. **Cryobiology**, v. 57, n. 3, p. 209–15, 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.; SMITZ, J. E. J. In vitro follicle growth: Achievements in mammalian species. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 36, p. 3–9, 2001.

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

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

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

DANIEL, S. A. J., ARMSTRONG, D. T. & GORE-LANGTON, R. E. et al.. Growth and development of rat oocytes in vitro. **Gamete Research**, v. 24, p. 109–121, 1989.

DE BEM, A. R.; AMORIM, C. A.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R. Efeito do intervalo de corte do tecido ovariano no tissue chopper sobre o número de folículos pré-antrais isolados a partir de ovários de vacas nelore. **ANAIS DA XII REUNIÃO ANUAL DA SBTE**, Foz do Iguaçu-PR, v. 25, p. 178–178, 1997.

- DE CLERCK, L. S.; BRIDTS, C. H.; MERTENS, A. M.; MOENS, M. M.; STEVENS, W. J. Use of fluorescent dyes in the determination of adherence of human leucocytes to endothelial cells and the effect of fluorochromes on cellular function. **Journal of Immunological Methods**, v. 172, p. 115-124, 1994.
- DEMEESTERE, I.; DELBAERE, A.; GERVY, C.; VAN DEN BERGH, M.; DEVREKE, F.; ENGLERT, Y. Effect of preantral follicle isolation technique on *in vitro* follicular growth, oocyte maturation and embryo development in mice. **Human Reproduction**, v. 17, p. 2152-2159, 2002.
- DOWNEY, K.M.; TAN, C.K.; SO, A.G. DNA polymerase delta: a second eucaryotic DNA replicase. **Bioessays**, v.12, p.231-236, 1990.
- DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications and for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v. 55, p. 1211-1239, 2001.
- DRUMMOND, A. E. The role of steroids in follicular growth. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 4, p. 1-11, 2006.
- DUARTE, A. B.; CHAVES, R. N.; ARAÚJO, V. R.; CELESTINO, J. J.; SILVA, G. M.; LOPES, C. A.; TAVARES, L. M.; CAMPELO, C. C.; FIGUEIREDO, J. R. Follicular interactions affect the *in vitro* development of isolated goat preantral follicles. **Zygote**, v. 28, p. 1-13, 2010.
- DURRANT, B.S. et al. Isolation and characterization of canine advanced preantral and early antral follicles. **Theriogenology**, v.49, p.917-932, 1998.
- EL-HEFNAWY, T.; ZELEZNIK, A. J. Antigen (PCNA) and Cyclin D2 expression in rat granulosa cells synergism between FSH and activin in the regulation of proliferating cell nuclear. **Endocrinology**, v. 142, n. 10, p. 4357-4362, 2001.
- EPPIG J. J.; SCHROEDER, A. C. Capacity of mouse oocytes from preantral follicles to undergo embryogenesis and development to live young after growth, maturation, and fertilization *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 268-276, 1989.
- EPPIG, J. J.; O'BRIEN, M. Development *in vitro* of mouse oocytes from primordial follicles. **Biology of Reproduction**, v. 54, p. 197-207, 1996.
- EPPIG, J.J.; TELFER, E.E. Isolation and culture of oocytes. **Methods in Enzymology**, v.225, p.77-84, 1993.
- ERICKSON, B.H. Development and radio-response of prenatal bovine ovary. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.11, n.1, p. 97-105, 1966.
- ERICKSON, B.H.; REYNOLDS, R.A.; MURPHREE, R.L. Ovarian characteristics and reproductive performance of the aged cow. **Biology of Reproduction**, v. 15, p. 555-560, 1976.
- ERICKSON, G. F.; SHIMASAKI, S. The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. **Fertility and Sterility**, v. 76, p. 943-949, 2001.

- ERICKSON, G.F.; SHIMASAKI, S. The spatiotemporal expression pattern of the bone morphogenetic protein family in rat ovary cell types during the estrous cycle. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 9, 2003
- ETHIER, J. F.; FINDLAY, J. K. Roles of activin and its signal transduction mechanisms in reproductive tissues. **Reproduction**, v. 121, p. 667–675, 2001.
- FIGUEIREDO, J. R.; HULSHOF, S. C.; THIRY, M.; VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M. M.; NUSGENS, B.; BECKERS, J. F. Extracellular matrix proteins and basement membrane: their identification in bovine ovaries and significance for the attachment or cultured preantral follicles. **Theriogenology**, v. 5, p. 845-858, 1995.
- FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, A. P. R.; AMORIM, C. A.; 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.
- FIGUEIREDO, J.R. *et al.* Development of a combined new mechanical and enzymatic method for the isolation of intact preantral follicles from fetal, calf and adult bovine ovaries. **Theriogenology**, v. 40, p.789-799, 1993.
- FINDLAY, J.K. An update on the roles of inhibin, activin and follistatin as local regulators of folliculogenesis. **Biology of Reproduction**, v. 48, n. 1, p. 15-23, 1993.
- FORTUNE, J. E. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 135-163, 2003.
- FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; EVANS, A. C. O.; TURZILLO, A. M. Differentiation of dominant vesus subordinate follicles in cattle. **Biology Reproduction**, v. 65, p. 648-654, 2001.
- FREMAN, B. The active migration of germ cells in the embryos of mice reproduction. **Reproduction**, v. 125, p. 635-632, 2003.
- GILCHRIST, R. B.; RITTER, L. J.; ARMSTRONG, D. T. Oocyte-somatic cel interactions during follicle development in mammals. **Animal Reproduction Science**, v. 82-83, p. 431-446, 2004.
- GONZALEZ MANCHON, C.; VALE, W. Activin-A, inhibin and transforming growth factor- $\beta$  modulate growth of two gonadal cell lines. **Endocrinology**, v. 125, p. 1666–1672, 1989.
- GORDON, I. Prenatal development of the bovine ovary. In: Gordon I. Laboratory production of cattle embryos. **CAB International, Raven Press**, Cambridge, UK, p.4349, 1994.
- GOUGEON, A. Human ovarian follicular development: From activation of resting follicles to preovulatory maturation. **Annales d'Endocrinologie**, v. 71, p. 132–143, 2010.
- GREENWALD, G.S.; MOOR, R.M. Isolation and preliminary characterization of pig primordial follicles. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.87, p.561-571, 1989.

- GREGORY, S.J.; LACZA, C.T.; DETZ, A.A.; XU, S.; PETRILLO, L.A.; KAISER, U.B. Synergy between activin A and gonadotropin-releasing hormone in transcriptional activation of the rat follicle-stimulating hormone-beta gene. **Molecular Endocrinology**, v. 19, n. 1, p. 237-54, 2004.
- GUDERMANN, T.; NÜRNBERG, B.; SCHULTZ, G. Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. I. G-protein-coupled receptors: structure and function. **Journal of Molecular Medicine**, v.73, p.51–63, 1995.
- 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.; CAMPBELL, B. K.; WEBB, R. Development of a long term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle- stimulating hormone, and morphological characteristics. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 608–616, 1990.
- 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.
- GUTIERREZ, C.G.; RALPH, J.H. & TELFER,E.E. et al. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. **Biology Reproduction**, v. 62, p.1322–1328, 2000.
- HAFEZ, E. S. E. **Reproduction in farm animals**. 7.ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1995. 573 p.
- HASEGAWA A, MOCHIDA N, OGASAWARA T, KOYAMA K. Pup birth from mouse oocytes in preantral follicles derived from vitrified and warmed ovaries followed by in vitro growth, in vitro maturation, and in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**, 86(suppl. 4):1182-1192, 2006.
- HELDIN, C. H.; MIYAZONO, K.; TEN DIJKE, P. T.G.F.- $\beta$  signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. **Nature**, v. 390, p. 465–471, 1997.
- HESS, K.A.; CHEN L & LARSEN, W.J. Inter-alpha-inhibitor binding to hyaluronan in the *cumulus* extracellular matrix is required for optimal ovulation and development of mouse oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 436–44, 1999.
- HIGUCHI,R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology**, v.11, p.1026-1030, 1993.
- HIRAO, Y.; NAGAI, T.; KUBO, M.; MIYANO, T.; MIYAKE, M.; KATO, S. In vitro growth and maturation of pig oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 100, p. 333-339, 1994.
- HIRASHIMA, Y.; KOBAYASHI, H.; GOTOH J & TERAQ, T. Inter-alpha-trypsin inhibitor is concentrated in the pericellular environment of mouse granulosa cells through hyaluronan-binding. **European Journal of Obstetrics, Gynecology and Reproductive Biology**, v. 73, p. 79–84, 1997.

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.

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

HSUEH, A. J. W.; BICSAK, T. A.; JIA, X. C.; DAHL, K. D.; FAUSER, B. C.; GALWAY, A. B.; CZEKALA, N.; PAVLOU, S. N.; PAPKOFF, H.; KEENE, J. Granulosa cells as hormone targets: the role of biologically active follicle stimulating hormone in reproduction. **Recent Progress in Hormone Research**, v.5, p.209-277, 1989.

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

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

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

HULSHOF, S.C.J. et al. Isolation and characterization of preantral follicles from fetal bovine ovaries. **The Veterinary Quarterly**, v.16, p.78-80, 1994.

HULSHOF, S.C.J.; BEVERS, M.M.; VAN DER DONK, H.A.; VAN DEN HURK, R. The isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **In: Proceedings of the 12th International Congress on Animal Reproduction, vol 1, The Hague**, p. 336–338, 1992.

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.

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

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

- 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.
- JUENGEL, J. L.; HUDSON, N. L.; HEATH, D. A.; SMITH, P.; READER, K. L.; LAWRENCE, S. B.; O'CONNELL, A. R.; LAITINEN, M. P. E.; CRANFIELD, M.; GROOME, N. P.; RITVOS, O.; MCNATTY, K. P. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. **Biology Reproduction**, v. 67, p. 1777-1789, 2002.
- JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 332 p.
- KIPP, J. L.; KILEN, S. M.; WOODRUFF, T. K.; MAYO, K. E. Activin regulates estrogen receptor gene expression in the mouse ovary. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 282, p. 36755-36765, 2007.
- KNIGHT, P. G.; GLISTER, C. TGF- $\beta$  superfamily members and ovarian follicle development. **Reproduction**, v. 132, p. 191-206, 2006.
- KOBAYASHI H; SUN, G.W.; HIRASHIMA, Y.; TERAOKA, T. Identification of link protein during follicle development and *cumulus* cell cultures in rats. **Endocrinology**, v. 140, p. 3835-3842, 1999.
- KRETZER, D. M.; ROBERTSON, D. M. The isolation and physiology of inhibin and related proteins. **Biology Reproduction**, v. 40, p. 33-47, 1989.
- KURVILA, A. Cloning and sequencing of FSH receptor gene from buffalo preantral follicles. **M.V.Sc. thesis submitted to division of physiology and climatology, Deemed University, IVRI, Izatnagar, 2007.**
- LEE, V.H. Expression of Rabbit Zona Pellucida Messenger Ribonucleic Acid During Early Follicular Development. **Biology of Reproduction**, v. 63, p. 401, 2000.
- LEWIS, K. A.; GRAY, P. C.; BLOUNT, A. L.; MACCONELL, L. A.; WIATER, E.; BILEZIKJIAN, L. M.; VALE, W. Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. **Nature**, v. 404, p. 411-414, 2000.
- LI, R.; PHILLIPS, D. M.; MATHER, J. P. Activin promotes ovarian follicles development *in vitro*. **Endocrinology**, v.136, p. 849-856, 1995.
- LIMA-VERDE ,I.B.; MATOS, M.H.; SARAIVA, M.V.; BRUNO, J.B.; TENÓRIO, S.B.; MARTINS, F.; 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.
- LIVAK, K. J., and SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $^{-2\Delta\Delta CT}$  method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.
- LOPES, C. A. P.; SANTOS, R. R.; CELESTINO, J. J. H.; MELO, M. A.; CHAVES, R. N.; CAMPELLO, C. C.; SILVA, J. R.; BÁO, S. N.; JEWGENOW, K.; FIGUEIREDO, J. R.

Short-term preservation of canine preantral follicles: Effects of temperature, medium and time. **Animal Reproduction Science**, v. 115, p. 201-214, 2009.

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

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

MAGALHÃES, D. M.; DUARTE, A. B.; ARAÚJO, V. R.; BRITO, I. R.; SOARES, T. G.; LIMA, I. M.; LOPES, C. A.; CAMPELLO, C. C.; RODRIGUES, A. P.; FIGUEIREDO, J. R. In vitro production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. **Theriogenology**, v. 75, p. 182-188, 2011.

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

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.

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

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

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

MARTINS, F. S.; CELESTINO, J. J.; 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.

MASSAGUE, J.; CHEN, Y. G. Controlling TGF- $\beta$  signaling. **Genes & Development**, v. 14, p. 627-644, 2000.

MATHER, J.P.; MOORE, A; LI, R.H. Activins, inhibins, and follistatins: further thoughts on a growing family of regulators. **Cell Biology**, Jul;215(3):209-22, 1997.



MATHEWS, L. S.; VALE, W. W. Characterization of type II activin receptors. Binding, processing, and phosphorylation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 19013–19018, 1993.

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

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

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, 2007.

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 Science**, v.3, n.4, p.415-422, Oct./Dec. 2006.

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

MCGEE, E.; SPEARS, N.; MINAMI, S.; HSU, S. Y.; CHUN, S. Y.; BILLIG, H.; HSUEH, A.J. Preantral ovarian follicles in serum-free culture: suppression of apoptosis after activation of the cyclic guanosine 3',5'-monophosphate pathway and stimulation of growth and differentiation by follicle-stimulating hormone. **Endocrinology**, v. 6, p. 2417–2424, 1997.

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

McLAUGHLIN, M.; BROMFIELD, J. J.; ALBERTINI, D. F.; TELFER, E. E. Activin promotes follicular integrity and oogenesis in cultured preantral bovine follicles. **Molecular Human Reproduction**, v. 16, n. 9, p. 644–653, 2010.

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

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

MIZUNUMA, H.; LIU, X.; ANDOH, K.; ABE, Y.; KOBAYASHI, J.; YAMADA, K.; YOKOTA, H.; IBUKI, Y.; HASEGAWA, Y. Activin from secondary follicles causes small preantral follicles to remain dormant at the resting stage. **Endocrinology**, v. 140, n. 1, p. 37–42, Jan. 1999.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. **Início do desenvolvimento humano**. Embriologia Clínica. Guanabara Koogan, 5<sup>a</sup> ed., 1994, p. 13-38.

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

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

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

NAKAMURA, M.; MINEGISHI, T.; HASEGAWA, Y.; NAKAMURA, K.; IGARASHI, S.; ITO, I.; SHINOZAKI, H.; MIYAMOTO, K.; ETO, Y.; IBUKI, Y. Effect of an activin A on follicle-stimulating hormone (FSH) receptor messenger ribonucleic acid levels and FSH receptor expressions in cultured rat granulosa cells. **Endocrinology**, v. 133, p. 538–544, 1993.

NEWTON, H.; WANG, Y.; GROOME, N.P.; ILLINGWORTH, P. Inhibin and secretion during murine preantral follicle culture and following HCG stimulation. **Human Reproduction**, 17(1): 38-43, 2002.

NUTTINCK, F.; COLLETE, L.; MASSIP, A. Histologic and autoradiographic study of the *in vitro* effects of FGF-2 and FSH on isolated bovine preantral follicles: preliminary investigations. **Theriogenology**, v.45, p.1235-45, 1996.

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 development competence. **Biology of Reproduction**, v. 8, p. 1682-1686, 2003.

OKTAY, K. *et al.* Isolation and characterization of primordial follicles from fresh and cryopreserved human ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, v.67, p.481-486, 1997.

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

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

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

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

PANGAS, S.A.; WOODRUFF, T.K. Activin signal transduction pathways. **Trends in endocrinology and Metabolism**, 11(8): 1043-2760, 2000.

PANGAS, S.A.; WOODRUFF, T.K. Activin signal transduction pathways. **Trends in endocrinology and Metabolism**, v. 11, n. 8, p. 1043-2760, 2000.

PENG, C.; MUKAI, S.T. Activins and their receptors in female reproduction. **Biochemistry and Cell Biology**, n. 78, v. 3, p. 261-279, 2000.

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

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

RABINOVICI, J.; SPENCER, S.J.; DOLDI, N.; GOLDSMITH, P.C.; SCHWALL, R.; JAFFE, RB. Activin-A as an intraovarian modulator: actions, localization, and regulation of the intact dimer in human ovarian cells. **Reproductive Endocrinology Center**, n. 89, v. 5, p. 1528-36, 1992.

RACHID, M. A.; VASCONCELOS, A. C.; NUNES, V. A. Apoptosis in the lymphoid depletion induced by T-2 toxin in broiler chicks. Histomorphometry of the bursa of Fabricius. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, p. 6, 2000.

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

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

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

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

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

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.

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

- SADEU, J. C.; CORTVRINDT, R.; RON-EL, R.; KASTERTEIN, E.; SMITZ, J. Morphological and ultrastructural evaluation of cultured froze-thawed human fetal ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, v.85, p.1130-1141, 2006.
- SALEHNIA, M.; MOGHADAM.E.A.; VELOJERDI, M.R. Ultrastructure of follicles after vitrification of mouse ovarian tissue. **Fertility and Sterility**, v. 78, n. 3, p. 644-645, 2002.
- SANTOS, R. R.; THARASANIT, T.; VAN HAEFTEN, T.; FIGUEIREDO, J. R.; SILVA, J. R. V.; VAN DEN HURK, R. Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. **Cell and Tissue Research**, v. 327, p. 167–176, 2007.
- SANTOS, R. R.; THARASANIT, T.; FIGUEIREDO, J. R.; VAN HAEFTEN, T.; VAN DEN HURK, R. Preservation of caprine preantral follicle viability after cryopreservation in sucrose and ethylene glycol. **Cell and Tissue Research**, v. 325, p. 523–531, 2006.
- SANTOS, S.S.D.; BIONDI, F.C.; CORDEIRO, M.S. Isolation, follicular density, and culture of preantral follicles of buffalo fetuses of different ages. **Animal Reproduction Science**, 95:1-15. 2006.
- 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, 2010.
- 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, 2010.
- 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.
- SAS. Institute Inc. Statistical Analysis System user's guide. Version 9.13 ed. Cary: SAS Institute, USA, 2002.
- SAUMANDE, J.; CAHILL, L. P.; RAVVAULT, J. P.; BLANC, M.; THIMONIER, J.; MARIANA, J. C. Hormonal and follicular relationships in ewes of high and low ovulation rates. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 62, p. 141-150, 1981.
- 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.

SCHOENFELDER, M.; EINSPANIER, R. Expression of hyaluronan synthases and corresponding hyaluronan receptors is differentially regulated during oocyte maturation in cattle. **Biology of Reproduction**, 69 269–277, 2003.

SCHOTANUS, K.; HAGE, W.J.; VANDERSTICHELE, H.; VAN DEN HURK, R. Effects of conditioned media from murine granulosa cell lines on the growth of isolated bovine preantral follicles. **Theriogenology**, v. 48, p. 471-483, 1997.

SCHOTANUS, K.; HAGE, W.J.; VANDERSTICHELE, H.; VAN DEN HURK, R. Effects of conditioned media from murine granulosa cell lines on the growth of isolated bovine preantral follicles. **Theriogenology**, v. 48, p. 471-483, 1997.

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

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

SHAW, J. M.; ORANRATNACHAI, A.; TROUNSON, A. O. Fundamental cryobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 53, p. 59–72, 2000.

SHIDAIFAT, F.; KHAMAS, W.; HAILAT, N. Activin-A differentially regulates steroidogenesis by sheep granulosa cells. **Research in Veterinary Science**, v. 71, n. 1, p. 23-25, 2001.

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

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

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

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

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

SILVA, J. R. V.; FERREIRA, M. A. L.; COSTA, S. H. F.; SANTOS, R. R.; CARVALHO, F. C. A.; RODRIGUES, A. P. R.; LUCCHI, C. M.; BÁO, S. N.; FIGUEIREDO, J. R.

Degeneration rate of preantral follicles in the ovaries of goats. **Small Ruminant Research**, v. 43, p. 203-209, 2002.

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

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

SIMONI, M.; GROMOLL, J.; NIESCHLAG, E. The Follicle-Stimulating Hormone Receptor: Biochemistry, Molecular Biology, Physiology, and Pathophysiology. **Endocrine Reviews**, v.18, p.739-773, 1997.

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

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

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

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

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

TAMILMANI, G.; RAO, B.S. & VAGDEVI, R. Nuclear maturation of ovine oocytes from sheep preantral follicles cultured *in vitro*. **Small Ruminant Research**, 60:295-305, 2005.

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

TELFER, E.E. et al. *In vitro* development of oocyte from porcine and bovine primary follicles. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.163, p.117-123, 2000.

THOMAS, F. H.; ARMSTRONG, D. G.; TELFER, E. E. Activin promotes oocyte development in ovine preantral follicles *in vitro*. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1 , p. 76, 2003.

THOMAS, F.H.; ARMSTRONG, D.G.; TELFER, E.E. Activin promotes oocyte development in ovine preantral follicles *in vitro*. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, n. 9, p. 1-76, 2003.

- 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 DEN HURK, R., BEVERS, M.M.; BECKERS, J.F. In vivo and in vitro development of follicles preantral. **Theriogenology**, v. 47, p. 73, 1997.
- VAN DEN HURK, R.; SPEK, E. R.; HAGE, W. J.; FAIR, T., RALPH, J. H.; SCHOTANUS, K. Ultrastructure and viability of isolated bovine preantral follicles. **Human Reproduction**, v. 4, p. 833-841, 1998.
- VAN DEN HURK, R.; SPEK, E. R.; HAGE, W. J.; FAIR, T., RALPH, J. H.; SCHOTANUS, K. Ultrastructure and viability of isolated bovine preantral follicles. **Human Reproduction**, v. 4, p. 833-841, 1998.
- VAN DEN HURK, R.; VAN DE PAVERT, S. A. Localisation of an activin/activin receptor system in the porcine ovary. **Molecular Reproduction and Development**, v. 60, p. 463–471, 2001.
- VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, p. 1717-1751, 2005.
- WANDJI, S. A.; PELLETIER, G.; SIRARD, M. A. Ontogeny and cellular localization of 125I-labeled basic fibroblast growth factor and 125I-labeled epidermal growth factor binding sites in ovaries from bovine fetuses and neonatal calves. **Biology of Reproduction**, v. 47, p. 807-813, 1992.
- WANDJI, S. A, SRŠEÒ V., VOSS A.K., EPPIG J.J., FORTUNE J.E. Initiation in vitro of growth of bovine primordial follicles. **Biology of Reproduction**, v. 55, p. 942-94, 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, C.; ROY, S.K. Expression of bone morphogenetic protein receptor (BMPR) during perinatal ovary development and primordial follicle formation in the hamster: possible regulation by FSH. **Endocrinology**, v. 150, p. 1886–1896, 2009.
- WASSARMAN, P. M.; ALBERTINI, D. F. Mammalian ovum. In Knobil E, Neill J (EDS): **The physiology of Reproduction**, cap. 3, p. 79-123. New York, Raven Press, 1994.
- WOODRUFF, T. K.; LYON, R. J.; HANSEN, S. E.; RICE, G. C.; MATHER, J. P. Inhibin and activin locally regulate rat ovarian folliculogenesis. **Endocrinology**, v. 127, p. 3196–3205, 1990.
- WRIGHT, C.S.; HOVATTA, O.; MARGARA, R.; TREW, G.; WINSTON, R.M.L.; FRANKS, S.; HARDY, K. Effects of follicle-stimulating hormone and serum substitution on the in-vitro growth of human ovarian follicles. **Human Reproduction**. v.14, p.1555–62, 1999.

WU, J.; EMERY, B. R.; CARRELL, D. T. In vitro growth, maturation, fertilization, and embryonic development of oocytes from porcine preantral follicles. **Biology of Reproduction**, v. 64, p. 375-381, 2001.

XIAO, S.; FINDLAY, J.K.; ROBERTSON, D.M. The effect of bovine activin and follicle-stimulating hormone (FSH) suppressing protein/follistatin on FSH-induced differentiation of rat granulosa cells in vitro. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 69, p. 1 – 8, 1990.

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

SHAV-TAL, Y.; LAPTER, S.; PARAMESWARAN, R.; ZIPORI, D. Activin Receptors. **Academic Press Cytokine Reference.**, doi: 10.1006/rwcy.2001.. 1906., chapter posted nov. 2001.

CHEN, Y.; WENDY, N.; JEFFERSON, R. R. ; PADILLA-BANKS N. E.; PEPLING, M. E. Estradiol, Progesterone, and Genistein Inhibit Oocyte Nest Breakdown and Primordial Follicle Assembly in the Neonatal Mouse Ovary *in Vitro* and *in Vivo*. **Endocrinology.**, v. 148, p. .3580–3590, 2007.

ZAMORANO, P.L.; MAHESH, V.B.; DE SEVILLA, L.M.; CHORICH, L.P.; BHAT, G.K.; BRANN, D.W. Expression and localization of the leptin receptor in endocrine and neuroendocrine tissues of the rat. **Neuroendocrinology**, v.65, p.223-228, 1997.

ZHAO, J.; TAVERNE, M. A.; VAN DER WEIJDEN, G. C.; BEVERS, M. M.; VAN DEN HURK, R. Effect of activin A on *in vitro* development of rat preantral follicles and localization of activin A and activin receptor II. **Biology of Reproduction**, v. 65, p. 967–977, 2001.